

Technische Universität München

Lehrstuhl für Botanik

Identifizierung und Charakterisierung des Abscisinsäure-
Responsregulators GCA2 in *Arabidopsis thaliana*

Arthur Stephan Korte

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer
3. apl. Prof. Dr. R.A. Torres Ruiz

Die Dissertation wurde am 29.06.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.08.2009 angenommen.

für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III	
Abbildungsverzeichnis.....	VI	
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII	
Zusammenfassung	1	
Summary	2	
1	Einleitung	3
1.1	Abscisinsäure	3
1.1.1	ABA-Biosynthese.....	4
1.1.2	Signaltransduktion	5
1.1.3	Regulation der Schließzellen	10
1.2	Calcium	14
1.2.1	CPKs	15
1.3	GCA2.....	18
1.4	Transiente Genexpression.....	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Molekularbiologische Methoden: DNA und RNA.....	22
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung	22
2.1.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme	22
2.1.3	Herstellung kompetenter Zellen	23
2.1.4	Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA	24
2.1.5	Methoden für die DNA-Isolation	25
2.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.1.7	Kolonie-PCR.....	28
2.1.8	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.1.9	Verwendete Größenstandards	29
2.1.10	Aufreinigung von DNA	29
2.1.11	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen	29
2.1.12	Auffüllen von Einzelstrang-DNA Überhängen (Klenow)	30
2.1.13	Dephosphorylierung geschnittener DNA	30
2.1.14	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.1.15	<i>Site directed mutagenesis</i>	30
2.1.16	Verwendete Oligonukleotide	31
2.1.17	Vektoren und Plasmide.....	31
2.1.18	RNA-Isolation aus <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.....	35
2.1.19	Konzentrationsbestimmung RNA-haltiger Lösungen.....	35
2.1.20	Reverse Transkription von RNA und RT-PCR	36
2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	36
2.2.1	Proteinextraktion aus Pflanzen	36
2.2.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	37
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.4	Verwendete Größenstandards	38

2.2.5	Coomassie-Färbung	38
2.2.6	Western Blot	38
2.2.7	Immunologischer Nachweis	38
2.2.8	Antikörper	39
2.3	Physiologische Methoden	39
2.3.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	39
2.3.2	Sterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen.....	40
2.3.3	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	41
2.3.4	Keimungsversuche	42
2.3.5	Wurzelwachstumsversuche	42
2.3.6	Isolierung von <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten.....	42
2.3.7	Transfektion von Protoplasten	43
2.3.8	Messung der β -D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten	44
2.3.9	Nachweis der <i>Photinus pyralis</i> Luciferase-Aktivität	45
2.3.10	Untersuchung im Epifluoreszenz-Mikroskop	46
2.3.11	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	46
2.3.12	Bi-molekulare Fluoreszenz Komplementation	46
2.4	Geräte und Chemikalien	47
2.4.1	Geräte	47
2.4.2	Chemikalien / Reagenzien	48
2.4.3	Enzyme	48
2.5	<i>In silico</i> Analyse	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Positionelle Klonierung des <i>GCA2</i> Locus.....	50
3.1.1	Physikalische und genetische Karte des <i>GCA2</i> Locus	50
3.1.2	Komplementationanalyse mit Cosmiden	51
3.1.3	Identifizierung der Mutation.....	57
3.2	Transformation der <i>gca2</i> Mutante mit <i>CPK23</i>	60
3.2.1	ABA-Sensitivität komplementierter Pflanzen	62
3.2.2	Analysen im transienten System.....	64
3.2.3	ABA-Sensitivität in Abhängigkeit des <i>GCA2</i> -Genprodukts	67
3.2.4	Analyse des <i>CPK23</i> -Transkripts	72
3.2.5	Analyse von <i>CPK23</i> -GFP-Fusionsproteinen	81
3.2.6	Phänotyp von <i>GCA2</i> -GFP exprimierenden Pflanzen.....	88
3.2.7	Transiente Expression von <i>GCA2</i> in Protoplasten	89
3.3	<i>Ler</i> x <i>Col</i> Kreuzungen	90
3.3.1	Analyse einer T-DNA Insertions-Linie aus <i>Columbia</i>	92
3.3.2	Abhängigkeit der ABA-Sensitivität vom <i>GCA2</i> -Locus.....	93
3.4	Regulation der Stomata während der Nacht	97
3.4.1	Photooxidative Schädigung des Photosystems II.....	99
3.5	Funktion des <i>GCA2</i> Proteins	100
3.5.1	Interaktion zwischen <i>GCA2</i> und <i>RCAR</i> -Proteinen.....	100
3.6	<i>RCAR</i>	102
3.6.1	Bindung von ABA an <i>RCAR</i> -Proteine	102
3.6.2	Einfluss von <i>RCAR1</i> auf den ABA-Signalweg	105
3.6.3	Effekt von <i>GCA2</i> auf <i>RCAR1</i>	108
4	Diskussion	115
4.1	<i>GCA2</i> : Ein Regulator der ABA-Signaltransduktion.....	115
4.2	Externe Signale und Calcium-Oszillationen	131
4.3	Natürliche Variation im <i>GCA2</i> Gen	140
	Literaturverzeichnis.....	144

Appendix	i
Lebenslauf.....	xi
Danksagung	xii

Abbildungsverzeichnis

Abb.1-1 Struktur der Abscisinsäure.....	3
Abb.1-2 ABA-Katabolismus über 8'-Hydroxylierung	5
Abb.1-3 ABA-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	8
Abb.1-4 RNA-Metabolismus und ABA-Signaltransduktion	9
Abb.1-5 Modell der Regulation der am Stomataschluss beteiligten Ionenkanäle.....	13
Abb.1-6 Struktur, Genfamilie und Regulation von CPKs	16
Abb.1-7 Induzierung des Stomataschluss durch ABA und CO ₂	19
Abb.3-1 Kartierungsintervall der <i>gca2</i> Mutante	50
Abb.3-2 Schema des pBIC 20 Vektors.....	51
Abb.3-3 Komplementationsschema	53
Abb.3-4 Wurzelwachstum von <i>Ler</i> und <i>gca2</i> auf verschiedenen ABA-Konzentrationen ...	54
Abb.3-5 Komplementation von <i>gca2</i>	55
Abb.3-6 Struktur des Cosmids 5IC15.....	57
Abb.3-7 <i>HindIII</i> -Verdau des Cosmid 5IC15	58
Abb.3-8 Das Gen At4g04740 und die <i>gca2</i> -Mutation	58
Abb.3-9 DeCAP Marker für den <i>GCA2</i> -Locus	59
Abb.3-10 Komplementation von <i>gca2</i> mit <i>CPK23</i>	61
Abb.3-11 schematische Darstellung der Genom- und T-DNA-spezifischen PCR	62
Abb.3-12 Analyse komplementierter <i>gca2</i> -Pflanzen.....	63
Abb.3-13 Protoplasten-Experiment mit <i>gca2</i> und <i>Ler</i>	64
Abb.3-14 Komplementationsversuch von <i>gca2</i> im transienten Protoplastenversuch	65
Abb.3-15 Komplementation von <i>gca2</i> mit p35S:: <i>GCA2</i>	66
Abb.3-16 Verifizierung der <i>gca2-2</i> Mutante.....	67
Abb.3-17 Keimungsversuch mit WT, <i>gca2-1</i> und <i>gca2-2</i> Samen	68
Abb.3-18 Protoplastenversuch mit der <i>gca2-2</i> Mutante.....	69
Abb.3-19 Regulation der Schließzellen in vier Wochen alten <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	70
Abb.3-20 Wurzelwachstumstest mit WT, <i>gca2-1</i> und <i>gca2-2</i>	71
Abb.3-21 Vergleich verschiedener Keimungsversuche	72
Abb.3-22 RT-PCR.....	73
Abb.3-23 Detaillierte Analyse der <i>CPK23</i> -mRNA Expression.....	74
Abb.3-24 Das <i>CPK23</i> -Transkript unterliegt einem alternativen Spleißvorgang.....	75
Abb.3-25 <i>RACE</i> -PCR.....	76
Abb.3-26 Vorhergesagte Sekundärstruktur der 5' UTR des <i>GCA2</i> -Gens.....	78
Abb.3-27 Protoplastenexperiment mit p <i>GCA2</i> :: <i>LUC</i> -Konstrukten	79
Abb.3-28 Struktur der p <i>GCA2</i> :: <i>LUC</i> und p35S::UTR:: <i>LUC</i> Konstrukte	80
Abb.3-29 Protoplastenversuch mit p35S::UTR:: <i>LUC</i> Konstrukten.....	81
Abb.3-30 <i>GCA2</i> -Peptidantikörper	82
Abb.3-31 Westernblot mit α -GFP Antikörper	83
Abb.3-32 Lokalisation von <i>GCA2</i> -GFP Fusionsproteinen in <i>Arabidopsis</i> Keimlingen	85
Abb.3-33 FRAP-Experiment.....	86
Abb.3-34 Lokalisation in Protoplasten.....	87
Abb.3-35 Lokalisation von <i>GCA2</i> -GFP Fusionsproteinen in Protoplasten	87
Abb.3-36 Keimungsversuch mit <i>GCA2</i> -GFP exprimierenden Pflanzen	88
Abb.3-37 Co-Expression von <i>GCA2</i> -VK in Protoplasten	90
Abb.3-38 Vergleich der ABA-Sensitivität von <i>Landsberg erecta</i> und <i>Columbia</i>	91
Abb.3-39 Vergleich des <i>GCA2</i> Proteins mit dem <i>CPK23</i> Protein aus <i>Columbia</i>	91
Abb.3-40 Isolation einer <i>CPK23</i> K.o. Linie aus <i>Columbia</i>	92
Abb.3-41 Gelbilder der CAPS-PCR für den <i>ERECTA</i> - und <i>GCA2</i> -Locus	93
Abb.3-42 Wurzelwachstumstest mit <i>Landsberg x Columbia</i> Kreuzungen.....	95
Abb.3-43 Diurnale Regulation der Stomata.....	98
Abb.3-44 Photooxidativer Schutz des Photosystems II	99
Abb.3-45 Interaktion von <i>GCA2</i> mit <i>RCAR1</i>	101

Abb.3-46 Phylogenetischer Baum der RCAR Genfamilie	102
Abb.3-47 ITC Daten der Bindung von ABA an RCAR1	103
Abb.3-48 ITC-Experiment: Bindung von ABA an einen RCAR8/PP2C-Komplex	104
Abb.3-49 ITC- Experiment mit RCAR1-ABI2 Komplex	105
Abb.3-50 Effekt der RCAR1-Expression in Protoplasten.....	106
Abb.3-51 RCAR1-vermittelte Hyperstimulierung des ABA-Signalwegs in WT und ABA- defizienten Protoplasten.....	107
Abb.3-52 RNAi-Protoplasten.....	108
Abb.3-53 Effekt von RCAR1 in <i>gca2-1</i> Protoplasten	109
Abb.3-54 Co-Expression von RCAR1 und GCA2 in Protoplasten	110
Abb.3-55 Phosphorylierungstellen im RCAR1 Protein.....	112
Abb.3-56 Protoplastenversuch mit mutierten RCAR1 Proteinen	113
Abb.4-1 Regulationsmechanismen durch uORFs	120
Abb.4-2 Modell für den Mechanismus von GCA2 als Modulator der RCAR Funktion.....	129
Abb.4-3 Mathematisches Modell zur Entstehung von Calcium-Oszillationen	132
Abb.4-4 Modell zur Regulation der Calcium-Oszillationen durch GCA2	135
Abb.4-5 Polymorphismen des <i>CPK 23</i> Gens	142

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. thaliana</i> (At)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscisinsäure
ABI/abi	Abscisinsäure-insensitiv
Abb.	Abbildung
ABRC	ABA-Respons-Komplex
ABRE	ABA-Respons-Element
Amp	Ampicillin
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
ca.	circa
CBL	<i>calcineurinB-like protein</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	kodierende Sequenz (<i>coding sequenz</i>)
CE	<i>coupling element</i>
CIPK	<i>CBL interacting protein kinase</i>
CPK	<i>calcium-dependent protein kinase</i>
cM	<i>centi Morgan</i>
<i>Col</i>	<i>Columbia</i>
d	Tag
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung 1 g = 9.81 m/s ²

gca	<i>growth control exerted by ABA</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
IAA	Indol-3-Essigsäure
IP ₃	Inosit-1,4,5-trisphosphat
IP ₆	Inositol-Hexakisphosphat
ITC	isothermale Titrations-Kalorimetrie
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani-Bakteriennährlösung
Ler	<i>Landsberg erecta</i>
LUC	Luciferase
M	mol/l
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MeOH	Methanol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MS	Murashige und Skoog-Medium
MUG	4-Methylumbelliferon-β-D-glucuronid
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
Ori	<i>origin of replication</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPase	Phosphatase
<i>ppm</i>	<i>parts per million</i>
PP2C	Protein Phosphatase der Klasse 2C
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
Rif	Rifampicin
RLU	relative Lumineszenzeinheiten

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Ter	Terminator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	nicht-translatierte Region
UV	ultraviolett
vs.	<i>versus</i>
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Zusammenfassung

Die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen ist eine der größten Herausforderungen im pflanzlichen Lebenszyklus. Komplexe Signalnetzwerke in der Pflanze sind die molekulare Basis dieser Anpassungsreaktion. Das Phytohormon Abscisinsäure stellt dabei den endogenen Botenstoff dar, der die Adaptation an verschiedene Umweltbedingungen herbeiführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch positionelle Klonierung der *GCA2*-Locus identifiziert werden. Der *GCA2*-Locus reguliert alle Facetten der ABA-Signaltransduktion und die Abscisinsäure-insensitive Mutante *gca2-1* weist Störungen in allen Abscisinsäure-abhängigen Prozessen auf. Dies stellt das *GCA2* Gen an den Beginn der Abscisinsäure-Signaltransduktion. Das *GCA2* Gen codiert für eine Calcium-abhängige Proteinkinase und besitzt als negativer Regulator des Abscisinsäure-Signalwegs eine Schlüsselfunktion in der Anpassung der Pflanze an externe Stimuli. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Punktmutation in der 5`UTR des *GCA2* Gens die Expression des Proteins in der *gca2-1* Mutante verstärkt ist. Die Überexpression des *GCA2* Proteins bewirkt das Abscisinsäure-insensitive Verhalten der Mutante. *GCA2* interagiert mit Mitgliedern einer Familie von Abscisinsäure-Hormonrezeptoren und stellt so vermutlich einen Integrator der pflanzlichen Stressantwort dar. Die spezifische Bindung des Phytohormons Abscisinsäure an diese neue Klasse von Rezeptoren konnte mithilfe der isothermalen Kalorimetrie gezeigt werden. Die Regulation des Abscisinsäure-Rezeptors steht im Einklang mit den Position von *GCA2* am Anfang der Abscisinsäure-Signaltransduktion.

Das *GCA2*-Gen ist hoch polymorph zwischen verschiedenen *Arabidopsis* Ökotypen und eng mit der Ausprägung einer unterschiedlichen ABA-Sensitivität in den Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia* gekoppelt. Zusammenfassend handelt es sich bei *GCA2* um einen neu identifizierten negativen Regulator des ABA-Signalwegs, der vermutlich externe biotische und abiotische Stimuli integriert und direkt die ABA-Sensitivität der Pflanze modifiziert.

Summary

Adaptation to a changing environment is one of the major challenges of plant life. The molecular basis for this adaptation consists of a complex signalling network, with the phytohormone abscisic acid being a major endogenous mediator of plant responses. In this work, the *GCA2* locus could be identified by positional cloning. The *gca2-1* mutant is abscisic acid insensitive with respect to the regulation of stomatal aperture, seed germination and root growth. *GCA2* encodes a calcium dependent protein kinase. Due to a base pair exchange in the 5'UTR of the gene, the *gca2-1* mutant displays an increased expression level of the *GCA2* protein, which presumably causes the abscisic acid insensitive phenotype of the mutant. *GCA2* interacts with different members of an abscisic acid receptor family. The specific binding of the phytohormone to this novel class of receptors could be demonstrated using isothermal titration calorimetry.

The *GCA2* gene is highly polymorphic in different *Arabidopsis* accessions. Segregation analysis showed that the difference in abscisic acid sensitivity of two ecotypes is linked to the *GCA2* locus.

In summary, *GCA2* affects all facets of abscisic acid signalling and physically interacts with a novel class of abscisic acid hormone receptors. It follows that *GCA2* must play a very central role in the abscisic acid signal transduction pathway. I conclude that *GCA2* is a negative regulator of abscisic acid signalling that presumably integrates biotic and abiotic stimuli into plant responses by modulating the abscisic acid sensitivity of the plant.

1 Einleitung

1.1 Abscisinsäure

Pflanzen als sessile Organismen müssen flexibel auf exogene Reize reagieren können und eine hohe Plastizität in ihrer Entwicklung aufweisen. Die Koordination des pflanzlichen Wachstums und die Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen wird im wesentlichen durch endogene organische Verbindungen, den Phytohormonen, gesteuert. Phytohormone als pflanzeneigene organische Verbindungen wirken in niedrigen Konzentrationen und integrieren extrazelluläre Signale in die endogenen Entwicklungsprozesse, indem sie direkt oder indirekt auf die Genexpression der Pflanze Einfluss nehmen. Zahlreiche Prozesse der pflanzlichen Entwicklung sowie der Adaptation an Wasser-, Salz- oder Kältestress werden durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) reguliert (Zhu 2002; Chinnusamy *et al.* 2004; Christmann *et al.* 2006; Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 2007). ABA ist ein monozyklisches Sesquiterpen (systematischer Name: 3-Methyl-5-(1'-hydroxy-4'-oxo-2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexen-1'-yl)-cis-2,4-pentadiensäure, siehe Abb.1.1A), welches ursprünglich als Dormin oder Abscisin II bezeichnet wurde (Ohkuma *et al.* 1963). Erst nach der Entdeckung, dass auch andere physiologische Prozesse durch Abscisinsäure gesteuert werden, wurde der Name in Abscisinsäure (*abscisic acid*) geändert (Addicott *et al.* 1968).

Interessanter Weise beschränkt sich die Wirkung und das Vorkommen der Abscisinsäure nicht nur auf das Pflanzenreich: ABA wird auch in menschlichen Granulocyten gebildet und hat dort die Funktion eines Cytokins (Bruzzone *et al.* 2007).

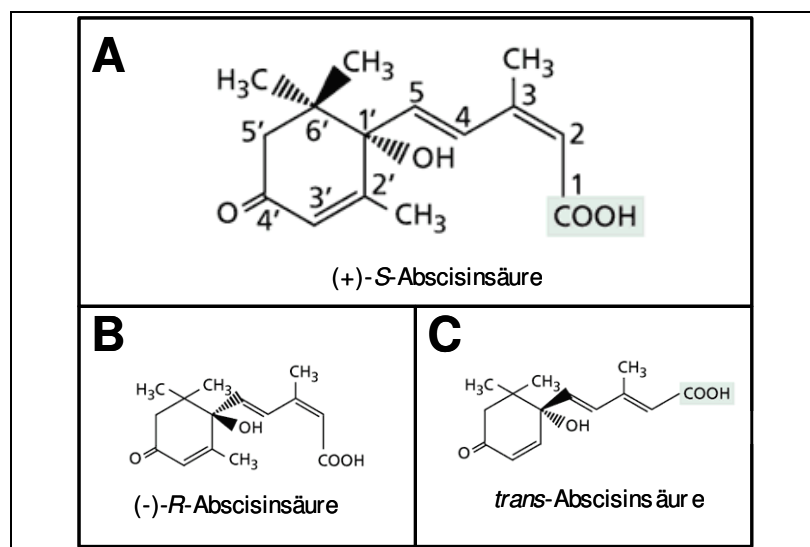


Abb.1-1 Struktur der Abscisinsäure

A: (+)-S-Abscisinsäure. B: (-)-R-Abscisinsäure. C: trans-Abscisinsäure

1.1.1 ABA-Biosynthese

Die ABA-Biosynthese findet hauptsächlich in Schließzellen, Zellen der Wurzeln und des Leitgewebes statt (Christmann *et al.* 2005; Nambara und Marion-Poll 2005; Christmann *et al.* 2006). Während in Pilzen wie zum Beispiel *Cercospora sp.* oder *Botrytis cinerea* die Bildung von Abscisinsäure über den Mevalonat-Biosynthese-Weg (*MVA-pathway*) erfolgt (Hirai *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2000), findet die ABA-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana* über die Bildung von Xanthoxin aus Carotenoiden statt. Diese werden über den plastidären 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Biosyntheseweg (*MEP-pathway*) gebildet: Die pflanzliche ABA-Biosynthese ist somit unabhängig vom cytosolischen Mevalonat-Syntheseweg (Lichtenthaler *et al.* 1997; Rodriguez-Concepcion und Boronat 2002; Eisenreich *et al.* 2004). Die C₁₅-Verbindung Xanthoxin entsteht durch die oxidative Spaltung der C₄₀-Epoxy-carotenoide 9'-*cis*-Violaxanthin und 9'-*cis*-Neoxanthin durch die plastidär lokalisierte 9'-*cis*-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase (NCED) (Schwartz *et al.* 2001). Xanthoxin wird anschließend ins Cytosol transportiert und dort durch die kurzkettige Alkoholhydrogenase ABA2 in Abscisin-Aldehyd umgewandelt (Cheng *et al.* 2002b; Gonzalez-Guzman *et al.* 2002). Dieses wird durch die Molybdän-abhängige Abscisin-Aldehyd-Oxidase 3 (AAO3) zur Abscisinsäure oxidiert (Seo *et al.* 2000).

Die natürlich in der Pflanze vorkommende Form ist das *S*-ABA (Abb.1-1A), trotzdem besitzt auch das synthetisch hergestellte Enantiomer *R*-ABA (Abb.1-1B) *in planta* eine (eingeschränkte) physiologische Aktivität (Nambara *et al.* 2002). Des Weiteren kann ABA sowohl als *cis*-, wie auch als *trans*-Isomer (Abb.1-1C) bezogen auf die Carboxylgruppe am C-2 Atom vorliegen.

ABA wird als ‚Stresshormon‘ bezeichnet und sorgt für die Anpassung der Pflanze an Trockenheit, osmotischen und Salzstress. Die Bedeutung dieses Hormons für die Stressadaptation wird dadurch gestützt, dass die Expression der ABA-Biosynthesegene ebenfalls durch Stressfaktoren gefördert wird (Iuchi *et al.* 2001).

Der ABA-Katabolismus erfolgt durch Oxidation zur Phasein- oder Dihydrophaseinsäure sowie über Bildung von ABA-Glucose-Konjugaten (Cutler und Krochko 1999; Xu *et al.* 2002). Der oxidative ABA-Abbau erfolgt über eine Hydroxylierung des C'7, C'8 oder C'9 Atoms, wobei die entstehenden (Zwischen-) Produkte teilweise noch biologische Aktivität aufweisen (Jadhav *et al.* 2008). Die Bildung des 8'-Hydroxy ABAs, welches das Hauptabbauprodukt dieses Katabolismus darstellt, wird durch die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP707A katalysiert (Abb.1-2). Mutanten dieses Gens zeigen eine veränderte Regulation von Dormanz und Keimung (Okamoto *et al.* 2006). Dies zeigt die enge Vernetzung zwischen ABA-Katabolismus und ABA-Signaltransduktion an. Die Expression dieses Enzyms wird zusätzlich durch hohe Luftfeuchtigkeit, Gibberelline und Brassinolide verstärkt (Krochko *et al.* 1998; Saito *et al.* 2004; Okamoto *et al.* 2009).

Dieses Beispiel lässt das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Hormone innerhalb der Pflanze erahnen.

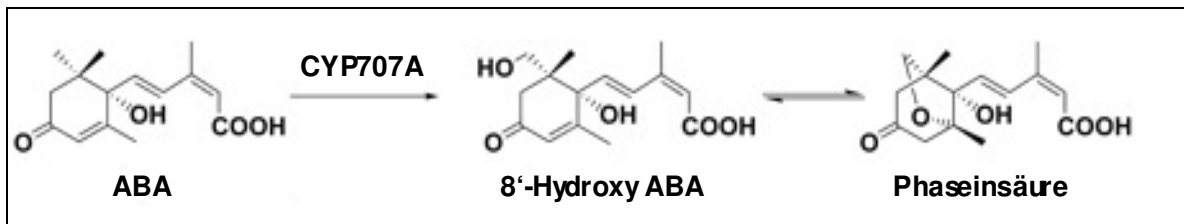


Abb.1-2 ABA-Katabolismus über 8'-Hydroxylierung

Oxidativer Abbau von ABA über Hydroxylierung des C'8 Atoms und anschließender Oxidation zur Phaseinsäure.

1.1.2 Signaltransduktion

ABA fördert in frühen Stadien der Embryogenese das embryonale Wachstum und die Bildung von Speicherproteinen und -lipiden, wohingegen in der späten Embryogenese die Keimung durch ABA gehemmt und die Dormanz der Samen gefördert wird (Finkelstein *et al.* 2002). Bei Wassermangel hemmt ABA die Akkumulation von Ethylen, die Pflanze kann so das Wurzel- und Sprosswachstum aufrechterhalten (Spollen *et al.* 2000; Sharp und LeNoble 2002). Bei Trockenstress steigt die Konzentration an Abscisinsäure in den Blättern an (Christmann *et al.* 2007) und bewirkt ein Schließen der Spaltöffnungen und reduziert somit den Wasserverlust der Pflanze (Schroeder *et al.* 2001b).

Um diese vielen biologischen Funktionen in der Pflanze erfüllen zu können, muss nach Synthese des Phytohormons dieses in den jeweiligen Zellen erkannt und die spezifische Signaltransduktion aktiviert werden. Die Signaltransduktionskaskaden können, je nach Entwicklungsstadium der Pflanze oder in verschiedenen Zelltypen, zum Teil deutlich voneinander variieren (Finkelstein 2006). Zunächst muss das Hormon durch einen Rezeptor ‚erkannt‘ werden. Dabei werden sowohl membranständige (Anderson *et al.* 1994; Jeannette *et al.* 1999) als auch cytoplasmatische (Levchenko *et al.* 2005) Perzeptionsorte diskutiert. Bis *dato* sind vier verschiedene Moleküle als ABA-Rezeptoren beschrieben: Die H-Untereinheit der Magnesium-Chelatase (ABAR/CHLH) (Shen *et al.* 2006), ein putativer *G protein-coupled receptor* GCR2 (Liu *et al.* 2007) und die zwei ebenfalls membrangebundenen Proteine GTG1 und GTG2 (Pandey *et al.* 2009). Für das auch als ABA-Rezeptor diskutierte Protein FCA konnte hingegen gezeigt werden, dass keine Bindung des Liganden an das Protein erfolgt (Risk *et al.* 2008). Die gleiche Arbeitsgruppe zweifelt ebenfalls an der Bindung von ABA an GCR2 (Risk *et al.* 2009). Dieser Zweifel wird noch verstärkt durch physiologische Untersuchungen und *in silico* Analysen dieses Proteins, die sowohl die vorausgesagte Struktur eines G-Proteingekoppelten Rezeptors, als auch dessen physiologische Rolle im ABA-Signalweg hinterfragen (Gao *et al.* 2007; Guo *et al.* 2008; Illingworth *et al.* 2008). Auch das plastidär

lokalisierte Protein ABAR/CHLH, welches an der Synthese des Magnesium Protoporphors und der retrograden Plastid-Kern-Kommunikation beteiligt ist, ist nicht unumstritten (McCourt und Creelman 2008; Muller und Hansson 2009). Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass keiner der beschriebenen Rezeptoren ein zufriedenstellendes bzw. komplettes Bild der Perzeption des ABA-Signals bietet.

An der Weiterleitung und Modulation des ABA-Signals sind etliche nachgeschaltete Moleküle und Botenstoffe beteiligt. Wichtige Funktionen kommen dabei besonders den sogenannten *second messengers* wie Ca^{2+} , cADPR, IP_3 , IP_6 , NO und Diacylglycerolphosphat zu. Aber auch der Redox-Status oder der pH-Wert haben einen Einfluss auf die Signaltransduktion (Brault *et al.* 2004; Bright *et al.* 2006).

ABA-abhängige Prozesse lassen sich generell in kurzfristige, schnelle Antworten und langfristige Anpassungsreaktionen unterteilen (eine schnelle Antwort, wie sie zum Beispiel der ABA-abhängige Schließvorgang der Spaltöffnungen darstellt, wird ausführlich unter 1.1.3 beschrieben). Bei den langfristigen Effekten des Phytohormons läuft die Anpassung über eine differenzielle Veränderung der Genexpression ab. Dabei konnte gezeigt werden, dass nahezu 10 % des gesamten Genoms von *Arabidopsis thaliana* einer ABA-abhängigen differenziellen Genregulation unterliegt (Hoth *et al.* 2002; Nemhauser *et al.* 2006). Schlüsselkomponenten der ABA-Signaltransduktion stellen dabei Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2C) dar. Im *Arabidopsis* Genom gibt es 76 Gene, die für PP2C Phosphatasen codieren (Schweighofer *et al.* 2004). Von diesen wurde für die Phosphatasen PP2CA, HAB1, HAB2 und AHG1 gezeigt, dass sie als negative Regulatoren des *ABA-Signalwegs* wirken (Leonhardt *et al.* 2004; Saez *et al.* 2004; Schweighofer *et al.* 2004; Kuhn *et al.* 2006; Nishimura *et al.* 2007). Für die beiden, ebenfalls zur gleichen Subfamilie der PP2Cs gehörenden Phosphatasen ABI1 und ABI2 wurden zwei dominant negative Allele *abi1-1* und *abi2-1* identifiziert (Koornneef *et al.* 1984). Diese Mutanten zeigen globale, ABA-insensitive Phänotypen: In diesen Mutanten sind die klassischen ABA-Antworten wie das Aufrechterhalten der Dormanz, die Regulation der Schließzellen und die Inhibierung des Wachstums beeinträchtigt (Meyer *et al.* 1994; Leung *et al.* 1997; Allen *et al.* 1999). Diese pleiotropen Effekte lassen vermuten, dass die beiden Proteine ABI1 und ABI2 am Anfang der ABA-Signaltransduktionskaskade stehen und eine zentrale Rolle in dieser einnehmen.

Die Mutationen in den dominant-negativen *abi1-1* und *abi2-1* Mutanten beruhen auf einem Aminosäureaustausch eines Glycins zu einem Aspartat an äquivalenter Position innerhalb der jeweiligen katalytischen PP2C-Domäne (*abi1-1* : $\text{G}^{180} \rightarrow \text{D}$; bzw. *abi2-1* : $\text{G}^{168} \rightarrow \text{D}$). Diese Mutation führt zu einer verminderten Sensitivität der *abi1-1* und *abi2-1*

Mutanten gegenüber ABA (Leube *et al.* 1998; Rodriguez *et al.* 1998). Zusätzlich konnte für *abi1* gezeigt werden, dass diese hypermorphe Mutation mit einer präferenziellen Kernlokalisierung des mutierten Proteins einhergeht (Moes *et al.* 2008). In einem Suppressor-Screen auf *abi1-1* wurden rezessive, intragene Revertanten gefunden, die eine erhöhte ABA-Sensitivität aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Hypersensitivität mit dem Verlust der Phosphatase-Aktivität korreliert, und somit ABI1 als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion anzusehen ist (Gosti *et al.* 1999). So zeigen Doppelmutanten eines rezessiven *loss-of-function* Allels *abi1-2* mit dem ebenfalls rezessiven *hab1-1* eine erhöhte Sensitivität gegenüber ABA (Saez *et al.* 2006). Im Widerspruch dazu stehen Mikroinjektionsstudien in Hypokotylzellen aus Tomate, bei denen der negative Effekt von *abi1* durch einen Überschuss an co-injiziertem ABI1 aufgehoben wurde (Wu *et al.* 2003). Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass ABI1 außer einer hemmenden Wirkung auch eine positive Rolle im ABA-Signalweg übernehmen kann. ABI1 interagiert wiederum mit einer Reihe weiterer Proteine und beeinflusst so deren Aktivität. Unter diesen Proteinen sind unter anderem der Transkriptionsfaktor HB6 (Himmelbach *et al.* 2002) und die zur Klasse der SNF1-related-Kinasen 2 (SnRK2) zählende Kinase OST1 (Yoshida *et al.* 2006; Fujii *et al.* 2007) zu nennen. Da die Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 als negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion gelten (siehe oben) und die ABA-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit einer Phosphorylierung dieser einhergeht (Uno *et al.* 2000; Furihata *et al.* 2006; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006), ist zu postulieren, dass Proteinkinasen als positive Regulatoren dieses Signalwegs existieren. So zeigen *loss-of-function* Mutanten in OST1 (welches auch als Snrk2.6 bezeichnet wird) ein ABA-insensitives Verhalten der Stomataregulation (Mustilli *et al.* 2002). Die *snrk2.2/snrk2.3* Doppelmutante verhält sich insensitiv auf das Phytohormon ABA bei Keimung und Keimlingswachstum (Fujii *et al.* 2007). Bei diesen Kinasen handelt es sich also um positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktion, die spezialisierte Funktionen übernehmen. Die Tripelmutante *snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6* zeigt eine sehr starke, globale ABA-Insensitivität (Fujii und Zhu 2009). Dies zeigt die umfassende Bedeutung der über diese Kinasen vermittelte Proteinphosphorylierung für die ABA-Signaltransduktion an.

Ein nicht unerheblicher Teil der durch ABA regulierten Gene codiert für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Finkelstein *et al.* 2002; Abe *et al.* 2003). Einige dieser Gene können auch durch Trockenheit oder Kälte in ABA-defizienten (*aba2*) oder ABA-insensitiven (*abi1-1*) Mutanten reguliert werden: Auch ABA-unabhängige Wege tragen zur Anpassung an diese Stimuli bei (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006).

Diese aktivierten Transkriptionsfaktoren, die sowohl transkriptionell als auch posttranslational über Phosphorylierungen reguliert werden, erkennen spezifische *cis*-Elemente innerhalb der Promotorsequenz ihrer Zielgene. Das häufigste *cis*-regulatorische Element, welches zu einer ABA-abhängigen Aktivierung der Transkription führt, ist das ABRE (*ABA-responsive element*). Dieses acht bis zehn bp lange Element, welches durch eine ACGT-Kernsequenz gekennzeichnet ist (Hattori *et al.* 2002), tritt oft in Verbindung mit einem coupling element (*CE*) auf (Shen *et al.* 1996) und wird dann als ABRC (*abscisic acid response complex*) bezeichnet (Abb.1-3).

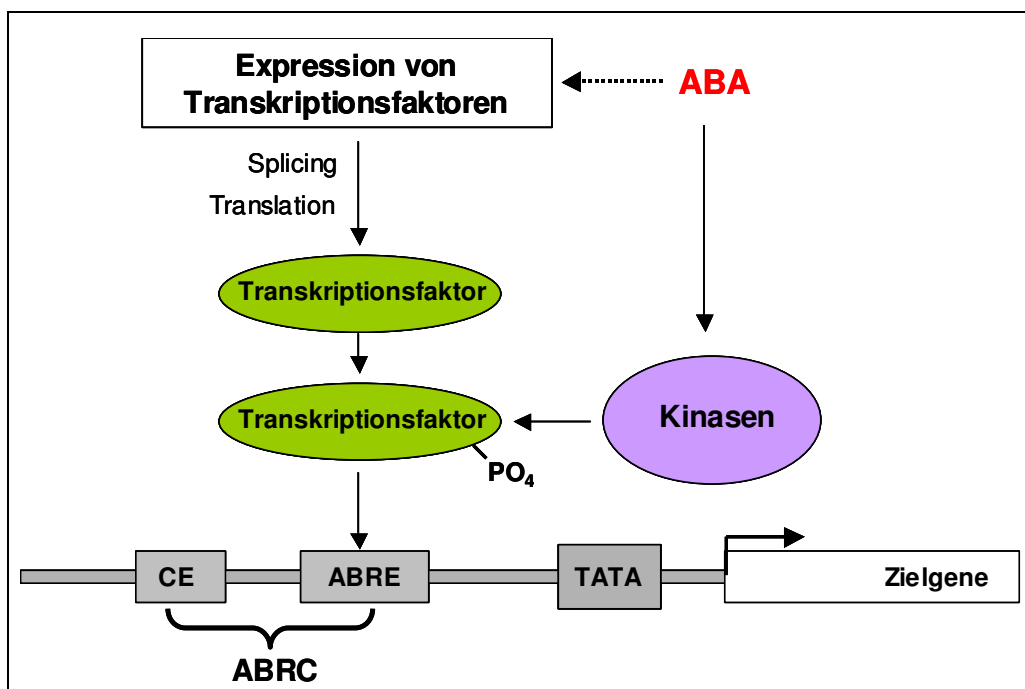


Abb.1-3 ABA-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren
 ABA aktiviert Transkriptionsfaktoren durch Steuerung ihrer Expression, der Translation und Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren über Kinasen. Diese ‚aktivierten‘ Transkriptionsfaktoren erkennen *cis*-regulatorische Elemente in den Promotoren ihrer Zielgene, die darauf hin verstärkt exprimiert werden.

Wichtige Transkriptionsfaktoren stellen die Proteine ABI3, ABI4 und ABI5 dar. Die ABA-insensitiven Mutanten dieser Proteine wurden aufgrund ihres gegen ABA insensitiven Keimungsverhaltens isoliert (Finkelstein 1994; Lopez-Molina und Chua 2000). Alle drei Transkriptionsfaktoren beeinflussen primär die Samenreife, gehören aber unterschiedlichen Klassen von Transkriptionsfaktoren an: ABI3 wird zur Gruppe der B3-Transkriptionsfaktoren gezählt (Rohde *et al.* 1999), während ABI4 eine AP2-ähnliche Struktur aufweist (Finkelstein *et al.* 1998) und ABI5 zu den bZIP-Transkriptionsfaktoren gezählt wird (Finkelstein und Lynch 2000; Nakamura *et al.* 2001). Die Überexpression jedes einzelnen dieser Proteine geht mit einem ABA-hypersensitiven Verhalten der transgenen Pflanzen einher. Dieses Resultat untermauert ihre Stellung als wichtige Mediatoren der durch ABA vermittelten Adaptation der Pflanze (Brocard *et al.* 2002).

Neben dieser direkten Regulation der Genexpression über verschiedenartige Transkriptionsfaktoren greift ABA noch über andere Prozesse in die Genexpression ein. So zeigen Mutanten von verschiedenen, an der RNA-Prozessierung beteiligten Genen, ein hypersensitives Verhalten gegenüber dem Phytohormon. In Abb.1-4 sind Teile des pflanzlichen RNA-Metabolismus und die daran beteiligten Gene, die eine Verbindung zur RNA-Signaltransduktion darstellen, gezeigt.

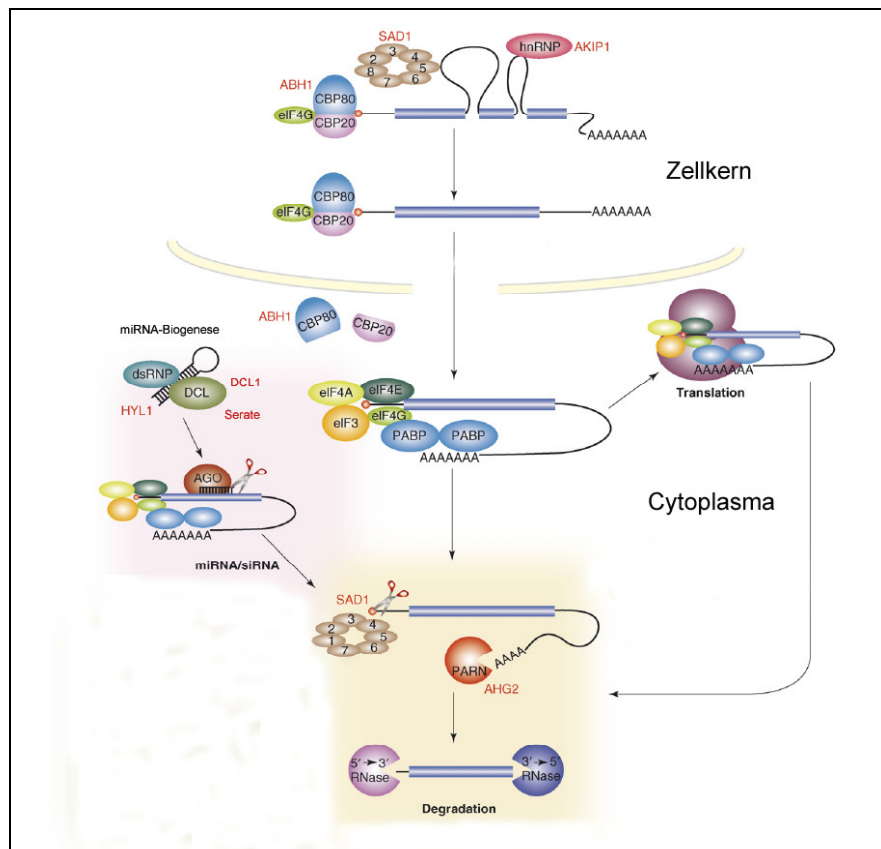


Abb.1-4 RNA-Metabolismus und ABA-Signaltransduktion

Abbildung verändert nach (Hirayama und Shinozaki 2007).

Proteine, für die eine Beteiligung an der ABA-Signaltransduktion postuliert wird, sind rot dargestellt. Eine genaue Beschreibung der einzelnen abgebildeten Prozesse des RNA-Metabolismus und die Funktion der daran beteiligten Proteine ist im Text näher erläutert.

Die *abh1/cpb80* Mutante ist sowohl bezüglich der Keimung, als auch der Stomataregulation ABA-hypersensitiv. Das *ABH1/CPB80* Gen codiert für ein mRNA-CAP-Bindeprotein, das Bestandteil des heterodimeren *CPB20-CBP80* Komplexes ist, der durch Bindung an die 5' CAP Struktur der mRNA die RNA-Prozessierung beeinflusst (Hugouvieux *et al.* 2001). Die Mutante *sad1* zeigt ein ABA-hypersensitives Verhalten hinsichtlich der Keimung und des Wurzelwachstums. Das *SAD1* Protein weist hohe Homologien zu snRNPs (*small nuclear ribonucleo proteins*) auf, die am Spleißvorgang und dem RNA-Abbau beteiligt sind (Xiong *et al.* 2001). Die SnRK2 Kinase AAKK

phosphoryliert, nach ihrer ABA-abhängigen Aktivierung, das hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleo protein*) AKIP1 und sorgt für dessen Umlagerung in *nuclear speckles* und induziert so dynamische Änderungen der kernlokalisierten Spleißfaktoren (Li *et al.* 2002). Auch für das am mRNA-Abbau beteiligte Protein AHG2/PARN wurden ABA-hypersensitive Phänotypen für Keimung und Entwicklung der Pflanze in der *ahg2* Mutante beschrieben (Nishimura *et al.* 2005). Die Mutanten *hyl1*, *dcl1* und *se*, deren Genprodukte für die korrekte Prozessierung von miRNAs verantwortlich sind, weisen ebenfalls einen ABA-hypersensitiven Phänotyp auf (Lu und Fedoroff 2000; Yang *et al.* 2006a; Fang und Spector 2007; Fujioka *et al.* 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ABA während der Keimung zu einer Akkumulation der microRNA 159 (miR159) führt. Die Zielgene dieser miRNA sind die zwei Transkriptionsfaktoren MYB33 und MYB101, die positive Regulatoren der ABA-Antwort darstellen. Sie werden durch die miRNA ausgeschaltet, um so die ABA-Sensitivität während der Keimung herunter zu setzen (Reyes und Chua 2007). Für die *abh1/cpb80* Mutante konnte ebenfalls eine Verbindung zur miRNA-Genese hergestellt werden. In dieser Mutante sind weniger fertig prozessierte (und somit aktive) miRNAs anzutreffen (Kim *et al.* 2008b).

Die enge Verstrickung der ABA-abhängigen Regulationsmechanismen und der durch die miRNAs vermittelte Kontrollmechanismus bietet vielfältige regulatorische Möglichkeiten die ABA-Sensitivität zu modifizieren.

Für die Proteinphosphatase HAB1 konnte eine Interaktion mit SWI3B, einer Komponente des *chromatin-remodeling-complexes* nachgewiesen werden und *swi3b* Mutanten weisen eine reduzierte ABA-Sensitivität auf (Saez *et al.* 2008). Zusätzlich konnte auch ein Einfluss von ABA auf den Acetylierungs- und Methylierungsstatus der Histone nachgewiesen werden (Ng *et al.* 2006; Chinnusamy *et al.* 2008). Es ist bekannt, dass epigenetische Kontrolle durch Modifikation der Histone eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression spielt (Margueron *et al.* 2005).

1.1.3 Regulation der Schließzellen

Die Regulation der Schließzellen, gerade bei Trockenstress, ist eine der wichtigsten Aufgaben des Phytohormons Abscisinsäure. Deshalb stellen Schließzellen ein gut studiertes Modell für die Untersuchung der ABA-Signaltransduktion dar (Schroeder *et al.* 2001a; Fan *et al.* 2004; Sirichandra *et al.* 2009).

Die Reaktion der Schließzellen auf ABA gehören zu den schnell ablaufenden Prozessen. Nach exogener ABA-Applikation schließen sich die Stomata binnen weniger Minuten (Szyroki *et al.* 2001). Diese schnellen Effekte gehen hauptsächlich auf Änderungen von Ionenflüssen zurück, auch wenn die oben beschriebenen Komponenten der Signaltransduktion auch in diese Prozesse eingreifen.

Aufgabe der Stomata ist die Regulation der CO₂-Aufnahme sowie der Wasserabgabe über Transpiration. Die Regulation der Porengröße erfolgt über einen ABA-abhängigen Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration.

ABA aktiviert Calcium-permeable Kanäle in der Plasmamembran der Schließzellen (Hamilton *et al.* 2000; MacRobbie 2000) und sorgt so für eine Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration. Außer durch Abscisinsäure kann diese Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration auch durch andere Faktoren hervorgerufen werden. Hier sind unter anderem pathogene Elicitoren (Klusener *et al.* 2002), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (McAinsh *et al.* 1996; Pei *et al.* 2000), NO (Desikan *et al.* 2002; Bright *et al.* 2006; Neill *et al.* 2008) und Ozon (Evans *et al.* 2005) zu nennen. Aber auch exogene Calcium-Applikation führt zu einem Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration (McAinsh *et al.* 1995; Allen *et al.* 2001). So konnte gezeigt werden, dass die Bildung von H₂O₂ durch eine ABA-induzierbare, membrangebundene NADPH-Oxidase ebenfalls die Calcium-Kanäle in der Plasmamembran aktiviert. Der *knock-out* von den zwei katalytischen Untereinheiten AtrbohD and AtrbohF geht mit einer Reduktion der ROS-Bildung und einer Beeinträchtigung der ABA-abhängigen Stomata-Regulation einher (Kwak *et al.* 2003). Die Erhöhung des cytosolischen Calciums (und das spezifische Oszillationsmuster, siehe auch 1.3) führt zu einer Aktivierung von auswärts gerichteten Anionenkanälen in der Plasmamembran (Hedrich *et al.* 1990; Schroeder und Hagiwara 1990). Der erste dieser Kanäle, der kloniert wurde ist SLAC1 (Vahisalu *et al.* 2008). Die Aktivierung dieses Kanals initiiert die Depolarisierung der Plasmamembran, während gleichzeitig die H⁺-ATPasen, welche für die Hyperpolarisierung der Plasmamembran verantwortlich sind, gehemmt werden (Kinoshita *et al.* 1995). Diese Depolarisierung der Membran führt dann zu einer Aktivierung des ebenfalls auswärtsgerichteten Kalium-Kanals GORK (Hosy *et al.* 2003) und einer Hemmung der nach innen gerichteten Kalium-Kanäle KAT1 und KAT2 (Pilot *et al.* 2001). Neben den Ereignissen an der Plasmamembran wird Kalium aus der Vakuole über vakuoläre Kalium-Kanäle freigesetzt (Gobert *et al.* 2007).

Zusätzlich führt Calcium zu einer Freisetzung von Calcium aus der Vakuole über den SLOW vacular (SV) Kanal TPC1 (Peiter *et al.* 2005). Dieser *calcium-induced calcium release* (CICR) verstärkt somit das primäre Calcium-Signal. Diese komplexe Regulation der Ionenmobilisierung in den Schließzellen führt schließlich zu einem Verlust des Turgors in der Zelle und dem Schließen der Pore.

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen scheinen dabei mechanistisch eine zentrale regulatorische Rolle zu spielen: So erfolgt die Calcium-abhängige Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle in der Plasmamembran über reversible Phosphorylierung (Schmidt *et al.* 1995a). Auch die Regulation von KAT1 wird durch Phosphorylierung, in diesem Fall

durch eine CPK, gesteuert (Li et al. 1998). Die Inaktivierung der membranständigen H⁺-ATPase AHA2 erfolgt *via* Phosphorylierung über die Calcium-abhängige Kinase PKS5, welche auch als CIPK11 bezeichnet wird (Fuglsang *et al.* 2007). Die Mutation in zwei CPKs (*cpk3* und *cpk6*) hat genauso wie die Mutation der ABA-abhängigen und Calcium-unabhängigen Kinase AAPK, eine Beeinträchtigung der ABA-abhängigen Aktivierung der membranständigen S-Typ Anionenkanäle zur Folge (Li und Assmann 1996; Mori et al. 2006). Eine Mutation in der zur Familie der SnRK2 Kinasen gehörenden Kinase OST1 führt ebenfalls zu einer Insensitivität der Spaltöffnungen gegenüber ABA. Hier konnte gezeigt werden, dass in der *ost1* Mutante die Bildung des *second messengers* H₂O₂ beeinträchtigt ist und so die Aktivierung der Plasmamembranlokalisierten Calcium-Kanäle ausbleibt (Mustilli *et al.* 2002; Xie *et al.* 2006). Des Weiteren konnte eine direkte physische Interaktion von OST1 mit der Proteinphosphatase ABI1 gezeigt werden (Yoshida *et al.* 2006).

Die Bedeutung der Proteinphosphatasen wird neben der Regulation von OST1 noch durch eine reduzierte Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle in *abi1-1* und *abi2-1* Mutanten deutlich (Grabov *et al.* 1997; Pei *et al.* 1997). Aber auch andere Faktoren sind direkt an der Regulierung der Ionenkanäle beteiligt: In den beiden ABA-hypersensitiven Mutanten *era1-2* und *abh1-1* zeigt sich eine verstärkte Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle. Der Phänotyp der *era1-2* Mutante geht dabei auf einen Defekt der Farnesyltransferase und der der *abh1* Mutante auf einen Defekt im mRNA-CAP-Bindeprotein zurück (Cutler *et al.* 1996; Hugouvieux *et al.* 2001).

Zusätzlich kann eine Kontrolle der cytoplasmatischen Ionenkonzentration durch Sphingosin-1-Phosphat erreicht werden (Ng *et al.* 2001). ABA stimuliert die Aktivität der Sphingosin-Kinase, die daraufhin das Sphingosin-1-Phosphat bildet. Dieses hemmt die einwärts-gerichteten Kalium-Kanäle und trägt so zum Stomataschluss bei. Interessanterweise tritt dieser Effekt nicht in *gpa1* Mutanten auf. Bei diesen Mutanten ist die einzige Alpha-Untereinheit des trimeren G-Proteins in *Arabidopsis* nicht funktionsfähig: Es besteht also ein Zusammenhang zwischen dem ABA-Signalweg und Signaltransduktionskomponenten des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Wang *et al.* 2001; Coursol *et al.* 2003).

Einen zusätzlichen Regulator stellt die Phospholipase Dα1 dar: Dieses Enzym katalysiert ABA-abhängig die Bildung von Phosphatidsäure (PA), welche dann an ABI1 bindet und die Phosphatase inaktiviert. Durch diese Inaktivierung von ABI1 wird der negative Effekt von ABI1 auf den Stomataschluss aufgehoben und das Schließen der Stomata gefördert. Zusätzlich binden PLDα1 und PA noch an GPA1 und sorgen für eine Inhibierung der Stomataöffnung (Mishra *et al.* 2006).

In Abb.1-5 sind nochmals die wichtigsten Komponenten der Stomataregulation graphisch dargestellt.

Zusätzlich bleibt festzustellen, dass andere Pflanzenhormone, wie z.B. Auxin, Cytokinin, Ethylen, Jasmonsäure, Brassinosteroide und Salycylsäure ebenfalls die Regulation der Schließzellen beeinflussen und so ein *fine-tuning* der Regulation erreicht werden kann (zusammengefasst in (Acharya und Assmann 2009)).

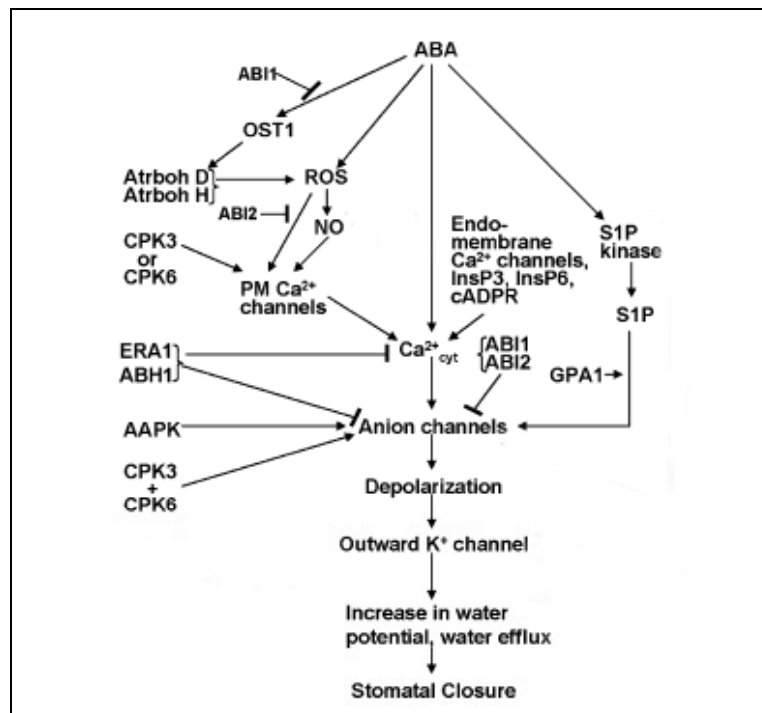


Abb.1-5 Modell der Regulation der am Stomataschluss beteiligten Ionenkanäle.

Gezeigt sind die wichtigsten im Text erwähnten regulatorischen Komponenten, die zum Schließen der Stomata führen. Abbildung verändert nach (Pandey *et al.* 2007).

Die Mechanismen, welche zur Wiederöffnung der Schließzellen führen, sollen hier nicht *en detail* dargestellt werden. Im Prinzip läuft der Öffnungsvorgang nach folgenden Prinzipien ab: Bleibt das ABA-Signal aus, werden die membranständigen H⁺-ATPasen wieder aktiviert und sorgen durch die Hyperpolarisierung der Membran für die Aktivierung einwärts-gerichteter Kalium-Känale. Die Aufnahme von Kalium-Ionen sorgt zusammen mit der Resynthese osmotisch aktiver Substanzen (wie z.B. Malat und Saccharose) für die Öffnung der Stomata (Schroeder *et al.* 2001b). Die an der Regulation der Öffnung beteiligten Proteine unterscheiden sich jedoch teilweise von den oben beschriebenen Komponenten, die den Schließvorgang kontrollieren (Wang *et al.* 2001). Zusätzlich wirkt z.B. Blaulicht über PHOT1/PHOT2 als ein die Öffnung stimulierendes Agens (Dietrich *et al.* 2001; Shimazaki *et al.* 2007).

1.2 Calcium

Calcium stellt einen der wichtigsten *second messenger* in Pflanzen dar, der sowohl an der Vermittlung von biotischen und abiotischen Stress als auch an Wachstums- und Entwicklungsprozessen der Pflanze beteiligt ist. Die intrazelluläre Calcium-Konzentration ist unter normalen Bedingungen mit ungefähr $0,1 \mu\text{M}$ sehr gering. Um diese geringe Calcium-Konzentration im Cytoplasma aufrechtzuerhalten, pumpen Calcium-ATPasen Calcium gegen einen Konzentrationsgradienten aus dem Cytosol heraus (Inesi 1985). Durch verschiedene Signale wie Hormone, Licht, abiotischen Stress oder Elicitoren wird die cytosolische Calcium-Konzentration moduliert (Trewavas und Malhó 1998; Evans *et al.* 2001; Reddy 2001). Diese Stimuli verursachen einen charakteristischen Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration durch eine differenzierte Aktivierung verschiedener Calcium-Kanäle und Calcium-ATPasen (Allen *et al.* 2000; Hwang *et al.* 2000). Dieser cytosolische Anstieg der Calcium-Konzentration spiegelt sich in einem je nach Stimulus spezifischen Oszillationsmuster der Calcium-Konzentration wieder (McAinsh *et al.* 1995). Dabei wird angenommen, dass die Stimulus-spezifischen Oszillationsmuster durch Rückkopplungen mit den jeweiligen Calcium-Kanälen und -Pumpen und der Modifizierung deren Affinität für das Ion hervorgerufen werden und so verschiedene Formen von Oszillationen entstehen können, die sich mithilfe mathematischer Modelle näherungsweise berechnen lassen (Meyer und Stryer 1988; Calder *et al.* 1997; Schuster *et al.* 2002). Dauer, Frequenz und Lokalisation der Oszillationen in der Zelle sind für eine spezifische Antwort entscheidend (Berridge 1997; Dolmetsch *et al.* 1998; Allen *et al.* 2001; Evans *et al.* 2001; Sanders *et al.* 2002; Chinnusamy *et al.* 2004). Diese spezifischen Calcium-Signaturen werden von verschiedenen Calcium-bindenden Proteinen decodiert und beeinflussen so die Genexpression oder den Phosphorylierungsstatus nachgeschalteter Proteine. In Pflanzen gibt es verschiedene Klassen sensorischer, Calcium-bindender Proteine, die spezifisch an der Weiterleitung des Calcium-Signals beteiligt sind.

Einer der verbreitetsten Calcium-Sensoren, der in allen Eukaryoten zu finden ist, ist Calmodulin (Chin und Means 2000; Yang und Poovaiah 2003). Es gibt aber auch pflanzenspezifische Calcium-Sensoren, wie die Calcineurin B-*like* (CBL) Proteine oder die mit diesen Proteinen interagierenden Calcineurin B-*like interacting kinases* (CIPK). Die verschiedenen CBL-CIPK Interaktionen stellen ein komplexes Calcium-decodierendes Netzwerk in Pflanzen dar, das für Anpassungen an verschiedene Stresssituationen verantwortlich ist (Batistic und Kudla 2004; Luan 2009). Für einige CIPKs konnte eine direkte Interaktion mit den PP2Cs ABI1 und ABI2 gezeigt werden, was dieses Calcium-decodierende Netzwerk in eine direkte Verbindung zum ABA-Signalweg bringt (Guo *et al.*

2002; Ohta *et al.* 2003). Für CIPK3 konnte eine Funktion als molekularer Link zwischen ABA-abhängigem Calcium-Signal und einer daraus resultierenden Veränderung der Genexpression nachgewiesen werden (Kim *et al.* 2003). Aber auch die Kontrolle der intrazellulären Kalium-Konzentration wird über CBL-CIPKs gesteuert: Die Aktivierung des Kalium-Kanals AKT1 geht direkt auf eine Phosphorylierung des Kanals durch den CBL1-CIPK23-Komplex zurück (Lee *et al.* 2007).

Zusätzlich gibt es in Pflanzen noch die Familie der CPKs (siehe 1.2.1), bei denen die Calcium-bindende Domäne und die Kinaseaktivität in einem Protein vereint sind und deren Funktion ebenfalls in der Decodierung und Weiterleitung der Calcium-Signale liegt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass Pflanzen ein hoch komplexes Netzwerk von Calcium-induzierenden und decodierenden Proteinen besitzen, das eng mit den verschiedenen (Stress-)Signalwegen verstrickt ist und die Möglichkeit eröffnet, eine gezielte Anpassung der Pflanze an variable Umweltbedingungen zu erreichen.

1.2.1 CPKs

CPKs sind Serin/Threonin-Kinasen, die nur in Pflanzen und einigen Prokaryoten wie dem Malariaerreger *Plasmodium* vorkommen (Harmon *et al.* 2000; Billker *et al.* 2004). Sie gehören neben den CBL-CIPKs zu den wichtigsten Calcium-Sensoren in *Arabidopsis*. Beim Komplex aus dem Calcium-Sensor CBL und dem Mediator des Signals (CIPK) spricht man von einem *sensor relay*, da es sich um zwei getrennte Proteine handelt. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei CPKs um so genannte *sensor responder*, bei denen die Calmodulin-ähnliche Calcium-bindende Domäne kovalent an die Kinase-Domäne gebunden ist und die Aktivierung der Kinaseaktivität unabhängig von Calmodulin ist (Sanders *et al.* 2002). In *Arabidopsis* bilden die CPKs eine Genfamilie mit 34 Mitgliedern, die eine aus vier Domänen bestehende konservierte Struktur aufweisen (siehe Abb.1-6). Am N-Terminus besitzen die Proteine eine variable Region, die nur eine geringe Sequenzhomologie zwischen den Familienmitgliedern aufweist, gefolgt von der hoch konservierten Kinasedomäne, einer autoinhibitorischen Domäne und der Calcium-bindenden Calmodulin-ähnlichen Domäne. Diese Molekülstruktur erlaubt eine direkte Aktivierung der Kinaseaktivität durch Calcium. Die Calmodulin-ähnliche Domäne besitzt in der Regel vier Calcium bindende EF-Hand-Motive (in 25 der 34 CPKs, bei den übrigen sind eine oder mehrere Calcium-Bindestellen mutiert) (Cheng *et al.* 2002a), die zu zwei funktionellen Gruppen, der sogenannten *N-lobe* und der *C-lobe* zusammengefasst sind. Die *C-lobe* hat eine hohe Calcium-Affinität, so dass schon bei basalen Calcium-Konzentrationen ($< 0,1 \mu\text{M}$) eine Bindung des Ions an dieser Domäne vorliegt. Dies hält das Protein in einem abgeschalteten Status, da die autoinhibitorische Domäne die

Kinasedomäne blockiert. Erhöht sich die cytosolische Calcium-Konzentration, bindet auch die niedrigaffinere *N-lobe* das Calcium-Ion und initiiert eine Konformationsänderung im Protein, welche zur Aktivierung der Kinasedomäne führt (Vitart *et al.* 2000; Christodoulou *et al.* 2004; Chandran *et al.* 2006). Die Calcium-Konzentration, die zur Aktivierung der Kinaseaktivität führt, kann hierbei je nach Affinität der Calcium-Bindung zwischen verschiedenen Isoformen deutlich variieren (Lee *et al.* 1998).

Der Regulationsmechanismus der CPKs ist nochmals graphisch in Abb.1-6 dargestellt.

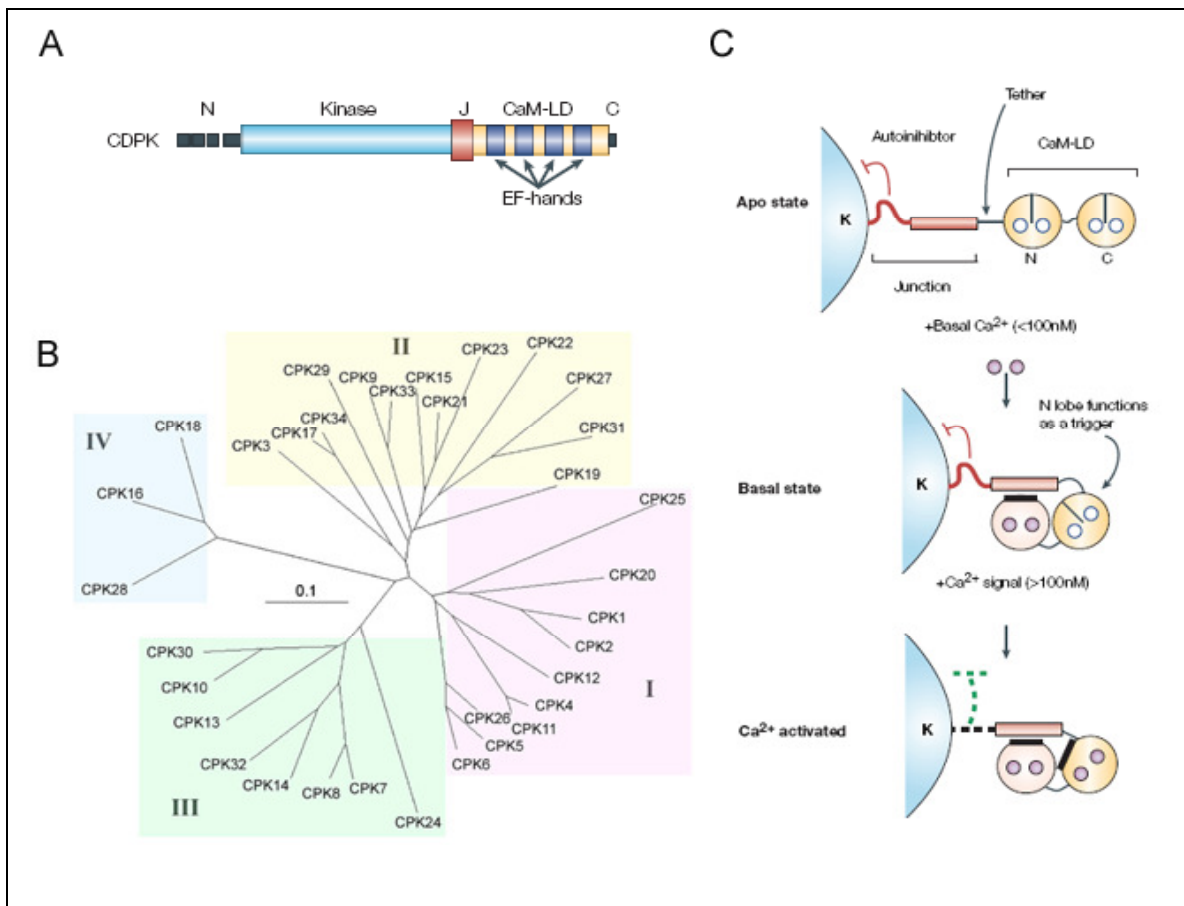


Abb.1-6 Struktur, Genfamilie und Regulation von CPKs

A: Schematische Struktur von CPKs. B: Phylogenetischer Baum der 34 CPKs in *Arabidopsis thaliana*. C: Modell zur Calcium-abhängigen Aktivierung der CPKs. Abbildung A und C entnommen aus (Harper und Harmon 2005) und Abb. B entnommen aus (Cheng *et al.* 2002a).

Die unterschiedlichen Isoformen sind an verschiedenen Orten in der Zelle lokalisiert. So finden sich CPKs unter anderem im Zellkern, im Cytoplasma, an der Plasmamembran, in den Peroxisomen oder in der äußeren Mitochondrienmembran (Pical *et al.* 1993; Lu und Hrabak 2002; Dammann *et al.* 2003). Bis dato ist für keine CPK eine Lokalisation als integrales Membranprotein beschrieben worden, vielmehr wird die Verankerung der membranständigen Isoformen über Myristoylierung und Palmytilierung erreicht (Martin und Busconi 2000).

Für einige CPKs wurde ein Anstieg der Transkriptmenge nach Kälte-, Salz- und Trockenstress nachgewiesen (Urao *et al.* 1994; Martin und Busconi 2001; Wan *et al.* 2007). In der Zelle sind CPKs an unterschiedlichen Prozessen beteiligt: So konnte in Protoplasten ein Einfluss der CPK10 und CPK30 auf die ABA-induzierte Stress-Signaltransduktion gezeigt werden (Sheen 1996). Weitere Verknüpfungen der CPKs mit der ABA-Signaltransduktion finden sich in der Regulation des Schließvorgangs der Stomata durch CPK3 und CPK6 (siehe auch 1.1.3, (Mori *et al.* 2006)). In Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die NADPH Oxidase ebenfalls über Phosphorylierung durch eine CPK reguliert (Kobayashi *et al.* 2007). Für die Proteine AtCPK4 und AtCPK11 konnte eine direkte Regulation der ABA-Signaltransduktion gezeigt werden. Die Mutanten dieser Gene zeigen eine ABA-Insensitivität bezüglich Keimung, Keimlingswachstum und Stomataregulation. Weiterhin konnte *in vitro* eine Phosphorylierung der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren ABF1 und ABF4 durch diese beiden CPKs gezeigt werden (Zhu *et al.* 2007).

CPKs sind nicht nur an ABA-gesteuerten Prozessen beteiligt: In Gerste und Tabak wurde beispielsweise ein Zusammenhang mit der Gibberellin-Signaltransduktion nachgewiesen (McCubbin *et al.* 2004; Ishida *et al.* 2008). Ebenfalls im Tabak konnte eine Ethylen-vermittelte Verbindung zwischen CPKs und dem MAPK-Signalweg hergestellt werden (Ludwig *et al.* 2005). Folglich obliegt den CPKs die Kontrolle verschiedener Hormon-Signalwege.

Eine Vielzahl weiterer putativer Interaktionspartner von CPKs wurde über einen groß angelegten *Yeast-Two-Hybrid-Screen* identifiziert (Uno *et al.* 2009). Die Bedeutung dieser Interaktionspartner für die vielen verschiedenen durch CPKs vermittelten Prozesse muss allerdings noch experimentell bestätigt werden. Durch verschiedene Lokalisation, Calcium-Affinitäten, der Expression in verschiedenen Geweben oder während verschiedenen Entwicklungsstadien kann so zusammen mit den unterschiedlichen Interaktionspartnern durch CPKs eine spezifische Umsetzung der verschiedenen Calcium-Signaturen in der Zelle erreicht werden. Ein faszinierender Befund dieses CPK-Netzwerks ist die Beteiligung an unterschiedlichen pflanzlichen Signalwegen, was die Möglichkeit der Integration verschiedener Signale ermöglicht.

1.3 GCA2

Bei der *gca2-1* Mutante (*growth control exerted by ABA*) handelt es sich um eine ABA-insensitive Mutante, die in einem EMS-Mutagenese *screen* auf ABA-insensitives Wurzelwachstum isoliert wurde (Iten 1992). Die *gca2-1* Mutante zeigt zusätzlich zum ABA-insensitiven Wachstumsverhalten auch eine ABA-Insensitivität hinsichtlich der Stomataregulation und der Keimung (Himmelbach *et al.* 1998).

gca2-1 stellt eine rezessive Mutante mit einem schwachen ABA-insensitiven Phänotyp dar, der sich sowohl auf die embryonale als auch auf die vegetative Entwicklung der Pflanze auswirkt. Zusätzlich zeigen isolierte Blätter der Mutante ein verändertes Seneszenzverhalten und einen chlorotischen Phänotyp (Benning 1999).

Die Aktivierung der ins Cytosol gerichteten Calcium-Kanäle durch H_2O_2 ist in der *gca2-1* Mutante beeinträchtigt, was eine Insensitivität der Schließzellen sowohl gegenüber H_2O_2 als auch gegenüber ABA zur Folge hat (Pei *et al.* 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ABA-induzierten Calcium-Oszillationen, die für das Schließen der Stomata verantwortlich sind (Allen *et al.* 2000), in *gca2-1* in ihrer Frequenz verändert sind (Allen *et al.* 2001). Eine der wichtigsten Aufgaben der Schließzellen ist die Kontrolle des Gasaustauschs der Pflanze mit ihrer Umwelt (siehe auch 1.1.3). So ist es nicht verwunderlich, dass eine erhöhte CO_2 -Konzentration ebenfalls zum Stomataschluss führt. Dies erfolgt über eine Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle in der Plasmamembran (Raschke *et al.* 2003). GCA2 scheint maßgeblich an diesen Prozess beteiligt zu sein, da eine Erhöhung der CO_2 -Konzentration in der Mutante nicht zum Stomataschluss führt (Young *et al.* 2006). Der CO_2 -induzierte Stomataschluss geht im Wildtyp mit einer geringeren Anzahl an Calcium-*transients* einher, d.h. die Frequenz der Calcium-Oszillation wird beim Stomataschluss langsamer, wohingegen in der *gca2-1* Mutante keine Modulation der *transients* zu beobachten ist. Interessanterweise unterscheidet sich die CO_2 -Insensitivität der *gca2-1* Mutante vom Phänotyp anderer ABA-insensitiver Mutanten: So reagieren die für den Stomataschluss ABA-insensitiven *ost1* Mutanten ähnlich wie der Wildtyp auf CO_2 (Mustilli *et al.* 2002). Auch für die pleiotrope *abi1-1* Mutante konnte eine Reaktion auf CO_2 nachgewiesen werden (Young *et al.* 2006), obwohl in früheren Studien eine Insensitivität dieser Mutante gegenüber CO_2 erwähnt wurde (Webb und Hetherington 1997). Eine Mutation in der HT1-Kinase führt hingegen zu einer CO_2 -Insensitivität der Pflanzen, ohne dass Komponenten des ABA-Signalwegs betroffen sind (Hashimoto *et al.* 2006). Obwohl die Schließzellen in dieser Mutante insensitiv auf CO_2 reagieren, zeigen sie ein normales Verhalten nach ABA-Applikation.

In Abb.1-7 ist die vermutete Position des GCA2 Proteins im ABA-Signalweg und seine Funktion beim Stomataschluss dargestellt.

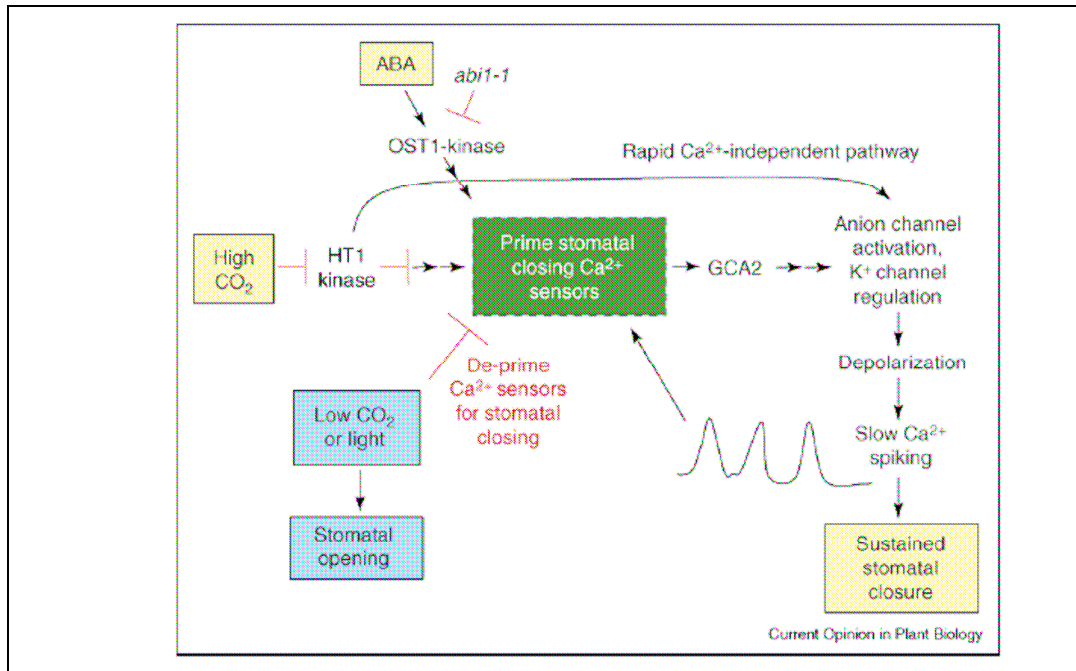


Abb.1-7 Induzierung des Stomataschlusses durch ABA und CO₂

Die vermutete Position von GCA2 und einigen anderen Komponenten im Signalweg, der zum Stomataschluss führt. Abbildung entnommen aus (Israelsson *et al.* 2006).

Bei der *gca2-1* Mutante handelt es sich also um eine pleiotrope ABA-insensitive Mutante, die zusätzlich zu den Beeinträchtigungen in den ABA-verwandten Signalwegen noch in weiteren Anpassungsreaktionen der Pflanze gestört ist. Das GCA2 Protein, das aufgrund der globalen Beeinträchtigung der physiologischen ABA-Antworten relativ am Anfang der ABA-Signaltransduktion stehen sollte, stellt somit einen interessanten Kandidaten für die Integration externer Stimuli (wie CO₂) und der ABA-Signaltransduktion dar.

1.4 Transiente Genexpression

Eine schnelle Möglichkeit die Genregulation in Pflanzen zu visualisieren und den Einfluss verschiedener Effektoren zu testen, stellen transiente Expressionssysteme dar: Zahlreiche Methoden wurden entwickelt, um den Gentransfer in Pflanzenzellen und die darauffolgende vorübergehende Expression der eingebrachten Gene möglichst effizient zu machen. So ergaben zum Beispiel Mikroinjektionsexperimente in Tomate neue Aufschlüsse über die Funktion des ABI1 Proteins innerhalb der ABA-Signaltransduktionskaskade (Wu *et al.* 2003). Eine weitere Möglichkeit der transienten Transformation stellt die ballistische Transformation pflanzlicher Zellen mittels Partikelkanone dar. Hierbei werden mithilfe von Mikropartikeln aus Gold oder Wolfram DNA-Moleküle in die Zellen geschossen (Klein *et al.* 1987). Auch Protoplasten eignen sich für den direkten Gentransfer. Die DNA-Transformation kann hier durch verschiedene

Verfahren wie Elektroporation oder Behandlung mit Polyethylenglykol durchgeführt werden (Paszkowski *et al.* 1984; Sheen 2001).

Die Co-Expression regulierter Reportergenkonstrukte und Komponenten, die den entsprechenden Signalweg beeinflussen, stellt eine Möglichkeit dar, Signaltransduktionswege in Pflanzen zu analysieren. Reportergenkonstrukte visualisieren die Regulation eines Promotors dadurch, dass ein Promotor anstelle seines endogenen Gens nun ein Reporter gen, dessen Genprodukt leicht zu quantifizieren ist (wie zum Beispiel das Luciferasegen), kontrolliert. Somit kann über die Messung der Luciferaseaktivität auf die Regulation des Promotors zurückgeschlossen werden. Der Promotor des *RD29b* Gens enthält zwei ABRE-Motive (siehe 1.1.2) und wird durch die in der ABA-Signaltransduktion beteiligten bZIP-Transkriptionsfaktoren AREB1 und AREB2 aktiviert (Uno *et al.* 2000). Dadurch kann dieser Promotor genutzt werden, um einen transienten Einblick in die ABA-Signaltransduktion zu bekommen. In Maisprotoplasten konnte so die negativ regulatorische Rolle von PP2C Phosphatasen im ABA-Signaltransduktionsnetzwerk nachgewiesen werden (Sheen 1998).

In *Arabidopsis*-Protoplasten wurde die Regulation verschiedener ABA-induzierbarer Promotoren getestet: So wurde unter anderem die ABA-abhängige Aktivierung des *ATHB6*-Promotors durch das eigene Genprodukt, den co-exprimierten HD-Zip Transkriptionsfaktor *ATHB6*, nachgewiesen (Himmelbach *et al.* 2002).

Eine weitere Anwendung transienter Expressionssysteme stellen Lokalisationsstudien von chimären Fusionsproteinen dar (Hwang und Sheen 2001).

Ein großer Vorteil von transienten Expressionsanalysen ist der geringe Zeitaufwand. Während die Etablierung stabil transformierter Linien mehrere Monate in Anspruch nehmen kann, können transiente Expressionsexperimente innerhalb weniger Tage durchgeführt werden. Ergebnisse, die im transienten System erzielt wurden, sollten jedoch unter Vorbehalt auf die ganze Pflanze übertragen werden, da es sich bei Protoplasten zwar um ein *in vivo* System, aber doch um ein artifizielles System handelt. Sollten z.B. Komponenten der Zellwand oder die Lageinformation der Zellen im Gewebeverband einen Einfluss auf den zu untersuchenden Prozess haben, können diese Faktoren in Protoplasten ihren Einfluss nicht ausüben.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Abscisinsäure ist essentiell für die Anpassung der Pflanze an veränderte Umweltbedingungen. Auch wenn die dahinterstehenden molekularen Mechanismen immer klarer werden und neue Komponenten der ABA-Signalwege identifiziert wurden, ist das Verständnis dieser komplexen Vorgänge immer noch unzureichend. Ein wichtiger Teil der Stressadaptation ist die Integration von externen Stimuli in das Netzwerk der verschiedenen Signalkomponenten.

Die *gca2-1* Mutante stellt ein wichtiges System zur Analyse dieser Prozesse dar. Die verschiedenen pleiotropen Phänotypen der *gca2-1* Mutante lassen das GCA2 Protein als wichtige Komponente der Stressadaptation erscheinen. Durch die Identifizierung des GCA2 Proteins sollte es möglich sein, die Regulation und Decodierung der Calcium-Oszillationen und deren molekulare Basis, sowie ihren Zusammenhang mit der ABA-Signaltransduktion besser zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte als erstes das *GCA2* Gen durch positionelle Klonierung identifiziert werden. Hierzu wurde ein bereits durch Genkartierung eingegrenzter Bereich als Startpunkt der Analyse gewählt. Über die funktionelle Analyse des GCA2 Proteins sollte dann die molekulare Rolle des Proteins im ABA-Signalweg eingehend betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden: DNA und RNA

2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme und ihre Kultivierung

Stamm	Genotyp	Resistenz	Quelle
DH5 α	F-, ϕ 80dlacZ_M15, (lacZYA-argF) U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk-, mk+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1	keine	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Tetracyclin	Invitrogen (Karlsruhe)

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten jeweils bei 37 °C.

Die Selektion von Transformanden erfolgte durch Zusatz der jeweiligen Antibiotika zum Nährmedium.

LB-Medium

0,5% (w/v) Hefeextrakt
 1,0% (w/v) Pepton
 1,0% (w/v) NaCl
 1,5% (w/v) Agar (nur für Festmedium)
 autoklavieren, pH-Wert 7,0.

Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C wurden Antibiotika zugegeben.

Ampicillin: 100 mg/l (Stocklösung 100 mg/ml in sterilem H₂O)

Kanamycin: 50 mg/l (Stocklösung 50 mg/ml in sterilem H₂O)

2.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Quelle
C58pGV3101	Ti-Plasmid : pMP90 (Koncz und Schell 1986)	Rifampicin und Gentamycin	Csaba Koncz (MPI Köln)

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten jeweils bei 28 - 30 °C.

Die Selektion von Transformanden erfolgte durch Zusatz der jeweiligen Antibiotika (siehe oben) und zusätzlich dem Antibiotikum Rifampicin (12,5 mg/l Endkonzentration) zum Nährmedium.

Die Lagerung von *E. coli*- bzw. Agrobakterium-Stämmen erfolgte in Glycerol (je 500 µl Flüssigkultur mit 500 µl 87% (v/v) Glycerin steril) bei -80 °C.

2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

Chemisch kompetente Zellen (*E. coli*):

Eine 250 ml-Kultur von DH5α-Zellen (Stammsammlung #62, siehe Anhang) wurde in Medium A bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Nach 10-minütigem Abkühlen der Kultur auf Eis wurden die Zellen 15 min in einem Beckman JA-10 Rotor bei 4000 rpm (2500 × g) und 4°C abzentrifugiert und in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. Nach einer zweiten Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert und in 10 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. In die Zellsuspension wurde 0,7 ml DMSO eingerührt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 200 µl-Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Medium A

20 g/L Bacto Trypton
5 g/L Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

TB-Medium

10 mM PIPES pH 6,4
55 mM MnCl₂
15 mM CaCl₂
250 mM KCl

Elektrokompetente Zellen (*E. coli* bzw. *A. tumefaciens*):

Nach Anziehen von 500 ml-ÜN-Kulturen (Stammsammlung #845) wurden diese bei einer OD₆₀₀ von 0,5-1 zuerst auf Eis abgekühlt, dann 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 ml eiskaltem A. bidest gewaschen und erneut 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach einmaliger Wiederholung dieses Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurden die Pellets jeweils in 20 ml 10% (v/v) Glycerol (steril) resuspendiert und erneut bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 3 ml 10% (v/v) Glycerol (steril) aufgenommen und als Aliquote von 200 µl nach Schockgefrieren in flüssigem N₂ bei -80°C gelagert.

2.1.4 Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA

Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen:

Vor der Transformation wurden die chemisch kompetenten DH5 α -Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 μ l bis 10 μ l der zu transformierenden DNA gemischt und 30 min auf Eis stehen lassen. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42 °C im Wasserbad, danach wurde jeder Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 800 μ l LB-Medium versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h unter Schütteln bei 37 °C wurden die transformierten Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen ausplattiert.

Transformation von *E. coli*-/*A. tumefaciens*-Zellen über Elektroporation:

Die in bidestillierten Wasser gelöste DNA wurde in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt und auf Eis vorgekühlt. Von der auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension wurde 100 μ l (*E. coli*) bzw. 100 μ l (*A. tumefaciens*) zur DNA zugegeben und der ganze Ansatz gemischt. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Bei einem Abstand der Küvettenelektroden von 0,2 cm wurden folgende Elektroporationsparameter eingestellt:

<u><i>E. coli</i>:</u>	<u><i>A. tumefaciens</i></u>
V = 1800 V	V = 2500 V
C = 25 μ F	C = 25 μ F
R = 200 Ω	R = 700 Ω
T = 5 ms	T = 17.5 ms

Nach dem Impuls wurden 800 μ l YM- oder SOC-Medium zugegeben, gemischt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß zurücküberführt. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 2 h bei 28 °C (*A. tumefaciens*) im Thermoinkubator geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit entsprechender Selektion ausplattiert und bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*A. tumefaciens*) inkubiert.

YM-Medium

0,4 g/l Hefeextrakt
10 g/l Mannitol
1,7 mM NaCl
0,8 mM 1M MgSO₄*7H₂O
2,2 mM K₂HPO₄*3H₂O
pH 7,0 , autoklavieren

SOC-Medium

20 g/L Bacto Trypton
5 g/L Hefeextrakt
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄
20 mM Glucose
autoklavieren

2.1.5 Methoden für die DNA-Isolation

2.1.5.1 Plasmid-Isolierung aus Mikroorganismen (*E. coli*)

2.1.5.1.1 DNA-Minipräparation aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA über alkalische Lyse wurden 4 ml einer Bakterienübernachtskultur 5 min bei 4000 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl GTE-Puffer (Lösung 1) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl stark alkalischem Lysepuffer (Lösung 2) wurden die Bakterien 5 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 250 µl 3M Natriumacetat, pH 4,8 (Lösung 3) wurden genomische DNA und Proteine ausgefällt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 16000×g (14000 rpm) wurde der Überstand mit 1ml eiskaltem (- 20°C) 96 %igen Ethanol versetzt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte 15 min lang bei -20°C. Anschließend wurde 15 min bei 14000 × g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) EtOH gewaschen und nach 5-minütiger Zentrifugation bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl Aqua bidest. oder 0,1 × TE-Puffer, der 25 µg/ml RNase enthielt, gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch oder über ein Agarosegel bestimmt.

Lösung 1 (GTE-Puffer)

50 mM Glucose
10 mM EDTA (pH=8,0)
25 mM Tris-HCl (pH=8,0)

Lösung 2 (Lysepuffer)

0,2 M NaOH
1% SDS

Lösung 3

3 M NaAc (pH 4,8-5,2)

0,1 × TE-Puffer

1 mM Tris HCl pH 8
0,1 mM EDTA

Ethanol (96 %ig (-20°C) und 70 %ig)

2.1.5.1.2 DNA-Midipräparation aus *E. coli*

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA, die sowohl für Klonierungszwecke als auch zur transienten Expression in Protoplasten eingesetzt werden kann, wurde DNA aus 100 ml ÜN-Kultur mit dem JetStar®-MIDI Kit (GENOMED, Löhne) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.1.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen

Zur Abschätzung der DNA-Konzentration der verschiedenen isolierten DNAs wurde eine 100-fache Verdünnung der DNA mit H₂O hergestellt und eine Absorptionsmessung bei 260 nm in einem Zweistrahlphotometer durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes $c=A \cdot d^{-1} \cdot \epsilon^{-1}$. Bei einer Schichtdicke (d) von 1 cm und einem Extinktionskoeffizienten für doppelsträngige DNA von $\epsilon=20 \mu\text{l} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ergibt sich beispielsweise bei $A_{260\text{nm}}=1$ eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ für eine unverdünnte DNA-Lösung.

2.1.5.3 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung genomischer Pflanzen-DNA im kleinen Maßstab aus einzelnen Keimlingen oder Pflanzenorganen (meistens ein einzelnes Blatt) wurde nach einem modifizierten Protokoll, welches CTAB zur DNA-Perzipitation verwendet, durchgeführt (Murray und Thompson 1980).

Die so isolierte DNA wurde als *template* für PCR-Reaktionen eingesetzt, um Pflanzen zu genotypisieren und die *gca2-1* Mutante zu sequenzieren.

2 × CTAB Puffer

2% Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromid (CTAB)
1,4 M NaCl
100 mM Tris HCl pH 8,0
20 mM EDTA
nicht autoklavieren!

0,1 × TE-Puffer + RNase

1 mM Tris HCl pH 8
0,1 mM EDTA
0,2 mg/ml RNase

Chloroform

Isopropanol

EtOH (70 %ig)

Eine geringe Menge Pflanzenmaterial (z. B. ein *Arabidopsis*-Blatt oder ein *Arabidopsis*-Keimling) wurde in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff mit einem Glasstab zu Pulver zerrieben. Direkt im Anschluss wurde 300 μl vorgewärmter 2 × CTAB Puffer zugegeben und die Ansätze bei 65°C inkubiert (t > 30 Minuten), dann wurde der Ansatz abgekühlt und 300 μl -Chloroform dazupipettiert.

Um wässrige und organische Phase voneinander zu trennen, wurden die Ansätze gevortext und bei $16000 \times g$ (14000 rpm) zentrifugiert, dann wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Zur Fällung der pflanzlichen DNA wurde 300 μl Isopropanol zugegeben, gut gemischt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4°C). Der darauffolgende Waschschrift wurde mit 70% (v/v) Ethanol durchgeführt, das Pellet getrocknet und in 50 μl 0,1 TE-Puffer + RNase aufgenommen und erst 30 min bei 37°C und danach 15 min bei 65°C inkubiert. Von der so erhaltenen DNA wurde 1 μl als *template* bei PCR-Ansätzen (siehe unten) verwendet.

2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zum Klonieren und Sequenzieren wurde mit einer *proof-reading* Polymerase (*High Fidelity Polymerase*, Roche) durchgeführt. PCR zur Genotypisierung von Pflanzen und für RT-PCRs wurden mit der GoTaq[®]-Polymerase (Promega) durchgeführt

Ein typischer PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Komponente	Endkonzentration	Volumen [μl] für einen 20 μl Ansatz
<i>template</i>	1 – 20 ng	1
10x Puffer [†]	1x	2
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 mM	1
Forward-Primer (20 μM)	1 μM	1
Reverse-Primer (20 μM)	1 μM	1
DNA-Polymerase (5U/ μl)	0,5 U	0,1
Mit MQH ₂ O auf 20 μl auffüllen.		

[†] für die GoTaq[®] Polymerase wurden 4 μl eines 5x Puffers verwendet.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im TGradient-Cycler (Biometra) durchgeführt:

Dauer	Temperatur	Vorgang	Anzahl der Zyklen
3 min	94°C	Denaturierung	1
30 sek	94°C	Denaturierung	30 [†]
30 sek	$42-63^\circ\text{C}$ [§]	Primer-Annealing	30 [†]
1 min [‡]	72°C	Elongation	30 [†]
5 min	72°C	finale Elongation	1

[†] je nach verwendeten Primern variierte die Zyklanzahl zwischen 28 und 35 Zyklen

[§] Die benötigte Annealingtemperatur für einen Primer lässt sich aufgrund seines GC-Gehaltes (Anteil der organischen Basen Guanin und Cytosin in Prozent) und seiner Länge in Basenpaaren (PL) näherungsweise durch folgende Formel berechnen:

$T_m = 64,3^\circ\text{C} + 0,41 \times \text{GC\%} - 650/\text{Länge des Primers.}$

[‡] Die zu wählende Elongationszeit ist von der Länge des Amplifikats abhängig: Als Faustregel gilt 1 min/kb Länge.

2.1.7 Kolonie-PCR

Für die schnelle und effiziente Überprüfung von transformierten Plasmiden in *E. coli* wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden 10 µl ddH₂O in die PCR-Gefäße vorgelegt und etwas Material einer frischen Kolonie des entsprechenden Stammes mit einer sterilen Pipettenspitze darin resuspendiert. Der PCR-Ansatz wurde wie oben beschrieben pipettiert. Zur Zerstörung der Zellen und zur Gewährleistung der kompletten Denaturierung wurde der erste Schritt der PCR-Reaktion auf 10 Minuten bei 95 °C verlängert.

2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR- und Klonierungsprodukte sowie für die Isolation von Vektoren und PCR-Produkten nach der Restriktionsspaltung diente die Agarose-Gelelektrophorese. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Molekülgröße erfolgte bei Agarose-Konzentrationen von 0,8% bzw. 2,0% (w/v) in 1xTAE als Elektrophorese-Puffer. Für die Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde den Gelen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V Gleichspannung in der Gelkammer. Als Größenstandards diente entweder mit *HindIII* gespaltene λ-DNA oder verschiedene kommerziell vertriebene DNA-Marker (siehe unten). Vor dem Probenauftrag in die Gelkammern wurden die DNA-Proben mit 6 x Gelladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1xTAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 5 µl Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt und das Gel gegossen.

EtBr-Stammlösung: 100 mg Ethidiumbromid in 10 ml dH₂O

Gelladepuffer (6fach Orange G): 50% (v/v) Glycerin
0,25% (w/v) Orange G
1 mM EDTA (pH 8,0)

50fach TAE-Puffer: 2 M Trisbase
5,71% (v/v) Eisessig
50 mM EDTA pH 8,0

2.1.9 Verwendete Größenstandards

λ -HindIII-Marker	eigene Herstellung [†]
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas
100 bp ladder	MBI Fermentas
100 bp ladder PLUS	MBI Fermentas
<i>Ultra low</i> DNA ladder	MBI Fermentas

[†] 300 μ l λ -DNA (300 μ g/ μ l) wurden in einem Endvolumen von 1600 μ l für 1 Stunde bei 37°C mit HindIII verdaut. Im Anschluss wurde das Enzym hitzeinaktiviert (20 min, 65°C) und der Ansatz mit 200 μ l Gelladepuffer versehen (Endkonzentration: 50 ng/ μ l).

2.1.10 Aufreinigung von DNA

Ethanol-Fällung

Für die Präzipitation wurden DNA-haltige Lösungen mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100%igen Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte für 60 min bei -20°C. Die DNA wurde durch Zentrifugation (30 min, 16.000 x g, 4°C) pelletiert und nach Entfernung des Überstandes mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung des DNA-Pellets an der Luft oder unter Vakuum erfolgte die Resuspension in ddH₂O.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 316$ nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution aus der Gelmatrix erfolgte mit dem Peqlab Gel Extraktions Kit (Peqlab®) nach den Angaben des Herstellers.

2.1.11 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Für das Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von New England BioLabs (NEB) und von MBI Fermentas verwendet. Für Analysen zur Überprüfung von Plasmidgrößen und ligierten DNA-Fragmenten wurde 0,5–1 μ g DNA eingesetzt. Beim Verdau von PCR-Amplifikaten wurde der gesamte, vorher über Gelextraktion gereinigte PCR-Ansatz verwendet. Jeder Verdauansatz enthielt neben dem entsprechenden Puffer 1-2 U Restriktionsenzym pro μ g Plasmid-DNA. Beim Verdau genomischer DNA wurden 5 U pro μ g DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte nach Angaben des Herstellers für die jeweiligen Enzyme. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde über Agarosegele geprüft.

2.1.12 Auffüllen von Einzelstrang-DNA Überhängen (Klenow)

Um durch Restriktionsverdau entstandene einzelsträngige DNA-Überhänge am 3'- und am 5'-Ende zu glätten, wurde das Klenow Fragment (DNA Polymerase I *Large Fragment*, MBI Fermentas) benutzt, welches aufgrund seiner 3'-5'-Exonuklease-Aktivität Einzelstrangüberhänge am 3'-Ende entfernen und aufgrund seiner 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität Überhänge am 5'-Ende auffüllen kann. Diese Reaktion erfolgte 15 min bei 37°C unter empfohlenen Pufferbedingungen mit 10 *units* Enzym / µg DNA und wurde anschließend durch Zugabe von 20 mM EDTA sowie einer 20-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt.

2.1.13 Dephosphorylierung geschnittener DNA

Um die Religation linearisierter DNA-Fragmente einzuschränken, wurden die entsprechenden komplementären DNA-Enden dephosphoryliert. Ein typischer Dephosphorylierungsansatz enthielt 1-2 µg linearisierte DNA, 1-2 U Alkalische Phosphatase (AP, *alkaline phosphatase*, NEB) sowie 1 × Puffer in einem Gesamtvolumen von 15 µl. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37°C für 5-30 min, anschließend wurde das Enzym durch eine 20-minütige Hitzeinaktivierung bei 65°C gestoppt.

2.1.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA Fragmenten mit linearisiertem Vektor wurde ein molares Verhältnis von Vektor:Insert von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem 10 µl Ansatz mit der T4 Ligase (Fermentas) in dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer. Der Ansatz wurde entweder für 1 h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.1.15 Site directed mutagenesis

Um gezielt Mutationen in bereits vorhandene Vektoren einzuführen oder eine beim Klonieren entstandene Mutation wieder in die Originalsequenz zurückzuführen, wurde die Methode der *site-directed mutagenesis* genutzt. Dazu wurden *forward* Primer an der zu mutierenden Stelle kreiert, die die einzuführende Mutation tragen und jeweils rechts und links dieser mit mindestens 15 bp an die Ausgangssequenz binden. Die dazugehörigen *reverse* Primer sind in ihrer Sequenz *revers* komplementär zu den vorwärts Primern. Beide Primer binden also an den entgegengesetzten Strang der

gleichen DNA-Sequenz und die Amplifikation dieser läuft dann in unterschiedliche Richtungen. Als *template* der PCR wurden 50 ng des zu mutierenden Plasmidvektors eingesetzt. Nach 20 PCR-Zyklen mit der Ultra Pfu II[®] (Stratagene) wurde der PCR-Ansatz mit dem Restriktionsenzym *DpnI* geschnitten. Dieses Enzym schneidet nur methylierte DNA der Sequenz GA^{CH3}TC. Die Sequenz GATC wird in den *E. coli* Stämmen DH5 α und XL1-blue durch das dam-Methylase-System methyliert, so dass die als *template* eingesetzte Vektor-DNA, da sie in diesen Stämmen generiert wurde, durch das Enzym geschnitten wird. Das neu amplifizierte PCR-Produkt weist jedoch keine Methylierung an dieser Stelle auf, und bleibt deshalb unverdaut. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 80°C kann der PCR-Ansatz direkt zur Transformation in XL1-blue Zellen verwendet werden. Die beiden amplifizierten Einzelstränge des Plasmids lagern sich durch ihre homologen Bereiche aneinander an und die noch vorhandenen Bruchstellen der beiden Einzelstränge können in den *E. coli* Zellen ligiert werden, so dass wieder ein funktionsfähiger Vektor entsteht.

2.1.16 Verwendete Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma MWG-Operon (www.eurofinsdna.com). Die in lyophilisierter Form gelieferten Oligonukleotide wurden in ddH₂O so gelöst, dass eine Konzentration von 100 pmol/ μ l erreicht wurde. Die Aufbewahrung der gelösten Oligonukleotide erfolgte bei -20°C.

Im Anhang findet sich eine komplette Liste dieser Oligonukleotide samt ihrer numerischen Zuordnung in der Primerliste des Labors.

2.1.17 Vektoren und Plasmide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und klonierten Plasmide sowie die entsprechenden *E. coli*-Stämme sind im Anhang samt numerischer Registrierung in der Stammsammlung zu finden.

Die in dieser Arbeit neu klonierten Konstrukte sind dort gekennzeichnet und die jeweiligen Klonierungsstrategien im folgenden kurz beschrieben.

2.1.17.1 Klonierungsstrategien

psK::GCA2 (#1333)

Ein 5,4 kb großes genomisches Fragment aus *Landsberg erecta* wurde mit den Primern 110 und 111 amplifiziert und über *SalI* in den psK-Vektor (Stammsammlung Nr. # 400) kloniert.

psK::gca2 (#1346)

Der Vektor #1333 wurde über *site-directed-mutagenesis* mit den Primern 137 und 138 so modifiziert, dass die *gca2*-Mutation wieder eingeführt wurde.

psK::GCA2mutSTOP (#1344)

Der Vektor #1333 wurde über *site-directed-mutagenesis* mit den Primern 132 und 133 so modifiziert, dass im Leseraster des *GCA2* Gens an Stelle des Lys¹⁰² ein STOP-Codon entsteht (K¹⁰²→*)

pBI121Ascl::GCA2 (#1348)

Die genomische *GCA2*-DNA wurde mit den Primern 126 und 127 vom Vektor pSK::GCA2 (#1333) amplifiziert, *Ascl* verdaut und in den Vektor pBI121Ascl (#427) über die dortige *Ascl* Schnittstelle kloniert. Das Inset hat die selbe Orientierung wie das *npt2* Gen des Vektors. Das Plasmid wurde in *A. tumefaciens* eingebracht (Stamm-Nr. #1352).

pBI121Ascl::gca2 (#1351)

Die genomische *GCA2*-DNA wurde mit den Primern 126 und 127 vom Vektor pSK::gca2 (#1346) amplifiziert, *Ascl* verdaut und in den Vektor pBI121Ascl (#427) über die dortige *Ascl* Schnittstelle kloniert. Das Inset hat die selbe Orientierung wie das *npt2* Gen des Vektors. Das Plasmid wurde in *A. tumefaciens* eingebracht (Stamm-Nr. #1353).

pSpyNe::35S::GCA2 (#2140)

Die *GCA2* CDS wurde mit den Primern 301 und 148 amplifiziert und mit *BamHI* und *SmaI* verdaut. Der Vektor pSpyNe::RCAR1 (#1316) wurde ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut und das RCAR1 Gen so durch *GCA2* ersetzt.

pSpyCe::35S::GCA2 (#2143)

Die *GCA2* CDS wurde mit den Primern 301 und 148 amplifiziert und mit *BamHI* und *SmaI* verdaut. Der Vektor pSpyCe::RCAR1 (#1317) wurde ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut und das RCAR1 Gen so durch *GCA2* ersetzt.

psK::35S::GCA2::GFP (#2146)

Die GCA2 CDS wurde mit den Primern 293 und 148 amplifiziert und mit *SalI* und *SmaI* verdaut. Der Vektor pSK::35S::EGFP (#1338) wurde ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut und das GCA2 Gen N-terminal des GFPs kloniert.

pBI221::35S::GCA2 (#2452)

Die GCA2 CDS wurde mit den Primern 301 und 309 amplifiziert und mit *BamHI* und *SacI* verdaut. Das GUS-Gen des Vektors pBI221 (#813) wurde durch Verdau des Vektors mit den gleichen Enzymen entfernt und durch das GCA2 Gen ersetzt.

pBI221::35S::GCA2-VK(#2454)

Ein Teil der GCA2 CDS wurde mit den Primern 301 und 399 amplifiziert und mit *BamHI* und *SacI* verdaut. Das so entstandene PCR-Produkt ist eine verkürzte Version des GCA2 Gens, bei der das Gln³⁴⁷ durch eine Mutation im *reverse* Primer (399) durch ein Stop-Codon ersetzt wurde (Q³⁴⁷→*). Das GUS-Gen des Vektors pBI221 (#813) wurde durch Verdau des Vektors mit den gleichen Enzymen geschnitten und durch das verkürzte GCA2 Gen ersetzt.

pSK_AscI::EGFPocs (#1400)

Die EGFP-ocs Kasette wurde aus dem Vektor pSK::35S::EGFP (#1338) mit *SpeI* und *HindIII* isoliert und in den ebenfalls mit *SpeI* und *HindIII* geschnittenen Vektor pSK_AscI kloniert, so dass die EGFP-Kasette nun durch *AscI*-Schnittstellen flankiert ist.

pSK_AscI::pGCA2::GCA2::GFP (#1424)

Die genomische GCA2-Sequenz mit endogenen Promotor (pGCA2) und ohne Stop-Codon wurde mit den Primern 110 und 148 vom pSK::GCA2-Plasmid (#1333) amplifiziert und mit *SalI* und *XmaI* verdaut und anschließend in den ebenfalls mit *SalI* und *XmaI* geschnitten Vektor pSK_AscI::EGFPocs (#1400) kloniert.

pBI112::PGCA2::GCA2::GFP (#1436)

Das GCA2-GFP-Fragment wurde durch *AscI* aus dem Vektor pSK_AscI::pGCA2::GCA2::GFP (#1424) geschnitten und in ein ebenfalls mit *AscI* geschnittenen Vektor pBI121AscI (#427) kloniert. Das Plasmid wurde in *A. tumefaciens* eingebracht (Stamm-Nr. #1466).

pSK_AscI::pGCA2::gca2::GFP (#1426)

Die genomische GCA2-Sequenz mit endogenem Promotor (pGCA2) und ohne Stop-Codon wurde mit den Primern 110 und 148 vom pSK::gca2-Plasmid (#1346) amplifiziert und mit *SalI* und *XmaI* verdaut und in den ebenfalls mit *SalI* und *XmaI* geschnittenen Vektor pSK_AscI::EGFPocs (#1400) kloniert.

pBI112::PGCA2::GCA2::GFP (#1438)

Das GCA2-GFP-Fragment wurde durch *AscI* aus dem Vektor pSK_AscI::pGCA2::gca2::GFP (#1426) geschnitten und in ein ebenfalls mit *AscI* geschnittenen Vektor pBI121AscI (#427) kloniert. Das Plasmid wurde in *A. tumefaciens* eingebracht (Stamm-Nr. #1467).

pSK::pGCA2::GUS (#1409)

Der pRD29b-Promotor des Vektor pSK_AscI::pRD29b::GUS (#1323) wurde durch den pGCA2-Promotor mit mutierter 5`UTR ersetzt. Dieser wurde mit den Primern 165 und 166 aus dem Vektor pSK::GCA2 (#1333) amplifiziert und mit *SacI* und *BamHI* verdaut

pSK::pgca2::GUS (#1411)

Der pRD29b-Promotor des Vektor pSK_AscI::pRD29b::GUS (#1323) wurde durch den pGCA2-Promotor mit mutierter 5`UTR (pgca2) ersetzt. Dieser wurde mit den Primern 165 und 166 aus dem Vektor pSK::gca2 (#1346) amplifiziert und mit *SacI* und *BamHI* verdaut.

pSK::pGCA2::LUC (#1440, #2448)

Das GUS-Gen des Vektors pSK::pGCA2::GUS (#1409) wurde über *BamHI* und *SacI* durch das Luciferase-Gen des Vektors pSK35SS1LUC (#665) ersetzt. Von diesem Vektor existieren zwei Varianten: Der Ausgangsvektor 1440, hat noch ein ca. 50 bp lange Fremd-DNA Sequenz zwischen den pGCA2-Promotor und dem Luciferase-Startcodon. Diese wurde durch PCR des ganzen Plasmids ohne diesen Bereich mit den Primern 207 und 208 über die *unique BamHI* Schnittstelle des Vektors entfernt. Diese Konstrukt (#2448) besitzt eine fünf bis sechs fach höhere Luciferaseaktivität als das Ausgangskonstrukt und wurde deshalb in sämtliche transienten Experimenten verwendet.

pSK::pgca2::LUC (#1442, #2450)

Das GUS-Gen des Vektors pSK::pgca2::GUS (#1411) wurde über *BamHI* und *SacI* durch das Luciferase-Gen des Vektors pSK35SS1LUC (#665) ersetzt. Mit diesem

Vektor wurde analog dem oben beschriebenen Vektor pSK::pGCA2::LUC verfahren und ebenfalls nur das verkürzte Konstrukt #2450 für die Experimente verwendet.

pSK::p35S::GCA2-5' UTR::LUC (#2392)

Um die GCA2-5'UTR zwischen den p35S-Promotor und das Luciferase Gen zu klonieren, wurde als erstes der p35S-Promotor aus dem Vektor pBI221 (#813) mit den Primern 402 und 403 amplifiziert und mit *SacII* und *XbaI* verdaut. Dieses Fragment wurde in den in den pSK_AscI Vektor (#425) kloniert. Als nächstes wurde die 5' UTR des GCA2 Gens aus dem Vektor #1333 mit den Primern 404 und 405 amplifiziert und *via XbaI* und *BamHI* in den oben generierten Vektor kloniert. Nun wurde das Luciferase Gen so durch die Primer 400 und 425 vom Vektor pSK35SS1LUC (#665) amplifiziert, dass das Umfeld des Start-Codons, dem des endogenen GCA2 Gens, entspricht. Dazu wurde die *BamHI*-Klonierungsstelle hinter das Startcodon verlegt, was zu zwei Basenaustauschen in der Luciferase CDS führt ($E^2 \rightarrow D$ und $D^3 \rightarrow P$), welche aber keinen merklichen Einfluss auf die Aktivität haben. Dies PCR-Produkt wurde nun mit *BamHI* und *SalI* in den vorbereiteten Vektor kloniert.

psK::p35S::gca2-5' UTR::LUC (#2456)

Dieser Vektor wurde analog dem Vektor #2392 kloniert, einzig die mutierte 5'UTR wurde vom Vektor pSK::gca2 (#1346) amplifiziert.

2.1.18 RNA-Isolation aus *Arabidopsis*-Keimlingen

Für Experimente, die RNA-Material mit hohem Reinheitsgrad erforderten, wurden auf ½ MS-Agarose-Platten angezogene, 5 d alte Keimlinge zur Isolierung von Gesamt-RNA benutzt. Dabei wurden pro Probe 100 mg Pflanzenmaterial aus Keimlingen verwendet, deren RNA über die Säulen eines RNA-Isolationskits (Rneasy®, Quiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt wurde

2.1.19 Konzentrationsbestimmung RNA-haltiger Lösungen

Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurden zuerst photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Absorption einer 1:100 Verdünnung jeweils bei 260 und 280 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte im Anschluss anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für RNA, $\epsilon=25 \mu\text{l} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Die Verunreinigung mit Proteinen wurde über den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$

bestimmt, der im Optimalfall im Bereich von 1,8-2 liegen sollte. Alle RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.1.20 Reverse Transkription von RNA und RT-PCR

Das Umschreiben von mRNA in cDNA erfolgte unter Nutzung der reversen Transkriptase M-MuLV mit einem cDNA-Synthese-Kit (First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas). Als Ausgangsmaterial für RT-PCRs wurde bei der reversen Transkription jeweils 1 µg Gesamt-RNA zum Umschreiben in cDNA eingesetzt. Zum Umschreiben der RNA wurden entweder OligodT-Primer und/oder Random-Hexamer Primer verwendet. Die cDNA Synthese wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Von dieser so synthetisierten cDNA wurden 0,5 µl bis 1 µl als *template* in einer PCR eingesetzt. Zur Quantitätsbestimmung der cDNA wurden Actin-Primer verwendet und die PCR mit 28 Zyklen gefahren. Die PCRs mit den jeweiligen Gen-spezifischen Primern wurde an die jeweilige Signalintensität angepasst.

Der Nachweis der aus den cDNA-Templaten erhaltenen PCR-Amplifikate erfolgte über Auftrennung in Agarosegelen mit EtBr-Färbung.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinextraktion aus Pflanzen

Für die Analyse des Zellrohextraktes von *Arabidopsis* wurden Keimlinge oder Blätter adulter Pflanzen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gemörsert. Zu diesem zerkleinerten Pflanzenmaterial wurden 250 µl bis 300 µl 2D-Puffer hinzugegeben und die Proben anschließend für 15 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proben 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand als Rohextrakt für die weiteren Analysen verwendet.

2D-Puffer : 50 mM Tris/HCl (pH 6,8)
 2 % SDS
 36 % Harnstoff (8 M)
 30 % Glycerol
 5 % β-Mercaptoethanol
 0,5 % Bromphenolblau
 1,25 mM NaOH

2.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte im SDS- Gel durch Färbung mit Coomassie-Lösung und BSA-Lösungen definierter Konzentration als Standard (Ramagli 1985).

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese nach (Laemmli 1970) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in Elektrophorese-Einheiten (PerfectBlue Doppelsystem Twin ExW S) der Firma peqlab mit einem 12- bzw. 10%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit Laemmli-Puffer versehen und für 5 min bei 95°C gekocht. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 120 V.

	12% Trenngel	10% Trenngel	4% Sammelgel
Acrylamidlösung	4,0 ml	3,35 ml	390 µl
dH ₂ O	3,35 ml	4,0 ml	2,3 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	255 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	3 µl
APS	50 µl	50 µl	15 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	3 ml

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

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

SDS-Lösung: 10% (w/v) SDS

TEMED: unverdünnt

APS-Lösung: 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Elektrodenpuffer (1x): 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS

6 x Laemmli-Puffer: 0,3 M Tris/HCl, pH 6,8

10% (w/v) SDS
30% (v/v) Glycerol
0,1% (w/v) Bromphenolblau
100 mM DTT

2.2.4 Verwendete Größenstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

2.2.5 Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde für mindestens 1 h in der Coomassie-Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Für die Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel zuerst für 1-3 h in Entfärbelösung und im Anschluss in ddH₂O unter Schütteln inkubiert.

Färbelösung: 0,2 g Coomassie R250
0,05 g Coomassie G250
10% Eisessig
0,8% EtOH

Entfärbelösung: 10% Eisessig
45% EtOH

2.2.6 Western Blot

Nach der SDS-Page wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Whatman, Schleicher&Schuell, Protran, Drassel, Deutschland) im semi-dry Blotverfahren transferiert. Die Membran und sechs Lagen Filterpapier (Whatmann®) wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in Transferpuffer gelegt. Auf die Blotapparatur (Anode) wurden luftblasenfrei zuerst drei Lagen Filterpapier, dann die Membran, anschließend das SDS-Gel und abschließend wieder drei Lagen Filterpapier gelegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 25V.

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl
192 mM Glycin
20% Methanol
pH-Wert 8,3

2.2.7 Immunologischer Nachweis

Nach dem Transfer wurde die Membran in 4°C in der Blockierungslösung inkubiert. Dadurch konnten unspezifische Bindungsstellen des primären Antikörpers auf der Membran abgesättigt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran für 1 h bei RT mit dem primären Antikörper. Nach dem Waschen (3 x 5 min)

mit 1x TBST wurde die Membran für 1 h im sekundären Antikörper geschwenkt, bevor sie abschließend drei Mal für 15 min mit 1 x TBST gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte mit dem Pierce Super Signal West Femto Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Lichtdetektion erfolgte mit einer CCD-Kamera (ORCAII ERG, Hamamatsu Photonics, <http://jp.hamamatsu.com>) und der SimplePCI Imaging Software (Version 5.0.0.1503, Compix Inc., Imaging Systems, USA).

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

TBST: 1x TBS
0,05% Tween 20

Blockierungslösung: 5% (w/v) Milchpulver in 1xTBS/T

2.2.8 Antikörper

Primärer Antikörper	Firma/Quelle	Verdünnung in Western Blot-Analyse
Mouse-anti- α -GFP	Santa-Cruz (USA)	1:1.000
Rabbit-anti- α -GCA2	Diese Arbeit, Hersteller : Genescript [®]	1:1.000

Sekundärer Antikörper	Firma/Quelle	Verdünnung in Western Blot-Analyse
Goat-anti mouse	Pierce (USA)	1:10.000
Goat-anti rabbit	Pierce (USA)	1:10.000

2.3 Physiologische Methoden

2.3.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

In dieser Arbeit wurden die zwei verschiedene *Arabidopsis thaliana* Ökotypen *Landsberg erecta* (*Ler*) und *Columbia* (*Col*), so wie einige in diesen Ökotypen generierten Mutanten (*gca2-1*, *gca2-2*, *gca2-3*, *aba-2*, und *abi1-1*) verwendet. Die Anzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Conviron, Kanada) unter Langtagbedingungen von 16 h Licht ($\sim 180 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22°C, 65% Luftfeuchtigkeit) und 8 h Dunkelheit (17°C, 75% Luftfeuchtigkeit) in einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ T). Unter diesen Bedingungen lag die Generationszeit bei 6-8 Wochen.

2.3.2 Sterilisation von *Arabidopsis*-Samen

Für die sterile Anzucht wurden *Arabidopsis*-Samen zunächst 3 min in einer 4 %igen (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung und dann 20 min in einer Lösung aus 80% (v/v) Ethanol und 0,1% (v/v) Triton-X 100 bei RT geschüttelt. Abschließend wurden die Samen mindestens fünf Mal mit sterilem ddH₂O gewaschen und unter der Sterilbank auf MS-Platten ausgebracht.

Um die eventuell noch vorhandene Dormanz zu brechen, wurden die Platten mit den Samen vor der Kultivierung 1-2 Tage bei 4°C gelagert. Die Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen auf Agar-Platten erfolgte im Zellkulturraum unter Dauerlicht (50 μE × m⁻² × s⁻¹, 23°C) auf einem kombinierten Pflanzenwachstumsmedium, das neben 1% Saccharose und 0,1% MES-Puffer Makrosalze entsprechend dem 1 × MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) sowie Mikrosalze und entsprechend dem 1 × B5-Medium (Gamborg et al. 1968) enthielt. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren 10 g/l Agar zu einer 1 x MS-Lösung hinzugeben. Die Zugabe von Antibiotika (20 mg/ml Kanamycin) bzw. ABA (0,1-25 μM) erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 60°C. Für die Analysen der ABA-abhängigen Genexpression (RT-PCR) wurden Platten mit 10g/l Agarose anstelle des Agars gegossen. Alle Platten wurden vor Benutzung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

10 × MS-Makrosalze

16,5 g/l NH₄NO₃
 19 g/l KNO₃
 3,32 g/l CaCl₂
 1,7 g/l KH₂PO₄
 3,7 g/l MgSO₄ × 7 H₂O

400 × B5-Mikrosalze

0,01 g/l CoCl₂ × 6 h₂O
 0,01 g/l CuSO₄ × 5 H₂O
 14,6 g/l Na₂EDTA
 1,2 g/l H₃BO₃
 0,3 g/l KI
 4 g/l MnSO₄ × 4 H₂O
 0,1 g/L Na₂MoO₄ × 2 H₂O
 0,8 g/l ZnSO₄ × 4 H₂O
 11,2 g/l FeSO₄ × 7 H₂O

1x MS-Medium:

100 ml/l 10 × MS-Makrosalze
 2,5 ml/l 400 × B5-Mikrosalze
 10 g/l Saccharose
 1 g/l MES
 pH 5,8 (KOH)
 autoklavieren

ABA-Stocklösung

10 mM ABA in 1% MES (≡ 47 mM), pH 7,5

2.3.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Die Methode des „floral dip“ wurde verwendet, um *Arabidopsis thaliana* einfach und schnell stabil zu transformieren (Clough und Bent 1998). Da die „gedipten“ Pflanzen transformierte Samen liefern, welche direkt selektiert werden können, entfällt bei dieser Methode die Regeneration von Pflanzen aus Gewebekultur.

Für die Transformation wurden 5-6 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen vom Ökotyp *Landsberg erecta* verwendet, die zu mehreren in Töpfen (9 × 9 cm) in einer Phytokammer angezogen wurden. Im Idealfall besaßen diese Pflanzen möglichst viele, nur teilweise geöffnete oder noch geschlossene und deshalb grüne Infloreszenzen.

Für die Transformation der *Arabidopsis*-Pflanzen wurden vorher über Elektroporation transformierte Agrobakterien (siehe 1.1.4) verwendet. Als binäre Ausgangsvektoren wurden dabei pBI121 Vektoren verwendet (Jefferson et al. 1987). Von den transformierten Agrobakterien wurden Vorkulturen mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht in LB-Medium mit Rifampicin (12,5 µg/ml) und zusätzlicher Selektion auf das enthaltene Plasmid (in der Regel Kanamycin, 50 µg/ml) bei 28-30°C inkubiert. Ausgehend von diesen frischen Vorkulturen wurde eine Hauptkultur von 200 ml LB-Medium ohne Selektion für 24 h bei 28-30°C angezogen. Diese wurden dann durch Zentrifugation (3000 × g, 4°C, 10 min.) geerntet und erst in 5 ml, dann insgesamt in jeweils ca. 300 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Die Infloreszenzen der Pflanzen wurden dann kopfüber in die Agrobakterium-Suspension eingetaucht und für 10 sek. mit den Zellen infiltriert, so dass alle Blüten mit der Zell-Suspension benetzt wurden. Gleichzeitig wurde der Kontakt der Agrobakterien-Suspension mit anderen Pflanzenteilen möglichst vermieden. Anschließend wurden die Infloreszenzen noch durch pipettieren mit der Agrobakterien-Suspension beträufelt.

Diese Transformationsprozedur wurde nach drei bis fünf Tagen identisch wiederholt, so dass auch Zellen transformiert werden konnten, die sich erst zu diesem Zeitpunkt im richtigen Entwicklungsstadium für die Transformation befanden. Die infiltrierten Pflanzen wurden bis zur Samenreife weiter kultiviert. Die geernteten Samen (T1) wurden mit Hilfe der entsprechenden Antibiotika auf MS-Platten selektioniert.

Infiltrationsmedium: 70 g/l Saccharose (7% Endkonzentration)
0,5 g/l MES
pH 5,8 (KOH)
500 µl/l Silwet L-77; (Lehle Seeds, Texas, USA)

2.3.4 Keimungsversuche

Die Analyse des Keimungsverhalten von *Arabidopsis*-Samen erfolgte auf MS-Platten mit verschiedenen ABA-Konzentrationen. Gleich alte Samen der zu analysierenden Pflanzen wurden sterilisiert und vereinzelt auf die jeweiligen Platten ausgebracht. Diese wurden dann für 24 h- 48 h im Kühlraum bei 4°C stratifiziert. Anschließend wurden die Platten horizontal in einem Kulturraum mit Dauerlicht ($50 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 23°C) zum Keimen gebracht. Die Keimung wurde, wenn nicht anders angegeben, nach 5 Tagen im Kulturraum ausgewertet. Dabei wurde der Durchbruch der Radicula durch die Samenschale als erfolgte Keimung gewertet.

2.3.5 Wurzelwachstumsversuche

Das Wurzelwachstum von Keimlingen auf ABA-haltigem Medium wurde analysiert, in dem auf normalem MS-Medium fünf Tage alte, vertikal gekeimte Keimlinge mit einer Federpinzette auf ABA-haltige MS-Platten umgesetzt wurden. Die Position der Wurzelspitze wurde mit einem Edding auf der Platte markiert. Diese Platten wurden weitere drei Tage vertikal im Kulturraum inkubiert. Das Wachstum der Wurzel während dieser Zeitspanne wurde zu Analyse Zwecken herangezogen. Die verwendeten ABA-Konzentrationen für diese Versuche betragen zwischen 10 μM und 30 μM .

2.3.6 Isolierung von *Arabidopsis*-Protoplasten

Die Protoplastenpräparation erfolgte nach modifizierten Protokollen (Abel und Theologis 1998; Sheen 2001). Zur Protoplastierung wurden etwa 4 Wochen alte, in Erde angezogene Pflanzen vom Ökotyp *Columbia* oder *Landsberg erecta* samt den zugehörigen Mutanten verwendet. Von diesen Pflanzen wurden 30-50 Blätter (2-3 g Frischgewicht) abgeschnitten und sofort in eine Petrischale mit 15 ml Enzymlösung überführt. Der Verdau des Blattmaterials erfolgte auf einem Kippschüttler in langsamer Schüttelbewegung bei RT für 3-5 h. Die entstandene Protoplasten-Suspension wurde durch ein Nylonnetz mit 150 μm Maschenweite zur Abtrennung unverdaulichem Materials in eine neue Petrischale filtriert und die Suspension mit abgeschnittenen blauen Spitzen in ein frisches Falcon®-Röhrchen pipetiert. Dann wurden 8 ml WIMK-Lösung zur Suspension pipetiert. Nach einer Zentrifugation bei RT und $60 \times g$ für 3 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig in 4 ml WIMK resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde mit gleichen Zentrifugationsbedingungen wiederholt und danach wurde das Protoplasten-Pellet in einer angemessenen Menge MaMg aufgenommen. Das Endvolumen wurde an die anschließend bestimmte Protoplasten-Konzentration angepasst. So wurden die Zellen zur Kontrolle ihrer

Vitalität mit Fluoresceindiacetat (FDA) angefärbt. Hierfür wurde 0,5 µl FDA zu 20 µl einer 1:10 verdünnten Protoplasten-Suspension gegeben. Mittels eines Hematocytometers wurde die Anzahl der fluoreszierenden Protoplasten pro Volumeneinheit mit einem Zeiss Axioskop und einem FITC Filtersatz (480 (40) nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 (50) nm Emissionsfilter) ermittelt. Als Richtwert entsprach 1 Protoplast/Kleinquadrat 4×10^6 Protoplasten/ml. Die Protoplastenkonzentration in der Suspension wurde mit MaMg der Zählung entsprechend auf Konzentration von $0,5-1 \times 10^6$ Protoplasten pro ml eingestellt. Zur Erzielung besserer Transformationsraten wurde die Protoplasten-Suspension anschließend für mindestens 30 min bei 4 °C aufbewahrt.

Enzymlösung 1 % (w/v) Cellulase „Onozuka“ R-10, (Yakult , Tokyo, Japan)
0,25 % (w/v) Macerozym R-10 (Yakult , Tokyo, Japan)
400 mM Mannit
8 mM CaCl₂
1% (w/v) BSA
5 mM MES-KOH (pH = 5,6)

Die Herstellung der Enzymlösung erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook und Russell 2001). Dabei wurde eine Stammlösung mit 2 % Cellulase, 0,5 % Macerozym und 10 mM MES-KOH (pH = 5,6) gegen 10 mM MES-KOH (pH=5,6) zweimal für je 40 min dialysiert und mit PMSF (0,5 mM) behandelt. Die für die Dialyse benötigten Schläuche wurden nach Standardprotokoll vorbereitet und bei 4 °C aufbewahrt (Sambrook und Russell 2001). Anschließend wurde Mannit und CaCl₂ zugesetzt und die Lösung bei 55 °C für 30 min inkubiert. Nach dem Zusatz von BSA und der Kontrolle des pH-Wertes wurde die fertige Lösung durch 0,22 µm Filter sterilfiltriert, zu jeweils 50 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

WIMK: 0,5 M Mannit
5 mM MES-KOH (pH = 5,8-6,0),
autoklavieren

MaMg: 400 mM Mannit
15 mM MgCl₂
5 mM MES-KOH (pH=5,6-5,8), autoklavieren

FDA-Lösung: 1 mg/ml in Aceton

2.3.7 Transfektion von Protoplasten

Zur Aufnahme der DNA in die Protoplasten wurde Polyethylenglycol (PEG-4000) verwendet. In einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 15 µl der zu transfizierende DNA mit dem gleichem Volumen sterilem 0,8 M Mannit vorgelegt. Zu

dieser Lösung wurde 100 µl der Protoplasten-Lösung mit abgeschnittenen gelben Spitzen (Eppendorf) gegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Nach dem Zusatz von einem Volumen warmer (37°C) PEG-Lösung (entsprechend 130 µl) wurde wieder vorsichtig gemischt und die Suspension für 3-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 750 µl WIMK zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde bei RT und 800 × g für 3 min zentrifugiert und in WIMK resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet wieder in WIMK aufgenommen (je nach Ansatz 100-500 µl Gesamtvolumen). Je nach Experiment wurde die Protoplastensuspension gesplittet und mit Zusätzen wie Abscisinsäure (1 % der jeweiligen Stocklösung) versehen. Im Falle von co-transformierten Effektor-Plasmiden erfolgte die Zugabe von ABA erst nach zweistündiger phänotypischer Expression. Die verschiedenen Proben wurden schließlich im Kulturraum bei 23°C und Schütteln mit 30-50 U/min bzw. bis zur weiteren Verwendung inkubiert. Bei mikroskopischen Analysen von fluoreszierenden Proteinen wurden die Protoplasten im Dunkeln inkubiert.

Die Analyse der Reporteraktivität oder die mikroskopische Analyse der Protoplasten erfolgte 12 h bis 18 h nach der Transfektion.

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

ABA-Stocklösung: 10 mM ABA (Sigma-Aldrich) in 1 % MES, pH 7,4

Aus dieser Stocklösung wurden 100 x Gebrauchslösungen (10 µM bis 1 mM) durch Verdünnung mit WIMK hergestellt. Die Endkonzentration des Phytohormons in den Protoplasten betrug dann zwischen 100 nM und 10 µM.

2.3.8 Messung der β-D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten

Die β-D-Glucuronidase- (GUS) Aktivität wurde bestimmt, indem 90 µl der Protoplastensuspension direkt in schwarze Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend mit 100 µl, in CCLR gelösten 2 x MUG-Puffer versetzt wurden.

Die im Extrakt vorhandene Glucuronidaseaktivität wurde fluorimetrisch erfasst. Als Substrat wurde 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) verwendet. Die β-D-Glucuronidase katalysiert die Esterhydrolyse und damit die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon. 4-Methylumbelliferon kann fluorimetrisch (365 nm Anregung; 460 nm Emission) quantifiziert werden. Die Messung wurde in schwarzen Mikrotiterplatten

(Nunc GmbH & Co. KG) im HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader (Perkin Elmer) durchgeführt. Im Bioassayreader wurde bei 30°C über 8 min (25 Zyklen) alle 20 sek die Fluoreszenz gemessen, wobei die Anregung bei 360 nm und die Emission bei 465 nm erfolgte. Die gemessene Zunahme der relativen Fluoreszenz pro Zeiteinheit (dRFU, *relative fluorescence units*) ist direkt proportional zur Enzymaktivität. Zur Standardisierung wurde 4-Methylumbelliferon verwendet.

<u>CCLR-Extraktionspuffer:</u>	25 mM Tris-Phosphatpuffer (pH=7,8) 2 mM DTT 2 mM DCTA 10% (v/v) Glycerin 1% (v/v) Triton X-100
<u>20 x MUG-Substrat-Lösung:</u>	4 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) in CCLR gelöst

2.3.9 Nachweis der *Photinus pyralis* Luciferase-Aktivität

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität in Protoplastenextrakten wurde nach der Methode von (Luehrsen *et al.* 1992) durchgeführt. Bei dieser Methode bleibt die Lichtemission durch die Verwendung von Coenzym A über einen längeren Zeitraum stabil und ist nicht wie bei Verwendung von Substratlösungen ohne Coenzym A nur von vergleichsweise kurzer Dauer (0,3 sek). Für den Luciferasenachweis wurde die zuvor für die Messung der Glucoronidaseaktivität verwendete Suspension direkt im *flash`n glow* Luminometer (Berhold) analysiert. Dazu wurden die kompletten 190 µl der Protoplastensuspension in geeignete Plastikröhrchen (Sarstedt) pipetiert. Im Luminometer wird als erstes die Hintergrundlumineszenz über 10 sek. (*bkg.*) gemessen. Dann wird das nach Zugabe von 100 µl Substrat (LAR) emittierte Licht über 20 sek gemessen (RLU).

Die spezifische Luciferaseaktivität (dRLU, *relative luminessenz units*) wurde nach folgender Formel ermittelt : $dRLU = (RLU - 2 \cdot bkg) / 20$.

<u>Substratpuffer (LAR):</u>	20 mM Tricin (pH=7,8, einstellen mit NaOH) 1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \times 5H_2O$ 2,7 mM $MgSO_4$ 0,1 mM Na_2EDTA 33,3 mM DTT 0,27 mM Coenzym A 0,47 mM D-Luciferin (PJK GmbH, Kleinbittersdorf) 0,53 mM ATP
-------------------------------------	--

2.3.10 Untersuchung im Epifluoreszenz-Mikroskop

Zur zellulären Lokalisation wurden GFP- bzw. YFP-Fusionsproteine transient in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert. Die Untersuchung der ÜN inkubierten Protoplasten im Epifluoreszenz-Mikroskop erfolgte in der Zählkammer oder auf Objektträgern unter Nutzung eines FITC-Filtersatzes, der für GFP 480 (40) nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 (50) nm Emissionsfilter enthielt. Für die Untersuchung von YFP am wurde ein FITC-Filtersatz aus 500 (20) nm Anregungs-, 515 nm Sperr- und 535 (30) nm Emissionsfilter verwendet.

Die GFP-Lokalisation in transgenen Keimlingen der T₂- bzw. T₃-Generation erfolgte unter Verwendung der gleichen Filtersätze. Die Untersuchung der Keimlinge erfolgte unter Zugabe von Wasser auf mit Deckgläsern abgedeckten Objektträgern.

2.3.11 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Bei dem verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein inverses konfokales Mikroskop Fluoview FV1000 der Firma Olympus.

Es wurden ein Argonlaser der Emissionswellenlängen $\lambda = 488$ nm für GFP und ein Argonlaser der Emissionswellenlängen $\lambda = 515$ nm für die Visualisierung des YFP verwendet. Die Proben wurden mit einem 10fach UPLFLN 10x/0,3 oder einem 60fach LUMPLFL: 60wx/1,1 Objektiv analysiert.

Zur Untersuchung der subzellulären GFP- bzw. YFP-Lokalisation im inversen Konfokalmikroskop wurden *Arabidopsis*-Protoplasten auf speziellen Objektträgern, die unten nur ein Deckglas als Trägermaterial haben, pipettiert und mikroskopiert (Spezialanfertigung J.Reischenbeck).

Die GFP-Lokalisation in transgenen Keimlingen erfolgte unter Verwendung des gleichen Lasers. Die zu untersuchenden Keimlinge wurden vorsichtig mit einer Federpinzette von den Agarplatten zwischen zwei Deckgläser mit Wasser transferiert.

2.3.12 Bi-molekulare Fluoreszenz-Komplementation

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen durch das Split-YFP-System (Walter *et al.* 2004) wurden Protoplasten mit jeweils 10 μ g Plasmid-DNA von zwei Fusionsproteinen transformiert. Dabei waren die zu analysierenden Proteine entweder mit dem N-Terminus des YFP-Proteins (Aminosäure 1-155, YFP^N) und/oder dem C-Terminus des YFP-Proteins (Aminosäure 156-239, YFP^C) fusioniert. Die Fusionsproteine wurden anschließend in Protoplasten exprimiert und im konfokalen

Mikroskop betrachtet. Hierbei zeigt eine YFP-Fluoreszenz eine Interaktion der beiden Proteine an.

2.4 Geräte und Chemikalien

2.4.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Blotapparatur	Trans-Blot semi dry	BioRad
CCD-Kamera	ORCAII ERG	Hamamatsu Photonics
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Fluoview FV1000	Olympus
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus
Gelelektrophoreseapparatur	E844 (400 V-400 mA)	Consort
Inkubator	ED 53	WTC Binder
Laminar Flow Workstation		Microflow
Lumiometer	Flash n glow	Berthold
Magnetrührer	Stuart	Bibby
Mikroplattenleser	HTS 7000 Plus	Perkin Elmar
PCR-Cycler	Tgradient	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer	Reprostar 3	Camag
SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	Peqlab
Thermomixer	comfort	Eppendorf

Thermoshaker	Laboshake	Gerhardt
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf
UV	P91D	Mitsubishi
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter

2.4.2 Chemikalien / Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden - soweit nicht anders angegeben - von den Firmen Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) und J.T. Baker (Deventer, Holland) in pA- Qualität bezogen.

2.4.3 Enzyme

Enzym	Firma
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas und New England Biolabs
Taq Polymerase	MBI Fermentas
High Fidelity Taq	Roche (Mannheim)
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
RNase A	Roth
Cellulase, Mazerozym	Yakult (Tokyo, Japan)

2.5 *In silico* Analyse

Übersetzung einer Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz:
www.expasy.ch/tools/dna.html

Homologievergleich sowie Überprüfungen von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen:
www.ncbi.nlm.nih.gov
http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

Vorhersage eines Restriktionsverdaus:

<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

Vorhersagen über Proteinstrukturen:

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

<http://www.predictprotein.org/>

Ermittlung von DNA-Sequenzen und Markern:

www.arabidopsis.org

RNA-Sekundärstruktur:

<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>

Statistische Tests:

<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>

3 Ergebnisse

3.1 Positionelle Klonierung des *GCA2* Locus

3.1.1 Physikalische und genetische Karte des *GCA2* Locus

Die *gca2* Mutante wurde bereits anfangs der 90iger Jahre aus einem EMS-Screen auf ABA-insensitives Wurzelwachstum isoliert (Iten 1992). Durch genomische Kartierung konnte die Mutation auf ein ca. 100 kb großes Intervall (ungefähr 0,5 Centimorgan) auf dem kurzen Arm von Chromosom IV eingegrenzt werden (Benning 1999; Hoffmann 2002). Hierzu wurde die *gca2* Mutante, die im *Landsberg erecta* Ökotyp (*Ler*) generiert wurde, mit dem Ökotyp *RLD* gekreuzt und die Co-Segregation von genetischen Markern und des *gca2*-Phänotyps analysiert. Der *gca2*-vermittelte ABA-insensitive Phänotyp erwies sich jedoch im Ökotype *RLD* als nicht stabil, so dass eine weitere Eingrenzung des gefundenen Intervalls mit Hilfe dieser Kreuzungen als nicht zweckmäßig erachtet wurde. Deshalb wurde eine neue Kartierungspopulation durch Kreuzung von *gca2* mit dem Ökotyp *Columbia* (*Col*) erzeugt. Mittels der F_2 -Pflanzen dieser Kreuzungen und durch die Etablierung neuer CAPS-Marker in dem bereits eingegrenzten Intervall konnte der Bereich auf ein ~50 kb großes Fragment zwischen den zwei Markern T4B21-15 und T4B21-M verkleinert werden (siehe Abb.3-1).

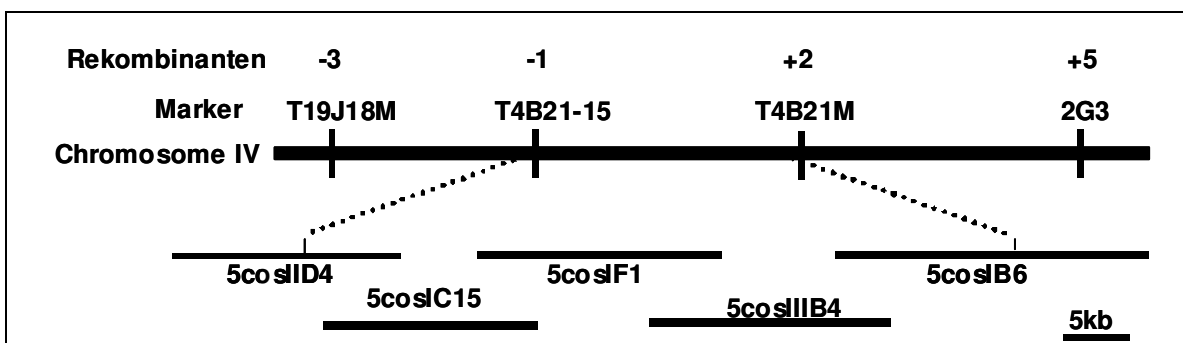


Abb.3-1 Kartierungsintervall der *gca2* Mutante

Dargestellt ist der Teil von Chromosom 4, der durch die 2 BACs T19J18 und T4B21 (bp 2.340.000 bis 2.480.000) abgedeckt wird, sowie die zur Kartierung genutzten Marker (Primersequenzen siehe Appendix B1). Die Anzahl der mit diesen Markern gefundenen Rekombinanten ist oberhalb des jeweiligen Markers angegeben. Das Intervall zwischen den Markern T4B21-15 und T4B21-M ist als Ausschnitt vergrößert gezeigt und die in diesem Bereich isolierten Cosmide sind gezeigt.

Für die in Abb.3-1 dargestellte Kartierung wurden insgesamt 800 F_2 -Pflanzen (entsprechend 1.600 Chromosomen) genotypisiert und der Genotyp der einzelnen Marker mit dem Phänotyp der Pflanzen verglichen. Da es sich bei der *gca2* Mutante um eine rezessive Mutante handelt (Iten 1992), muss eine Pflanze, die den *gca2* Phänotyp zeigt für den *GCA2*-Locus (die Stelle an der sich die Mutation befindet) homozygot sein. Da die Mutante im *Landsberg erecta* Ökotyp erzeugt wurde und mit Wildtyp *Columbia* Pflanzen

gekreuzt wurde, müssen also alle Pflanzen, die sich phänotypisch wie *gca2* verhalten, an dieser Stelle homozygot für das *Landsberg erecta* Allel sein. Je näher ein untersuchter Marker an der Mutation ist, desto weniger werden an diesem Locus rekombinante Pflanzen auftreten. Die in der Abb.3-1 angegebenen Zahlen an Rekombinanten beziehen sich auf Chromosomen, die trotz *gca2* Phänotyps an dieser Stelle die *Columbia* Sequenz aufweisen. Im Bereich zwischen den Markern T4B21-15 und T4B21-M liegen ein bzw. zwei Rekombinationsereignisse: Somit konnte der Bereich, in welchem die zur ABA-Insensitivität führende Mutation ist, auf dieses Intervall eingegrenzt werden.

Zur Identifizierung des *GCA2*-Gens wurden in diesem Bereich verschiedene Cosmide generiert, indem die DNA des BAC T4B21 durch einen partiellen *HindIII*-Verdau geschnitten und in die solitäre *HindIII* Schnittstelle des Cosmid-Vektors pBIC 20 kloniert wurden (Abb.3-2, siehe auch (Benning 1999)).

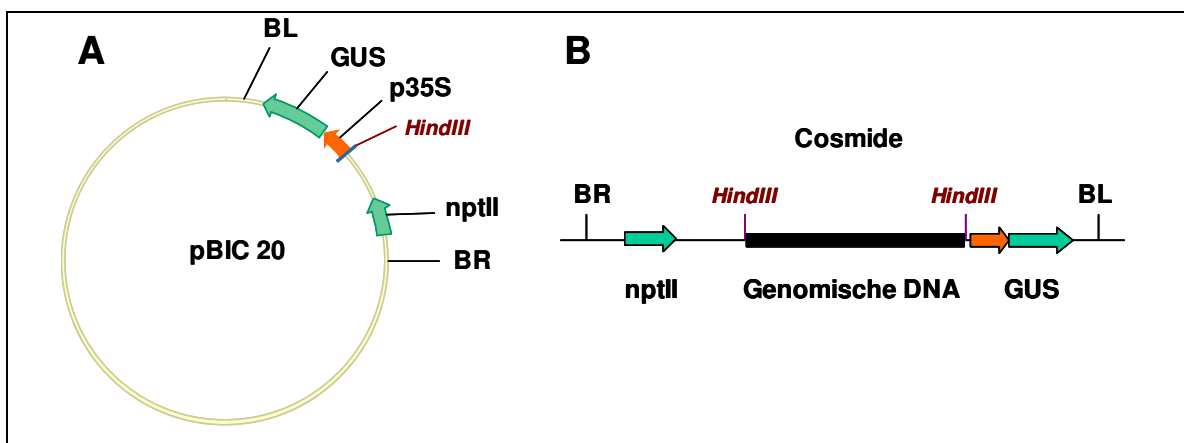


Abb.3-2 Schema des pBIC 20 Vektors

A: Vektorkarte des pBIC20 Vektors mit der pro-T-DNA Region, die durch die *right border* (RB) und *left border* (BL) begrenzt ist. Der Vektor enthält eine pflanzliche Kanamycin-Resistenz (*nptII*) und ein *GUS*-Gen unter der Kontrolle des *p35S*-Promotors. B: Die zur Klonierung der genomischen DNA-Fragmente in die verschiedenen Cosmide verwendete *HindIII* Restriktionsschnittstelle befindet sich zwischen diesen beiden Genen.

Zusätzlich zu den von Herrn Benning isolierten Cosmidklonen wurde noch ein weiteres Cosmid 5cosIC15 aus einer *Landsberg*-Cosmid-Genbank isoliert. Dieses deckt das nicht überlappende Intervall zwischen den beiden Cosmiden 5cosIID4 und 5cosIF1, die beide aus *Columbia* stammen, ab (siehe Abb.3-1).

3.1.2 Komplementationanalyse mit Cosmiden

Im Folgenden wurde nun versucht, die *gca2* Mutante mit den in Abb.3-1 gezeigten Cosmiden zu komplementieren. Hierbei stellt sich jedoch das Problem, dass es sich bei *gca2* um eine *rat* (*resistant to Agrobacterium tumefaciens*) Mutante (Zhu *et al.* 2003) handelt, welche sich nicht (oder nur sehr schlecht) transformieren lassen (Benning 1999).

Durch einen erneuten von mir durchgeführten Versuch der Transformation von *gca2* wurde dieser Befund bestätigt. Die Transformation der Mutante lieferte eine um den Faktor zehn schlechtere Transformationseffizienz mit dem Kontrollplasmid pBI121. Die Transformationseffizienz betrug beim Wildtyp ~0,6 % wohingegen der Wert in *gca2* auf 0,07% sank. Neben dieser sehr geringen Effizienz wurde zusätzlich noch ein Problem mit der vollständigen Integration der T-DNA ins Genom beobachtet. Der zur Transformation verwendete binäre Vektor pBI121 trägt neben dem *nptII*-Gen (*neomycin phosphotransferase II*), welches den transformierten Pflanzen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin verleiht, auch noch ein Gen für das bakterielle Enzym β -Glucuronidase (*GUS*). Diese Marker liegen an den beiden Enden der T-DNA, so dass mit Hilfe dieser Enzyme die vollständige Integration der DNA ins Pflanzengenom überprüft werden kann (siehe Abb.3-2). Nach der Transformation zeigten nur knapp 60 % der kan⁺-*gca2*-Pflanzen auch eine Aktivität des Enzym β -Glucuronidase (zum Vergleich beim Wildtyp exprimierten knapp 98% der kan⁺-Pflanzen auch β -Glucuronidase). Dieser Befund spricht dafür, dass neben der geringen Effizienz bei der Transformation auch die Integration der T-DNA ins Genom der *gca2* Mutante betroffen ist. Da dies aber für eine Komplementationsanalyse unerlässlich ist, wurde der direkte Gentransfer in die *gca2* Mutante verworfen.

In der Arbeit von Benning (1999) wurde versucht, dieses Problem durch das Einkreuzen der *gca2*-Mutation in den *RLD* Ökotyp zu umgehen. Wie oben bereits erwähnt ist jedoch der ABA-insensitive Phänotyp der Mutante in diesem genetischen Hintergrund nicht stabil. Des Weiteren spielen ökotypische Unterschiede gerade in Hinblick auf die Sensitivität gegenüber ABA eine nicht zu vernachlässigende Rolle (Ehrler 1997; Li *et al.* 2003), weshalb für die nachfolgenden Analysen nach folgendem Schema verfahren wurde (siehe Abb.3-3). Als erstes wurden *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps *Landsberg erecta* mit den verschiedenen Cosmidklonen transformiert. Aus der T₂-Generation dieser Pflanzen wurden dann für das Transgen homozygote Pflanzen isoliert. Diese wurden als nächstes mit der *gca2* Mutante gekreuzt und schließlich die hieraus resultierende F₂-Generation zur weiteren Analyse herangezogen. Es wurden also sämtliche Analysen mit einer sowohl den *GCA2*-Locus als auch die T-DNA betreffenden segregierenden Population durchgeführt.

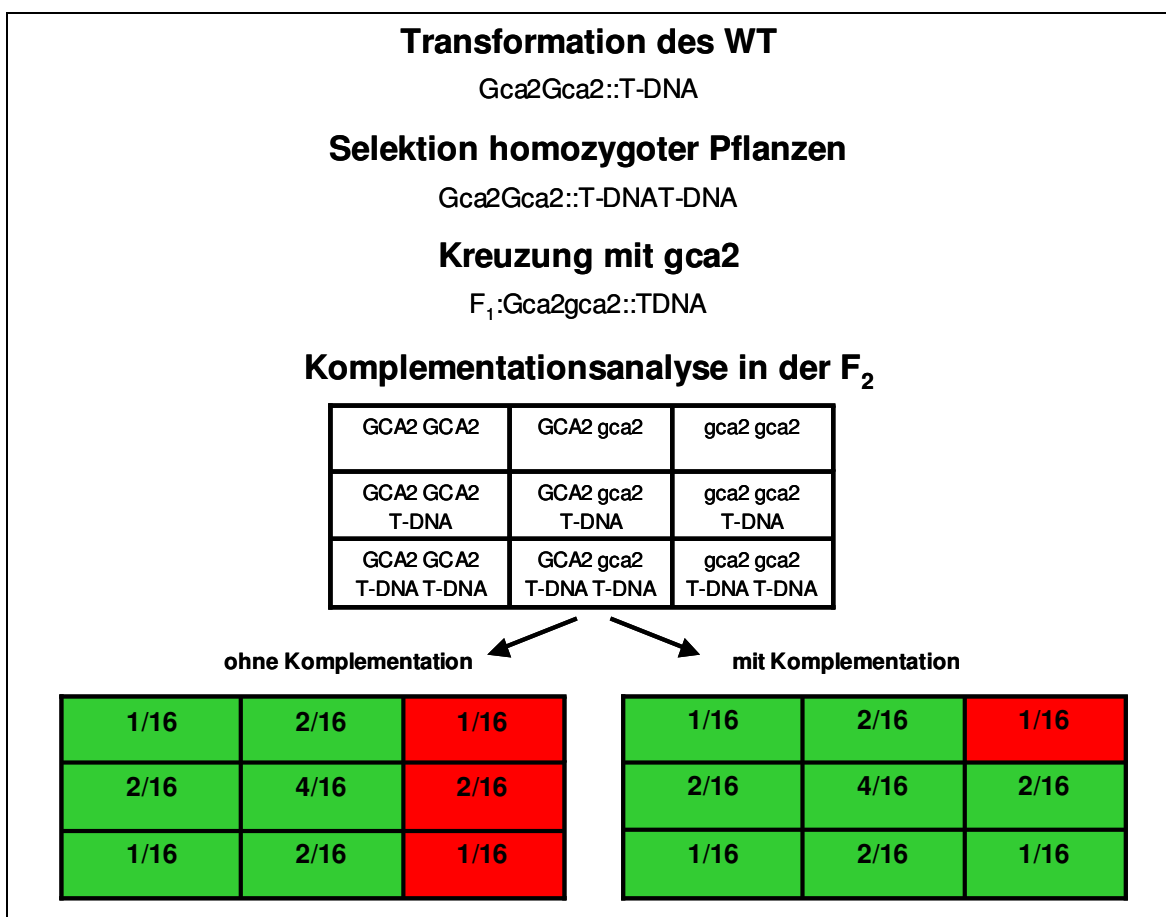


Abb.3-3 Komplementationsschema

Schematische Darstellung der Komplementation von *gca2* über vorherige Transformation von *Ler* und Rückkreuzung mit *gca2*. Die möglichen Genotypen der F₂-Pflanzen mit ihren statistischen Wahrscheinlichkeiten sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Pflanzen, die aufgrund ihres Genotyps sensitiv gegenüber ABA sein sollten, sind grün und solche, die insensitive sein sollten, rot dargestellt.

Durch den rezessiven Charakter der *gca2* Mutante ergibt sich dann in der F₂-Generation ein Bild von 25 % Keimlingen, die homozygot für das mutierte *gca2* Allel sind (rote Felder im linken Teil der Abb.3-3). Von diesen Pflanzen tragen 75 % mindestens eine Kopie der T-DNA. Wenn diese keinen Einfluss auf die ABA-Sensitivität hat (nicht komplementiert), sollten alle dieser Pflanzen ein ABA-insensitives Verhalten aufweisen, somit sind 25 % der F₂-Pflanzen insensitive gegenüber dem Phytohormon. Führt jedoch die eingebrachte T-DNA zu einer Komplementation des Phänotyps, sollten rein rechnerisch nur noch 6,7 % der F₂-Pflanzen einen insensitiven Phänotyp zeigen (rechter Teil in der Abb.3-3).

Ein deutlicher Unterschied in der Sensitivität gegenüber dem Phytohormon ABA ist die Voraussetzung für die Komplementationsanalyse. Deshalb wurde zur phänotypischen Unterscheidung zwischen der ABA-insensitiven *gca2* Mutante und dem Wildtyp das Wurzelwachstum von Keimlingen auf ABA-haltigen MS-Platten untersucht.

3.1.2.1 ABA vermittelte Hemmung des Wurzelwachstums

Für diesen Versuch wurden 5 d alte *Arabidopsis* Keimlinge auf MS-Platten mit 10 μM ABA umgesetzt und das Wurzelwachstum für weitere drei Tage gemessen.

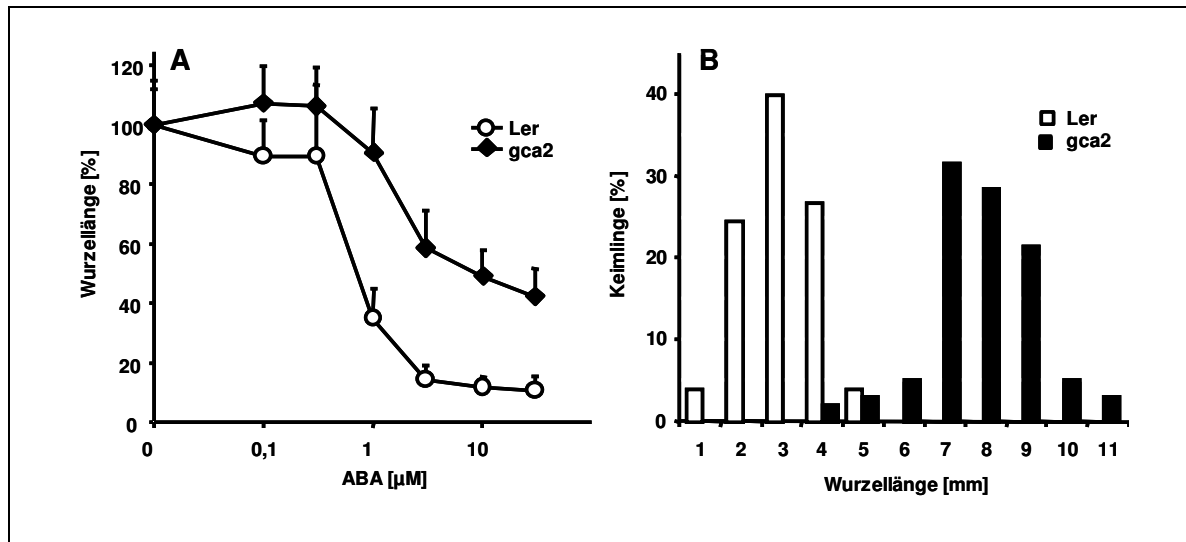


Abb.3-4 Wurzelwachstum von *Ler* und *gca2* auf verschiedenen ABA-Konzentrationen

A: Inhibierung des Wurzelwachstums von 5d alten *Arabidopsis* Keimlingen auf MS-Platten mit verschiedenen ABA-Konzentrationen. Die jeweilige Wurzellänge ohne ABA sind auf 100 % gesetzt (100% \pm 14,6 mm beim Wildtyp und 19,7 mm in *gca2*). $n > 50$. B: Wurzelwachstum auf 10 μM ABA nach fünf Tagen: Einzelverteilung der Keimlinge nach Wurzellänge. $n > 50$.

Die ABA-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums ist bei sämtlichen getesteten ABA-Konzentrationen (0,1 μM ; 0,3 μM ; 1 μM ; 3 μM ; 10 μM und 30 μM) in der *gca2* Mutante deutlich weniger ausgeprägt als im Wildtyp. Die Wurzellänge der Keimlinge auf den Platten ohne ABA betrug beim Wildtyp $14,6 \pm 1,8$ mm und bei *gca2* $19,7 \pm 3,0$ mm. Diese wurde gleich 100 % gesetzt. Bei ABA-Konzentrationen von 1 bis 10 μM ist der Unterschied zwischen Wildtyp und der Mutante besonders deutlich ausgeprägt. Die *Ler*-Keimlinge zeigen schon bei geringen ABA-Konzentrationen von 0,1 und 0,3 μM ABA eine Reduktion der Wurzellängen auf $89,6 \pm 12,0$ % bzw. $89,5 \pm 24,0$ %, wohingegen die *gca2* Keimlinge bei diesen Konzentrationen eine Wurzellänge von $107,4 \pm 12,4$ % bzw. $106,4 \pm 13,0$ % aufweisen. Bei 1 μM ABA reduziert sich die Wurzellänge beim Wildtyp auf $34,8 \pm 10,3$ % und bei *gca2* auf $90,8 \pm 14,9$ %. Bei hohen ABA-Konzentrationen von 3 bis 30 μM erreichen die Wurzeln des Wildtyp nur noch Längen von $14,3 \pm 4,9$ % (3 μM), $11,8 \pm 3,7$ % (10 μM) und $10,5 \pm 5,3$ % (30 μM). In der *gca2* Mutante liegen die entsprechenden Wurzellängen bei $58,6 \pm 12,7$ % ; $49,2 \pm 8,7$ % und $42,2 \pm 9,6$ %.

Wenn man bei einer ABA-Konzentration von 10 μM ABA die Verteilung der einzelnen Keimlinge analysiert (Abb.3-4B), sieht man einen nur sehr geringen Überlappungsbereich bei einer Wurzellänge von 4-5 mm. Kein einziger Wildtyp-Keimling wies eine Wurzellänge von mehr als 5 mm auf, wohingegen nur 2 Keimlinge der *gca2* Mutante (3 %) eine

Wurzellänge von 4 mm aufwiesen, und kein einziger ein noch geringeres Wachstum zeigte.

Durch die unterschiedliche ABA-Sensitivität zwischen der *gca2* Mutante und dem WT in diesem Experiment ist das Wurzelwachstum vom Keimlingen geeignet, um die Komplementation der *gca2* Mutante zu analysieren.

Nach dem oben (Abb.3-3) beschriebenen Komplementationsschema wurde nun versucht, die *gca2* Mutante mit den fünf, das Kartierungsintervall umspannenden, Cosmidklonen zu komplementieren. Mit dem Cosmid 5cosIIID4, das direkt proximal des Markers T4B21-15 zugeordnet wurde, konnten keine transgenen Pflanzen erzeugt werden, weshalb die Analyse nur mit den verbliebenden vier Cosmiden durchgeführt wurde.

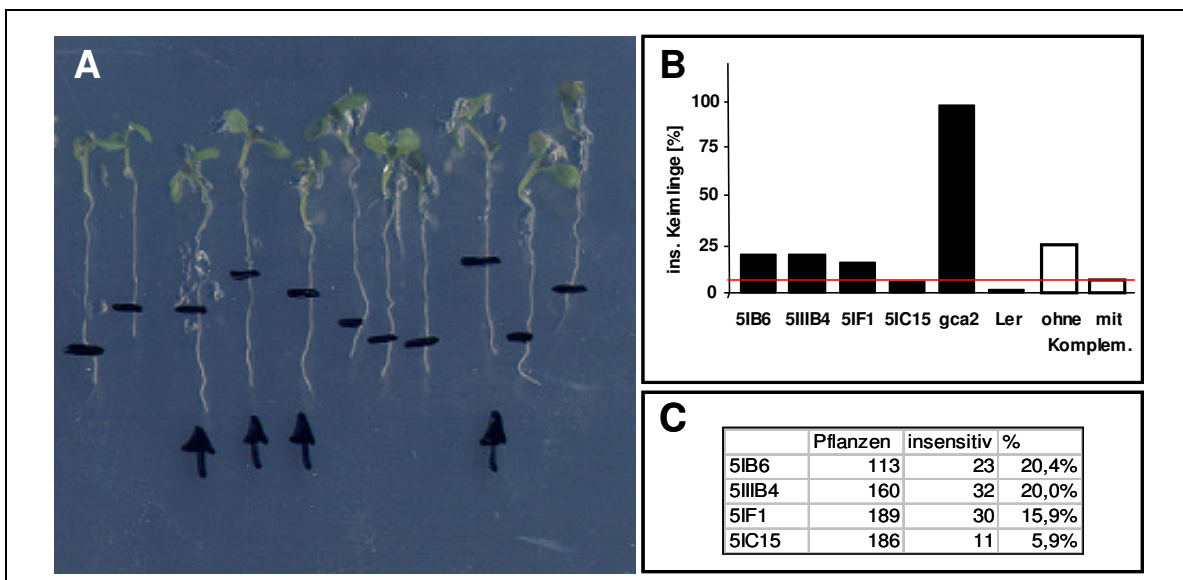


Abb.3-5 Komplementation von *gca2*

A: Segregierender Phänotyp einer F_2 -Kreuzung auf MS-Platten mit 10 μ M ABA. Insensitive Keimlinge sind mit einem Pfeil (\rightarrow) markiert. B: Prozentualer Anteil der insensitive Keimlinge der Kreuzungen mit den verschiedenen Cosmiden. Bei den beiden rechts gezeigten Werte (offene Balken) handelt es sich um die theoretischen Werte ohne und mit Komplementation des insensitive Phänotyps. Die rote Linie zeigt den Erwartungshorizont bei einer Komplementation an. C: Anzahl der Keimlinge für die in Abb.B gezeigte Graphik.

Die F_2 -Pflanzen der Kreuzungen zwischen *gca2* und den mit den jeweiligen Cosmiden transformierten homozygoten Wildtypen wurden analog dem oben beschriebenen Wurzelwachstumstest analysiert. Dabei ergab sich eine auf die ABA-Sensitivität bezogene heterogene Keimlingspopulation. In Abb.3-5A sind deutlich ABA-insensitive Keimlinge (Pfeil) von sensitiven Keimlingen zu unterscheiden. In der Kontrollpopulation von nicht transformierten Keimlingen zeigen 98 % der *gca2* Keimlinge und 2 % der *Landsberg erecta* Keimlinge ein insensitive Verhalten. Für zwei der untersuchten Cosmide (5IB6 und 5IIIB4) zeigte sich mit ungefähr 20 % keine signifikante Abweichung der bei Nicht-Komplementation zu erwartenden Anzahl an insensitive Keimlingen von 25 %. Beim

Cosmid 5IF1 lag diese Zahl mit 15,9 % bereits unterhalb dieses Wertes, erreichte aber noch nicht den für eine Komplementation anzunehmenden Wert von 6,7 %. Beim Cosmid 5IC15 war nur noch bei 5,9% der Keimlinge ein insensitives Verhalten zu beobachten, was sogar unterhalb des errechneten Wertes lag.

Diese Analyse wurde mit F_2 -Keimlingen aus Kreuzungen von unabhängigen Primärtransformanten der jeweiligen Cosmidklone wiederholt. Die jeweiligen Ergebnisse für die Cosmidklone 5IF1, 5IB6 und 5IIIB4 unterschieden sich nicht merklich von den oben beschriebenen Werten. Der prozentuale Anteil an insensitiven Keimlingen lag für alle untersuchten Kreuzungen zwischen 15 % und 25 %. Bei F_2 -Keimlingen, die aus unabhängigen Primärtransformanten mit dem Cosmidklon 5IC15 hervorgegangen sind, zeigten zwischen 1,9 % und 11,1 % der Keimlinge, abhängig von den unterschiedlichen Transformanten die für die Kreuzung benutzt wurden, ein ABA-insensitives Verhalten. Die ABA-Sensitivität dieser Keimlinge unterschied sich also für die unabhängigen Kreuzungen merklich.

Der in allen Cosmidklonen enthaltene GUS-Marker (siehe Abb.3-2) dient zu Verifizierung einer vollständigen Integration der T-DNA ins pflanzliche Genom, da der Einbau von T-DNA von der *right border* (BR) zur *left border* (BL) läuft und somit bei GUS-positiven Pflanzen von einer vollständigen Integration der T-DNA ausgegangen werden kann. Ein mögliches Problem einer nicht vollständigen Komplementation könnte in einer unvollständigen Integration der T-DNA liegen. Bei einer erfolgreichen Komplementation sollten alle ABA-insensitiven Pflanzen auch GUS-negativ sein, also keine (oder nur eine partielle) Integration der T-DNA in das Genom aufweisen. Abhängig von den jeweils analysierten Kreuzungen der unabhängigen Primärtransformanten mit dem Cosmidklon 5IC15 zeigten sich jedoch für einige Linien auch unter ABA-insensitiven (also nicht komplementierten) F_2 -Keimlingen GUS-positive Pflanzen. Für die Linie (5IC15.1.7 x *gca2*), die mit 11,1 % insensitiver Pflanzen (12/108), den größten Anteil nicht komplementierter Pflanzen aller unabhängiger Transformanten dieses Cosmidklons stellt, zeigten vier der insensitiven Pflanzen eine GUS-Färbung, also eine vollständige Integration der T-DNA. Bei diesen Pflanzen führte die Integration der T-DNA nicht zu einer Komplementation.

Durch die deutliche Verschiebung der ABA Sensitivität der mit dem Cosmid 5IC15 transformierten Pflanzen, die sich von den Pflanzen, welche mit den anderen Cosmidklonen transformiert wurden, unterschied, wurde der DNA Fragmentbereich des Cosmids 5IC15 als möglicher Ort der Mutation genauer analysiert.

3.1.3 Identifizierung der Mutation

Bei dem Cosmid 5IC15 handelt es sich um ein Derivat des Vektors pBIC 20 (Abb.3-2), in welchen über die *HindIII*-Restriktionsschnittstelle ein ca. 20 kb großer genomischer DNA-Bereich aus *Landsberg erecta* integriert wurde. Auf diesem Intervall liegen 3 komplette und ein partieller ORFs (*open reading frames*). Diese sind allesamt in TAIR annotiert und durch dazugehörige ESTs (*expressed sequence tags*) in den jeweiligen Datenbanken zu finden. Abb.3-6 zeigt die vorhandenen Gene auf dem Cosmid.

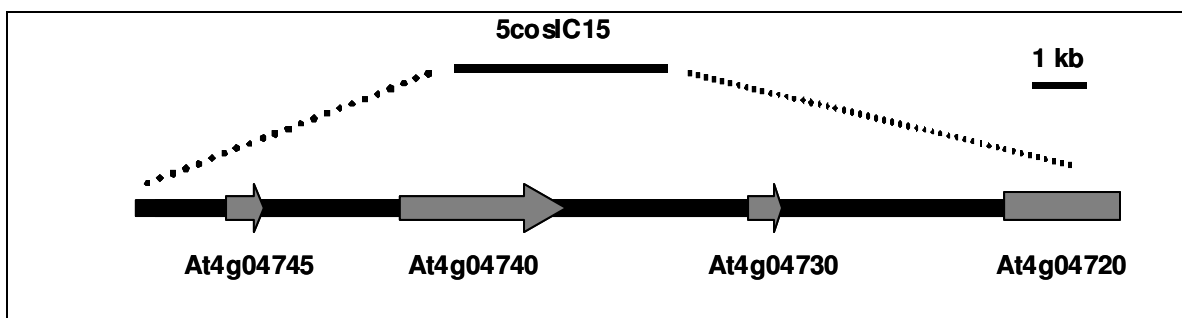


Abb.3-6 Struktur des Cosmids 5IC15

Dargestellt sind die vier auf dem Cosmid vorhandenen Gene in ihrer jeweiligen Orientierung und die dazwischenliegenden nicht-codierenden Bereiche. Der Längenstandard von 1 kb bezieht sich auf den unten gezeigten Ausschnitt.

Durch die oben beschriebene Komplementation der *gca2* Mutante mit diesem Cosmidklon ist zu vermuten, dass sich auf dem genomischen DNA-Fragment des Cosmidklons die *gca2*-Mutation befindet. Der gesamte genomische Bereich, der in dieses Cosmid kloniert wurde, weist zwischen den beiden Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia* außergewöhnlich viele Sequenz-Polymorphismen auf. Ein *HindIII*-Verdau des Cosmides lieferte nicht die für die entsprechende Columbia-Sequenz zu erwartenden Fragmentgrößen (siehe Abb.3-7).

Die im Netz verfügbaren *Landsberg*-Sequenzen der Firma Monsanto (<http://www.arabidopsis.org/browse/Cereon/index.jsp>) deckten diesen genomischen Bereich ebenfalls nicht ab. Bei dieser Sequenzdatenbank handelt es sich jedoch um eine nicht vollständige *single-shootgun*-Sequenzierung, bei der nur knapp 80 % des Genoms abgedeckt wurden (95 Mb, Stand 06/09).

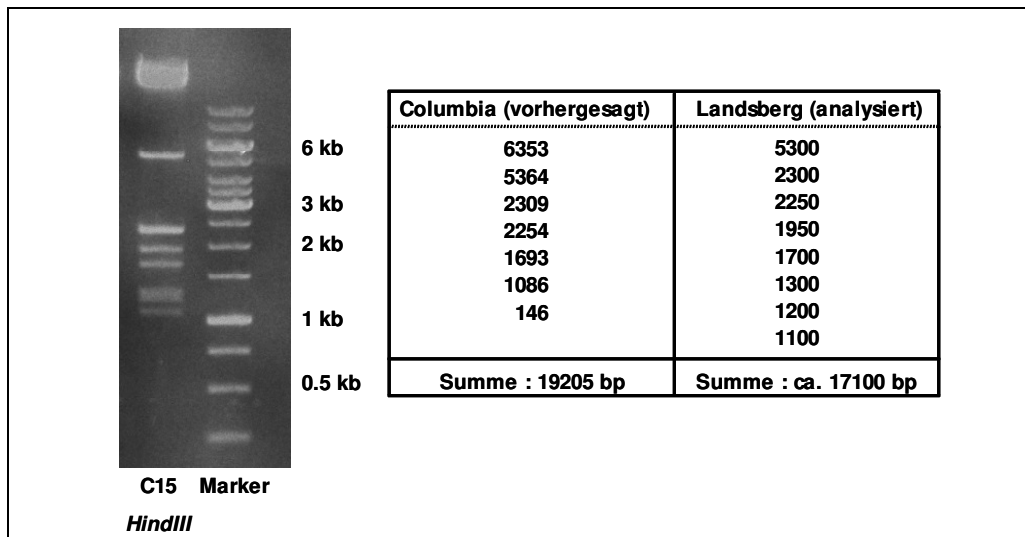


Abb.3-7 *HindIII*-Verdau des Cosmids 5IC15

Links: Gelbild des DNA-Restriktionsverdaues des Cosmidklons 5IC15. Rechts Tabelle mit den zu erwartenden Größen eines genomischen *Col* Fragmentes (Daten *in silico* generiert über den *Webcutter* (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) und die anhand der Analyse der abgebildeten DNA-Fragmente abgeleiteten Größen aus *Landsberg erecta*.

Deshalb wurde das gesamte knapp 20 kb große Insert vollständig sowohl für *gca2* als auch für den Wildtyp (*Ler*) sequenziert. Um die durch die vielen Polymorphismen auftretenden Probleme (Design von geeigneten Primern) zu umgehen, wurden teilweise erst die einzelnen *HindIII*-Fragmente des Vektors sequenziert (*via* Klonierung in einen pSK-Vektor) und anschließend dann die genomische DNA der Mutante. Die vollständige Sequenzierung (siehe Appendix A1) lieferte für den genomischen Bereich der *Arabidopsis* DNA, der Teil des Cosmid 5IC15 ist, nur einen einzigen Basenpaar-Austausch zwischen der Mutante und dem Wildtyp (Abb.3-8).

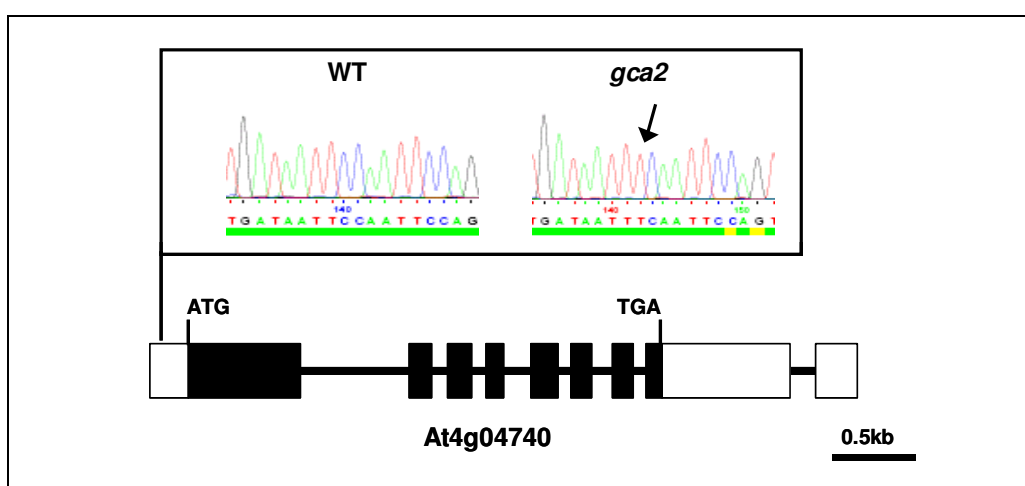


Abb.3-8 Das Gen At4g04740 und die *gca2*-Mutation

Struktur des Genes At4g04740, Exons sind dick und die Introns schmal dargestellt. Die transkribierten Exon-Bereiche in der 5'UTR und der 3'UTR sind als offene Rechtecke gezeichnet. Das in der 3'UTR vorhergesagte Intron ist mit einer offenen Linie dargestellt. Der DNA-Sequenzierlauf, welcher die Mutation in der 5'UTR zeigt, ist oben abgebildet, wobei hier ein Pfeil die C → T Transition anzeigt.

Die Mutation eines Thymins zu einem Cytosin ist eine typische durch EMS herbeigeführte Mutation. Bei mehr als 99% der durch EMS ausgelösten Mutationen führt EMS durch eine Alkylierung eines Guanins zu einer G/C → A/T Transitionen (Greene *et al.* 2003). Die gefundene Mutation befindet sich 120 bp vor dem Startcodon des Protein-codierenden Gens At4g04740. Diese Gen codiert für die Calcium-abhängige Proteinkinase CPK23. Zum einfachen Nachweis dieser Mutation wurde ein DeCAP-Marker entwickelt.

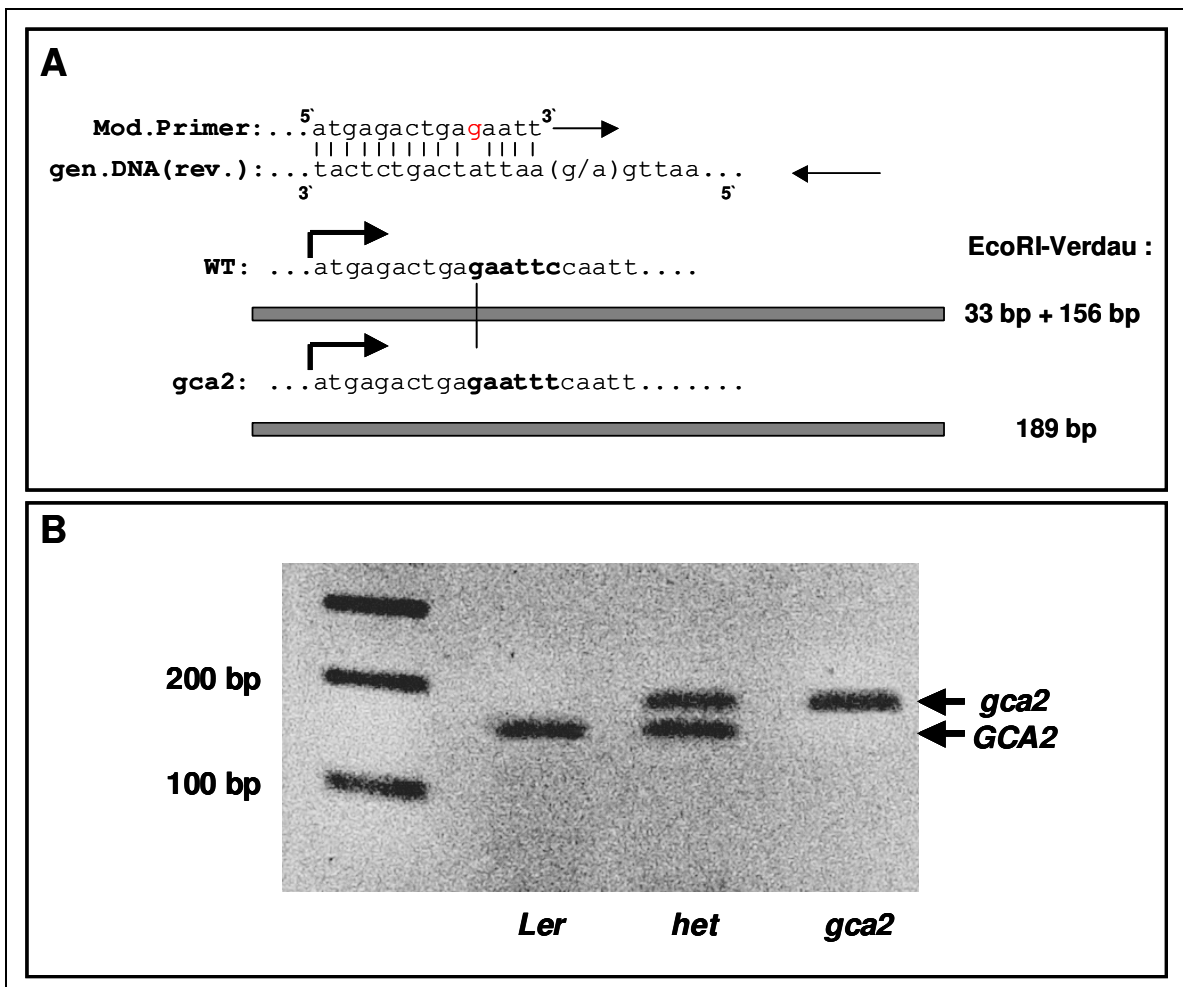


Abb.3-9 DeCAP Marker für den GCA2-Locus

A: Ein PCR-Primer wurde so mutiert (rote Base), dass nach einer PCR mit genomischer WT DNA ein Fragment mit einer *EcoRI*-Schnittstelle generiert wird, wohingegen die gleiche PCR mit *gca2* DNA als *target* zu einem Fragment ohne Schnittstelle führt. B: Die so erzeugten PCR-Fragmente wurden mit *EcoRI* verdaut und auf einem 2% Agarose-Gel getrennt. In der mittleren Spur wurde genomische DNA einer heterozygoten Pflanze (*het*) für die PCR verwendet.

Dafür wurde ein PCR-Primer so modifiziert (rot markiertes G in Abb.3-9A), dass das entstehende PCR-Produkt einen Basenpaaraustausch von T nach G kurz vor der Mutation aufweist und so eine *EcoRI* Schnittstelle (GAATTC) im WT PCR-Produkt entsteht. Die Amplifizierung der *gca2*-DNA generiert hingegen keine Restriktionsschnittstelle (GAATTT). Die beiden so generierten PCR Produkte wurden dann mit *EcoRI* verdaut und auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Diese Produkte

unterschieden sich um ca. 30 bp (Überhang am Primer welcher abgeschnitten wird) und lassen sich auf einem 2%igen Agarosegel deutlich von einander trennen. Im heterozygoten Zustand (*het*) waren beide Banden deutlich zu erkennen. Durch diesen DeCAP-Marker war es möglich, Pflanzen bezüglich des *GCA2*-Locus zu genotypisieren (z.B. sensitive / insensitive Einzelpflanzen nach einem Wurzelwachstumstest, siehe unten).

3.2 Transformation der *gca2* Mutante mit *CPK23*

Nachdem die Komplementationsanalyse von *gca2* mit dem Cosmid 5IC15 und dessen Sequenzanalyse das Gen *CPK23* als *GCA2*-Locus implizieren, sollte nun der abschließende Beweis durch Gentransfer des Gens At4g04740 in die *gca2* Mutante erbracht werden. Dazu wurde ein ungefähr 6 kb großes genomisches DNA Fragment aus *Landsberg erecta* mit PCR amplifiziert und in den binären Vektor pBI121Ascl (Hoffmann 2002) kloniert. Der so entstandene Vektor pBI121Ascl::*GCA2* (#1352) wurde ebenso zur Komplementation eingesetzt wie ein Kontrollplasmid, bei dem durch *site-directed-mutagenesis* des Vektors PBI121Ascl::*GCA2* der oben beschriebene Basenpaaraustausch der *gca2*-Mutation wieder eingeführt wurde und so das Plasmid pBI121Ascl::*gca2* (#1354) entstand.

Beide Konstrukte wurden *via floral dip* in *Landsberg erecta* Pflanzen transformiert und die homozygoten T₂-Pflanzen wurden anschließend mit *gca2* gekreuzt, um die F₂ dieser Kreuzungen zu analysieren (vgl. Abb.3-3). Die Ergebnisse der ABA-Sensitivität dieser Pflanzen sind in Abb.3-10 vorgestellt.

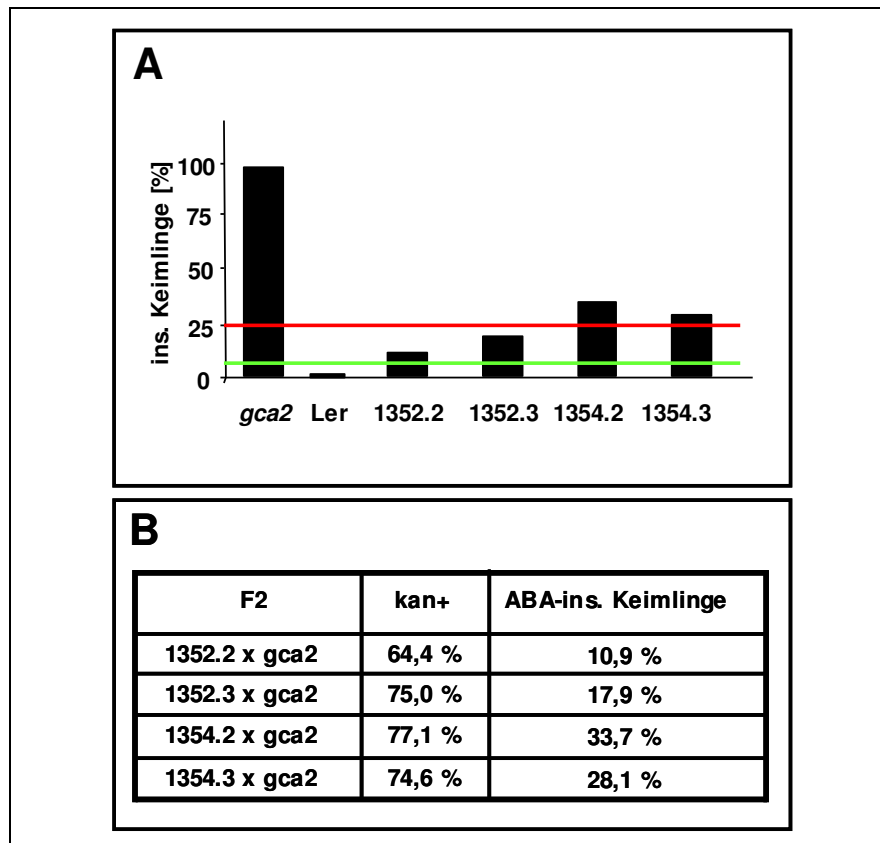


Abb.3-10 Komplementation von *gca2* mit *CPK23*

A: Prozentualer Anteil an insensitiven Keimlingen der F₂-Generation von Kreuzungen mit zwei verschiedenen WT-Linien (pBI121::*GCA2*: Konstrukt #1352 siehe Abbildung) und zwei verschiedenen Kontroll-Linien, die die *gca2*-Mutation tragen (pBI121::*gca2*, Konstrukt #1354 in der Abbildung). Die rot eingezeichnete Linie zeigt den Erwartungshorizont ohne Komplementation und die grüne Linie bezieht sich auf eine erfolgreiche Komplementation. B: Segregationsanalyse der getesteten Linien auf Kanamycin. Der prozentuale Anteil der kan⁺ und ABA-insensitiven Keimlingen ist tabellarisch dargestellt.

Nach einem Wurzelwachstumstest auf 10 µM ABA, ergab sich für die zwei unabhängigen Primärtransformanten mit dem Wildtyp-Konstrukt (#1352) ein Anteil von 10,5 % bzw. 17,9 % an ABA-insensitiven Pflanzen. Bei den zwei Kontrollansätzen, die mit dem mutierten Konstrukt (#1354) transformiert wurden, waren 33,7 % bzw. 28,1 % der Keimlinge ABA-insensitiv. Es zeigte sich hier ein klarer Unterschied in der ABA-Sensitivität von F₂-Keimlingen, bei denen die transformierten *Landsberg* Parental-Pflanzen mit dem WT oder dem mutierten Konstrukt transformiert wurden. Im Falle des nicht mutierten Konstrukts ließ sich eine (zumindest partielle) Komplementation beobachten, wohingegen bei den mutierten Konstrukten der Anteil an ABA-insensitiven Pflanzen zusätzlich erhöht war. Die ebenfalls getestete Segregation der jeweiligen F₂-Pflanzen auf Kanamycin (Abb3-10B) war für die Linie 1352.2 x *gca2* mit 64,4 % etwas unterhalb der statistisch zu erwartenden 75 %. Bei allen anderen drei Kreuzungen, lag der Anteil der kanamycinresistenten Pflanzen im Bereich von 74,6 % bis 77,1%.

Da die Komplementation nicht genau der Erwartung entsprach, bzw. nur teilweise erfolgreich war (bei erfolgreicher Komplementation wären nur 6,7% an ABA-insensitiven Pflanzen zu erwarten, vgl. 3-1-2), wurden im Folgenden Einzelpflanzen der Linie 1352.2 x *gca2*, welche immerhin eine deutliche Verschiebung der ABA-Sensitivität aufwiesen, genauer analysiert.

3.2.1 ABA-Sensitivität komplementierter Pflanzen

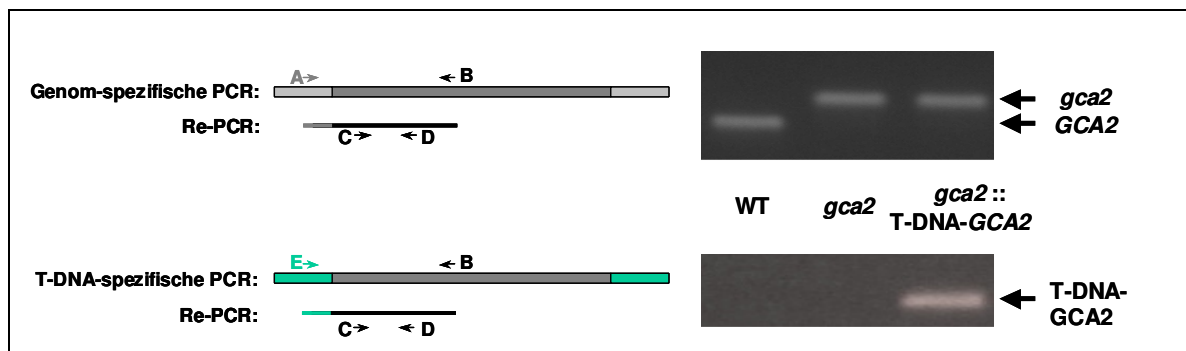


Abb.3-11 Schematische Darstellung der Genom- und T-DNA-spezifischen PCR

Schematisch dargestellt ist der 6 kb große für die Komplementation verwendete DNA-Abschnitt aus *Landsberg erecta* (dunkelgrau) sowie genomische DNA Bereiche, die an diesen Bereich angrenzen (hellgrau) und DNA-Abschnitte des Vektors pBI121 (grün). Die verwendeten Primer (A bis E) und ihre jeweilige Position sind durch Pfeile gekennzeichnet. Rechts ist ein Bild der Auftrennung der jeweiligen PCR-Fragmente auf einem 2 %igen Agarosegel zu sehen.

Um den Genotyp der komplementierten Einzelpflanzen bestimmen zu können, muss zwischen dem genomischen *GCA2*-Allel und dem über die T-DNA eingebrachten *GCA2*-Allel unterschieden werden. Dazu wurde mit dem oben (siehe Abb.3-9) beschriebenen DeCAP-Marker eine Re-PCR durchgeführt. Von den jeweiligen DNA-Präparationen der verschiedenen Pflanzen wurden zuerst zwei verschiedene ca. vier kb große DNA-Fragmente amplifiziert. Dabei ist das erste Fragment ein Amplifikat der DNA des genomischen *GCA2*-Locus. Der *forward*-Primer (Primer A in Abb.3-11) bindet außerhalb des zur Komplementation im pBI121 verwendeten DNA-Fragments, so dass nur das genomische Allel amplifiziert wird, jedoch nicht das an die T-DNA gekoppelte *GCA2*-Allel. Das zweite Fragment ist ein T-DNA spezifisches Produkt. Der Primer E (Abb.3-11) bindet nur auf der Vektor-Sequenz, so dass keine genomische DNA amplifiziert werden kann. Von diesen beiden PCR Fragmenten wurde dann eine 1:100 Verdünnung hergestellt und diese für eine erneute PCR mit den DeCAP-Primern eingesetzt. Durch diese PCR war es möglich, den Genotyp der verschiedenen analysierten F_2 -Pflanzen zu bestimmen. So konnten Pflanzen identifiziert werden, die genomisch homozygot für den mutierten Locus sind und (mind.) eine Kopie der *GCA2*::T-DNA tragen (*gca2gca2*::T-DNA-*GCA2*, siehe Gelbild in Abb.3-11).

Diese Pflanzen wurden dann auf ihre Segregation auf Kanamycin analysiert und die Pflanzen, welche homozygot für Kanamycin waren, wurden erneut analysiert.

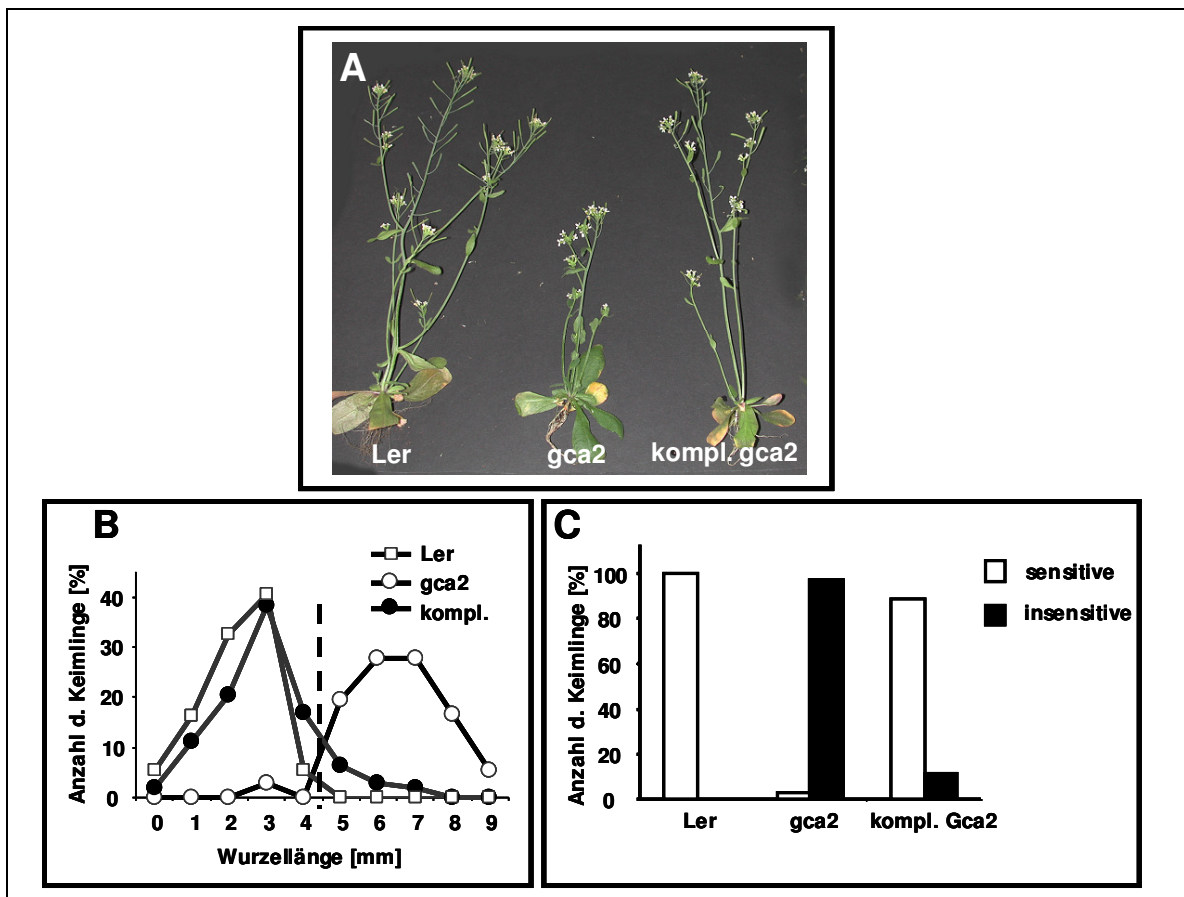


Abb.3-12 Analyse komplementierter *gca2*-Pflanzen

A: Makroskopisches Bild von ungefähr 6 Wochen alten *Landsberg erecta*, *gca2* und komplementierten *gca2* Pflanzen. B: Wurzelwachstumstest auf 10 μ M ABA, Einzelverteilung der Keimlinge. $n > 50$. Eine Differenzierungslinie zur Unterscheidung von sensitiven und insensitiven Keimlingen ist gestrichelt eingezeichnet. C: Prozentuale Darstellung der sensitiven und insensitiven Keimlinge aus B.

In Abb.3-12 ist exemplarisch eine komplementierte *gca2*-Pflanze gezeigt. Der in der Mutante deutlich ausgeprägte Zwergwuchs war in den komplementierten Pflanzen dem Wachstumsphänotyp des Wildtyps wieder sehr ähnlich (Abb.3-12A). Auch das Wurzelwachstum der F_3 -Keimlinge dieser Linie glich annähernd dem des WT. Im Wurzelwachstumstest auf 10 μ M ABA zeigten knapp 90 % der untersuchten Keimlinge wieder ein sensibles Verhalten nach Applikation des Phytohormones (Abb.3-12B + C). Im Labor von J. Schröder (La Jolla, CA) wurden diese Pflanzen auch elektrophysiologisch untersucht. Auch hier zeigte sich nicht mehr die für *gca2* typische Inhibierung der Anionenkanäle (Pei et al. 2000). Die Pflanzen zeigten wieder eine annähernd dem Wildtyp identische Regulation der Ionenkanäle (J Schröder, unveröffentlichte Daten), so dass in

diesen komplementierten Pflanzen durch das Einbringen des *GCA2*-Allels der ABA-Phänotyp wieder dem WT ähnelt.

Es bleibt jedoch anzumerken, dass die hier beschriebene Komplementation nicht bei allen Pflanzen die genotypisch homozygot *gca2* sind und ein an die T-DNA gekoppeltes *GCA2*-Allel enthalten (*gca2 gca2::T-GCA2 T-GCA2*) funktionierte. Von 16 dieser Pflanzen komplementierten nur acht vollständig. Es zeigte jedoch keine einzige (von 12) der mit dem Kontrollplasmid (#1354) oder einem leeren pBI121Ascl transformierten Pflanzen eine Komplementation des *gca2* Phänotyps, so dass die beobachtete Komplementation spezifisch auf das eingebrachte Wildtyp-Konstrukt zurückzuführen ist.

3.2.2 Analysen im transienten System

Eine schnelle und einfache Art die ABA-Signaltransduktion *in vivo* zu analysieren, bieten Protoplastenexperimente. Protoplasten aus vier Wochen alten Wildtyp- und *gca2*-Pflanzen werden dabei mit chimären Reporter-Konstrukten transformiert. Diese Konstrukte setzen sich aus einem ABA-induzierbaren Promotor und dem Gen, das für die *Firefly-Luciferase (LUC)* kodiert, zusammen (Luehrsen *et al.* 1992). In diesem Experiment wurden die beiden ABA-abhängigen Promotoren *pRab18* und *pRD29b* benutzt (Lang und Palva 1992; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993). Wurden die Protoplasten nach der Transfektion mit ABA inkubiert, ließ sich eine verstärkte Luciferaseaktivität messen. Anhand der gemessenen Luciferaseaktivität konnten dann Rückschlüsse auf die Promotoraktivität gezogen werden. So ließ sich die ABA-Insensitivität der *gca2* Mutante gegenüber dem Wildtyp anhand der ABA-abhängigen Induktion des *pRD29b::LUC* oder *pRab18::LUC* Reporters beobachten (Abb.3-13).

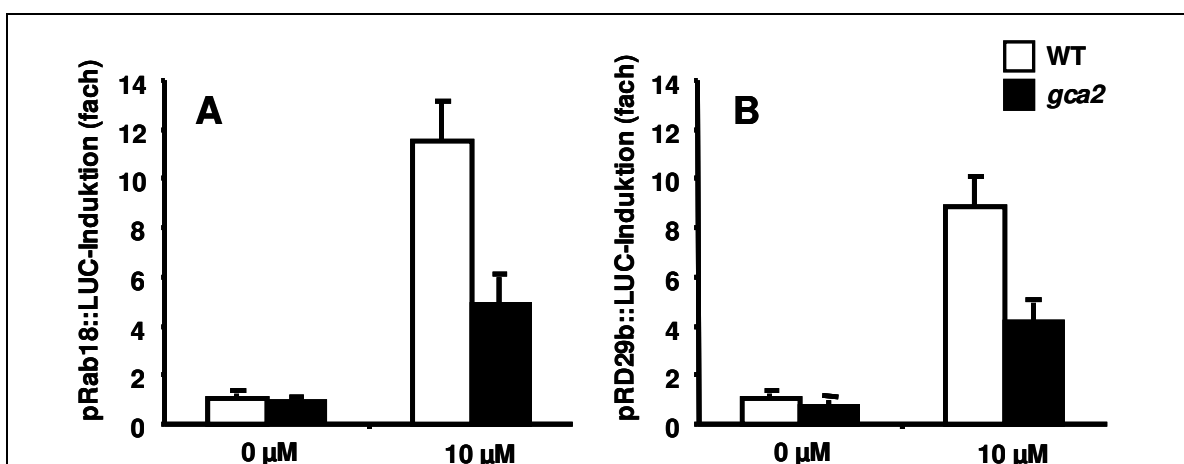


Abb.3-13 Protoplasten-Experiment mit *gca2* und *Landsberg erecta*

Die ABA-abhängige Induktion der Genexpression wurde im WT und *gca2* in einem Protoplasten-Experiment analysiert. Als ABA-abhängige Reporter wurden dazu *pRab18::LUC* (A) und *pRD29b::LUC* (B) verwendet. Die Inkubation mit ABA geschah für 16 h. $n > 3$.

Im WT betrug der ABA-abhängige Induktionsfaktor für *pRab18::LUC* und *pRD29b::LUC*, bezogen auf die jeweils nicht induzierten Werte, $11,4 \pm 1,5$ bzw. $9,1 \pm 1,1$. In den *gca2*-Protoplasten lagen die Induktionsfaktoren bei $5,2 \pm 1,1$ und $4,4 \pm 0,8$, respektive. Es zeigte sich also mit beiden ABA-abhängigen Promotoren eine mehr als 50 %ige Reduktion der ABA-induzierten Luciferaseaktivität in der Mutante verglichen mit dem WT. Die gemessene Luciferaseaktivität ohne exogene Applikation des Phytohormones lag in beiden Fällen auf basalem Niveau und war miteinander vergleichbar, wobei die relativen Werte für die Aktivierung des *pRab18*-Promotors unter den Versuchsbedingungen, im Vergleich zum *pRD29b*-Promotor, um einen Faktor fünf bis sechs höher lagen.

Die ABA-Insensitivität der *gca2* Mutante ließ sich also in diesem transienten System bestätigen. Da diese Art der Quantifizierung der Genantwort experimentell schnell und einfach durchzuführen ist, wurde versucht, den oben beschriebenen Unterschied in der ABA-Sensitivität durch Einbringen des *GCA2* Gens in die *gca2* Mutante transient zu komplementieren.

Hierzu wurden Protoplasten des WT und der *gca2*-Mutante zusätzlich zu dem oben beschriebenen Reporterkonstrukt (*pRD29b::LUC*) mit verschiedenen Effektoren co-transformiert (Abb.3-14).

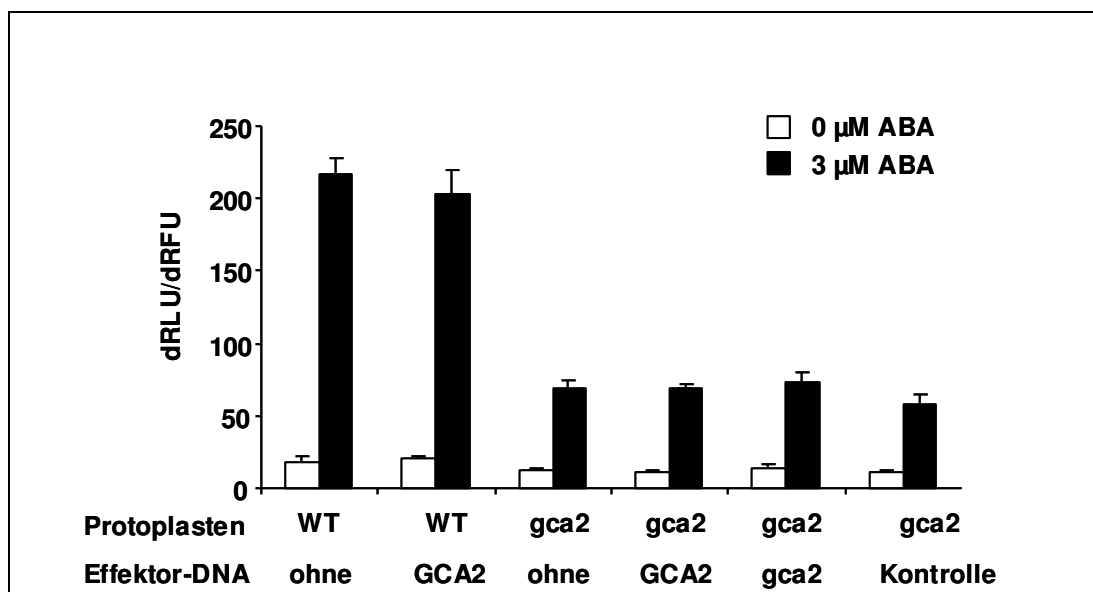


Abb.3-14 Komplementationsversuch von *gca2* im transienten Protoplastenversuch

Protoplasten aus WT oder *gca2* Pflanzen wurden mit $10 \mu\text{g}$ *pRD29b::LUC*, $2 \mu\text{g}$ *p35S::GUS* und $3 \mu\text{g}$ Effektor-DNA transformiert. Nach der Transformation wurde jeder Ansatz aufgeteilt und 2 h nach der Transfektion mit $1 \mu\text{l}$ Puffer oder ABA ($3 \mu\text{M}$) versetzt. Offene Balken zeigen die normalisierte Luciferaseaktivität der Protoplasten ohne ABA, geschlossene Balken die mit ABA. $n=3$.

Dabei ergaben sich für den WT Werte von $216,3 \pm 11,1$ RLU (relative Lumineszenz-Einheiten) mit ABA und $18,1 \pm 3,9$ RLU ohne ABA. Die Co-Transfektion mit $3 \mu\text{g}$ *pGCA2::GCA2*-Plasmid beeinflusst die Reporterexpression nur unmerklich: $202,9 \pm 15,9$

RLU mit ABA und $21,1 \pm 1,6$ RLU ohne ABA. Die Protoplasten der *gca2* Mutante zeigen die bereits oben beschriebene Insensitivität gegenüber der ABA-Applikation. Die Luciferaseaktivität betrug hier $68,7 \pm 6,3$ RLU mit und $12,2 \pm 1,9$ RLU ohne Phytohormon. Die Co-Expression des pGCA2::GCA2-Plasmids zeigte auch hier keine signifikante Änderung der Reporterexpression ($68,6 \pm 0,8$ bzw. $11,0 \pm 1,5$ RLU). Gleiches gilt für die Co-Expression des mutierten *pgca2*::GCA2-Plasmids und für eine Kontrolltransformation mit einem leeren pSK-Vektor.

Die Daten zeigen, dass die Komplementation im transienten System so nicht funktioniert. Als nächstes wurde analysiert, wie sich die ABA-Sensitivität der *gca2*-Protoplasten verändert, wenn das GCA2 Protein unter dem konstitutiven p35S-Promotor exprimiert wird (Abb.3-15).

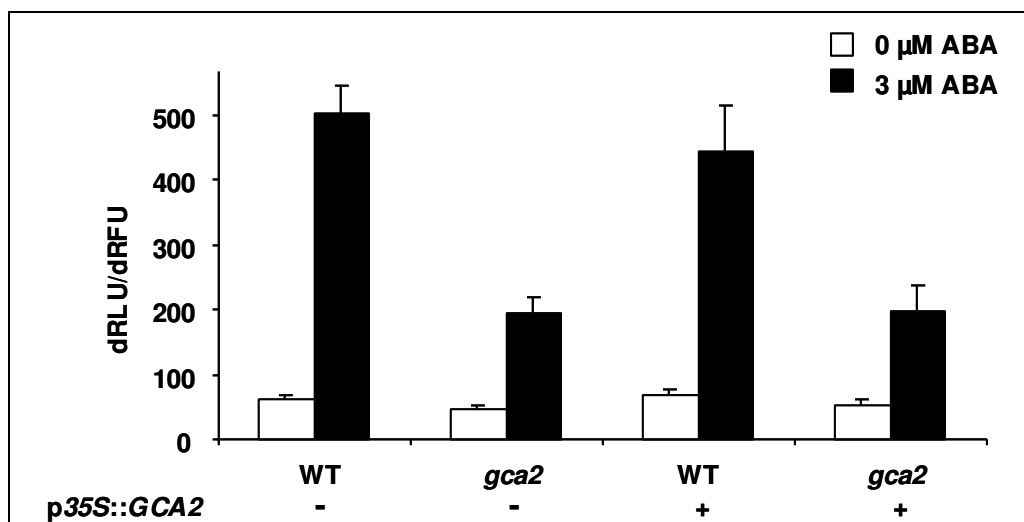


Abb.3-15 Komplementation von *gca2* mit p35S::GCA2

Protoplastenversuch wie oben (Abb.3-14) beschrieben. Die Co-Transfektion erfolgte mit 1 μg p35S::GCA2 (+) oder 1 μg Kontroll-DNA (-). n=3.

Auch die Co-Transfektion mit 1 μg p35S::GCA2 DNA verändert den ABA-insensitiven Phänotyp der *gca2*-Protoplasten nicht. Hierbei bleibt jedoch anzumerken, dass nach einer ebenfalls durchgeführten Transfektion mit einem p35S::GCA2::GFP-Konstrukt nur in weniger als 5 % der Protoplasten ein GFP-Signal zu detektieren war, wohingegen eine Transformation mit der gleichen Menge p35S::GFP eine Transformationseffizienz von ca. 30 bis 40 % aufwies. Eine zur genauen Quantifizierung durchgeführte FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) verlief *bis dato* wenig erfolgreich, so dass für die Quantifizierung zur Zeit keine exakten Daten angegeben werden können. Es zeigte sich jedoch eine erkennbare Reduktion der GCA2-Expression im Vergleich zur GFP-Expression in den Protoplasten, obwohl beide Gene unter dem konstitutiven p35S-Promotor exprimiert wurden.

Auffällig an den in Abb.3-15 dargestellten Werten ist zudem die Tatsache, dass die Expression von GCA2 im Wildtyp-Protoplasten ebenfalls zu einer (wenn auch nur geringfügigen) Reduktion der ABA-abhängigen Reporterexpression führte ($7,9 \pm 0,7$ ohne p35S::GCA2, bzw. $6,7 \pm 0,9$ mit dem Plasmid). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die ABA-Sensitivität von *Arabidopsis* Pflanzen in Abhängigkeit des GCA2-Genprodukts untersucht und überprüft, ob das Expressionsniveau von GCA2 die ABA-Sensitivität des WT beeinflusst.

3.2.3 ABA-Sensitivität in Abhängigkeit des GCA2-Genprodukts

Zunächst wurde der Phänotyp eines GCA2-Null-Allels analysiert. Dazu wurden aus der T-DNA-Insertions-Kollektion der *Cold Spring Harbour Laboratories* (<http://genetrapp.cshl.edu>) ein Allel isoliert, das eine T-DNA Insertion im ersten Exon des Gens *CPK23* besitzt. Diese Insertions-Linie (GT21748) wird im Folgenden als *gca2-2* bezeichnet. Analog dazu wird die `ursprüngliche` *gca2* Mutante um einen Appendix erweitert und als *gca2-1* bezeichnet. Von der *gca2-2* Mutante wurden homozygote Linien generiert und mittels PCR auf das Vorhandensein der T-DNA-Insertion getestet. Dazu wurde die genomische DNA verschiedener Linien mit Primern, die links und recht der Mutation liegen, amplifiziert.

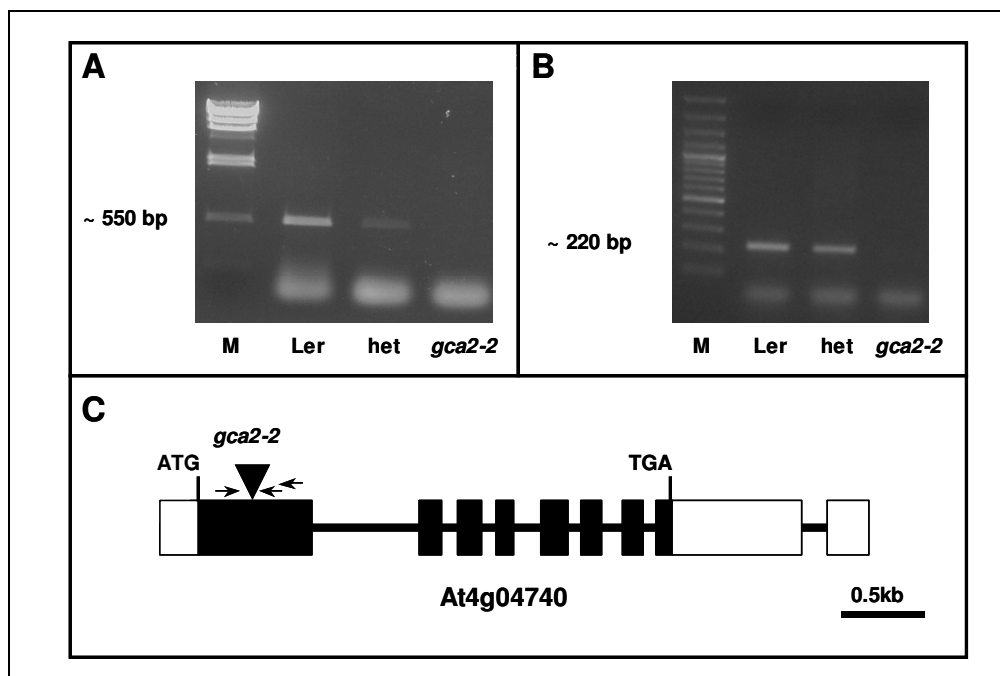


Abb.3-16 Verifizierung der *gca2-2* Mutante

A: Gelbild der Auftrennung der PCR-Fragmente einer genomischen PCR mit Primern, die die T-DNA-Insertion in *gca2-2* umspannen. Marker: Lambda *Hind*III. B: Gelbild einer RT-PCR. Marker: 100 bp ladder Plus. C: Schematische Struktur des GCA2 Gens mit der Insertion in *gca2-2* und den in A und B verwendeten Primern.

In der Abb.3-16A ist das amplifizierte genomische Fragment (bei ungefähr 550 bp) zu erkennen. Dieses Produkt zeigt sich auch in heterozygoten Pflanzen, obschon die Intensität deutlich schwächer ist, wohingegen in den homozygoten *gca2-2* Pflanzen kein Produkt zu amplifizieren ist. Von dieser DNA wurde außerdem noch eine T-DNA-spezifische PCR mit einem für die Insertion spezifischen Primer durchgeführt. Hier zeigte sich eine deutliche Bande in der *gca2-2* Mutante und keine Bande für den Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Aus für die T-DNA Insertion homozygoten Pflanzen wurde zusätzlich RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierung der cDNA zur Bestimmung der Transkriptmenge mit Primern, die ebenfalls die T-DNA Insertion umspannen, lieferten auch hier kein nachweisbares PCR-Produkt (Abb.3-16B), so dass davon auszugehen ist, dass kein vollständiges *CPK23*-Transkript entsteht. Durch die hohe Homologie der einzelnen *CPK*-Gene war es nicht möglich, spezifische Primer hinter der T-DNA Integrationsstelle zu generieren, d.h. es besteht die Möglichkeit, dass in der *gca2-2* Mutante ein verkürztes *CPK*-Transkript entsteht, dem daraus resultierenden Protein würde jedoch die für Proteinkinasen essentielle ATP-Bindedomäne fehlen, so dass ein eventuell synthetisiertes Protein keine Kinaseaktivität aufweisen dürfte. Die verifizierten homozygoten Linien dieser Mutante wurden zur weiteren Analyse herangezogen.

Zunächst wurde ein Keimungsversuch mit den Samen der *gca2-2* Mutante auf verschiedenen ABA Konzentrationen durchgeführt.

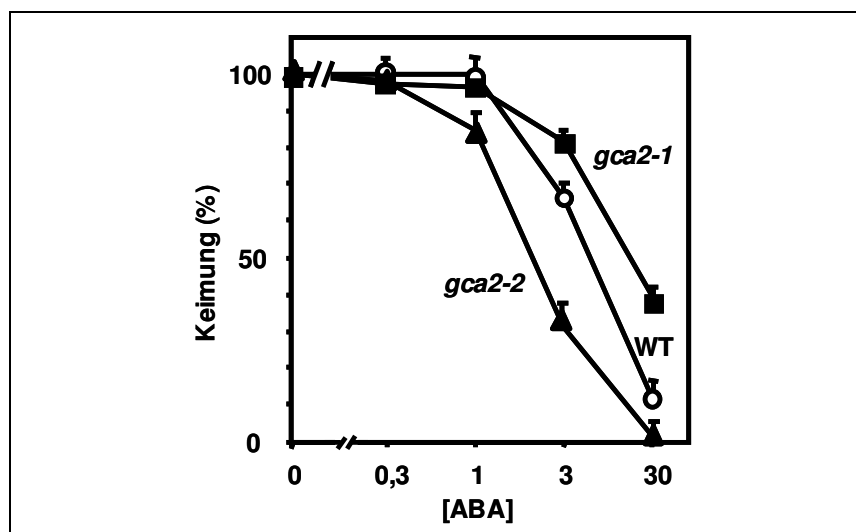


Abb.3-17 Keimungsversuch mit WT, *gca2-1* und *gca2-2* Samen

Keimungsversuch auf MS-Platten mit verschiedenen ABA-Konzentrationen. Samen der verschiedenen Pflanzen wurden auf MS Platten mit den jeweiligen ABA-Konzentrationen ausgebracht und für 48 h bei 4°C stratifiziert. Als Keimung wurde der Durchbruch der Radicula durch die Samenschale gewertet. Die Keimung wurde nach 6 d im Dauerlicht bei 23°C ausgewertet. Die Werte zeigen den Mittelwert von 2 Platten pro Linie mit jeweils mehr als 100 Keimlingen.

Wie in Abb.3-17 zu erkennen ist, zeigte sich das ABA-insensitive Verhalten der *gca2-1* Mutante auch im Keimungsversuch (vergleiche Wurzelwachstum in Abb.3-4). So keimten bei hohen ABA-Konzentrationen von 3 und 30 μM deutlich mehr Samen der *gca2-1* Mutante als Samen des WT. Die *gca2-2* Mutante zeigte ein konträres Bild: Sie verhielt sich hypersensitiv gegenüber dem Phytohormon. Bei einer ABA-Konzentration von 1 μM ABA waren hier deutlich weniger Samen als im WT gekeimt. Diese Tendenz verstärkte sich noch bei höheren ABA-Konzentrationen von 3 und 30 μM ABA.

Um die hier gezeigte Hypersensitivität der *gca2-2* Mutante weiter zu charakterisieren, wurde als nächstes die ABA-Signaltransduktion bei dieser Mutante im transienten Protoplasten-System untersucht.

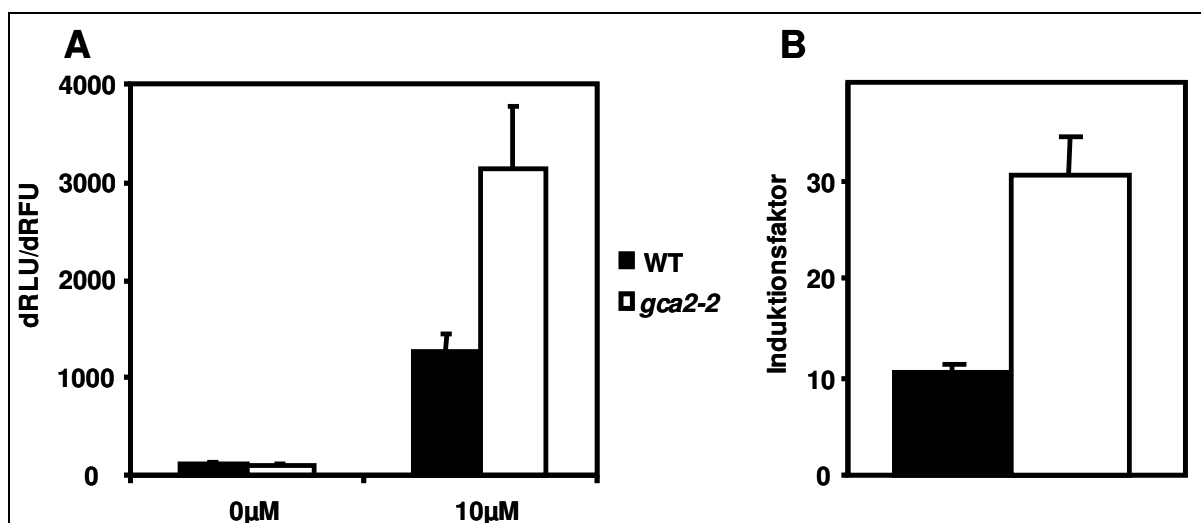


Abb.3-18 Protoplastenversuch mit der *gca2-2* Mutante

ABA-abhängige Induktion des *pRab18::LUC* Reporters. A: Relative Luciferaseaktivität im WT (schwarze Balken) und der *gca2-2* Mutanten (offene Balken) ohne und mit 10 μM ABA. B: Berechneter Induktionsfaktor ohne/mit ABA Applikation. $n=4$, $p<0,05$.

Bei dieser transienten Visualisierung der ABA-Wirkung ließ sich ebenfalls ein signifikanter ($p<0,05$) Unterschied in der Induktion des *pRD29b::LUC* Reporters zwischen dem WT und der *gca2-2* Mutante erkennen. So betrug der berechnete Induktionsfaktor für den WT $10,6 \pm 0,5$ (vgl. Abb.3-13A) und in *gca2-2* $30,4 \pm 4,0$. Die Hypersensitivität der *gca2-2* Mutante gegenüber dem Phytohormon ABA konnte somit auch im Protoplastenexperiment bestätigt werden, und es zeigte sich hier ebenfalls ein zu *gca2-1* konträres Bild.

Da die Regulation der Schließzellen neben der Inhibierung von Keimung und Wurzelwachstum ebenfalls durch ABA gesteuert wird, wurde als nächstes die Regulation der Schließzellen in den drei verschiedenen Linien (WT, *gca2-1* und *gca2-2*) betrachtet. In Wildtyp sorgt ABA, welches in der Pflanze unter anderem bei Trockenstress gebildet wird, für den Schluss der Stomata, damit sich die Pflanze vor Austrocknung schützen kann (Li

et al. 2006). Der Effekt einer exogenen ABA-Applikation auf die Apertur von vier Wochen alten Pflanzen ist in Abb.3-19 graphisch dargestellt.

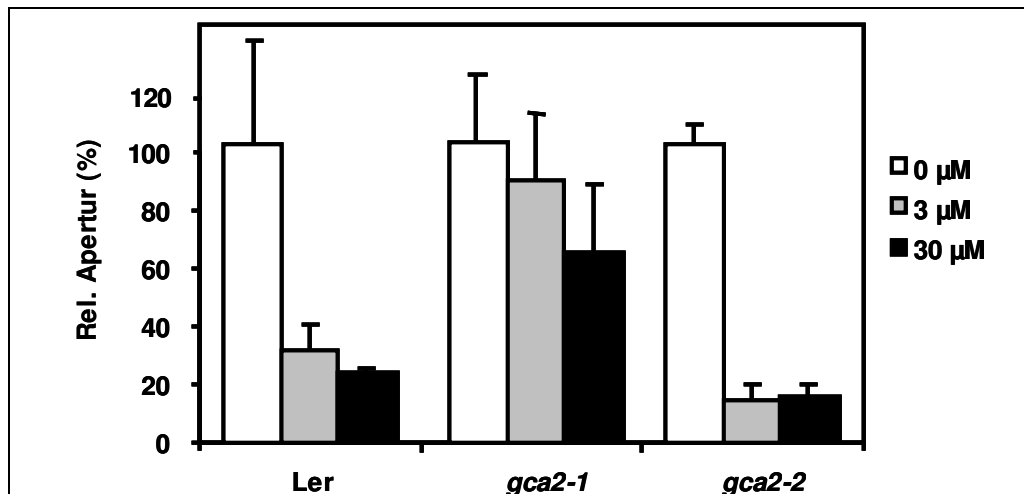


Abb.3-19 Regulation der Schließzellen in vier Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen
Die Pflanzen wurden in einer Phytokammer mit 10 mM MES-Puffer, pH 7,4 ohne ABA, mit 3 µM ABA oder 30 µM ABA besprüht, bis alle Blätter gleichmäßig befeuchtet waren. Die Rosettenblätter wurden nach 2 h unter dem Mikroskop auf die Öffnung der Spaltöffnungen untersucht. n=3. Blätter mit jeweils mehr als 30 untersuchten Spaltöffnungen pro Blatt. Die Apertur unter Kontrollbedingungen wurde auf 100 % gesetzt und betrug für den WT 0,23, für *gca2-1* 0,3 und für *gca2-2* 0,37.

Im WT waren unter normalen (*non-stress*) Verhältnissen trotzdem nicht alle Schließzellen zu jedem Zeitpunkt gleich weit (oder überhaupt) geöffnet. Die Aperturen (A = Breite/Länge der Pore) schwankten zwischen den einzelnen Spaltöffnungen ein und desselben Blattes zum Teil deutlich. Nach Besprühen mit einer 3 µM ABA-Lösung verringerte sich die durchschnittliche Apertur deutlich auf 30 % des Ausgangswertes. Bei 30 µM ABA ging dieser Wert weiter auf etwas mehr als 20 % zurück. Anzumerken bleibt, dass die verwendeten WT-Pflanzen unter Umständen schon vorgestresst waren, da die gemessenen Aperturen ohne ABA geringer als für die beiden Mutanten waren. In der *gca2-1* Mutante bewirkte die ABA-Applikation nur eine mäßige Reduktion der Apertur auf 88 % bei 3 µM ABA und auf 63 % bei 30 µM ABA. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der *gca2-2* Mutante eine Reduktion der Apertur auf 14 % mit 3 µM ABA, bzw. 16 % durch 30 µM ABA. Auffällig hierbei ist, dass die Reduktion der Apertur in der *gca2-2* Mutante durch 3 µM ABA bereits deutlicher ausfiel, als im WT durch 30 µM ABA. Die Erhöhung der ABA-Konzentration hatte in der *gca2-2* Mutante keine weitere Reduktion der Apertur zur Folge. In diesem Experiment zeigt sich ein ABA-insensitives Verhalten der *gca2-1* Mutante und ein ABA-hypersensitives Verhalten in der *gca2-2* Mutante bei der Regulation der Schließzellen.

Bei der Analyse des Wurzelwachstums auf verschiedenen ABA-Konzentrationen (Abb.3-20) zeigte sich jedoch ein anderes Bild.

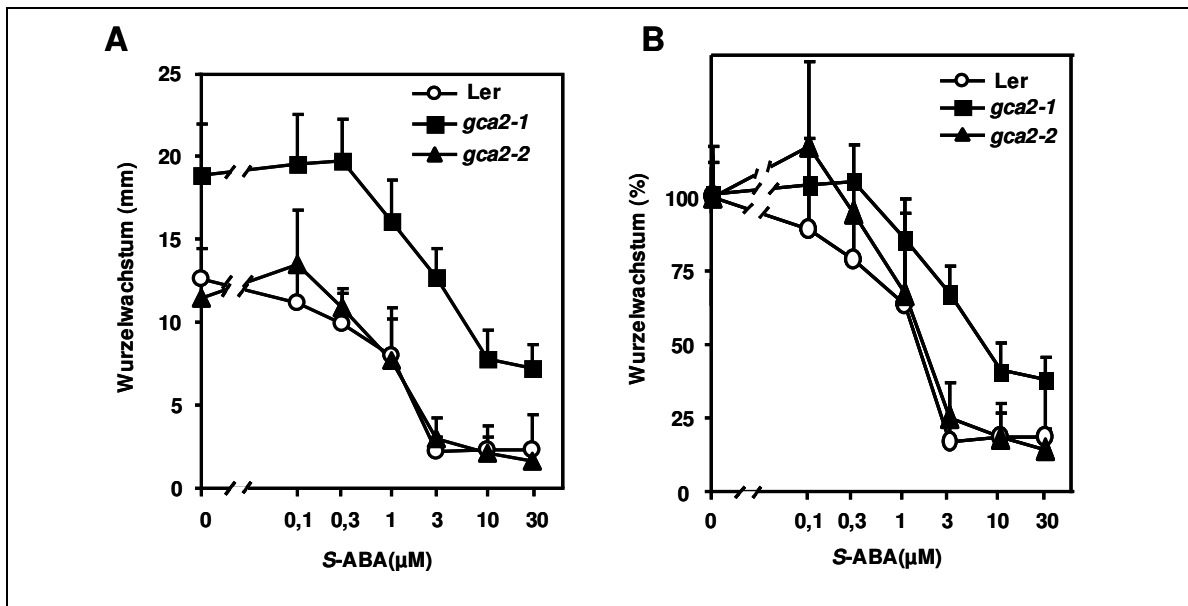


Abb.3-20 Wurzelwachstumstest mit WT, *gca2-1* und *gca2-2*

Inhibition des Wurzelwachstums vom 5d alten Arabidopsis Keimlingen auf MS-Platten mit verschiedene ABA-Konzentrationen. Die jeweilige Wurzellänge der Keimlinge in mm (A) und Prozent (B) ist graphisch gegen die Konzentration an ABA aufgetragen. Die gemessene Wurzellänge entspricht dem Wachstum an drei aufeinanderfolgenden Tagen auf den jeweiligen Platten. n>50.

Für die *gca2-1* Mutante zeigt sich auch in diesem Versuch die oben beschriebenen Insensitivität gegenüber ABA, wobei die längeren Wurzeln der Mutante ohne ABA auffallen (Abb.3-20A). Bei der *gca2-2* Mutante hingegen war im Gegensatz zu den oben beschriebenen Keimungs- und Protoplastenversuchen keine veränderte ABA-Sensitivität im Vergleich zum WT zu beobachten. Dies trifft sowohl für die Betrachtung der tatsächlichen (Abb.3-20A) als auch der prozentualen (Abb.3-20B) Wurzellängen zu. Es bleibt jedoch anzumerken, dass das für diesen Versuch verwendete Saatgut, obgleich ebenfalls homozygot für die T-DNA-Insertion, nicht mit dem für die vorangegangenen Versuche verwendeten Saatgut identisch war, sondern von einer anderen Mutterpflanze geerntet wurde. Um zu überprüfen, ob es sich bei der in diesem Experiment beobachteten ähnlichen ABA-Sensitivität der *gca2-2* Mutante und des WT um ein spezifisches Phänomen des Wurzelwachstums handelt, wurde mit diesem Saatgut erneut ein Keimungsversuch auf 3 µM ABA durchgeführt.

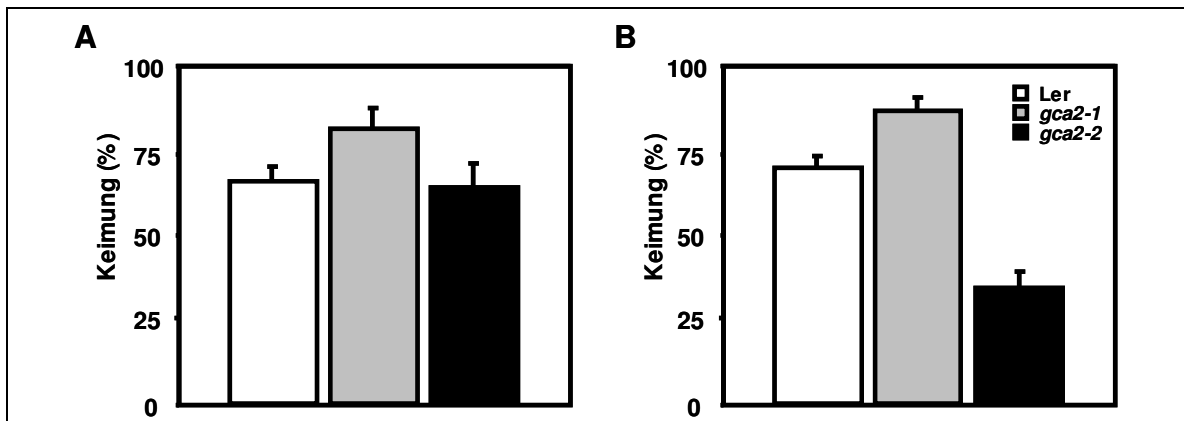


Abb.3-21 Vergleich verschiedener Keimungsversuche

A: Keimungsversuch auf MS-Platten mit 3 µM ABA. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an gekeimten Samen nach 6 d im Dauerlicht bei 23 °C und vorangehender Inkubation für 48 h bei 4 °C. n gleich 2 Platten a jeweils mehr als 100 Keimlinge. B: Balkendiagramm der Werte für 3 µM ABA des Keimungsversuchs aus Abb.3-17.

Auch in diesem Experiment konnten diesmal keine signifikanten Unterschiede zwischen der *gca2-2* Mutante und dem WT festgestellt werden (Abb.3-21A). Vergleicht man die Daten mit den in Abb.3-17 dargestellten Werten (die Werte für 3 µM ABA sind in Abb.3-21B noch mal als Balkendiagramm dargestellt), wo eine klare ABA-Hypersensitivität der *gca2-2* Mutante bei einer Konzentration von 3 µM ABA zu beobachten war, zeigt sich eine deutliche Diskrepanz der beiden Experimente. Einzig die verschiedene ‚Herkunft‘ des Saatguts unterscheidet die beiden abgebildeten Versuche.

Zusammenfassend ist, zumindest in einigen Fällen, eine ABA-Hypersensitivität der *gca2-2* Mutante zu beobachten. Dieser Phänotyp ist dem beschriebenen ABA-insensitiven Phänotyp in der *gca2-1* Mutante entgegengesetzt. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der *gca2-1* Mutante nicht um eine *loss-of-function* Mutante handelt, und die Mutation, trotz des rezessiven Phänotyps in der Mutante, nicht mit einem Funktionsverlust des *CPK23* Gens einhergeht.

Um diesen Befund experimentell zu untersuchen, wurde die Menge an *CPK23*-Transkript und Protein in der *gca2-1* Mutante analysiert und die Funktion des Proteins genauer charakterisiert.

3.2.4 Analyse des *CPK23*-Transkripts

Da der Phänotyp der *gca2-2* Mutante nicht dem Phänotyp der *gca2-1* Mutante entspricht und gezeigt werden konnte, dass in der *gca2-2* Mutante kein komplettes (gleich funktionstüchtiges) *CPK23*-Transkript gebildet wird, stellt sich Frage nach der Menge an gebildetem *CPK23*-Transkript in der *gca2-1* Mutante.

Dazu wurde eine semi-quantitative RT-PCR mit verschiedenen Primer für die Gene *CPK21* (At4g04720), *CPK23* (At4g04740), *FT* (*Flowering locus T*, At1g65480) und *Actin* (At3g18780) durchgeführt.

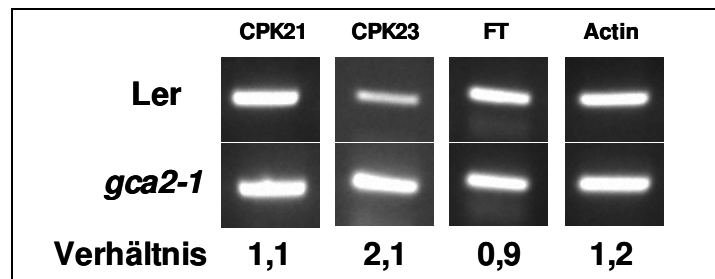


Abb.3-22 RT-PCR

Semi-quantitative RT-PCR mit cDNA aus 5 d alten WT und *gca2-1* Keimlingen. 28 Zyklen für Actin und 31 Zyklen für die anderen drei Gene. Gezeigt sind repräsentative PCR-Banden. Das Verhältnis der relativen mRNA-Mengen *gca2-1*/WT wurde durch Quantifizierung der PCR-Produkte mit dem Programm ImageJ berechnet.

Es zeigt sich ein ungefähr zweifach erhöhtes Transkriptlevel der *CPK23* mRNA in der *gca2-1* Mutante, während die anderen analysierten mRNA Mengen in der Mutante sich nicht signifikant vom WT unterschieden. Die zur Quantifizierung der cDNA Menge durchgeführte Actin-PCR zeigte in beiden Proben eine vergleichbare Signalintensität. Gleiches gilt für eine PCR in welcher spezifisch die *CPK21* mRNA amplifiziert wird. Da die mRNA der beiden *CPK* Transkripte zu ca. 90 % identisch sind, zeigen diese Ergebnisse eine spezifische Erhöhung des *CPK23*-Transkripts in der *gca2-1* Mutante im Vergleich zum WT an. Anschließend wurde eine genaue Analyse der Transkriptmenge nach Applikation von ABA und während verschiedener Zeitpunkte im Lauf des Tag- und Nacht-Rhythmus (da *gca2-1* auch einen spezifischen Phänotyp im Dunkeln zeigt, siehe 3-6-1) durchgeführt.

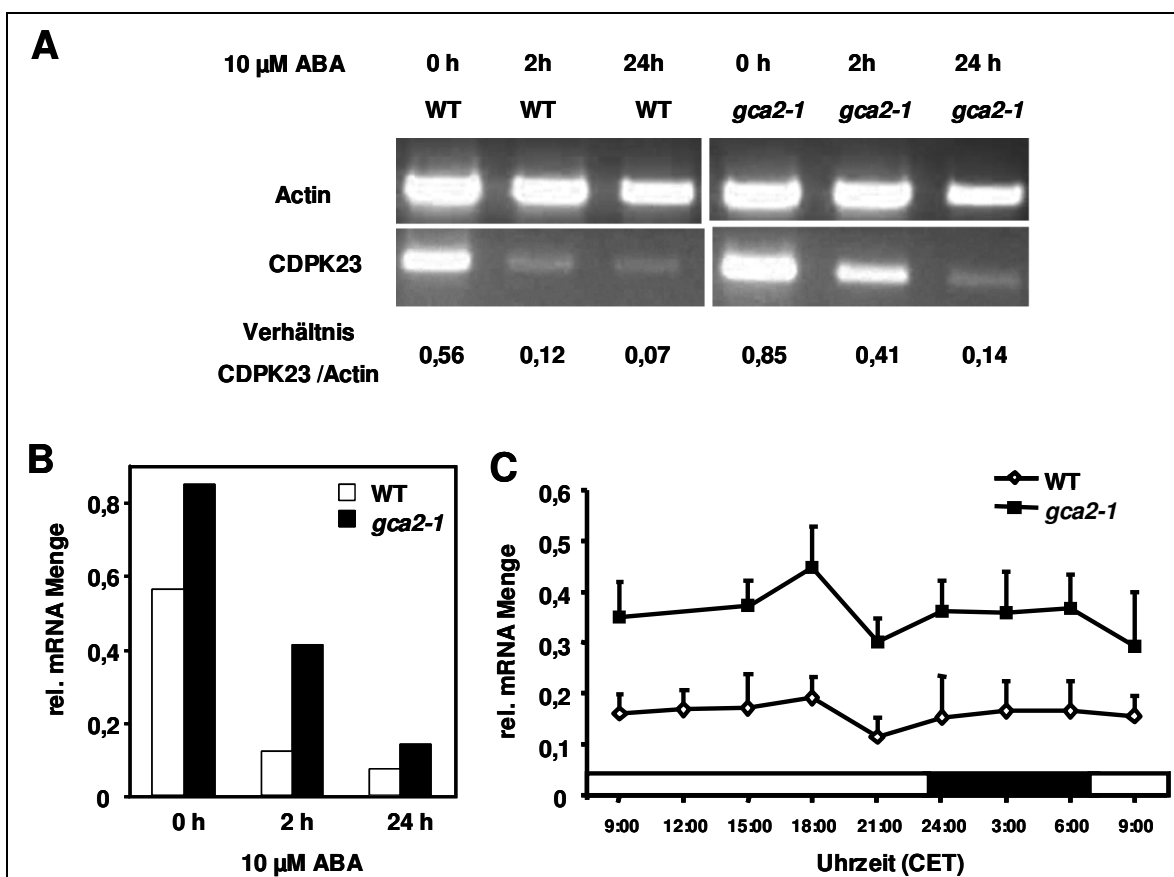


Abb.3-23 Detaillierte Analyse der *CPK23*-mRNA Expression

A: Gelbild einer repräsentativen RT-PCR Analyse: 5 d alte Keimlinge auf MS-Platten wurden für die RNA-Isolation geerntet, und z.T. 2 bzw. 24 h vor der Ernte mit einer 10 μ M ABA Lösung besprüht. Die relative *CPK23* mRNA Menge wurde normalisiert und das Verhältnis zur Actin mRNA Menge berechnet. B: Balkendiagramm der berechneten rel. *CPK23* mRNA Menge aus A. C: RNA wurde aus Rosettenblättern von 4 Wochen alten Pflanzen, die in einer Phytokammer unter Langtagbedingungen (16h Licht / 8 h Dunkelheit) angezogen wurden, isoliert. Die gezeigten relativen mRNA Mengen sind die Verhältnisse der *CPK23* mRNA zur *Actin* mRNA. Der Weiß-Schwarze Balken gibt den Tag/Nacht Rhythmus in der Kammer an. Die Uhrzeit des Erntezeitpunktes ist auf der Abszisse angezeigt. n=3.

Wie in Abb.3-23A zu erkennen ist, ließ sich eine Abnahme der Transkriptmenge nach Besprühen der Pflanzen mit ABA feststellen. Diese Abnahme trat im WT bereits deutlich nach 2 h auf: Hier betrug die mRNA Menge nur noch knapp 25 % im Vergleich zu den nicht mit ABA behandelten Keimlingen. In der *gca2-1* Mutante war nach 2 h ABA-Applikation noch knapp 50 % der Ausgangsmenge an mRNA vorhanden. 24 h nach der ABA-Applikation war die gebildete Transkriptmenge in beiden Fällen auf ein geringes Niveau gesunken und untereinander vergleichbar.

Des Weiteren zeigte sich, dass die bereits oben beschriebene erhöhte Menge des *CPK23* Transkripts in *gca2-1* auch im Verlauf eines 24 Stunden Tag-Nacht-Zyklus zu unterschiedlichen Messzeiten zu beobachten war (Abb.3-23C). Die gemessenen Werte zeigten durchweg eine um den Faktor 2 erhöhte mRNA Menge in der *gca2-1* Mutante.

3.2.4.1 Spleißen des *CPK23* Transkripts

Für die semiquantitative RT-PCR wurden, um die unterschiedlichen *CPK* Transkripte diskriminieren zu können, Primer gewählt, die beide im ersten Exon liegen. Wurden jedoch Primer gewählt, die das erste Intron umspannen (Bindung des *forward* Primers im 1. Exon und des reversen Primers im 2. Exon), zeigte sich noch ein zusätzliches Fragment als Produkt der PCR, das in seiner Größe der ungespleißten DNA entsprach (Abb.3-24B). Das in Tieren weit verbreitete Phänomen des alternativen Spleißens wird auch für pflanzliche Gene als regulatorischer Mechanismus beschrieben (Iida *et al.* 2004). Knapp 20 % der pflanzlichen Gene unterliegen einem alternativen Spleißvorgang, der oft durch *cis*-regulatorische Elemente gesteuert wird (Barbazuk *et al.* 2008).

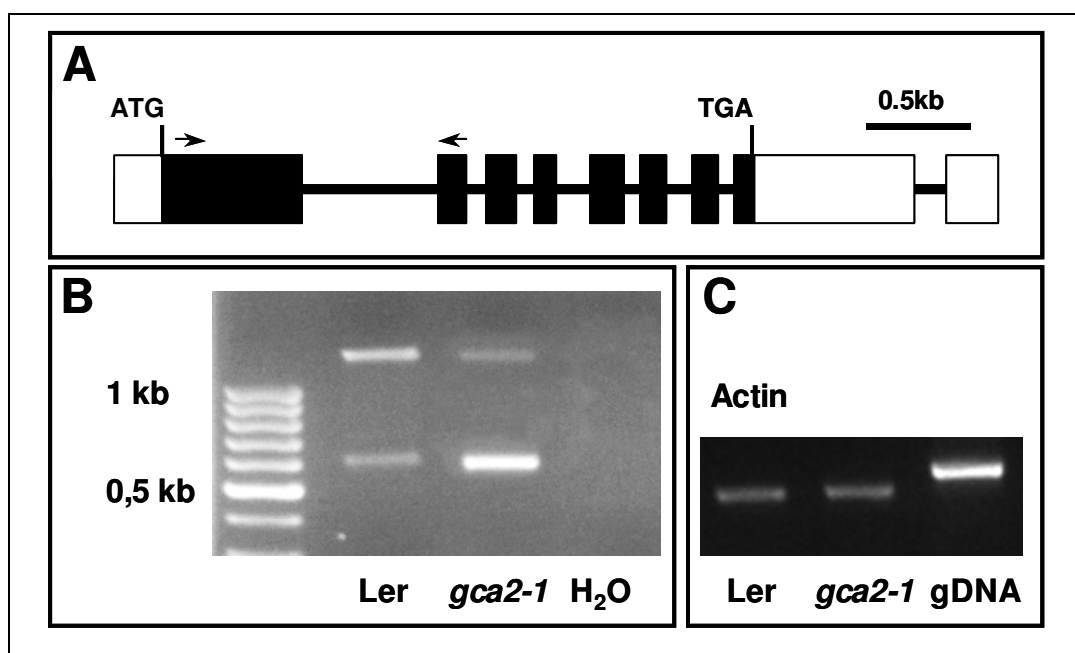


Abb.3-24 Das *CPK23*-Transkript unterliegt einem alternativen Spleißvorgang

A: Exon/Intron Struktur des *CPK23* Gens mit den verwendeten genspezifischen Primern. B: Gelbild der Auftrennung der PCR-Produkte mit diesen Primern. Die PCR wurde mit 32 Zyklen gefahren. Marker : 100bp ladder, die 0,5 kb und 1 kb Banden sind markiert. C: Actin Kontroll-PCR mit genomischer DNA (gDNA) als Kontrolle. 28 Zyklen.

Zum Test auf genomische Verunreinigungen der cDNA wurden Actin-Primer zum Amplifizieren der DNA gewählt, welche ebenfalls ein Intron im Actin-Gen umspannen. In dieser PCR (Abb.3-24C) konnten keine Spuren einer genomischen Verunreinigung nachgewiesen werden. Als weiterer Test wurde eine PCR mit Primern, die in einer IGR (*intergenic region*), also einem nicht-transkriptierten Bereich der DNA, liegen, durchgeführt. Auch in dieser PCR konnte bei gleicher Zyklenanzahl mit der eingesetzten cDNA keine genomisches DNA-Fragment amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzierung des größeren PCR-Fragments aus Abb.3-24B ergab eine perfekte Kopie der Sequenz der genomischen DNA, so dass in diesem Fall des alternativen Spleißens von einer *Intron-Retention* (es entsteht kein neues Leseraster und somit kein

neues/alternatives Protein) auszugehen ist. Diese *Intron-Retention* führt zu einem STOP-Codon im so erzeugten Leseraster, dies hat einen Abbau des Transkripts über den *nonsense-mediated-decay* (NMD) zur Folge (Jaillon *et al.* 2008). In der *gca2-1* Mutante scheint mehr korrekt gespleißte mRNA zu entstehen, während im WT mehr ungespleißtes Produkt vorliegt. Bei verschiedenen PCR-Analysen schwankte die Intensität des nicht gespleißten Produkts (unabhängig, ob WT oder *gca2* cDNA als *template* für die PCR eingesetzt wurde), so dass keine eindeutige Aussage möglich ist. Unter Umständen wird der Spleißvorgang noch von anderen, nicht identifizierten, Faktoren beeinflusst.

3.2.4.2 Bestimmung des Transkriptionsstarts

Als nächstes sollte durch *RACE-PCR* (*rapid amplification of cDNA ends*) geklärt werden, ob der Bereich der Mutation zum *GCA2* Transkript oder bereits zum Promotor gehört. Hierzu wurde eine cDNA-Genbank erstellt, an deren 5`Ende ein Adapter, der Bindestellen für verschiedene Primer aufweist, ligiert.

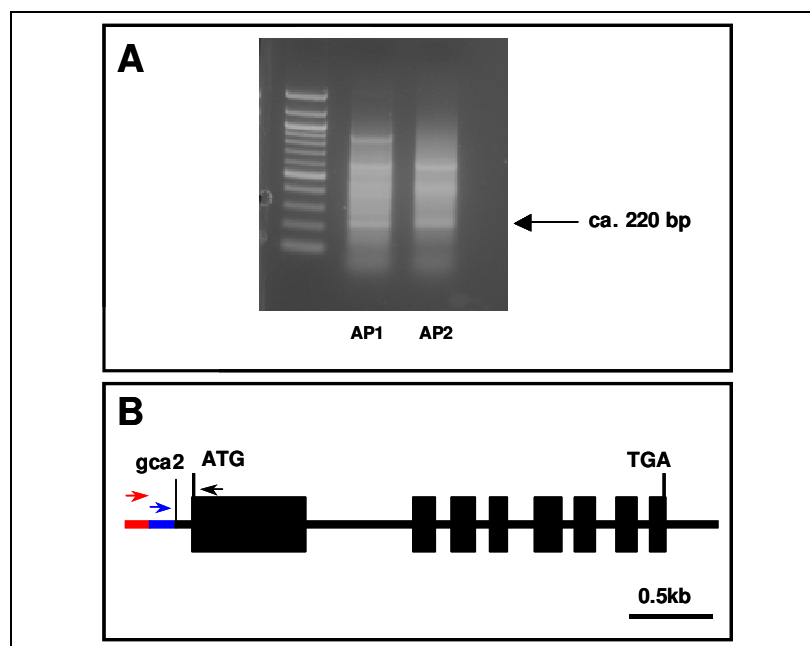


Abb.3-25 RACE-PCR

A: Gelbild der Auftrennung der *Race-PCR* Fragmente mit den verwendeten Adapter-Primern AP1 und AP2. Marker: 100 bp ladder Plus. Der Pfeil markiert ein distinktes Fragment bei ungefähr 220 bp. B: Genstruktur des CPK23 Gens mit den verwendeten Primern. Der AP1-Primer ist blau und der AP2 Primer rot dargestellt.

Mit einem für das *CPK23* Transkript spezifischen Primer (schwarzer Pfeil in Abb.3-25B) und zwei verschiedenen Primern, welche am Adapter binden (blauer Pfeil: AP1, mittlere Spur; bzw. roter Pfeil: AP2, rechte Gelspur) wurde wiederum eine PCR durchgeführt (Abb.3-25A). Eine Vielzahl an PCR-Produkten verschiedener Länge mit einigen distinkten Produkten konnte generiert werden. Drei distinkte Produkte, die sich mit beiden AP-

Primern amplifizieren ließen, wurden sequenziert. Dabei ergab die Sequenzierung der DNA nur für die kleinste dieser Banden (Pfeil in Abb.3-25A) eine Sequenzhomologie zum *GCA2*-Locus. Dieses PCR Produkt endet 193 bp vor dem AUG-Startcodon, so dass dies Teil der UTR ist und möglicherweise einen Transkriptionsstartpunkt darstellt. Es bleibt jedoch festzustellen, dass die bei einer RACE-PCR gebildeten Produkte nicht unbedingt die komplette Länge der mRNA wiedergeben müssen.

Als nächstes wurden computergestützte Algorithmen zur Verifizierung des Transkriptionsstarts herangezogen. Pflanzenspezifische Algorithmen wie *PlantPromDB* (<http://mendel.cs.rhul.ac.uk/mendel.php?topic=plantprom>) lieferten weder für die Vorhersage möglicher Promotor-Sequenzen noch für den Beginn des Transkriptionsstarts signifikante Treffer. Einzig mit dem auf *Drosophila* spezialisierten ‚*Neuronal-Network*‘ Programm (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) konnten zwei mögliche Transkriptionsstartstellen ermittelt werden. Hierbei befinden sich die vorhergesagten Startpunkte im ersten Fall 70 bp und im zweiten Fall 211 bp vor dem AUG-Startcodon der Translation.

Durch die Ermittlung des Transkriptionsstarts über die *RACE*-PCR konnte gezeigt werden, dass die gefundene Mutation in der *gca2-1* Mutante Teil des mRNA-Transkripts, in diesem Falle der 5`UTR, ist. Die *in silico* Analyse stützt ebenfalls diese Vermutung.

Zur Überprüfung dieses Befundes wurde versucht cDNA mit einem Primer vor der Mutation und einem reversen Primer im zweiten Exon zu amplifizieren. Die für den WT und die Mutante generierten PCR-Produkte wurde aus dem Gel isoliert und sequenziert. Hierbei zeigte sich in beiden Fällen ein perfekt gespleißtes *GCA2*-Transkript, welches ebenfalls das in *gca2-1* mutierte Basenpaar in der 5`UTR enthält (ein Cytosin im WT und ein Thymin in der Mutante).

Hierdurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Mutation im mRNA-Transkript des Gens liegt. Die Basensequenz der 5`UTR und der ermittelte Transkriptionsstartpunkt sind im Appendix A2 zu finden.

3.2.4.3 Bedeutung der 5`UTR

Die 5`UTR, die auch als *Leader*-Sequenz bezeichnet wird, kann eine vielfältige post-transkriptionelle Kontrolle auf die Proteinexpression ausüben. Dabei zeigen diese Strukturen oft stark ausgebildete Sekundärstrukturen, denen regulatorische Funktionen zukommen (Bocobza *et al.* 2007). Deshalb wurden, um die Funktion der Mutation in der 5`UTR zu charakterisieren, zunächst putative Sekundärstrukturen der 5`UTR mit Hilfe des RNA-Faltungsprogramm MFOLD (Zuker 2003) berechnet.

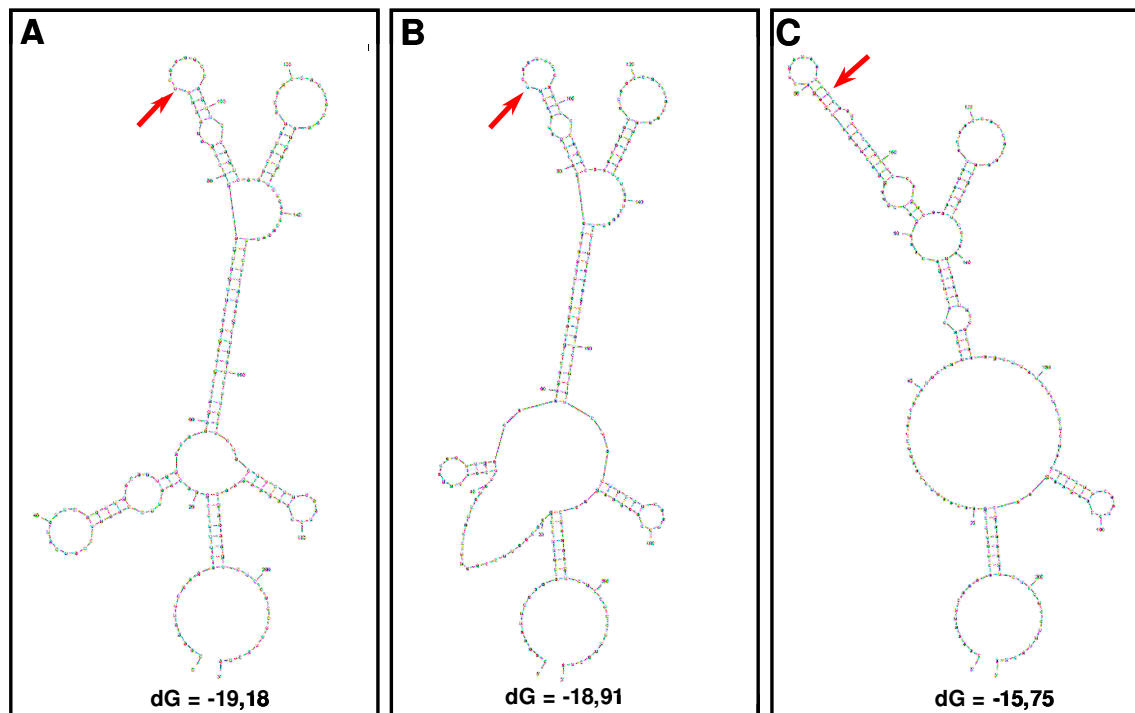


Abb.3-26 Vorhergesagte Sekundärstruktur der 5`UTR des *GCA2*-Gens

Die Sekundärstruktur der experimentell ermittelten Sequenz der 5`UTR wurde mit dem Faltungsprogramm MFOLD modelliert. Gezeigt sind drei der fünf wahrscheinlichsten Strukturen und die mit diesen Strukturen einhergehenden Änderungen der freien Energie (ΔG). Die Pfeile zeigen die Lage des Polymorphismus an.

Die Modelle der 5`UTR zeigen deutliche ausgeprägte Sekundärstrukturen. Die negativen ΔG Werte gehen mit einer Zunahme der Entropie ($\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$) einher. Dabei zeigt ein negativeres ΔG nach dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik eine höhere Wahrscheinlichkeit der vorhergesagten Struktur an. Die in *gca2-1* gefundene Mutation (roter Pfeil in den jeweiligen Sekundärstrukturen in Abb.3-26) hat keinen Einfluss auf die Struktur und den energetischen Wert. Um die Wirkung der Mutation zu prüfen, wurde der *GCA2*-Promotor (~1000 bp *upstream* des Startcodons) zusammen mit der endogenen 5`UTR (mutiert und nicht mutiert) vor das Gen der *Firefly-Luciferase* (*LUC*) kloniert. Die so entstandenen Vektoren *pGCA2::LUC* (WT) und *pgca2::LUC* (*gca2*) wurden daraufhin im Protoplastenversuch auf die Expression der Luciferase getestet.

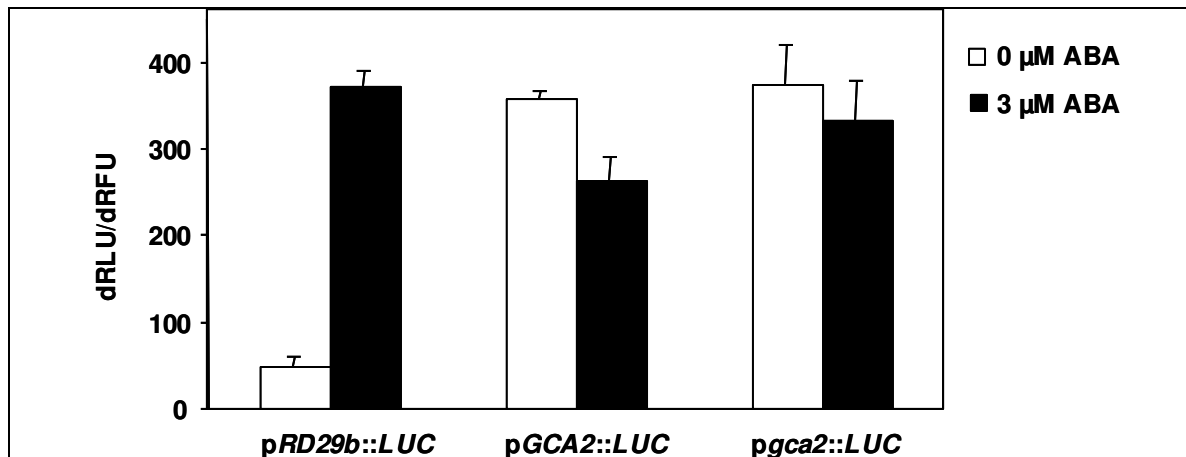


Abb.3-27 Protoplastenexperiment mit pGCA2::LUC-Konstrukten

ABA-abhängige Expression verschiedener Promotor-Luciferase Reporter Konstrukte. Protoplasten aus *Landsberg erecta* wurden mit 10 μg der jeweiligen Reporterkonstrukte transformiert. Die normalisierte Expression der Luciferase ohne (offene Balken) und mit 3 μM ABA (geschlossene Balken) ist gezeigt. $n > 3$.

Der pRD29b-Promotor zeigte eine, auch schon in Abb.3-13 beschriebene, ABA-abhängige Induktion der Promotoraktivität. Die Aktivität des pGCA2-Promotors war bereits unter Kontrollbedingungen ähnlich hoch wie die des induzierten pRD29b Promotors. Nach Inkubation mit ABA ließ sich eine geringe Abnahme der Aktivität feststellen. Das pgca2::LUC-Konstrukt, welches die mutierte 5'UTR beinhaltet, zeigte eine geringfügig (nicht signifikante) stärkere Expression der Luciferase. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zu den RT-PCR Ergebnissen (vgl. 3.2.4). Deshalb wurden zusätzliche Konstrukte, bei denen die beiden Varianten der 5'UTR zwischen den p35S-Promotor und das Luciferase Gen kloniert wurden, generiert. Bei diesen Konstrukten wurde darauf geachtet, dass der Kontext des Startcodons dem genomischen Kontext entsprach, d.h. die gleiche Basensequenz aufwies, falls ein möglicher regulatorischer Einfluss der UTR diesen Kontext benötigt. Hierzu wurde die verwendete Klonierungsschnittstelle hinter das Startcodon der Luciferase gesetzt (siehe Abb.3-28).

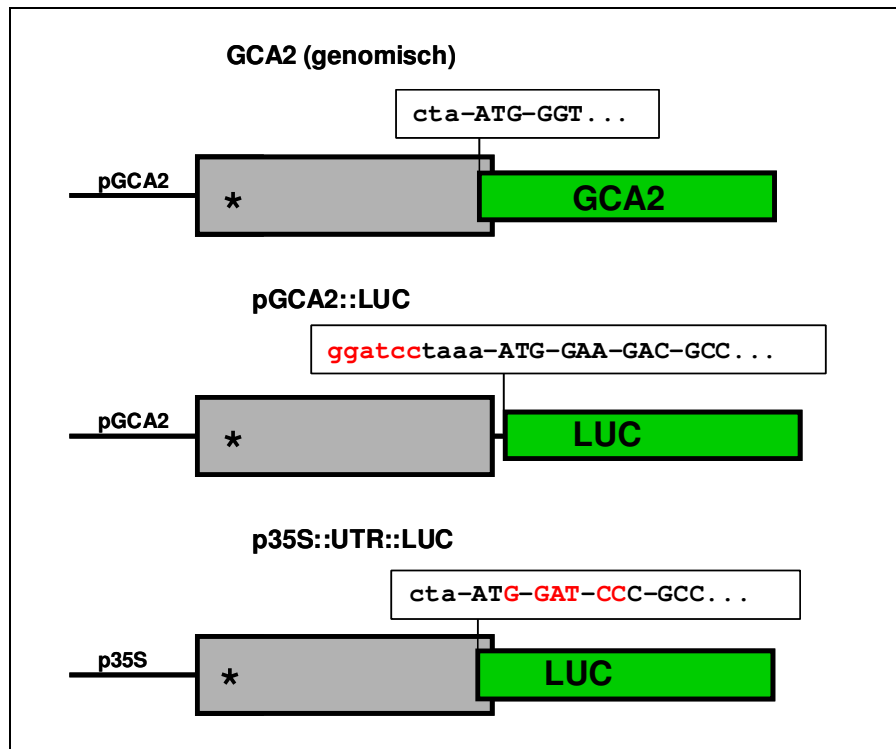


Abb.3-28 Struktur der pGCA2::LUC und p35S::UTR::LUC Konstrukte

Schematische Struktur des genomischen *GCA2*-Gens (oben), des pGCA2::LUC-Konstrukts (Mitte) und des p35S::UTR::LUC Konstrukts. Graue Kästchen präsentieren die transkribierten Bereiche der 5'UTR. Die CDS der Gene ist durch eine grüne Box gekennzeichnet. Der Stern zeigt die Position der *gca2* Mutation in der 5'UTR an. Die Sequenz um das Startcodon ist jeweils angegeben und die Basen der verwendeten Klonierungstelle (GGATTC, *Bam*HI) sind rot gefärbt.

Daraus resultieren zwei Aminosäureaustausche am Beginn des Luciferase Proteins (MEDAK... → MDPAK...), welche jedoch die enzymatische Aktivität nicht merklich beeinflussten.

Mit diesen so generierten Konstrukten wurde wiederum in Protoplastenversuchen die Expression der Luciferase und ein möglicher Einfluss der Mutation in der 5'UTR untersucht.

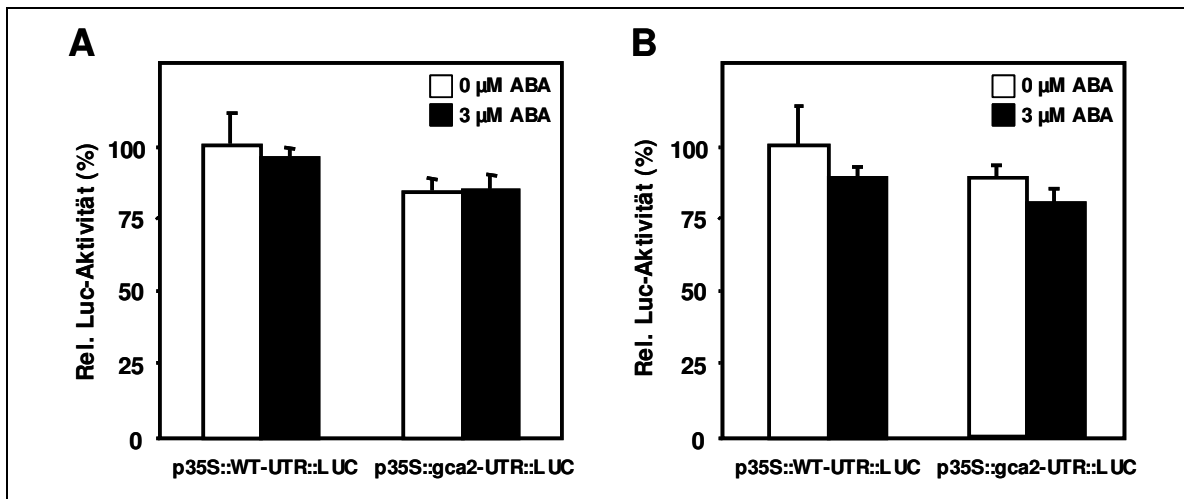


Abb.3-29 Protoplastenversuch mit p35S::UTR::LUC Konstrukten

Protoplasten aus *Landsberg erecta* wurden mit 2 μg p35S::GUS und in (A) mit 5 μg p35S::UTR::LUC oder in (B) mit 100 ng p35S::UTR::LUC und 5 μg pSK Plasmiden transformiert. Nach der Transformation wurden die Ansätze geteilt und mit 1 μl WIMK-Puffer oder 1 μl ABA in WIMK (Endkonzentration 3 μM) versetzt. Die normalisierte Luciferaseaktivität ist angegeben und für das p35S::WT-UTR::LUC-Konstrukt jeweils auf 100 % gesetzt. 100 % entsprechen in (A) 4000 RLU/dRFU und in (B) 170 RLU/dRFU. n=3.

Die Transformation von WT Protoplasten mit diesen p35S::UTR::LUC Konstrukten (Abb.3-29) lieferte keine signifikanten Unterschiede in der gemessenen Luciferaseaktivität in Abhängigkeit der mutierten oder nicht mutierten Sequenz der 5'UTR. Dabei unterschieden sich die relativen Meßwerte nicht voneinander, unabhängig ob 5 μg (Abb.3-29A) oder 100 ng (Abb.3-29B) der Reporterkonstrukts für die Transformation verwendet wurden. In beiden Fällen zeigte das Konstrukt mit der mutierten 5'UTR eine etwas geringere Luciferaseaktivität (auf ca. 80 %) als das Konstrukt mit der nicht mutierten 5'UTR. Die Applikation von ABA führte in drei von vier Fällen zu einer leichten Reduktion der Reporteraktivität, doch auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der beiden Konstrukte.

Auch mit diesen Konstrukten ließ sich kein regulatorischer Einfluss der Mutation auf die Expression des Luciferase-Gens in Protoplasten feststellen. Deshalb wurde als nächstes das GCA2-Proteinlevel in intakten Pflanzen analysiert.

3.2.5 Analyse von CPK23-GFP-Fusionsproteinen

Um den Einfluss der Mutation auf das Expressionsniveau des GCA2-Proteins näher zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: Zunächst wurde ein Peptidantikörper gegen ein für GCA2 spezifisches Peptid generiert (siehe Abb3-30).

GCA2	36	STPISV	RYPE TILGKGKALG	ILGKPFEDIR	KFYSLGKELG	RGGLGITYMC	...
CPK 21	56	SNPVSV	RDPD TILGK.....PFEDIR	KFYSLGKELG	RGQFGITYMC	...
CPK 15	78	LKPIVE	RETE TILGK.....PFEEIR	KLYTLGKELG	RGQFGITYTC	...

Abb.3-30 GCA2-Peptidantikörper

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von GCA2 und den beiden nächst verwandten CPKs 15 und 21 (siehe Abb.1-6). Gegen die rot markierten Aminosäuren wurde der Peptidantikörper hergestellt. Die in den drei Proteinen konservierten Aminosäuren sind in Fettschrift gezeigt.

Durch die hohe Homologie der 34 Mitglieder der CPK-Genfamilie ist es schwierig, einen für das CPK23 Protein spezifischen Antikörper zu generieren, der gegen eine als Antigen brauchbare Sequenz gerichtet ist. So hat das 14 Aminosäuren lange Peptid, welches zur Erzeugung des Antikörpers von der Firma *Genescript* (<http://www.genscript.com/>) benutzt wurde, immer noch 50 % Identität mit den beiden zu GCA2 nächst verwandten Proteinen CPK 21 und CPK 15 (siehe Abb.3-30). Deshalb ist nicht mit Sicherheit davon auszugehen, dass der Antikörper für GCA2 spezifisch sein wird.

Westernblots mit diesem Antikörper zeigten in der Tat keine Spezifität: Sowohl im WT, in der *gca2-1* Mutante als auch in der *gca2-2 knock-out* Mutante zeigte sich eine deutliche unspezifische Bande bei ungefähr 25 kDa und bei der zu erwartenden Größe von 58 kDa war kein Protein zu detektieren, obwohl der Antikörper rekombinantes GCA2-Protein erkannte. Deshalb erfolgte der Nachweis des GCA2 Proteins in Pflanzen indirekt unter Verwendung eines GFP Antikörpers. Dazu wurden transgene Pflanzen erzeugt, die ein GCA2-GFP-Fusionsprotein exprimierten. Diese konnten sowohl zur Visualisierung des GCA2-Proteins (siehe 3-2-5) als auch zu Quantifizierung der Proteinmenge durch einen GFP-Antikörper genutzt werden. Es wurden zwei verschiedene Konstrukte kloniert, bei denen sich das GCA2-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des endogenen *pGCA2*-Promotors befindet. Einmal wurde vor das Startcodon des Fusionsproteins die endogene 5'UTR des WT kloniert (*pGCA2::GCA2::GFP*), beim zweiten Konstrukt wurde die mutierte 5'UTR (*pGCA2::gca2::GFP*) verwendet.

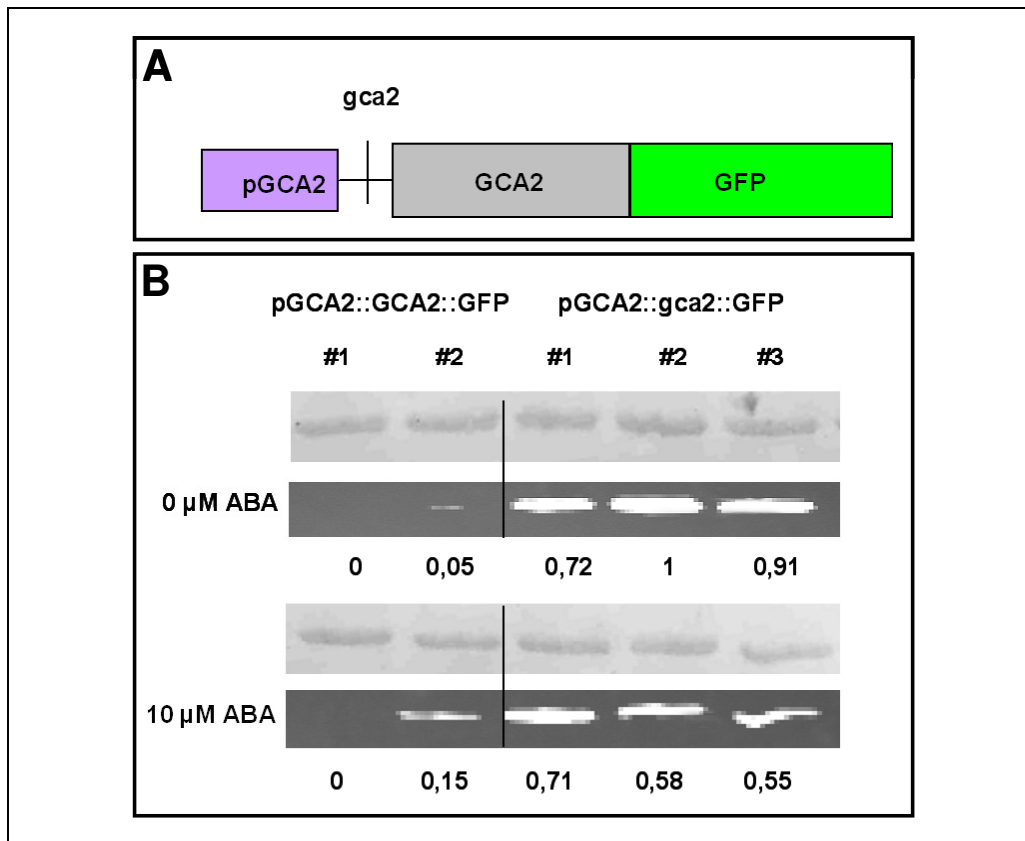


Abb.3-31 Westernblot mit α -GFP Antikörper

A: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Die Mutation in der 5'UTR ist markiert. B: Westernblot mit GFP-Antikörper. Es wurden 6 d alte Pflanzen auf MS-Platten von 2 verschiedenen homozygoten transgenen Linien für das WT-Konstrukt und 3 verschiedenen homozygoten transgenen Linien für das mutierte Konstrukt für die Proteinisolierung verwendet. Die MS Platten wurden 12 h vor der Proteinextraktion mit MES-Puffer mit und ohne 10 μ M ABA besprüht. Die obere Spur zeigt jeweils die *Ponceau* gefärbte Bande der großen Untereinheit der RuBisCo, während im unteren Gel das Lumineszenzsignal des Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers zu sehen ist. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte über die Analyse der Signalintensität mit dem Programm ImageJ.

Der Immunoblot wurde mit 6 d alten homozygoten Keimlingen die auf MS-Platten gekeimt waren durchgeführt. Zwölf Stunden vor der Proteinextraktion wurden die Keimlinge entweder mit Kontroll-Lösung (10 mM MES, pH 7,4) oder mit 10 μ M ABA besprüht. Es wurden zwei unabhängige transgene Linien mit dem WT-Konstrukt und drei unabhängige transgene Linien, die das mutierte Konstrukt tragen, analysiert. In Abb.3-31A ist schematisch der Aufbau der Konstrukte gezeigt. Wegen der potenziellen N-terminalen Myristylierungsstelle am Gly² (siehe Abb.3-35) im GCA2-Protein, die für die korrekte Funktionalität des Proteins wichtig sein kann, wurden sämtliche GFP-Fusionen C-terminal kloniert. Die detektierte Menge an Fusionsprotein unterschied sich deutlich zwischen den Linien, welche das WT-Konstrukt exprimierten (nicht detektierbar, bzw. 0,05 rel. Einheiten) und den Linien, welche die mutierte Version des Konstruktes tragen. Hier zeigte das relative Expressionslevel des Fusionsproteins Werte zwischen 0,72 und 1, was eine mehr als zehnfache Erhöhung des Proteinlevels widerspiegelt. Nach ABA-Applikation

lagen die detektierbaren Werte im ersten Fall bei 0,15 relativen Einheiten und bei den drei mutierten Versionen zwischen 0,55 und 0,71. Ein mit vier Wochen alten transgenen Pflanzen durchgeführter Immunoblot lieferte vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Die Konstrukte mit der mutierten 5`UTR zeigten eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression des GCA2-GFP Fusionsproteins in stabil transformierten Pflanzen, während in transienten Protoplastenexperimenten die Mutation keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression des dort verwendeten Reporters hatte.

3.2.5.1 Inter- und intrazelluläre Lokalisation

Nun wurde die Lokalisation des unter der Kontrolle des endogenen Promotors stehenden GCA2-GFP-Fusionsproteins in verschiedenen Geweben von Keimlingen analysiert. Sowohl die Gewebespezifität als auch die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins unterschied sich hierbei nicht zwischen Konstrukten mit mutierter oder nicht-mutierter 5`UTR. Einzig die Intensität des GFP-Signals war in den Pflanzen, die mit dem mutierten Konstrukt transformiert wurden, deutlich erhöht. Da das Signal in den Linien mit der WT-5`UTR kaum detektierbar war, sind in den folgenden Abbildungen die Linien mit dem mutierten Konstrukt zur Visualisierung der Lokalisation gezeigt.

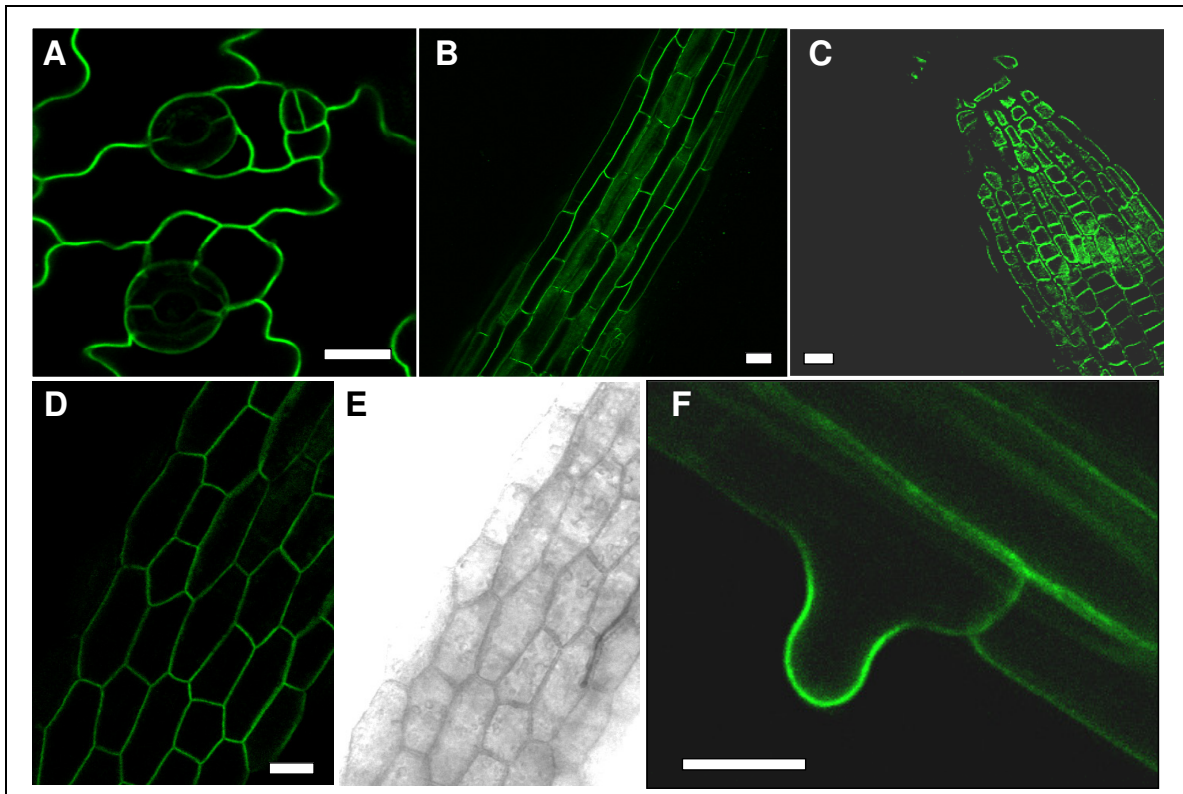


Abb.3-32 Lokalisation von GCA2-GFP Fusionsproteinen in *Arabidopsis* Keimlingen

Das GFP-Signal (A-D;F) ist in verschiedenen Geweben zu beobachten. A: Epidermiszellen mit Schließzellen. B: Teile der Wurzel. C: Wurzelspitze. D: Hypokotyl. E: Durchlichtbild von D. F: auswachsendes Wurzelhaar. Der als Größenstandard abgebildete weiße Balken entspricht jeweils 20 μm .

Das GCA2-Fusionsprotein wird in allen untersuchten Geweben exprimiert und scheint dort membranständig lokalisiert zu sein.

In Abb.3-32 A sind Epidermiszellen zu sehen. Das Signal ist in sämtlichen Zellen, inklusive den Schließzellen zu erkennen. Die in der Abbildung gezeigten Schließzellen sind offen. Das Gewebe war keinem Wasserstress ausgesetzt.

In gestressten Blättern (geschlossene Schließzellen) ergab sich eine vergleichbare Lokalisation (vgl. Abb.3-33). Gleiches gilt für Wurzelspitze (C), Hypokotyl (D+E) und Wurzelhaar (F). In letzterem ist ein starkes Signal an der auswachsenden Wurzelhaarspitze zu erkennen. Hierbei ist bekannt, dass Calcium wichtige Funktionen bei dem Auswachsen der Wurzelhaare zukommen (Carol und Dolan 2002).

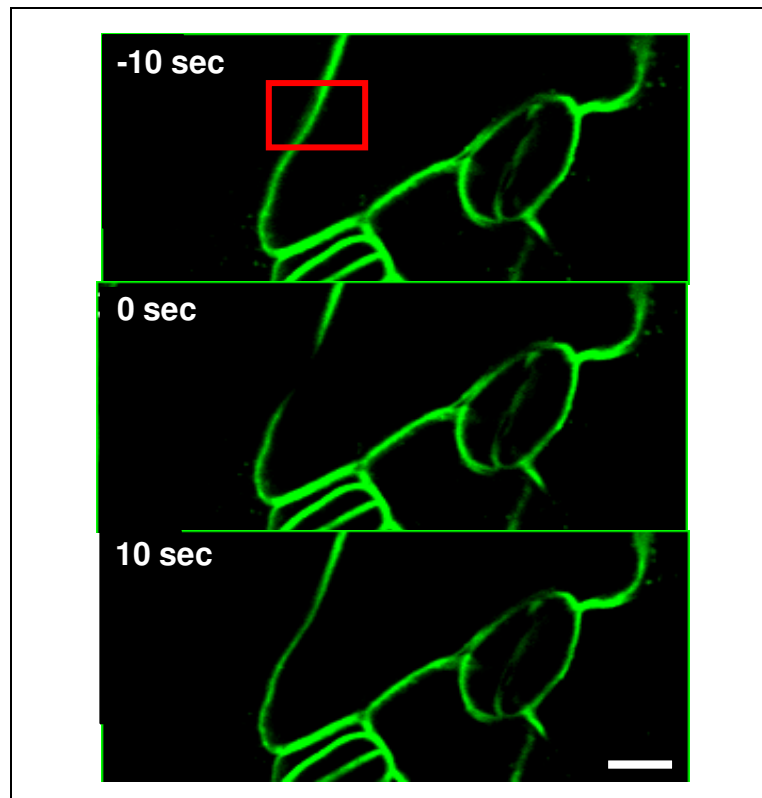


Abb.3-33 FRAP-Experiment

In einen FRAP-Experiment wurde ein Bereich der Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ sek. mit hoher Laserintensität ausgebleicht. Der Bereich (*ROI*) ist durch ein rotes Quadrat gekennzeichnet. Das obere Bild zeigt die Signalintensität vor dem Ausbleichen während im unteren Bild der Zustand 10 Sekunden danach gezeigt ist. Der weiße Balken entspricht $10 \mu\text{m}$.

In einem FRAP (*fluorescence recovery after bleaching*) Experiment wurde die Rückkehr des GFP Signals nach dem Ausbleichen eines bestimmten Bereiches (*ROI, region of interest*) genauer beobachtet. Bereits nach einer Zeitspanne von 10 Sekunden nach dem Ausbleichen war die volle Intensität des GFP Signals wieder sichtbar. Das heißt, dass in dieser Zeitspanne ($t < 10$ sec.) bereits genug Protein aus den umliegenden Bereichen wieder in den vorher gebleichten Bereich eingewandert sein muss, was für eine hohe Diffusionsrate spricht. Ähnlich schnelle membrangebundene Diffusion sind z.B. für das Transmembran-Protein FLS2 (*Flagellin sensitive 2*) mit Diffusionskoeffizienten von bis zu $0,34 \mu\text{m}^2/\text{sek}$. beschrieben (Ali *et al.* 2007).

Auch in transient transformierten Protoplasten war eine membranständige Lokalisation des Fusionsproteins zu erkennen (Abb.3-34). Das detektierte GFP-Signal war hier nach Transformation mit dem mutierten Konstrukt ebenfalls erkennbar stärker. Für eine genaue Quantifizierung der Signalintensität wurden FACS-Analysen initiiert, die jedoch keine messbaren Unterschiede aufwiesen und zukünftig erneut angegangen werden müssten.

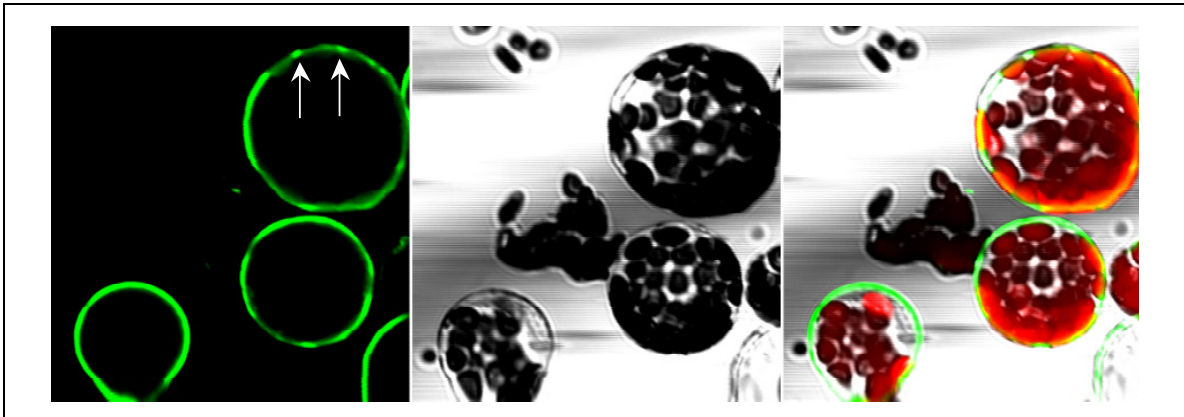


Abb.3-34 Lokalisation in Protoplasten

Transiente Expression von pGCA2::*gca2*::GFP in Protoplasten. Links: GFP-Kanal, in der Mitte Durchlicht und rechts GFP-Kanal + Durchlicht und Autofluoreszenzkanal. Die Pfeile im GFP-Bild markieren *spots* nahe an der Plasmamembran.

Deutlich zu sehen ist die schon in stabil transformierten Pflanzen beobachtete membranassoziierte Lokalisation des Fusionsproteins. Auffällig ist weiterhin, dass sich teilweise lokale Anhäufungen (*spots*, Pfeile in Abb.3-34) des GFP-Signals an der Membran zeigten.

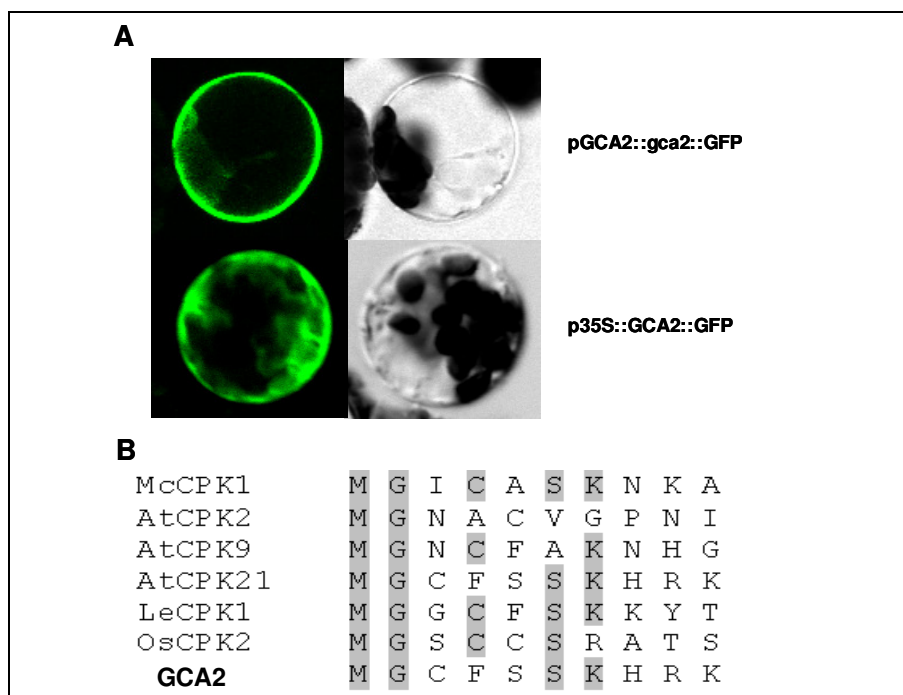


Abb.3-35 Lokalisation von GCA2-GFP Fusionsproteinen in Protoplasten

A: konfokale Bilder von Protoplasten, die mit 10 µg pGCA2::*gca2*::GFP oder 10 µg p35S::GCA2::GFP transformiert wurden. B: *N*-myristoylation-sites verschiedener CPKs (verändert nach (Dammann et al. 2003)) und die Homologie dieser Regionen zu GCA2. Konservierte AS sind grau hinterlegt.

In Abb.3-35B sind die vorhergesagten *N*-myristoylation-sites verschiedener CPKs gezeigt. Die zu diesen Sequenzen homologe GCA2-Sequenz weist ebenfalls eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Myristolierung am Gly² auf. Diese posttranslationale Modifikation

sorgt in den meisten Fällen dafür, dass das myristolierte Protein an die Plasmamembran angelagert wird. So konnte z.B. für etliche CBL-Proteine eine direkte Verbindung zwischen Myristolierung und Membranlokalisierung gefunden werden (Batistic *et al.* 2008). Wird das GCA2-GFP-Fusionsprotein allerdings unter dem starken p35S-Promotor exprimiert, zeigt sich (zusätzlich) eine cytoplasmatische Lokalisation des Proteins.

3.2.6 Phänotyp von GCA2-GFP exprimierenden Pflanzen

Nachdem die Expression und Lokalisation des GCA2 Proteins sowohl transient als auch in stabilen Pflanzen beschrieben wurde und gezeigt werden konnte, dass die Mutation in *gca2-1* zu einer verstärkten Expression des GCA2 Proteins führt, wurde nachstehend der Phänotyp von transgenen *Landsberg erecta* Pflanzen, die mit dem pGCA2::*gca2*::GFP Konstrukt transformiert wurden, mit dem WT und der *gca2-1* Mutante verglichen. Als erster physiologischer Test wurde ein Keimungsversuch mit gleich alten Samen homozygoter T₂-Pflanzen durchgeführt (Abb.3-36).

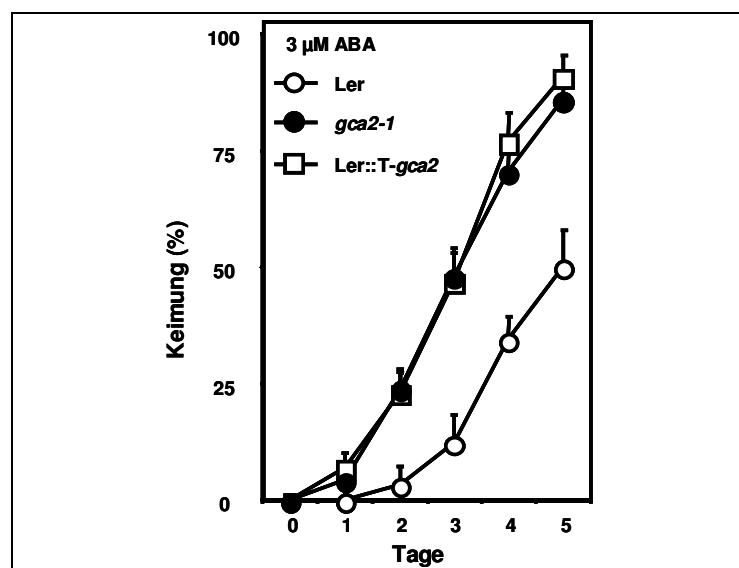


Abb.3-36 Keimungsversuch mit GCA2-GFP exprimierenden Pflanzen

Die Keimung von Arabidopsissamen des WT, der *gca2-1* Mutante und einer Linie, die stabil GCA2-GFP exprimiert, wurde auf MS-Platten mit 3 μM ABA jeden Tag auf den gleichen Platten ausgezählt. Die Samen wurden vor dem Versuch 48 h bei 4°C stratifiziert. Die Werte zeigen den Mittelwert der Keimungsrate von 2 Platten mit jeweils mehr als 100 Samen.

Die Auswertung dieses Keimungsversuchs zeigte den schon oben beschriebenen insensitiven Phänotyp der *gca2-1* Mutante (vgl. Abb.3-17). So keimten am fünften Tag nach Versuchsbeginn knapp 50 % der WT Samen, wohingegen über 80 % der *gca2-1* Samen und noch etwas mehr der GCA2-GFP exprimierenden transgenen Samen

keimten. Die (Über)Expression des GCA2::GFP-Fusionsproteins erzeugt eine *gca2*-ähnliche ABA-Insensitivität in den transformierten Wildtyp-Pflanzen. Gleiche Ergebnisse wurden mit transformierten Pflanzen, welche statt dem Fusionsprotein nur das GCA2 Protein unter dem endogenen Promotor mit mutierter 5'UTR exprimierten, erzielt. Diese Ergebnisse belegen die Funktionalität des GCA2-GFP Fusionsproteins. Die Expression eines mutierten *GCA2*-Allels, mit der daraus resultierenden höheren Expressionsrate des Proteins scheint somit ursächlich verantwortlich für die ABA-Insensitivität der *gca2-1* Mutante zu sein.

3.2.7 Transiente Expression von GCA2 in Protoplasten

Um die Abhängigkeit der ABA-Sensitivität vom Expressionsniveau des GCA2 Proteins genauer zu analysieren, wurde daraufhin in transienten Protoplastenexperimenten die Korrelation einer konstitutiven GCA2-Expression mit der ABA-abhängigen Reporterexpression analysiert. Dazu wurden Protoplasten zusätzlich zu dem ABA-abhängigen Reporter *pRD29b::LUC* und dem zur Normalisierung verwendeten Standard *p35S::GUS* noch mit *p35S::GCA2*-Konstrukten co-transformiert. Um eventuelle Probleme der Calcium-abhängigen Aktivierung der CPK in Protoplasten zu umgehen, wurde hierfür ein Konstrukt kloniert, welches für eine verkürzte Version des GCA2 Proteins kodiert. Bei dieser verkürzten Kinase (GCA2-VK) wurden nur die Aminosäuren 1-346 exprimiert. Anstelle von Gln³⁴⁷ enthält das Konstrukt ein *amber* Stop-Codon. Dadurch fehlen dem verkürzten Protein die Calcium bindenden C-terminalen *EF-hands*, welche das Protein Calcium-abhängig aktivieren (Sheen 1996). Dieses verkürzte Protein zeichnet sich durch eine Calcium-unabhängige Kinaseaktivität aus.

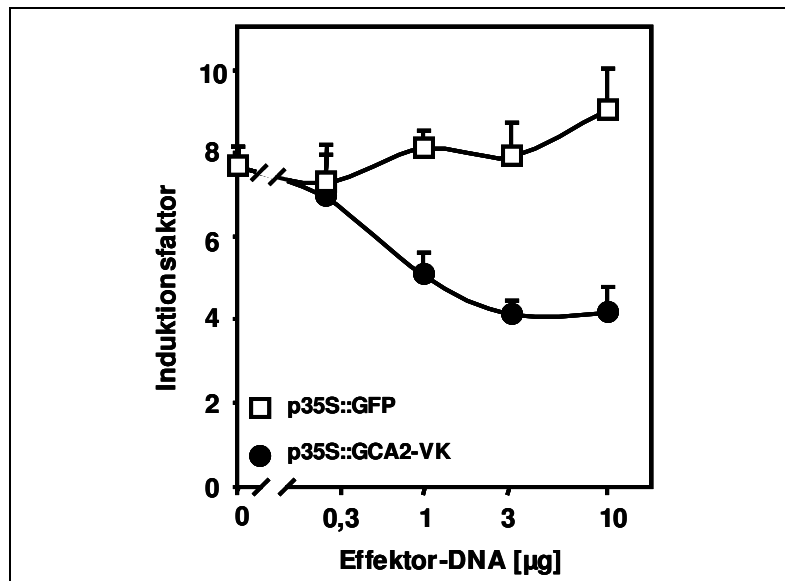


Abb.3-37 Co-Expression von GCA2-VK in Protoplasten

Die Protoplasten wurden zusätzlich zum *pRD29b::LUC* Reporter und *p35S::GUS* Standard noch mit verschiedenen Konzentrationen eines *p35S::GCA2-VK* (geschlossene Kreise) oder *p35S::GFP* (Kontrolle, offene Quadrate) Konstruktes transformiert. 2 h nach der Transformation wurde ABA (Endkonzentration: 3 µM) zugegeben und die Protoplasten nach weiteren 14 h der Induktion bei RT auf die Expression des Reporterkonstruktes analysiert. n = 3. p < 0,05.

Wird die Calcium-unabhängige Form des GCA2 Proteins in Protoplasten exprimiert, verringert sich der ABA-abhängige Induktionsfaktor des *pRD29b* Promotors dosisabhängig von $7,6 \pm 0,5$ ohne Effektorprotein auf $4,2 \pm 0,6$ bei Co-Transfektion mit 10 µg *GCA2-VK* (Abb.3-37). In den Kontrollprotoplasten, die mit einem *p35S::GFP*-Konstrukt transformiert wurden, änderte sich der Induktionsfaktor bis 3 µg DNA nicht wesentlich. Für 10 µg DNA erhöhte sich dieser auf $8,9 \pm 1,1$ und unterschied sich deutlich von den für das *GCA2-VK*-Konstrukt gemessenen Wert ($p < 0,05$). Auch hier führte eine Überexpression des (in diesem Falle Calcium-unabhängigen) GCA2 Proteins zu einer veränderten ABA-Sensitivität, vergleichbar der *gca2-1* Mutante (vgl. Abb.3-13). Selbst die Expression von 10 µg des *GCA2*-Plasmids führte jedoch nicht zu einer völligen ABA-Insensitivität der transformierten Protoplasten.

3.3 *Ler x Col* Kreuzungen

Die unterschiedlichen *Arabidopsis* Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia* weisen eine deutlich unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Phytohormon ABA auf: Dabei reagierten die *Landsberg erecta* Pflanzen sensibler auf das Hormon (siehe Abb.3-38).

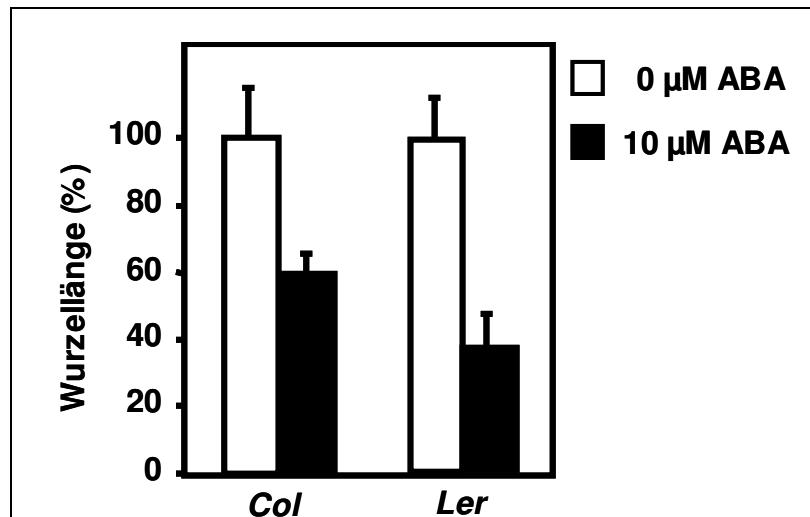


Abb.3-38 Vergleich der ABA-Sensitivität von *Landsberg erecta* und *Columbia*

Wurzelwachstumstest auf 10 μM ABA. 5 d alte Arabidopsis Keimlinge der Ökotypen *Columbia* und *Landsberg erecta* wurden auf MS-Platten ohne ABA (offene Balken) oder mit 10 μM ABA (geschlossene Balken) umgesetzt. Das Wurzelwachstum wurde für 3 weitere Tage gemessen und die jeweiligen Wurzellänge auf den Kontrollplatten gleich 100 % gesetzt. n > 50.

So reduzierte sich das Wurzelwachstum bei einer 10 μM ABA-Konzentration in *Columbia* auf knapp 60 % des Wachstums ohne ABA, wohingegen die *Landsberg erecta* Keimlinge nur noch knapp 40 % der Länge der Kontrollkeimlinge aufwiesen.

Aufgrund der 3:1 Segregation dieses Phänotyps ist anzunehmen, dass diese Verschiebung der ABA-Sensitivität auf einen einzigen (Haupt-)Locus zurückzuführen ist. Dabei ist zu vermuten, dass das verantwortliche Genprodukt a) im ABA-Signalweg involviert ist und b) Polymorphismen zwischen den beiden Ökotypen aufweist.

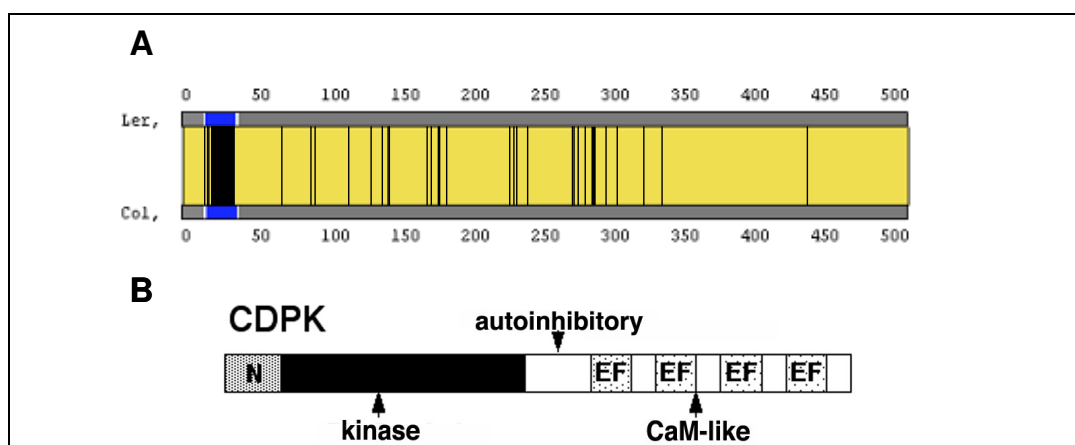


Abb.3-39 Vergleich des GCA2 Proteins mit dem CPK23 Protein aus *Columbia*

A: Statistischer Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen den *Landsberg erecta* (oben) und *Columbia* (unten) Proteinen. Unterschiedliche Aminosäuren sind durch einen schwarzen Strich gekennzeichnet; der N-terminale Bereich, der die größten Abweichungen aufweist ist blau dargestellt. B: Schematische Struktur von CPKs. Abbildung 3-39B entnommen aus (Sheen 1996).

Die beiden orthologen Proteine weisen eine Identität auf Aminosäureebene von 89,1 % auf (auf DNA-Ebene sind dies für die CDS 93,8 % und für die genomische DNA 85,1 %). Die Unterschiede manifestieren sich primär im zwischen den CPKs variablen N-Terminus (Abb.3-39). Die Aminosäuresequenz der beiden Proteine befindet sich zusammen mit einem Sequenzalignment, in dem die Substitutionen gekennzeichnet sind, im Appendix A3.

3.3.1 Analyse einer T-DNA Insertions-Linie aus *Columbia*

Zusätzlich zu den analysierten Mutanten *gca2-1* und *gca2-2* aus *Landsberg erecta*, wurde noch eine T-DNA Insertionslinie des *CPK23* Gens aus dem Ökotyp *Columbia* isoliert (SALK_007958). Diese Linie wird im folgenden als *gca2-3* bezeichnet.

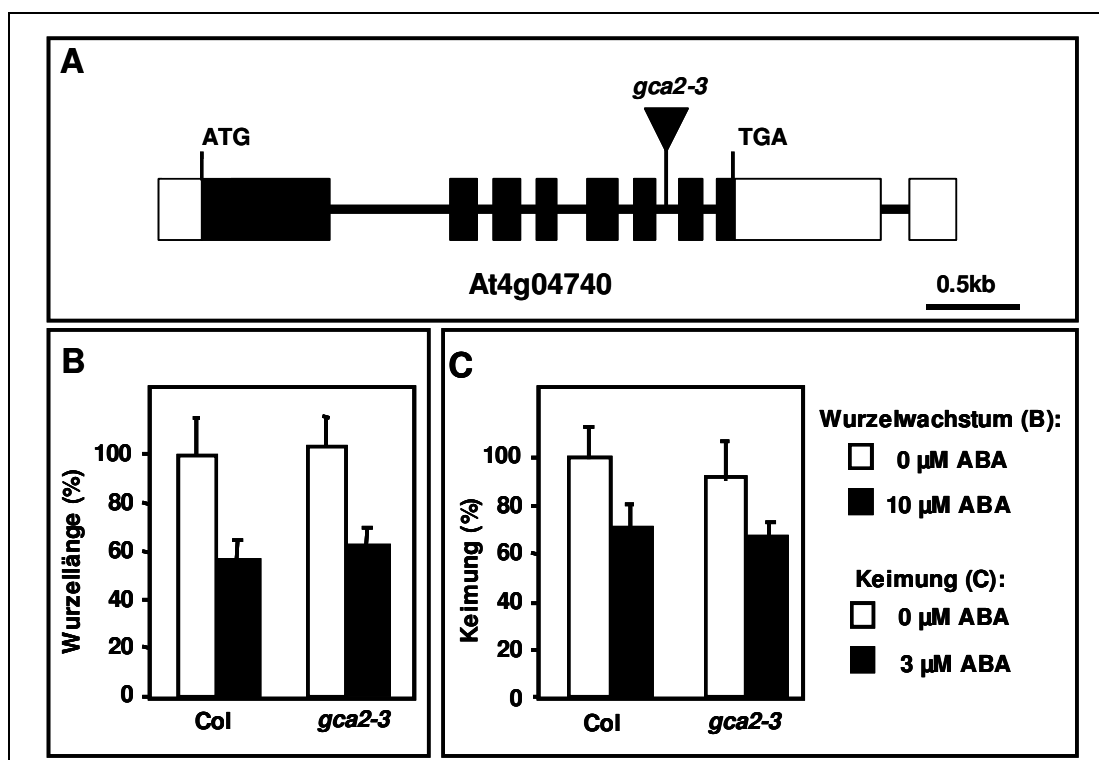


Abb.3-40 Isolation einer CPK23 K.o. Linie aus *Columbia*

A: Struktur des CPK23 Gens mit Insertionsstelle der T-DNA im 6. Intron. B Wurzelwachstumstest auf 10 μM ABA. 5 d alte Arabidopsis Keimlinge des Ökotyp Col und der *gca2-3* Mutante wurden auf MS-Platten ohne ABA (offene Balken) oder 10 μM ABA (geschlossene Balken) umgesetzt. Das Wurzelwachstum wurde für 3 weitere Tage gemessen und die Wurzellänge des WT auf den Kontrollplatten gleich 100 % gesetzt. $n > 50$. C: Keimungsversuch auf 3 μM ABA. Die Samen wurden vor dem Versuch 48 h bei 4°C stratifiziert. Die Werte zeigen den Mittelwert der Keimungsrate von 2 Platten mit jeweils mehr als 100 Samen nach 6 d bei 22°C und Dauerlicht an.

Die Insertion der T-DNA in der *gca2-3* Mutante befindet sich im 6. Intron des *CPK* Gens (Abb.3-40A). Sowohl in einem Wurzelwachstumsversuch (Abb.3-40B) als auch in einem Keimungsversuch (Abb.3-40C) wurden keine Unterschiede in der ABA-Sensitivität

zwischen der Mutante und dem WT (*Col*) detektiert. Anders sieht es, wie bereits unter 3-2-3 beschrieben, für das *gca2-2*-Allel aus *Landsberg erecta* aus. In dieser Mutante zeigt sich (zumindest partiell) eine Hypersensitivität gegenüber dem Phytohormon im Vergleich mit dem entsprechenden WT (Abb.3-17).

3.3.2 Abhängigkeit der ABA-Sensitivität vom *GCA2*-Locus

Da das *GCA2* Protein zwischen den beiden Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia* hochpolymorph ist und die *gca2-1* und *gca2-2* Mutanten einen klaren ABA-abhängigen Phänotyp zeigten, wurde in einem Wurzelwachstumstest die Co-Segregation der ABA-Sensitivität und des *GCA2*-Allels analysiert. Dazu wurden CAPS-Marker, welche das *Landsberg*-Allel von dem *Columbia*-Allel unterscheiden, sowohl für den *GCA2*- als auch den *ERECTA*-Locus (*At2g26330*) generiert.

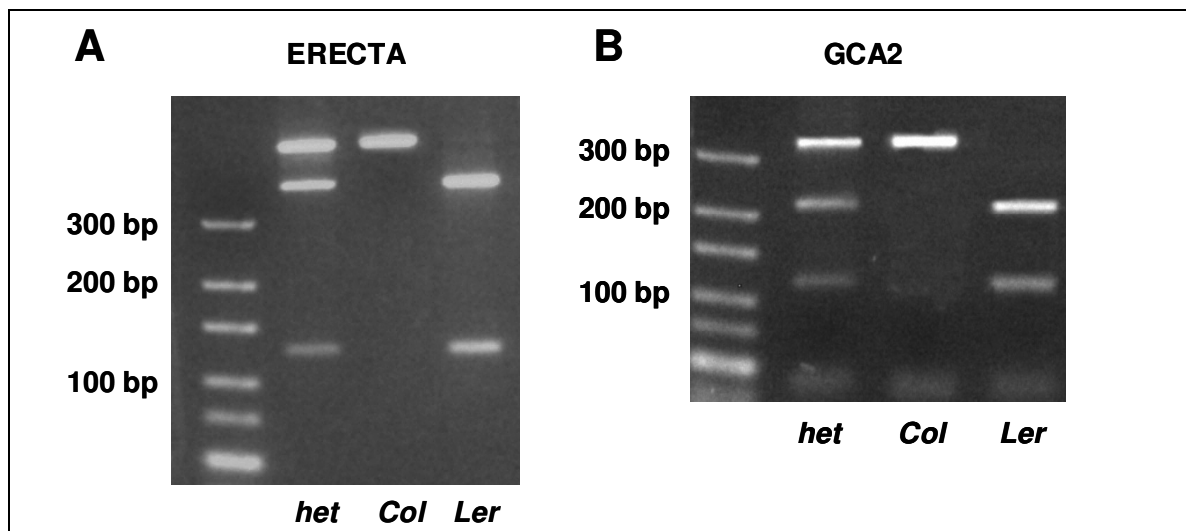


Abb.3-41 Gelbilder der CAPS-PCR für den *ERECTA*- und *GCA2*-Locus

Bilder von 2 %igen Agarosegelen mit den Produkten einer PCR mit den *ERECTA*-Primern (A) und den *GCA2*-Primern. (B) Mit verschiedener genomischer DNA (*het* = heterozygot *Ler* x *Col*; *Ler* und *Col*) als *template*. Die *Gene-ruler* Ultra-low DNA ladder wurde als Größenstandard verwendet.

Als erstes wurden die beiden CAPS-Marker getestet: Dazu wurde genomische DNA aus *Landsberg erecta*, *Columbia* und F_1 - Pflanzen einer *Ler* x *Col* Kreuzung isoliert. Mit dieser DNA wurde dann eine PCR mit den *ERECTA*-Primern durchgeführt und die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *DdeI* verdaut und auf einen 2%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb.3-41A). Durch einen Polymorphismus im *ERECTA*-Allel zwischen den beiden Ökotypen schneidet dieses Restriktionsenzym nur die DNA des *Landsberg*-Allels, nicht aber die orthologe *Columbia*-Sequenz. Es zeigte sich nach dem Restriktionsverdau der *Columbia*-DNA ein Fragment von ungefähr 500 bp. Für die *Landsberg*-DNA ergaben sich zwei verschiedene Produkte von 360 bp und 140 bp. In den heterozygoten F_1 -Pflanzen waren alle drei Produkte nachzuweisen.

Das gleiche Prozedere wurde mit den *GCA2*-Primern durchgeführt (Abb.3-41B). Hier lässt sich der Polymorphismus durch das Restriktionsenzym *EcoRV* sichtbar machen. Für das *Columbia*-Allel ergab sich ein 340 bp großes PCR-Fragment, welches sich in *Landsberg erecta* durch den Restriktionsverdau in zwei Produkte von 220 bp und 120 bp aufspaltete. In den heterozygoten Pflanzen waren wiederum alle drei Fragmente vorhanden. Die verwendeten Marker sind damit geeignet, die Allele der beiden Ökotypen voneinander zu unterscheiden.

Nun wurden die F_2 -Generation der *Ler* x *Col* Kreuzung bezüglich ihrer ABA-Sensitivität untersucht. Die verschiedenen Pflanzen dieser Generation stellen ein genetisches Mosaik der beiden Parentalpflanzen dar: Für jeden beliebigen Locus ergibt sich eine mendelsche Wahrscheinlichkeit von 1:2:1 dafür, dass die Pflanzen homozygot *Landsberg* (LL), heterozygot (LC) oder homozygot *Columbia* (CC) an dieser Stelle sind. Mit diesen genetisch variablen Individuen wurde ein Wurzelwachstumstest durchgeführt.

In diesem Experiment zeigte sich ein deutlicher ($p < 0,001$) Unterschied des Wurzelwachstums auf 20 μ M ABA für die beiden Ökotypen: Die Zunahme der Wurzellänge nach drei Tagen betrug in *Landsberg erecta* 2,1 mm \pm 0,8 mm und in *Columbia* 4,7 mm \pm 1,2 mm (Abb.3-42A). Wenn man die sich die Verteilung der Wurzellänge der einzelnen Keimlinge anschaut, zeigt sich nur bei einer Wurzellänge von 3 mm eine Überlappung der beiden Populationen (Abb.3-42B). Bei Wurzellängen, die geringer als 3 mm sind, fanden sich nur *Landsberg erecta* Keimlinge. Keimlinge, die ein Wachstum von mindestens 4 mm aufweisen, gehörten allesamt dem *Columbia* Ökotyp an.

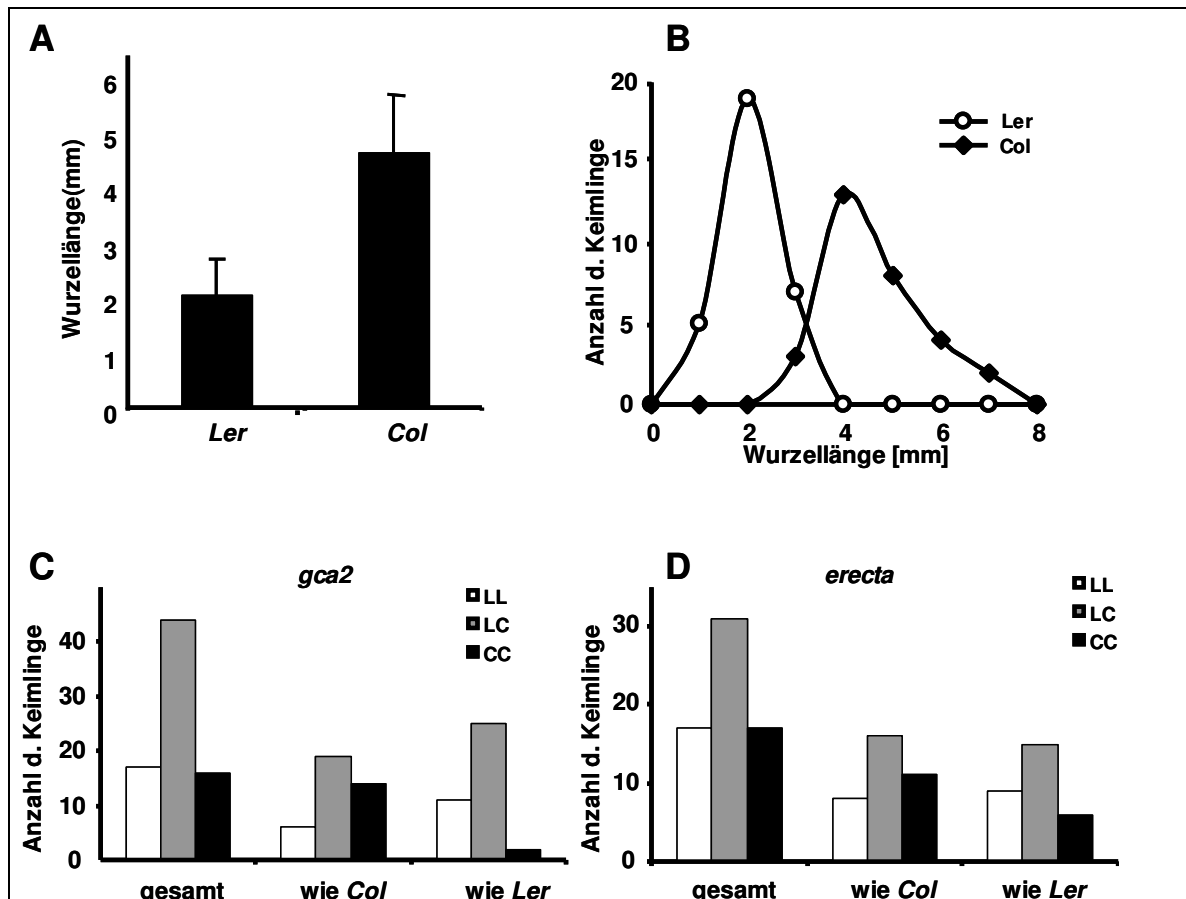


Abb.3-42 Wurzelwachstumstest mit *Landsberg* x *Columbia* Kreuzungen

Wurzelwachstumstest auf 20 μ M ABA. 5 d alte Arabidopsis Keimlinge der Ökotypen *Ler* und *Col* (A und B) sowie einer F_2 -Population einer *Ler* x *Col* Kreuzung (C und D) wurden auf MS-Platten mit 20 μ M ABA umgesetzt. Das Wurzelwachstum wurde für 3 weitere Tage gemessen und graphisch aufgetragen A: Wurzelwachstum von *Ler* und *Col* Keimlingen ($n > 30$). B: Einzelverteilung der Keimlinge aus A. C: Allel-Verteilung am *GCA2*-Locus aufgeteilt nach ABA-Sensitivität. Offene Balken: homozygot *Ler* (LL), graue Balken heterozygot (LC) und schwarze Balken homozygot *Col* (CC). D: Gleiche Analyse wie in C mit dem *ERECTA*-Locus.

Nun wurde das Wurzelwachstum der F_2 -Pflanzen analysiert und die Pflanzen anhand ihrer ABA-Sensitivität in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe, deren ABA-Sensitivität mit *Landsberg erecta* vergleichbar war (*Ler*-ähnlich: Wurzelwachstum kleiner als 3 mm) und eine zweite Gruppe, die sich wie *Columbia* verhielt (*Col*-ähnlich: Wurzelwachstum mindestens 4 mm). Von Pflanzen dieser beiden Gruppen wurde genomische DNA isoliert und die Segregation des *GCA2*- und des *ERECTA*-Locus durch PCR analysiert.

Die Keimlinge wurden anhand ihres Wuchsverhaltens als ABA-sensitiv oder ABA-insensitiv eingestuft. Dabei wurden Keimlinge, die sich in der `Grauzone` (zwischen 3 und 4 mm) befanden nicht gewertet. Für die anderen Keimlinge ergab sich eine Verteilung von 219 Keimlingen, die sensitiv auf ABA reagierten und 92, die ein insensitives Verhalten aufwiesen. Dies entsprach ca. 70 % sensitive Keimlinge, was ungefähr einer 3:1 Aufspaltung der F_2 -Pflanzen bezüglich ihrer ABA-Sensitivität entspräche. Allerdings könnte diese Verhältnis täuschen, da eine nicht zu vernachlässigende Teilpopulation

(zwischen 3 und 4 mm, n=108) in diesem Experiment nicht berücksichtigt wurde, da hier keine klare Zuordnung der ABA-Sensitivität möglich war.

Für den *GCA2*-Locus (Abb.3-42C) wurde die DNA von 77 Keimlingen (39 Keimlinge hiervon wiesen die eine *Columbia*-ähnliche ABA-Sensitivität und 38 ein *Landsberg*-ähnliche ABA-Sensitivität auf) genotypisiert. Es ergab sich ein Verhältnis von 17:44:16 (LL:LC:CC), was dem statistisch zu erwartenden Verhältnis (19:38:19) recht nahe kommt. Einzig der Anteil an heterozygoten Pflanzen lag mit 57 % etwas über dem statistischen Wert. Für Keimlinge, die ein ähnliches Wachstumsverhalten wie *Columbia* aufwiesen (39) ergab sich ein Verhältnis von 6:19:14. Hier waren Pflanzen, die am *GCA2*-Locus homozygot für das *Landsberg*-Allel sind, mit 15,4 % unter- und die Pflanzen, die auf beiden Chromatiden das *Columbia*-Allel tragen, mit 42,4 % überrepräsentiert. Für die Keimlinge, welche ein ABA-sensitives Verhalten wie *Landsberg*-Pflanzen aufwiesen ergab sich ein Verhältnis von 11:25:2. In diesem Fall waren 29,7 % der Pflanzen am *GCA2*-Locus homozygot für das *Landsberg*-Allel und nur 5,4 % homozygot für das *Columbia*-Allel. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine rein zufällige Abweichung von der statistisch zu erwartenden Verteilung von 9,5:19:9,5 handelt, wurde mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>). Dabei ergibt sich ein Wert für χ^2 von 8,05, was einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ entspricht. Die Verteilung unterscheidet sich also signifikant von der Normalverteilung. Auch der Kolmogorov-Smirnov Test, der Abweichungen von einer Normalverteilung ermittelt, ergibt eine Wahrscheinlichkeit von mindestens 99 %, dass es sich bei dieser Allel-Verteilung nicht um eine Normalverteilung handelt. Vergleicht man die Allel-Verteilung der beiden unterschiedlichen Gruppen (*Ler*-ähnlich und *Col*-ähnlich) in einer 2 x 2 Matrix mit *Fischer's exact test* untereinander, ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,005$, dass es sich um unabhängige Verteilungen handelt. Bei diesen Auswertungen ist die für statistische Zwecke vergleichsweise kleine Anzahl an Ereignissen zu berücksichtigen.

Beim *ERECTA*-Locus (Abb.3-42D) zeigte sich für 65 getestete Keimlinge (35 *Columbia*-ähnlich und 30 *Landsberg*-ähnlich) eine Aufteilung der jeweiligen Allele von 17:31:17 (LL:LC:CC), was auch hier eine statistisch gut gemischte Test-Population belegte. Betrachtet man die nach ihrer ABA-Sensitivität getrennten Sub-Populationen, ergibt sich für die *Columbia*-ähnliche Population ein Verhältnis von 8:16:11 und für die Keimlinge, die sich wie *Landsberg erecta* verhalten, eines von 9:15:6. Im Gegensatz zum *GCA2*-Locus zeigte sich hier nur eine leichte Abweichung des statistisch zu erwartendem Verhältnisses: So waren von den *Landsberg*-ähnlichen Pflanzen statt 25 % nur 20 % homozygot für das *Columbia*-Allel am *ERECTA*-Locus. Da die beiden Loci auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (*GCA2* auf Chromosom IV und *ERECTA* auf Chromosom II), können sie nicht miteinander gekoppelt sein. Die Abweichung des

ERECTA-Locus ist aufgrund der recht kleinen untersuchten Population allerdings statistisch nicht gut abgesichert. Führt man für diese Verteilungen die oben beschriebenen statistischen Tests durch, zeigt sich keine signifikante Abweichung der Normalverteilung.

Die Allel-Verteilung am *GCA2*-Locus scheint klar mit der ABA-Sensitivität der untersuchten Pflanzen zu korrelieren. Würde *GCA2* jedoch allein für die Sensitivität verantwortlich sein, dürfte keine ABA-sensitiven Pflanzen homozygot für das *GCA2*-Allel sein und alle ABA-insensitiven Pflanzen müssten homozygot für dieses Allel sein. Dies ist ebenfalls nicht der Fall, somit ist *GCA2* oder ein benachbartes Gen ein entscheidender Faktor der ABA-Sensitivität.

3.4 Regulation der Stomata während der Nacht

Spaltöffnungen dienen der Pflanze zum Gasaustausch mit ihrer Umwelt und verschiedene Reize führen zu dem Schließen der Spaltöffnungen. Hier ist zum Beispiel Trockenstress zu nennen, im Zuge dessen es zu einer Ausschüttung von ABA kommt, welches dann für den Schluss der Stomata verantwortlich ist (Christmann *et al.* 2006). Hohe CO₂-Konzentrationen führen ebenfalls zu einem Schluss der Poren (Israelsson *et al.* 2006). Die Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 800 ppm führt in *Arabidopsis* zu einem nahezu vollständigen Schließen der Spaltöffnungen, wohingegen die *gca2-1* Mutante komplett insensitiv auf dieses Signal reagiert (Young *et al.* 2006). Weiterhin ist bekannt, dass auch nachts die Spaltöffnungen in *Arabidopsis* geschlossen sind (Leymarie *et al.* 1998). Da dies auch mit einer lokalen, durch Respiration erzeugten Erhöhung der CO₂-Konzentration einhergeht, wurde die Apertur der Spaltöffnungen des WT und der *gca2-1* Mutante im Tag/Nacht Rhythmus untersucht.

Dazu wurden die Pflanzen in einer Phytokammer unter normalen Licht- und Feuchtigkeitsbedingungen in einem Langtagrhythmus mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit angezogen (siehe Material und Methoden) und die Apertur der Spaltöffnungen zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb.3-43).

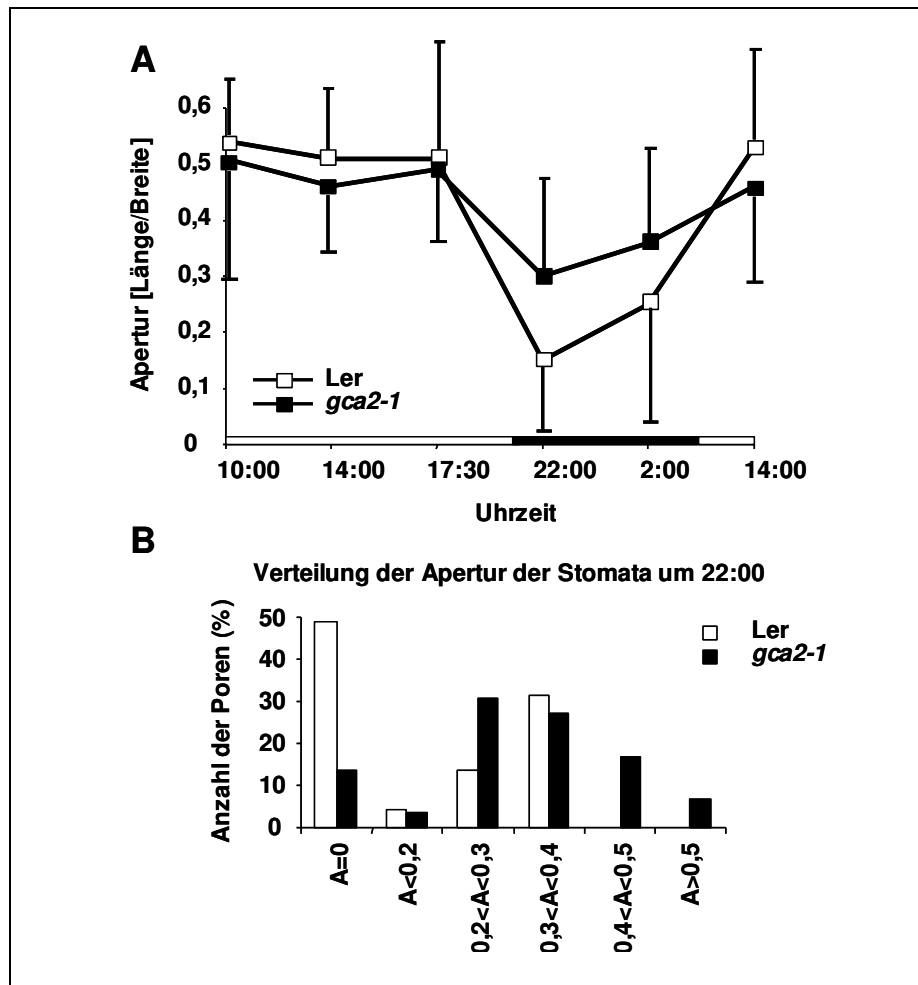


Abb.3-43 Diurnale Regulation der Stomata

A: Messung der durchschnittlichen Apertur der Poren auf der Unterseite von Rosettenblättern von 4 Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen. Die angegebene Apertur ist der Mittelwert von mehr als 50 Spaltöffnungen (von 3 verschiedenen Blättern) je angegebener Uhrzeit. Der weiß-schwarze Balken an der Abszisse gibt den 16:8 Tag/Nacht Rhythmus in der Phytokammer wieder. B: Verteilung der einzelnen gemessenen Aperturen um 22:00.

Untertags waren nahezu alle Spaltöffnungen sowohl des Wildtyps als auch der *gca2-1* Mutante komplett geöffnet. Die durchschnittliche Apertur lag bei ungefähr 0,5 (Abb.3-43A). Um 22:00, nach einer knappen Stunde Dunkelheit, reduzierte sich die Apertur im WT merklich auf $0,15 \pm 0,11$, wohingegen in der *gca2-1* Mutante noch eine durchschnittliche Apertur von $0,3 \pm 0,14$ festzustellen war. Durch die sehr variable Größe der einzelnen Poren ergaben sich die in der Graphik angegebenen relativ großen Standardabweichungen, deshalb wurden die Öffnungsgrößen der einzelnen Schließzellen für den 22:00 Uhr Zeitpunkt noch mal separat betrachtet (Abb.3-43B). Hierbei zeigte sich, dass im WT fast 50 % der analysierten Spaltöffnungen geschlossen waren und keine einzige eine Apertur größer 0,4 aufwies. In der *gca2-1* Mutante waren hingegen nur etwas mehr als 10 % der Spaltöffnungen komplett geschlossen und ein knappes Viertel (25 %) zeigte noch ein Apertur größer als 0,4.

Es zeigte sich also bei der Regulation der Schließzellen ein Unterschied zwischen der *gca2-1* Mutante und dem WT nicht nur in der bereits beschriebenen Insensitivität des Stomaschlusses gegenüber H_2O_2 , ABA und CO_2 (Pei *et al.* 2000; Allen *et al.* 2001; Young *et al.* 2006), sondern auch dem Stomaschluss bei Dunkelheit. Ob diese Missregulation der Schließzellen allerdings ursächlich auf einen CO_2 -Effekt oder einen Lichteffect zurückzuführen ist, kann durch diese Messungen nicht geklärt werden.

3.4.1 Photooxidative Schädigung des Photosystems II

Neben der unter Umständen Licht-induzierten Missregulation der Schließzellen weist die *gca2-1* Mutante zusätzlich auch einen chlorotischen Phänotyp der Blätter auf (Hoffmann 2002). Sowohl Fibrillin als auch ABA sind wichtig für die Adaptation des Photosystems II an hohe Lichtintensitäten (Yang *et al.* 2006b). Um zu untersuchen, ob in der *gca2-1* auch dieser regulatorische Prozess betroffen ist, wurde mit Hilfe des ‚PAM 2000‘- Messgerätes, welches die Fluoreszenz des Chlorophylls misst, die photooxidative Schädigung des Photosystems II nach Starklichtstress bestimmt.

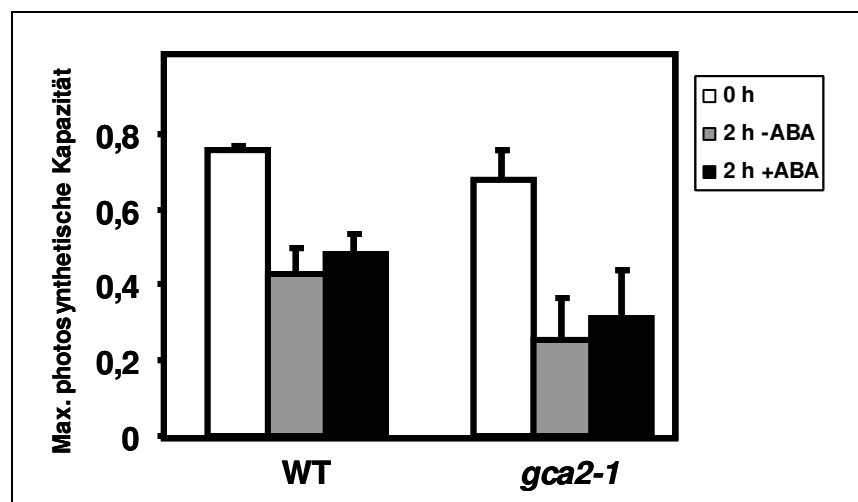


Abb.3-44 Photooxidativer Schutz des Photosystems II

Mit Hilfe des Chlorophyll-Fluoreszenz-Messgerätes ‚PAM 2000‘ wurde die Schädigung nach Lichtstress in Rosettenblättern von 4 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen gemessen. Die Blätter wurden bei RT in Pufferlösung mit und ohne $10 \mu M$ ABA für 2 h mit Lichtintensitäten von $1.800 \mu Einstein$ gestresst und danach vor der Analyse 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. $n > 6$.

Hierzu wurden Rosettenblätter des WTs und der *gca2-1* Mutante in Petrischalen in einer Pufferlösung inkubiert und bei RT für 2 h mit Starklicht ($1.800 \mu Einstein$) gestresst. Anschließend wurden die Blätter für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert, damit sich das photosensorische System wieder adaptieren kann. Danach wurde die Effizienz der max. Quantenausbeute des Photosystems II (Fv:m) bestimmt (Abb.3-44). Als Kontrolle wurde

diese zuvor bei nicht gestressten Blättern gemessen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Blättern des Wildtyps und der *gca2-1* Mutante ($0,77 \pm 0,02$ zu $0,71 \pm 0,08$). In den gestressten Blättern betrug die Quanteneffizienz im WT mit $0,42 \pm 0,08$ jedoch deutlich mehr als in der *gca2-1* mit $0,25 \pm 0,12$. Die Applikation von ABA hatte sowohl in der *gca2-1* Mutante als auch im WT eine geringfügig geringere Schädigung des Photosystem II zur Folge, übte also in beiden Fällen einen gewissen photooxidativen Schutz aus.

Dieses Experiment zeigte eine erhöhte Schädigung des Photosystems II nach Lichtstress in der *gca2-1* Mutante verglichen mit dem Wildtyp.

3.5 Funktion des GCA2 Proteins

Nachdem im obigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass sich die ABA-Sensitivität von *Arabidopsis* Pflanzen und Protoplasten in Abhängigkeit des GCA2-Proteins verändert und vielfältige Phänotypen der *gca2-1* Mutante beschrieben wurden, wurde nun versucht die Funktion und die zelluläre Wirkweise des Proteins zu analysieren. Dazu wurde eine *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse mit bekannten ABA-Signalkomponenten initiiert, mit dem Ziel GCA2 in das ABA-Signalnetzwerk einzubinden.

3.5.1 Interaktion zwischen GCA2 und RCAR-Proteinen

Bei der *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse werden Proteine mit einer DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert. Diese auch als *bait* bezeichneten Proteine werden mit anderen Proteinen (*prey*), die an eine Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert wurden, in Hefen coexprimiert. Interagieren beide Proteine miteinander, bindet die AD-Domäne des einen Fusionsproteins an die BD-Domäne des anderen und aktiviert die Transkription eines β -Galaktosidasegens (Chien *et al.* 1991). Die gebildete β -Galaktosidase kann daraufhin enzymatisch nachgewiesen werden (Spaltung von ONPG). Da die *gca2-1* Mutanten eine ABA-insensitiven Phänotyp zeigen, ist davon auszugehen, dass das GCA2 Protein in das Netzwerk der ABA-Signaltransduktion involviert ist. Schlüsselkomponenten der ABA-Signaltransduktion sind die Proteinphosphatasen (PP2Cs) ABI1 und ABI2, sowie die ABA-(Co-)Rezeptoren RCAR/PYR/PYL (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009). Dabei wurde sowohl für ABI1 eine Regulation durch eine SnRK2-Kinase gezeigt, wie auch ein Einfluss der ABA-Rezeptoren auf verschiedenen SnRK2-Kinasen (Yoshida *et al.* 2006; Park *et al.* 2009). Deshalb wurde in einem *Yeast-Two-Hybrid*-Versuch die Interaktion von GCA2 mit ABI1, ABI2, sowie RCAR1 und RCAR3 getestet (Abb.3-45).

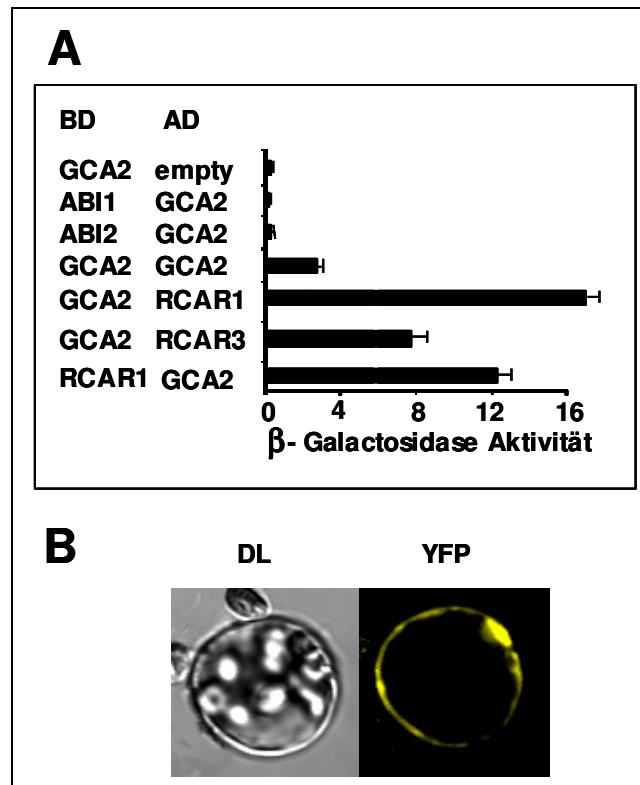


Abb.3-45 Interaktion von GCA2 mit RCAR1

A: *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse mit verschiedenen BD und AD-Fusionen. $n > 2$. B: *Split-YFP*: Interaktion in Protoplasten zwischen GCA2-YFP^N und RCAR1-YFP^C. Links: DIC-Bild, rechts: YFP-Kanal.

Dabei zeigte sich keine Interaktion zwischen GCA2 und den beiden getesteten Phosphatasen ABI1 und ABI2. Die gemessene β -Galaktosidase Aktivität war mit 0,25 bzw. $0,4 \pm 0,1$ nicht signifikant höher als in der Kontrolle (0,3). Wenn GCA2 als *prey* und auch als *bait* eingesetzt wurde (Interaktion mit sich selbst), wurde eine Aktivität von $3,1 \pm 0,3$ gemessen. Mit RCAR1 ergaben sich Werte von $16,9 \pm 0,8$ bzw. $12,1 \pm 0,6$, wenn die reziproken Fusionsproteine verwendet wurden. Für RCAR3 wurde der Versuch nur mit GCA2 als *bait* durchgeführt: Hier wurden $7,7 \pm 0,6$ β -Galactosidaseeinheiten gemessen. Es zeigte sich also eine Auto-Interaktion des GCA2-Proteins und eine Bindung mit den beiden getesteten Proteinen der RCAR-Familie.

Um die gefundene Interaktion von GCA2 mit RCAR1 *in vivo* zu bestätigen wurde diese in einem *Split-YFP* Experiment (Walter *et al.* 2004) getestet. Bei diesem Versuch werden Fusionsproteine kloniert, bei denen die jeweiligen Proteine mit dem N-Terminus des YFP-Proteins (Aminosäure 1-155, YFP^N) und/oder dem C-Terminus (Aminosäure 156-239, YFP^C) fusioniert werden. Diese unter dem konstitutiven p35S-Promotor exprimierten Konstrukte wurden gemeinsam in Protoplasten transformiert. Wenn die beiden Proteine miteinander interagieren, können sich die beiden Hälften des YFP-Proteins räumlich so nah aneinander lagern, dass wieder ein funktionales fluoreszierendes Protein entsteht. Das heißt, wenn im Mikroskop eine Fluoreszenz zu beobachten ist, kann davon

ausgegangen werden, dass beide Proteine miteinander interagieren. Dies ist für GCA2-YFP^N und RCAR1-YFP^C der Fall (Abb.3-45B). Die Interaktion dieser beiden Proteine konnte *in vivo* bestätigt werden.

3.6 RCAR

Nachdem RCAR1 als Interaktionspartner von GCA2 im Hefescreen identifiziert und die Interaktion über die *Split-YFP* Komplementation in Protoplasten bestätigt wurde, sollte im Folgenden dieses Protein näher charakterisiert werden. Das Protein RCAR 1 (*regulatory compound of ABA receptor 1*) gehört einer kleinen Genfamilie mit 14 Mitgliedern in *Arabidopsis* an (Abb.3-46). Diese Proteine weisen eine hohe strukturelle Homologie zu dem Pollenallergen BetV1a aus Birke (*Betula pendula*) auf (Gajhede *et al.* 1996).

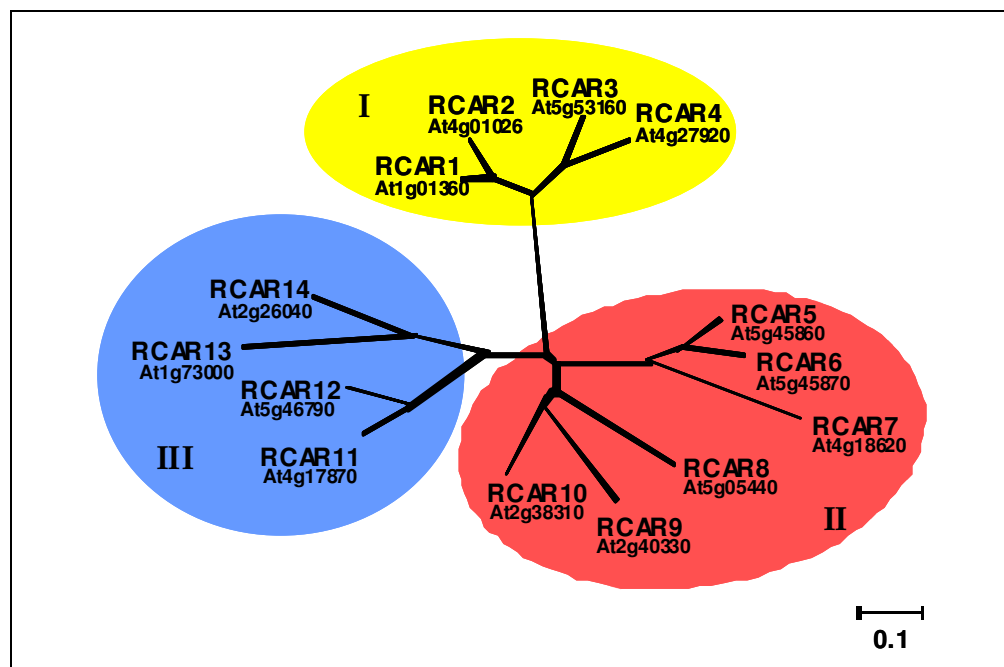


Abb.3-46 Phylogenetischer Baum der RCAR Genfamilie

Die 14 Mitglieder der Genfamilie untergliedern sich in 3 Klassen. Der Baum wurde nach der *Minimum Evolution* Methode mit der Mega[®] Software berechnet.

3.6.1 Bindung von ABA an RCAR-Proteine

Die Überexpression des Proteins RCAR1 in *Arabidopsis* führt zu einer ABA-Hypersensitivität (Ma *et al.* 2009). RCAR strukturell ähnliche Proteine sind in der Lage kleine hydrophobe Liganden zu binden (Radauer *et al.* 2008). Deshalb wurde mit Hilfe der isothermalen Kalorimetrie (ITC) untersucht, ob RCAR1 in der Lage ist ABA zu binden. Bei dieser Methode kann die bei Bindung von zwei Bindungspartnern (Protein/Protein oder Ligand/Protein) entstehende Temperaturdifferenz bestimmt werden, und so Rückschlüsse auf eine Bindung der untersuchten Moleküle gezogen werden (Pierce *et al.* 1999). *S*-ABA

stellt die physiologische aktive Form des Phytohormons dar (siehe Einleitung), weshalb sämtliche Bindungsstudien mit diesem Enantiomer durchgeführt wurden.

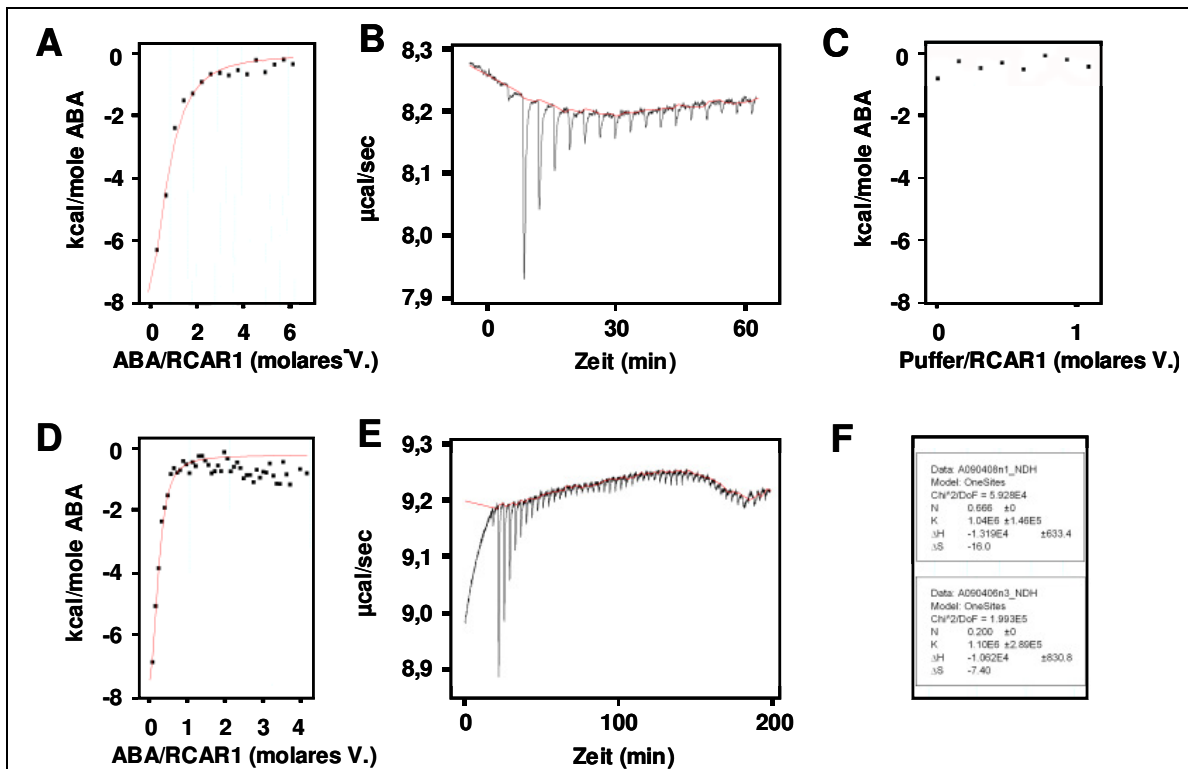


Abb.3-47 ITC Daten der Bindung von ABA an RCAR1

A: DeltaH Darstellung der Titration von 50 μM ABA an 2 μM RCAR1. B: Rohdaten des ITC-Lauf aus A. C: Delta H der Titration von Puffer in 2 μM RCAR1. D: Delta H der Titration von 50 μM ABA in 4 μM RCAR1 ohne Mn^{2+} im Puffer. E: Rohdaten des ITC-Lauf aus D. F: Berechnete K_a -Werte der Experimente aus A und D.

Bei der Titration des Liganden S-ABA zu dem RCAR1 Protein kann eine deutliche thermale Reaktion beobachtet werden (Abb.3-47A). Die dargestellten Kurven zeigen eine saturierbare Bindung des Liganden an das Protein RCAR1, wobei die Bindung eine relativ geringe Affinität mit einem K_d -Wert von 960 ± 140 nM aufweist. Wurde statt des Liganden Puffer zu dem Protein titriert (Abb.3-47C), entstand keine detektierbare Wärme, so dass klar gezeigt werden konnte, dass die in A gemessenen Temperaturänderungen auf das Phytohormon zurückzuführen sind. In einem weiteren Experiment (D und E) wurde auf die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen in dem Puffer und der Proteinlösung verzichtet. Auch hier zeigte sich ein vergleichbares Bild mit einem berechneten K_d -Wert von 900 ± 190 nM. Dies zeigt, dass die Zugabe der Manganionen nicht für die Bindung von ABA an RCAR1 notwendig ist.

In einem weiteren ITC-Experiment wurde die Bindung von RCAR Proteinen mit der Proteinphosphatase ABI2, welche bereits mit *Split-YFP* und *Yeast-Two-Hybrid* gezeigt werden konnte (Ma *et al.* 2009), untersucht. Hierzu wurde eine ABI2-Proteinlösung in der Messzelle vorgelegt und statt eines Hormon-Liganden ein RCAR Protein zugegeben. Da

bei der Proteinaufreinigung nur eine recht geringe Konzentration des RCAR1 Proteins erreicht wurde (max. 8 μM) und dies nicht für eine auch nur annähernde Sättigung der Bindung an ABI2 ausreichte, wurde ein anderes Mitglied der RCAR-Familie : RCAR8, welches ebenfalls S-ABA mit einem vergleichbaren k_d -Wert binden kann (Ma *et al.* 2009), für dieses Experiment verwendet (Abb.3-48).

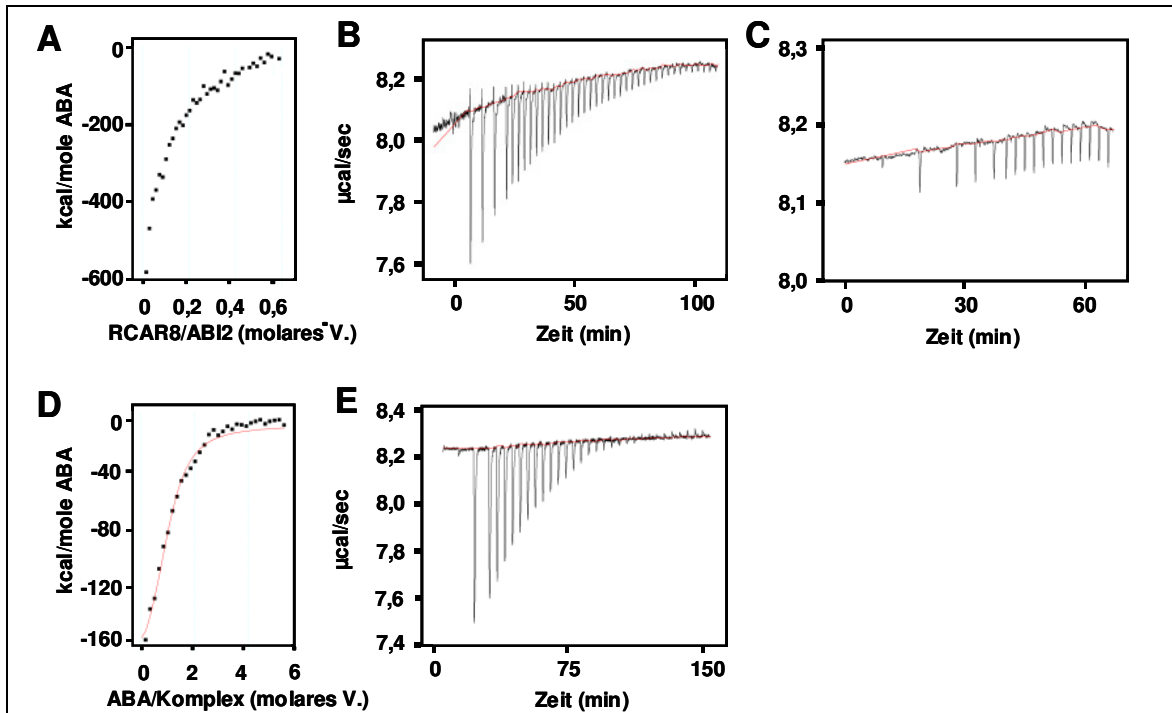


Abb.3-48 ITC-Experiment: Bindung von ABA an einen RCAR8/PP2C-Komplex

A: DeltaH der Titration von 12 μM RCAR8 in 2 μM ABI2. B: Rohdaten des ITC-Laufs aus A. C: DeltaH der Titration von 12 μM RCAR8 in 2 μM ABA + 100 μM ABA. D: DeltaH der Titration von 100 μM ABA in den in A gebildeten RCAR8-ABI2 Komplex. E: Rohdaten aus D.

Dabei ist eine deutliche Wärmeentwicklung bei der Titration der beiden Proteine zu beobachten, die aufgrund der (immer noch) zu geringen Konzentration des RCAR8-Proteins zu keiner vollständigen Sättigung der Reaktion führt. Interessanterweise zeigte sich diese Bindung der beiden Proteine nicht, wenn zusätzlich zu der Phosphatase auch noch 100 μM ABA in der Zelle vorgelegt wurden (C). Wurde dann aber zu dem RCAR8-ABI2 Komplex (aus B) ABA titriert, war erneut eine deutliche Bindung des Phytohormons an den Proteinkomplex über eine stark exotherme Reaktion nachweisbar (Abb.3-48D und E). Hierbei zeigten sich jedoch zwei erhebliche Unterschiede zu den in Abb.3-47 beschriebenen Experimenten, bei denen die Bindung des Liganden nur an das RCAR Protein allein untersucht wurde. Der aus diesem Experiment hervorgehende k_d -Wert liegt um eine Größenordnung niedriger bei 90 ± 18 nM und die bei der Bindung entstehende Energie betrug mit 160 kcal/mol Ligand ungefähr das Zwanzigfache der freigesetzten Energie im vorhergehenden Versuch (vgl. Abb.3-47A mit Abb.3-48D). Um zu testen, ob dieses Phänomen für RCAR8 spezifisch ist, oder sich bei Verwendung des RCAR1

Proteins ein ähnliches Bild zeigt, wurde zu einem Komplex aus RCAR1 (4 μM) und ABI2 (2 μM) S-ABA titriert (Abb.3-49).

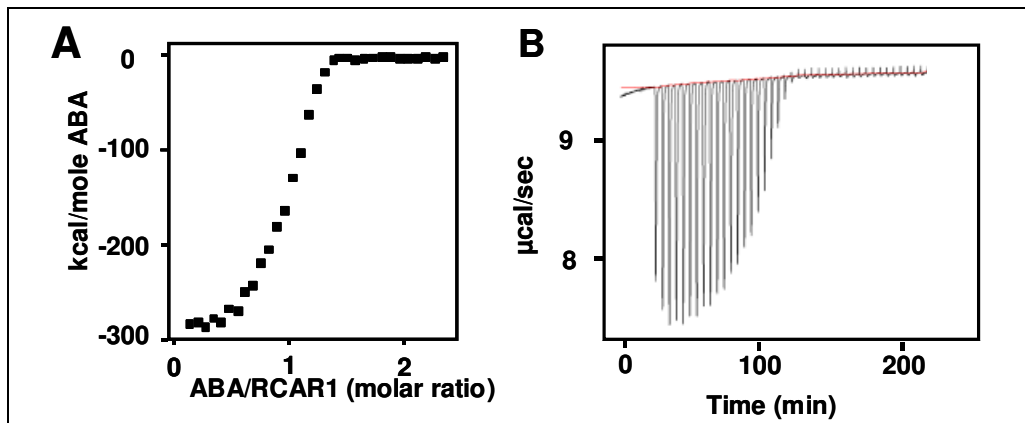


Abb.3-49 ITC-Experiment mit RCAR1-ABI2 Komplex

A: DeltaH der Titration von 50 μM ABA zu einem RCAR1-ABI2 Komplex. Pro Injektion wurden 4 μl ABA in den Komplex (1.6 ml) titriert B: Rohdaten aus A.

Auch in diesem Fall zeigte sich eine deutlich höhere Affinität des Komplexes zum Liganden. Der gemessene k_d -Wert betrug bei diesem Experiment $63 \pm 8 \text{ nM}$, ist also noch kleiner als der für den RCAR8-ABI2 Komplex gemessene Wert. Damit einhergehend war auch die frei werdende Energie ΔG pro Mol Ligand mit annähernd 300 kcal/mol nochmals erhöht. Es zeigte sich eine mehr als dreißigfache Erhöhung der Menge an frei werdender Energie pro Mol ABA mit dem RCAR1-ABI2 Komplex verglichen mit dem RCAR1 Protein allein.

Durch diese Experimente konnte eine spezifische, hochaffine Bindung des Phytohormons ABA an einen RCAR-ABI2 Proteinkomplex nachgewiesen werden. Die untersuchten RCAR Proteine alleine waren ebenfalls, obgleich mit einer um den Faktor zehn geringeren Affinität in der Lage, ABA zu binden.

3.6.2 Einfluss von RCAR1 auf den ABA-Signalweg

Nachdem im vorigen Kapitel gezeigt werden konnte, dass RCAR1 (und der RCAR1-ABI2 Komplex) die Fähigkeit besitzen, ABA zu binden, wurde als nächstes der Einfluss dieses Proteins auf die ABA-Signaltransduktion in transienten Protoplastenversuchen genauer untersucht.

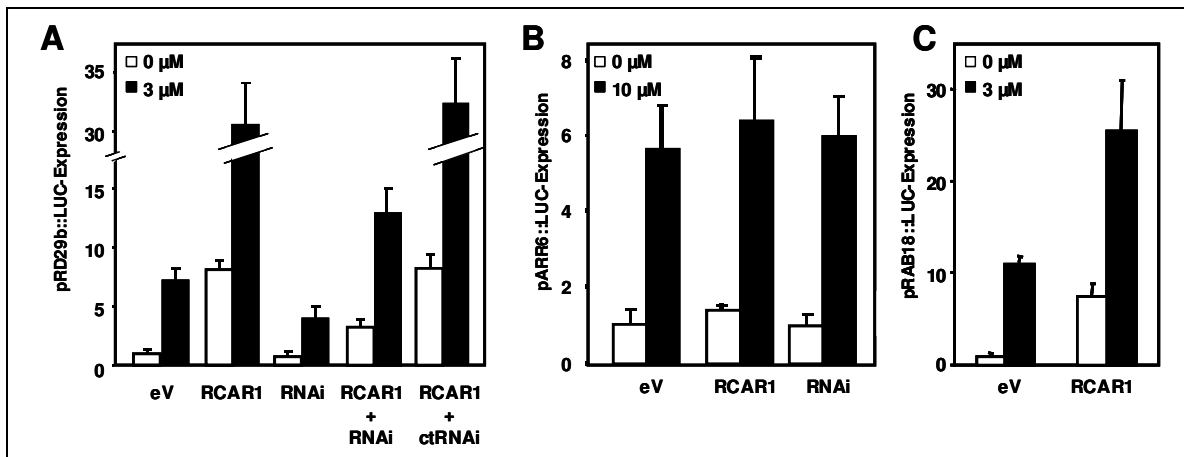


Abb.3-50 Effekt der RCAR1-Expression in Protoplasten

Protoplasten aus 4 Wochen alten *Landsberg erecta* Pflanzen wurden in A: Mit 10 μM pRD29b::LUC, 2 μM p35S::GUS und jeweils 1 μg der angegebenen Effektor-DNA (eV (empty vector) = Kontrollplasmid) transformiert. In B: Mit 10 μg pARR6::LUC, 2 μg p35S::GUS und jeweils 1 μg p35S::RCAR1 oder pHannibal::RCAR1 oder in C: mit 10 μg pRAB18::LUC, 2 μg p35S::GUS und 1 μg eV oder RCAR1 transformiert. Die Protoplasten wurden nach der Transfektion aufgeteilt und 2 h danach entweder mit Puffer oder ABA (3 μM ABA)(A,C), bzw. Zeatin (10 μM Zeatin) versetzt. Die Luciferaseaktivität wurde 14 h später gemessen. n>3.

In Protoplasten aus *Landsberg erecta*, die mit einem Kontrollplasmid (eV) co-transformiert wurden, war die durch den pRD29b-Promotor getriebene Luciferaseaktivität nach ABA-Applikation etwa sieben- bis achtfach höher als in den Kontrollprotoplasten ohne ABA (Abb.3-50A, vgl. auch Abb.3-13). Wurde zusätzlich noch ein p35S::RCAR1-Konstrukt co-transformiert war die Luciferaseaktivität bereits ohne exogene ABA-Applikation im Vergleich zum WT um den Faktor acht erhöht. Die Zugabe des Phytohormons bewirkte eine annähernd dreißigfach höhere Luciferaseaktivität als in den Kontrollprotoplasten ohne ABA und RCAR1. Dieser RCAR1-spezifische Effekt konnte durch die Co-Expression eines gegen RCAR1 gerichteten RNAi-Konstruktes (Ma *et al.* 2009) deutlich reduziert werden, wohingegen die Co-Expression eines Kontroll-RNAi Konstrukts (ctRNAi, gegen ACO2 (Ma *et al.* 2009)) keine Auswirkungen hatte.

Um zu untersuchen, ob diese beobachtete Hyperstimulierung der ABA-Signaltransduktion spezifisch für den ABA-Signalweg ist, wurde in einem weiteren Experiment statt dem ABA-abhängigen Reporter pRD29b::LUC, der Cytokinin-induzierbare Reporter pARR6::LUC (Hwang und Sheen 2001) verwendet (Abb.3-50B). Nach Induktion des Reporters mit 10 μM Zeatin zeigt sich hierbei eine ungefähr 5,5 fache Erhöhung der Luciferaseaktivität. Die Co-Expression von RCAR1 oder dem RCAR1-RNAi Konstrukt hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion dieses Reporters. Die Induktion eines zweiten ABA-abhängigen Reporters pRab18::LUC (siehe Abb.3-13) ließ sich wiederum deutlich durch die Expression des RCAR1 Proteins stimulieren (Abb.3-50C).

Diese Daten belegen eine spezifische Aktivierung des ABA-Signalwegs durch RCAR1. Dabei ist auffällig, dass bei Zugabe des RCAR1-Plasmids auch ohne exogene Applikation

des Phytohormons eine deutliche Induktion des *pRD29b*-Promotors zu beobachten war. Um die Frage zu klären, ob diese Induktion der Reporteraktivität auf endogen gebildetes ABA zurückzuführen war, wurde ein weiteres Protoplastenexperiment durchgeführt: Hierbei wurden sowohl Protoplasten des Wildtyps als auch Protoplasten von der in der ABA-Biosynthese defiziente Mutante *aba2* verwendet. Diese Mutanten haben einen Defekt in einer kurzkettigen Alkohol-Dehydrogenase, weswegen diese Pflanzen kein (oder nur wenig) endogenes ABA bilden können (Gonzalez-Guzman *et al.* 2002). Sie besitzen jedoch weiterhin die Kompetenz, auf ABA-Signale zu reagieren.

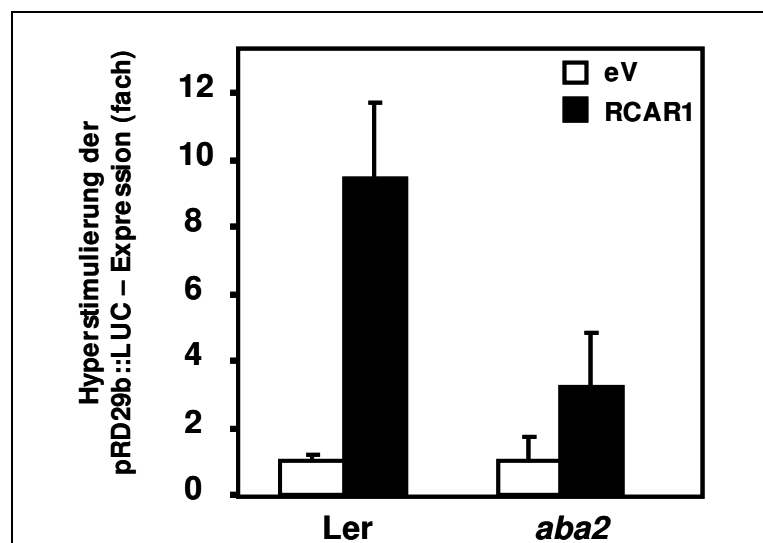


Abb.3-51 RCAR1-vermittelte Hyperstimulierung des ABA-Signalwegs in WT und ABA-defizienten Protoplasten

Protoplasten aus 4 Wochen alten *Landsberg erecta* und *aba2* Pflanzen wurden mit 10 µg *pRD29b::LUC*, 2 µg *p35S::GUS* und 1 µg Kontrollplasmid (offene Balken) oder 1 µg *p35S::RCAR1* (geschlossene Balken) transformiert. Die Protoplasten wurden nicht mit ABA induziert. n>3.p<0,01.

In der Abb.3-51 kann man im Gegensatz zum Kontrollplasmid eine ungefähr neunfache Stimulierung der *pRD29b::LUC* Reporteraktivität ohne ABA-Zugabe durch die Co-Transfektion von 1 µg *p35S::RCAR1* erkennen (vgl. auch Abb.3-50). Diese Stimulierung fiel in ABA-defizienten *aba2* Protoplasten mit einer nur dreifachen Hyperstimulation signifikant ($p < 0,05$) geringer aus.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Expression eines RNAi-Konstrukts (*pHannibal::RCAR1*), das gegen das endogene *RCAR1*-Transkript gerichtet war, in Protoplasten auch ohne ektopische Expression des *RCAR1* Proteins einen Einfluss auf den ABA-Signalweg hat.

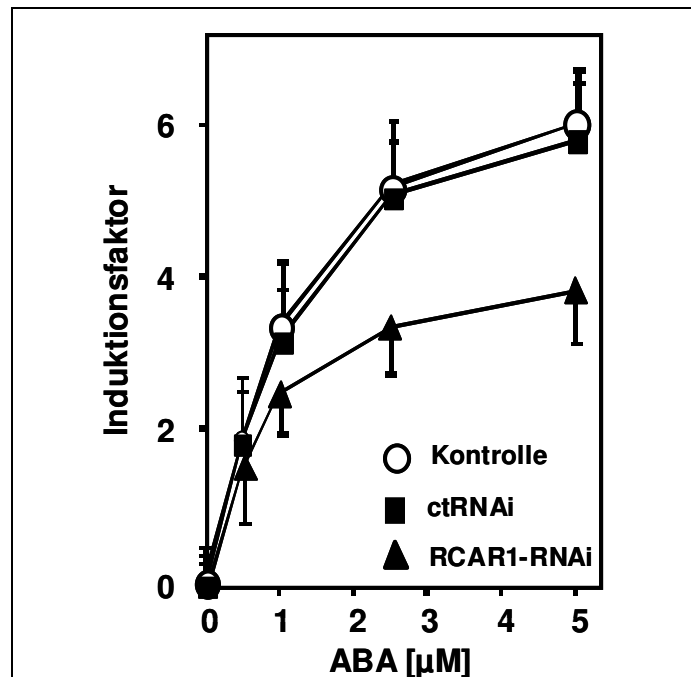


Abb.3-52 RNAi-Protoplasten

Protoplastenexperiment mit *pRD29b::LUC* als Reporter. Jeder Transformationsansatz wurde nach der Transformation in 5 Aliquots geteilt und 2 h später mit verschiedenen ABA-Konzentrationen versetzt. Offene Balken: Kontrollansatz ohne Co-Transformation, geschlossene Quadrate: Co-Transformation von 1 μg Kontroll RNAi-Konstrukt; geschlossene Dreiecke: Co-Transformation von 1 μg pHannibal-RCAR1. $n = 3$.

In Abb.3-52 ist die konzentrationsabhängige Induktion des *pRD29b*-Promotors durch ABA dargestellt (offene Kreise). Die Expression des Luciferasegens ließ sich annähernd sechsfach durch Zugabe von 5 μM ABA steigern. Die Co-Expression von 1 μg eines *RCAR1* RNAi-Konstrukts (geschlossene Dreiecke) reduzierte diese ABA-abhängige Aktivierung des *pRD29b*-Promotors deutlich. Hier betrug die Erhöhung der Luciferaseaktivität noch $3,8 \pm 0,6$. Wurden die Protoplasten mit einem Kontroll-RNAi-Plasmid, welches gegen das Gen *ACO2* gerichtet war, transformiert, wurden diese nicht in der Expression der Luciferase beeinträchtigt (geschlossen Quadrate). Das bedeutet, dass durch das Einbringen des RNAi-Konstrukts in Protoplasten der ABA-Signalweg desensibilisiert, jedoch nicht völlig abgeschaltet wurde, wohingegen die Überexpression des *RCAR1* Proteins zu einer verstärkten Aktivierung der ABA-abhängigen Signaltransduktion führte.

3.6.3 Effekt von GCA2 auf RCAR1

Im obigen Abschnitt wurde *RCAR1* als ABA (Co-)Rezeptor (und somit als positiver Regulator der ABA-Signaltransduktion) charakterisiert. Nachdem zuvor bereits *GCA2* als negativer Regulator des gleichen Prozesses beschrieben wurde und beide Proteine

miteinander interagieren, wurde als nächstes untersucht, ob sie sich gegenseitig in der Regulation der ABA-Signaltransduktion beeinflussen können. Dazu wurde als erstes analysiert, ob die Hyperstimulierung der ABA-Antworten durch RCAR1 mit GCA2 zu modifizieren ist. Hierzu wurden neben WT- und *aba2*-Protoplasten auch *gca2-1* Pflanzen protoplastiert und der Effekt der Co-Expression von RCAR1 in diesen Protoplasten untersucht (Abb.3-53).

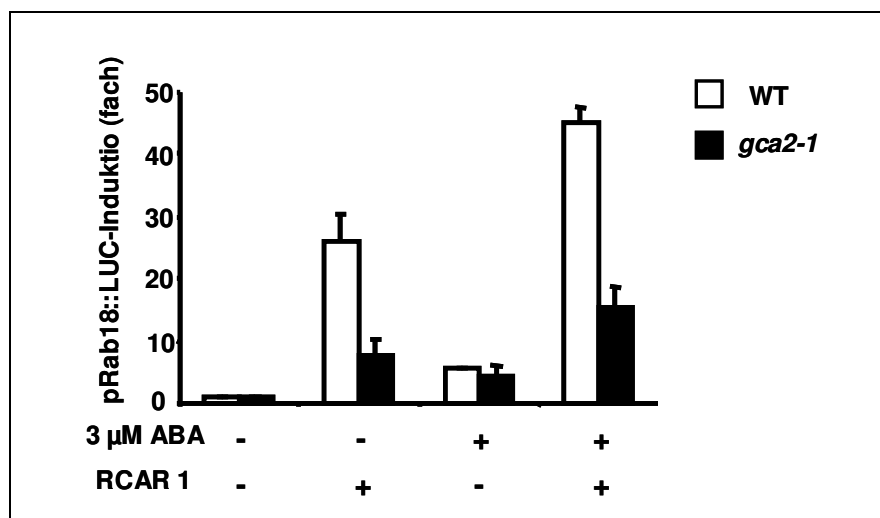


Abb.3-53 Effekt von RCAR1 in *gca2-1* Protoplasten

Protoplastenexperiment mit *pRab18::LUC* als Reporter. Protoplasten aus *Landsberg erecta* (offene Quadrate) und *gca2-1* (geschlossene Quadrate) wurden mit 10 μ g *pRab18::LUC*, 2 μ g *p35S::GUS* und entweder 3 μ g Kontrollplasmid oder 3 μ g *p35S::RCAR1* transformiert. Jeder Transformationsansatz wurde nach der Transformation in zwei geteilt und eins der Aliquote 2 h später mit 3 μ M ABA versetzt. n = 3.

In diesem Experiment zeigte sich eine deutlich Stimulierung der *pRab18::LUC* Expression durch Co-Transformation mit 3 μ g *p35S::RCAR1*-Plasmid in WT-Protoplasten. Ohne exogene Zugabe von ABA erhöhte sich die Luciferaseaktivität um ein Faktor von $26,2 \pm 4,0$, wohingegen nach Zugabe des Hormons ein Induktionsfaktor von $45,1 \pm 2,4$ gemessen wurde. Die ABA-induzierte Stimulierung der Luciferaseaktivität ohne *p35S::RCAR1* betrug in diesem Versuch $5,7 \pm 0,1$. In *gca2-1* Protoplasten war, wie die ABA-Insensitivität erwarten ließ, die Reporterexpression niedriger. So war die RCAR1-vermittelte Stimulierung ohne ABA $7,8 \pm 2,4$ -fach bzw. $15,4 \pm 3,3$ -fach mit dem Phytohormon: Die Hyperstimulierung in *gca2-1* Protoplasten erreichte etwa 30 % (ohne ABA) bzw. 34 % (mit ABA) dessen, was die Expression des *RCAR1*-Plasmids im WT bewirkte.

Nun wurde untersucht, ob dieser Effekt ebenfalls zu beobachten ist, wenn sowohl RCAR1 als auch GCA2 in Protoplasten gemeinsam exprimiert werden. Dazu wurden Protoplasten des WT und der *gca2-1* Mutante zusätzlich zu den *pRD29b::LUC* und *p35S::GUS*-Plasmiden noch mit 3 μ g *p35S::GCA2* und/oder 1 μ g *p35S::RCAR1* transformiert. Des

Weiteren wurde auch die bereits oben beschriebene Calcium-unabhängige Kinase (GCA2-VK, siehe Abb.3-37) in diesem Versuch getestet.

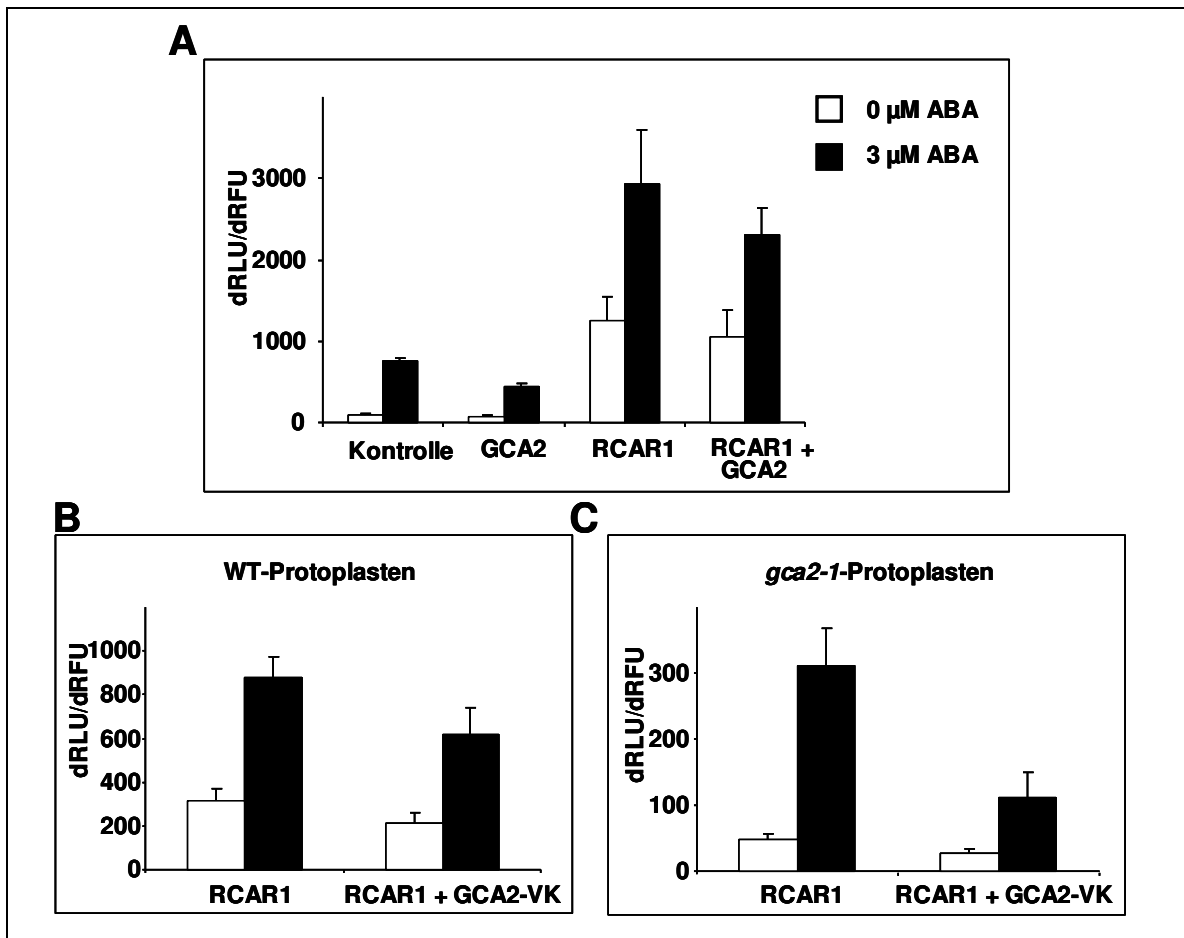


Abb.3-54 Co-Expression von RCAR1 und GCA2 in Protoplasten

Protoplastenexperiment mit *pRab18::LUC* (A) oder *pRD29b::LUC* (B und C) als Reporter. Protoplasten aus *Landsberg erecta* (A und B) und *gca2-1* (C) wurden mit 10 μg Reporter, 2 μg *p35S::GUS* und zusätzlich 1 μg der in den Abbildungen angegebenen Plasmide transformiert. Jeder Transformationsansatz wurde nach der Transformation in zwei geteilt und entweder mit 1 μl Puffer (offene Balken) oder 3 μM ABA (geschlossene Balken) versetzt. n = 3.

In Abb.3-54A zeigt sich erneut der stimulierende Effekt der RCAR1-Expression auf die Promotoraktivität des *pRab18*-Promotors in WT Protoplasten. Die zusätzliche Expression eines *p35S::GCA2* Plasmids reduzierte diesen Effekt auf ca. 80 %. Auf Grund der recht hohen Standardabweichungen ist die Signifikanz dieser Ergebnisse jedoch fraglich ($p < 0,1$). Wurde das gleiche Experiment mit dem *pRD29::LUC* Reporter und der GCA2-VK Version durchführt, (Abb.3-54B) änderte sich das Bild nur unwesentlich. Der RCAR1-Effekt war immer noch deutlich ausgeprägt und wurde durch die Co-Expression der Kinase nur geringfügig abgeschwächt. Analysierte man die Co-Expression hingegen in Protoplasten der *gca2-1* Mutante, in denen der Effekt des RCAR1 Proteins abgeschwächt ist (siehe Abb.3-53), konnte dieser zuvor schwache Effekt der Expression der konstitutiv aktiven Kinase (GCA2-VK) nun deutlich verstärkt werden (Abb.3-54C).

Das GCA2 Protein ist im transienten System offensichtlich in der Lage, die Aktivität des RCAR1 Proteins, welches zur Stimulierung der ABA-induzierten Reporterexpression führte, zu inhibieren. Diese Inhibierung war in *gca2-1* Protoplasten deutlich stärker ausgeprägt, als dies durch eine ektopische Co-Expression des GCA2 Proteins zu erreichen war. Da gezeigt werden konnte, dass die beiden Proteine miteinander interagieren und es sich bei GCA2 um eine Proteinkinase handelt, lag die Vermutung nahe, dass die Inaktivierung des RCAR1 Proteins durch Phosphorylierung geschieht. Um diese Hypothese zu testen, werden zur Zeit Phosphorylierungsversuche mit rekombinanten Proteinen durchgeführt (C. Wellmann, unveröffentlichte Daten). Außerdem wurden in einer Motivsuche putative Phosphorylierungsstellen (Ser oder Thr) im RCAR1 Protein identifiziert.

Die Aminosäuresequenz des RCAR1 Proteins (siehe Appendix A5) weist mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen auf. Bei diesen wurden dann analysiert, inwiefern es sich um mögliche Erkennungssequenzen für CPKs handeln könnte. Vier putative Phosphorylierungsstellen (S⁵¹, S⁷⁹, T¹³⁹ und S¹⁴⁴ des RCAR1 Protein) wurden über *site-directed-mutagenesis* mutiert und der Effekt der mutierten Proteine analysiert. Dabei wurden bewusst Phosphorylierungsstellen mit unterschiedlichen Erkennungsmotiven (siehe Abb.3-55) ausgesucht, da die genaue Zielsequenz der GCA2-Kinase nicht bekannt ist.

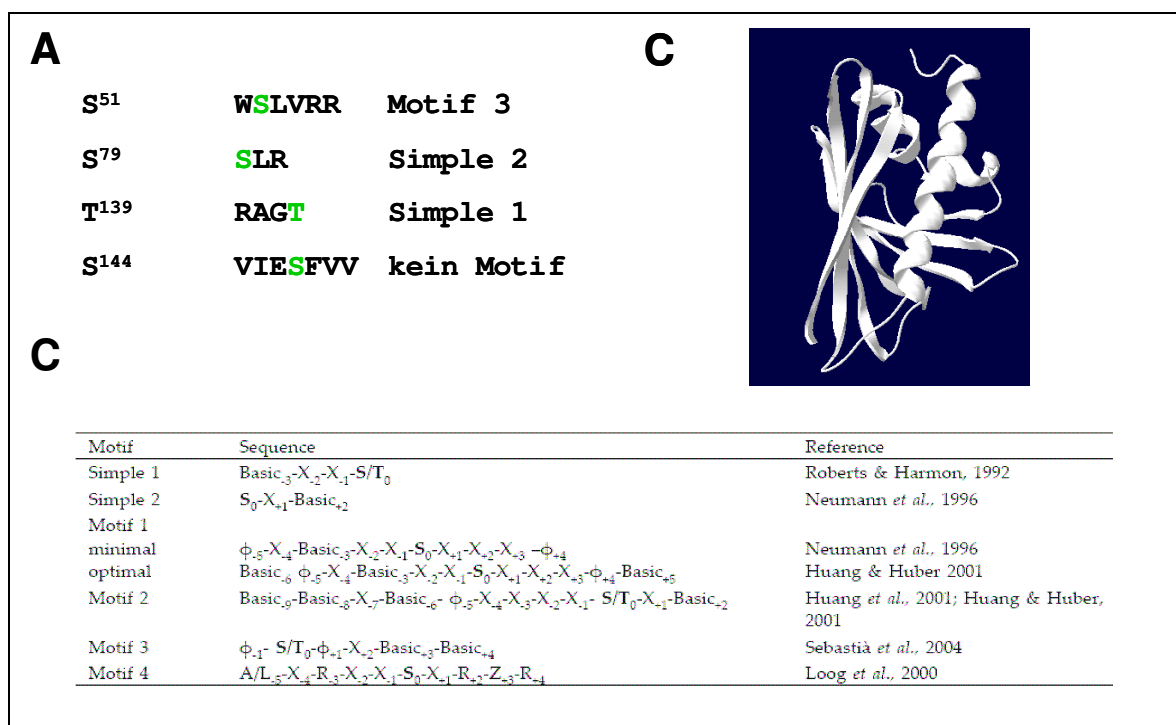


Abb.3-55 Phosphorylierungsstellen im RCAR1 Protein

A: Die vier in dieser Arbeit mutierten Phosphorylierungsstellen des RCAR1 Proteins und die Aminosäuresequenzen sind dargestellt. Die jeweilig mutierte Aminosäure ist grün dargestellt. Die Konsensusmotive beziehen sich auf C. B: Modellierter 3D-Struktur des RCAR1 Proteins. C: verbreitete Aminosäuremotive, die durch CPKs phosphoryliert werden, dabei bezeichnet Basic entweder Arg oder Lys und φ bezeichnet hydrophobe AS (Abb.3-55C entnommen aus (Klimecka und Muszynska 2007)).

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass der Effekt einer Phosphorylierung für ein Protein, durch das ‚Anheften‘ des negativen Phosphates verursacht wird. Wird eine neutrale Aminosäure in eine Aspartat mutiert, tritt der gleiche Effekt, das Anheften einer negativen Ladung, ein. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von ‚Phosphomimik‘ (Thorsness und Koshland 1987). Der umgekehrte Fall wird durch den Aminosäureaustausch zum Alanin erreicht: An diese unpolare Aminosäure ist es für eine Kinase nicht mehr möglich, einen Phosphatrest zu übertragen, weshalb diese Aminosäure ein konstitutiv nicht-phosphoryliertes Protein mimikt. Deshalb wurden diese potenziellen Phosphorylierungsstellen des RCAR1 Proteins sowohl zu einem Alanin als auch einem Aspartat mutiert. Mit diesen acht Konstrukten, bei denen das mutierte RCAR1 Protein jeweils unter der Kontrolle des p35S-Promotors exprimiert wird, wurden erneut Protoplastenversuche durchgeführt (Abb.3-56).

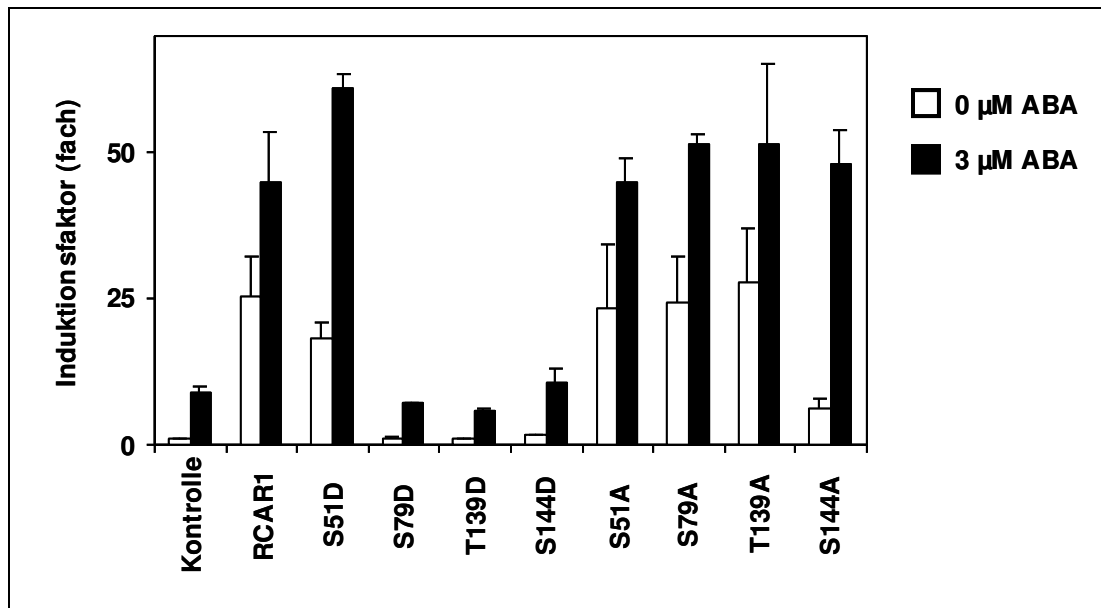


Abb.3-56 Protoplastenversuch mit mutierten RCAR1 Proteinen

Protoplastenexperiment mit *pRab18::LUC*: Die Protoplasten wurden mit 10 μg Reporter, 2 μg *p35S::GUS* und zusätzlich 3 μg der jeweiligen mutierten *p35S::RCAR1*-Konstrukte transformiert. Die Aminosäuremodifikationen der einzelnen Konstrukte sind in der Abbildung angegeben. Jeder Transformationsansatz wurde nach der Transformation in zwei geteilt und entweder mit 1 μl Puffer (offene Balken) oder 3 μM ABA (geschlossene Balken) versetzt. n = 3.

Der Austausch des Ser⁵¹ in ein Aspartat änderte die Aktivität von RCAR1 nicht oder nicht signifikant. Die Hyperstimulierung der *pRab18::LUC* Expression war ohne ABA etwas geringer als mit dem nicht mutierten RCAR1 Konstrukt, wohingegen die Werte mit 3 μM ABA etwas höher lagen. Der Austausch zum Alanin an dieser Stelle blieb ohne Einfluss auf die Proteinaktivität. Anders verhielt es sich mit der Mutation des Ser⁷⁹: Hier bewirkte der Aminosäureaustausch zum Aspartat einen deutlichen Effekt und das so mutierte Protein büßte seinen stimulierenden Effekt auf die ABA-Signaltransduktion ein. Die ermittelten Werte erreichten nur noch das Niveau der Kontrollprotoplasten ohne RCAR1 Protein. Die Mutation dieses Serins zum Alanin hatte hingegen keinen Einfluss auf diese Aktivität. Für die Mutation des Thr¹³⁹ ergab sich ein vergleichbares Bild: Auch hier führte der Austausch zum Aspartat zu einem nicht mehr funktionsfähigen RCAR1 Protein, wohingegen der Austausch zum Alanin ohne merklichen Effekt blieb. Für die vierte untersuchte putative Phosphorylierungsstelle des RCAR1 Proteins (Ser¹⁴⁴) zeigte sich ein nur geringfügig anderes Szenario: Das Aspartat an dieser Stelle bewirkte wiederum den Aktivitätsverlust des Proteins. Das Protein, welches statt dem Serin an dieser Stelle ein Alanin aufwies, verhielt sich jedoch unterschiedlich. Hier fiel der durch endogen in den Protoplasten gebildetes ABA ausgelöste Effekt geringer als mit dem nicht mutierten Konstrukt aus. Die Hyperstimulierung betrug in diesem Fall ohne exogene ABA-Applikation nur knapp 25 % des nicht mutierten RCAR1 Proteins. Nach Inkubation mit

dem Phytohormon ergab sich jedoch auch für dieses Konstrukt ein mit dem nicht mutierten Protein vergleichbares Bild.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für drei der vier mutierten Aminosäuren im RCAR1 Protein der Austausch zum Aspartat mit einem Aktivitätsverlust einhergeht, wohingegen der Austausch zum Alanin an gleicher Stelle die Aktivität nicht (Ser⁷¹ und Thr¹³⁹) oder nur gering (Ser¹⁴⁴) beeinflusst. Das Einführen eines Aspartats statt des Ser⁵¹ bewirkt hingegen keinen merklichen Effekt.

An drei Stellen führt die Phosphomimik zu einem RCAR1 Protein, welches nicht mehr als positiver Regulator des ABA-Signalwegs wirken kann.

4 Diskussion

Die Anpassung an äußere Reize und deren Übermittlung auf zelluläre Signalwege verläuft oftmals über die Regulation der cytosolischen Calcium-Konzentration (Reddy 2001). Hierbei stellen Calcium-abhängige Proteinkinasen (CPKs [in einigen Veröffentlichungen werden diese Enzyme auch als CDPKs bezeichnet]) eine wichtige Komponente des Calcium-decodierenden Systems dar und helfen die zellulären Prozesse so zu modifizieren, dass eine Adaptation an die jeweilige Situation erreicht wird (Harmon *et al.* 2000; Ludwig *et al.* 2004). In Pflanzen laufen viele abiotische Adaptationen, wie die Vermittlung von Trocken-, Kälte- und Salzstress, über das Phytohormon Abscisinsäure (ABA), dem eine zentrale Rolle in der Stress-Signaltransduktion zugeordnet wird (Finkelstein *et al.* 2002). Komponenten der beteiligten Signaltransduktionswege können über Mutanten, die Störungen in der jeweiligen Signalkette aufweisen, identifiziert werden. Eine solche Mutante ist die in dieser Arbeit untersuchte pleiotrope ABA-insensitive Mutante *gca2*.

4.1 GCA2: Ein Regulator der ABA-Signaltransduktion

Ist GCA2 eine CPK ?

Über positionelle Klonierung konnte der *gca2* Phänotyp auf eine Mutation im *CPK23*-Gen zurückgeführt werden. In der 5'UTR dieses Gens liegt eine EMS-typische Transition eines Cytosins in ein Thymin im mutierten Allel. Mittels dieser Mutation war es möglich, einen DeCAP-Marker für das *gca2*-Allel zu entwickeln. Die Komplementationsanalyse bestätigte, dass sich der Phänotyp der *gca2-1* Pflanzen durch Transformation mit einem ca. 6 kb großen genomischen Fragment, das den ORF (*open reading frame*) des Gen *CPK23* enthält, retten lässt. Da sich die *gca2-1* Mutante nicht transformieren lässt (mögliche Gründe dafür werden später diskutiert (siehe 4.2)), erfolgte die Komplementation indirekt über die Transformation von WT-Pflanzen und anschließenden Rückkreuzen der für das Transgen homozygoten Pflanzen mit *gca2-1*. Bei der Analyse der Nachkommen dieser Kreuzung zeigte sich für annähernd 50 % der homozygoten *gca2-1* Pflanzen eine Komplementation des Phänotyps, wenn das WT-Allel wieder eingebracht wurde. Wenn statt des WT-Allels, das mutierte Allel oder Kontroll-DNA in die Pflanzen eingebracht wurde, wurden nie komplementierte *gca2-1* Pflanzen beobachtet. Das heißt, die Komplementation ist nur partiell erfolgreich. Ein verbreitetes Phänomen bei der Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit Agrobakterien ist ein unterschiedliches Expressionsniveau des eingebrachten Transgens, welches durch verschiedene Faktoren, wie der Position der Integrationsstelle, der Anzahl der integrierten DNA-Fragmente oder

dem Methylierungsgrad beeinflusst wird (Meyer 2000; Morel *et al.* 2000; Meza *et al.* 2001; Francis und Spiker 2005). Dies kann die nur partielle Komplementation der Mutante erklären. Die komplementierten Pflanzen wiesen ein WT-ähnliches physiologisches Verhalten und Erscheinungsbild auf: So ist in diesen Pflanzen die ABA-induzierte Hemmung des Wurzelwachstums wieder genauso ausgeprägt wie im WT und unterscheidet sich deutlich von den ABA-insensitiven *gca2-1* Mutanten. Auch die Regulation der Anionenkanäle in der Plasmamembran, die in *gca2-1* gestört und ursächlich mit der veränderten ABA-Sensitivität der Mutante verknüpft ist (Pei *et al.* 2000; Allen *et al.* 2001), ist in den komplementierten Pflanzen vergleichbar zum WT (J Schröder, unveröffentlichte Daten).

Ein weiterer Grund für die nur teilweise erfolgte Komplementation der *gca2-1* Mutante mag in der Wirkung der Mutation liegen. In der *gca2-1* Mutante konnte eine (leicht) erhöhte Transkriptmenge des *CPK23* Transkripts festgestellt werden, während die Menge an Kontroll-Transkripten keinen Unterschied zum WT erkennen ließ. Da der hergestellte Peptid-Antikörper gegen das CPK23 Protein dieses nicht spezifisch erkannt hat, erfolgte die Detektion der CPK23 Proteinmenge in der *gca2-1* Mutante indirekt. Hierzu wurden transgene Pflanzen generiert, die ein GCA2-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des endogenen *pGCA2*-Promotors exprimieren. Trägt das transformierte Konstrukt die in *gca2-1* gefundene Mutation in der 5'UTR, zeigt sich eine deutlich (5- bis 20-fach) erhöhte Proteinmenge im Vergleich zu transgenen Pflanzen, bei denen die 5'UTR die Basensequenz des WT aufweist. Die Mutation in *gca2-1* sorgt also für eine spezifische Erhöhung der CPK23 Proteinmenge in den Mutanten, die für den veränderten Phänotyp der Mutante verantwortlich ist.

Durch die Expression eines zusätzlichen *GCA2*-Gens in den *gca2-1* Mutanten, würde man eine weitere Erhöhung der *GCA2*-Proteinmenge in diesen Pflanzen erwarten. Diese Erhöhung sollte jedoch, falls sie einen Einfluss hat, den Phänotyp nicht komplementieren, sondern eher noch verstärken.

Eine Möglichkeit, weshalb die Komplementation trotzdem (partiell) erfolgreich war, besteht in der Regulation der Transkriptmenge. Die Mutation beeinflusst die Proteinmenge hauptsächlich translational. Ist die Menge des *GCA2*-Transkripts ein begrenzender Faktor, zum Beispiel durch einen limitierenden spezifischer Transkriptionsfaktor, würden in Pflanzen die zwei Kopien des mutierten Allels tragen, sämtliche *GCA2*-Transkripte diese Mutation aufweisen und zu einer erhöhten Proteinmenge führen. Bei komplementierten Pflanzen, die zwei mutierte (endogene) und zwei WT-Allele (T-DNA) besitzen, wären nur 50 % der Allele mutiert. Geht man nun davon aus, dass die Menge an *GCA2*-Transkript in diesem Fall trotzdem nicht erhöht ist, da die Allele um die Bindung des Transkriptionsfaktors konkurrieren, würde dies eine Reduktion der Proteinmenge mit

sich bringen. Dies würde zur Komplementation der Pflanzen führen. Ein Nachweis der GCA2 Proteinmenge in den komplementierten Pflanzen könnte darüber Auskunft geben. Wobei eine Reduktion der Proteinmenge zu erwarten wäre.

Dies könnte erklären warum abhängig von der relativen Expressionsstärke des Transgens, eine Komplementation der *gca2-1* Mutante in verschiedenen Linien unterschiedlich ausfällt.

Nachdem der *gca2*-Phänotyp auf eine Mutation im *CPK23* Gen zurückzuführen ist, wurde als nächstes ein *knock-out* Allel dieses Gens in *Landsberg erecta* isoliert. Diese Mutante, *gca2-2* (die ursprüngliche *gca2* Mutante wird im folgenden als *gca2-1* bezeichnet), besitzt eine T-DNA Insertion im ersten Exon des *CPK23* Gens. Für diese Mutante konnte gezeigt werden, dass kein vollständiges *CPK23* Transkript gebildet wird. Bei der phänotypischen Analyse der Mutante zeigte sich ein konträres Bild. Dabei ließ sich abhängig von der Charge der *gca2-2* Samen entweder eine ABA-Hypersensitivität bei der Keimung, der Schließzellregulation und der Regulierung des ABA-induzierten *pRD29b*-Promotors im transienten Protoplastensystem feststellen oder die ABA-Sensitivität der *gca2-2* Mutante unterschied sich nicht vom WT.

Einen Einfluss der Umweltbedingungen der Mutterpflanze auf das Keimungsverhalten der Samen wurde für Phytochrom Mutanten beschrieben (Donohue *et al.* 2008). Hier konnte gezeigt werden, dass die Anzuchtbedingungen der Mutterpflanze (Kurztag vs. Langtag) einen direkten Bezug zum Keimungsverhalten der Samen haben. Zwar wurden solche oder ähnliche epigenetische Effekte *bis dato* hauptsächlich für die Kontrolle der Samenkeimung beschrieben (Donohue 2009), jedoch könnten sie gleichermaßen auch die ABA-Sensitivität von Keimlingen beeinflussen, um so den Nachkommen eine bestmögliche Anpassung an die von der Mutterpflanze wahrgenommenen Umweltbedingungen zu gewährleisten. Würde unter bestimmten Bedingungen die Aktivität des *CPK23* Gens nicht gebraucht werden, wäre kein Unterschied zwischen *knock-out* und WT zu erwarten. Beide Ausprägungen des Phänotyps eines funktionellen *knock-out* des *CPK23* Gens unterscheiden sich jedoch grundlegend vom Phänotyp der *gca2-1* Mutante.

Interessanter Weise handelt es sich, obwohl die *gca2-1* Mutante als eine rezessive Mutante beschrieben ist, bei dieser Mutante nicht um eine *loss-of-function* Mutante. Die Menge an CPK23 Protein (und Transkript) ist erhöht, was eine ABA-Insensitivität zur Folge hat. Wie lässt sich die rezessive Natur der *gca2-1* Mutante mit einem erhöhten Proteingehalt in Einklang bringen?

Normalerweise würde ein *gain of function* (also ein Funktionsgewinn, in diesem Fall mehr GCA2 Protein) auch in heterozygoten Pflanzen einen Phänotyp generieren, da bereits ein

mutiertes Allel ausreichen sollte, um die Proteinmenge in diesen Pflanzen zu erhöhen. Für die Mutante *rcd1* (radical induced cell death 1) konnte allerdings gezeigt werden, dass die Mutante resistent gegen das ROS-produzierende Herbizid Paraquat ist. Diese Resistenz zeigt einen klaren rezessiven Erbgang, obwohl es sich bei der Mutation um eine *gain of function* Mutation handelt (Ahlfors *et al.* 2004; Fujibe *et al.* 2006). Allerdings zeigt die Mutante einen Semi-Dominanz in Bezug auf die Ozon-Sensitivität (Overmyer *et al.* 2000). Erste Versuche deuten auch für die ABA-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums intermediäre Phänotypen in für den *GCA2*-Locus heterozygoten Pflanzen an, während der Zwergwuchs der Mutante eindeutig auf einen rezessiven Erbgang hinweist. Weitere Analysen zur Co-Dominanz der *gca2-1* Mutante sind allerdings nötig, um zu verstehen in welchen Situationen diese auftritt. Vermutlich muss ein gewisser Grenzwert (*threshold*) an Proteinmenge, welcher je nach analysiertem Phänotyp variieren kann, überschritten werden, bevor die Überexpression zu einer merklichen Veränderung des Phänotyps führen kann. Des Weiteren könnten zusätzliche / alternative Kontrollmechanismen eingreifen, die eine moderate Erhöhung der Proteinmenge noch kompensieren können.

Obwohl die Komplementation der *gca2-1* Mutante nur partiell erfolgreich war und der Mechanismus der Komplementation nicht aufgeklärt werden konnte, zeigt sich eindeutig, dass *GCA2* der *CPK23* entspricht. Denn die Komplementation der *gca2-1* Mutante war nur durch Expression des *CPK23* Gens möglich, niemals mit Kontrollkonstrukten. Außerdem führt die Expression des mutierten *GCA2*-Allels im WT wieder zu einem *gca2-1* ähnlichen Phänotyp in den transformierten Pflanzen.

Wie führt die Mutation in *gca2* zu einem Anstieg der *GCA2* Proteinmenge?

Durch die Bestimmung des Transkriptionsstarts konnte gezeigt werden, dass die Mutation Teil des *GCA2*-Transkripts und in der 5'UTR lokalisiert ist. Es gibt verschiedene Mechanismen, über welche die 5'UTR sowohl die Abundanz einer mRNA als auch ihre Translation kontrollieren kann. Einer der gängigsten ist die Kontrolle über miRNAs (Bartel 2004; Chen 2005). Gerade für Stress-Adaptationsmechanismen stellen miRNA wichtige regulatorische Komponenten dar (Shukla *et al.* 2008). MiRNAs sind kleine, 21- 24 bp lange, nicht proteincodierende RNAs, welche die mRNA ihrer Zielgene entweder zerschneiden und so für ihren Abbau sorgen oder die Translation der mRNA verhindern. Sie stellen eigene Transkriptionseinheiten mit eigenen Promotoren im Genom dar und werden über die RNA-Polymerase II transkribiert (Xie *et al.* 2005). So kontrollieren miRNAs die entsprechenden mRNAs und werden wiederum in ihrer Transkription durch ihre jeweiligen Promotoren reguliert. Es konnten verschiedene *cis*-regulatorische

Elemente, die durch biotischen oder abiotischen Stress aktiviert werden, in diesen Promotoren identifiziert werden (Megraw *et al.* 2006). Zusätzlich ist die Expression der miRNAs gewebe- und entwicklungspezifisch. Die gebildeten pri-miRNAs werden in der Pflanze über verschiedene Mechanismen weiter prozessiert, so dass schließlich die aktive miRNA-Spezies entsteht. Zusammen mit den ARGONAUTE (AGO) Proteinen bilden sie den so genannten RISC (*RNA-induced silencing complex*), der die Ziel-mRNAs abbaut oder ihre Translation inhibiert (zusammengefasst in (Voinnet 2009)).

Da in der *gca2-1* Mutante deutlich mehr Protein bei einer nur gering erhöhten mRNA-Menge vorliegt, wäre es denkbar, dass die *GCA2*-mRNA einer translationalen Kontrolle durch miRNAs unterliegt. Eine Datenbanksuche auf der Homepage des *Arabidopsis small RNA projects* (<http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/db/>) lieferte jedoch keine annotierte miRNA, die den Bereich um die Mutation in der 5'UTR als Zielsequenz hat. Die Datenbank besteht jedoch hauptsächlich aus Sequenzen, die aus dem Ökotyp *Columbia* stammen. Der Bereich der die Mutation umspannt ist zwischen diesen beiden Ökotypen nicht konserviert. Hinsichtlich der Populationen kleiner RNAs gibt es deutliche ökotypische Unterschiede zwischen den Ökotypen *Landsberg erecta* und *Columbia* (Zhai *et al.* 2008), so dass eventuelle *Landsberg*-spezifische miRNAs für die Regulation in Frage kommen.

Reporterkonstrukte, bei denen das Luciferase Gen unter der Kontrolle des p*GCA2*-Promotors samt endogener UTR steht, zeigen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Expression in Abhängigkeit der mutierten bzw. nicht-mutierten UTR. Dies widerspricht deutlich den Befunden in den transgenen Pflanzen: Die Expression des *GCA2*-GFP Fusionsproteins wurde hier deutlich durch die Mutation in der 5'UTR verstärkt.

Ein entscheidender Unterschied in diesen Reporterkonstrukten besteht allerdings darin, dass der Kontext des Startcodons vom *GCA2*-Gen sich vom Kontext des Startcodons im Reporterkonstrukt unterscheidet.

In Eukaryoten binden die Ribosomen die mRNA an der 5'CAP-Struktur und scannen die RNA bis zum ersten Startcodon, bei dem die Translation beginnt. Für diesen Prozess ist allerdings nicht nur das Startcodon alleine, sondern auch die Basen von der -3 bis zur +4(5) Position des Startcodons wichtig. Die Wahrscheinlichkeit einer Initialisierung der Translation ist von diesem Kontext abhängig. In dikotylen Pflanzen ist die Konsensus-Sequenz Aaa-ATG-Gc, wobei den -3 und +4 Positionen die Hauptfunktion zukommt (Joshi *et al.* 1997; Rangan *et al.* 2008).

Die 5'UTR des *GCA2*-Gens besitzt zwei ATG-Sequenzen vor dem eigentlichen Startcodon, die sich mit diesem nicht im selben Leseraster befinden. Solche Sequenzen bezeichnet man als uORFs (*upstream open reading frame*), die einen globalen Einfluss auf die Proteinexpression der nachgeschalteten Gene haben (Vilela und McCarthy 2003).

Mehr als 3000 *Arabidopsis* mRNAs enthalten solche uORFs in ihrer 5'UTR (Hayden und Jorgensen 2007).

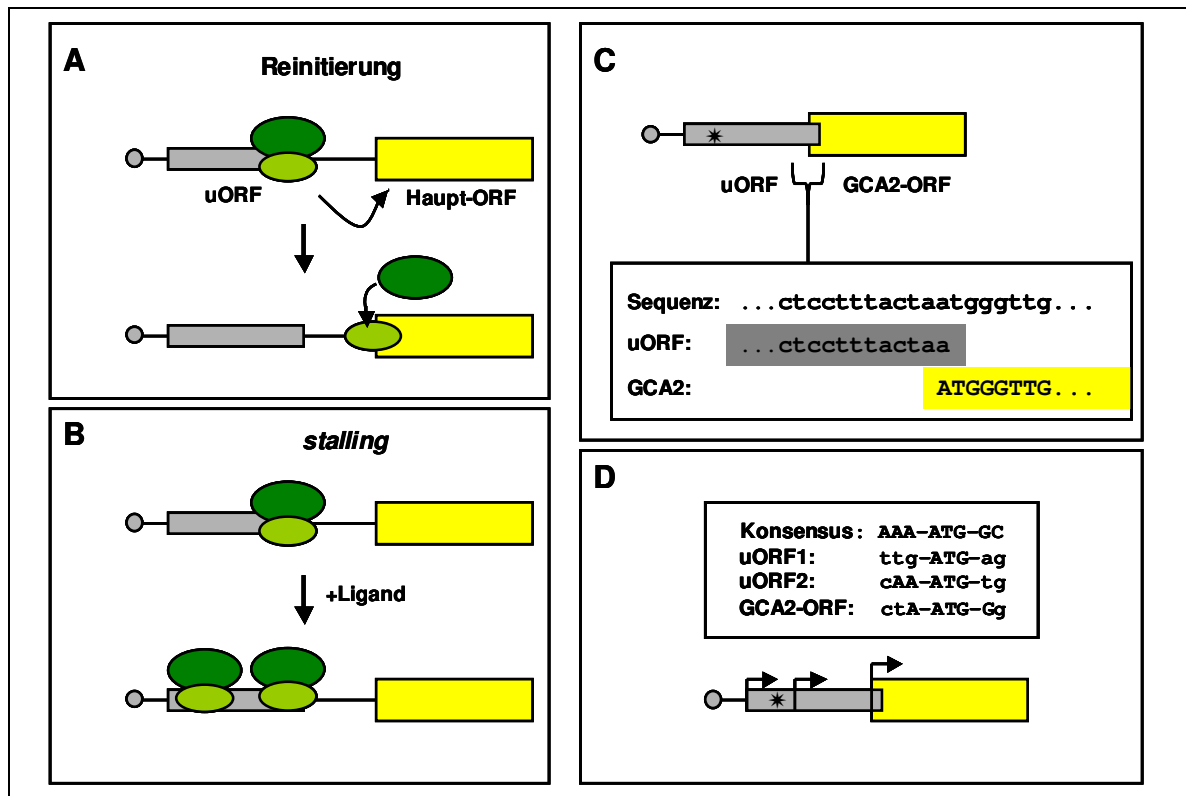


Abb.4-1 Regulationsmechanismen durch uORFs

A: Ribosomen (grün) binden an einen uORF (graue Box), nach der Termination des uORFs besteht die Möglichkeit einer Reinitialisierung am Haupt-ORF (gelb). B: Ein durch den uORF codiertes Peptid sorgt in Anwesenheit eines Liganden für ein *stalling* (Zurückbleiben) der Ribosomen am uORF, eine Reinitialisierung am Haupt-ORF findet nicht statt. C: Im *GCA2*-Gen überlappt das Stopcodon des uORF mit dem Startcodon des Haupt-ORFs. Die Position der Mutation im uORF ist durch einen Stern (*) gekennzeichnet. D: Sequenzkontext der Startcodons der beiden *GCA2*-uORFs und des Haupt-ORFs im Vergleich mit der Konsensus-Sequenz. Basen, die dieser entsprechen sind in Großbuchstaben dargestellt. Abb.4-1A und B verändert nach (Vilela und McCarthy 2003).

Die meisten uORFs führen zu einem Stocken der Ribosomen an dieser Stelle (siehe Abb.4-1B). Es kann aber auch zu einem Ablesen des uORFs oder einem Überspringen mit anschließendem Ablesen des Haupt-ORFs kommen (Abb.4-1A). Da das STOP-Codon des *GCA2*-uORFs direkt mit dem Startcodon des Haupt-ORFs überlappt (siehe Abb.4-1C), scheint eine Reinitialisierung am Haupt-ORF nach vorheriger Translation des uORFs eher unwahrscheinlich. Wie aus der Abb.4-1D ersichtlich ist, zeigen die Sequenzen der beiden uORFs in *GCA2* keine große Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz: Das Guanin an der wichtigen +4 Position ist hier in beiden Fällen nicht vorhanden, so dass es wahrscheinlich erscheint, dass einige Ribosomen diesen Startpunkt nicht erkennen und erst am Haupt-ORF die Translation initialisieren.

In den meisten Fällen reicht allein das Vorhandensein eines uORFs für die Regulation des Haupt-ORFs aus (Wang und Wessler 1998). Es gibt allerdings Beispiele, in denen die

Sequenz des durch den uORF codierten Peptides die Translation des Haupt-ORFs beeinflusst. Ein solches Beispiel in Pflanzen ist die durch Sucrose vermittelte Repression der Translation einiger bZIP Transkriptionsfaktoren (Wiese *et al.* 2005). Hier sorgt ein durch einen uORF codiertes ‚Kontroll-Peptid‘ für die Sucrose-abhängige Inhibierung der Translation von bZIP Transkriptionsfaktoren. Für dieses Kontroll-Peptid konnte sogar gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz des Peptids einen Einfluss auf diese Repression ausübt und bereits die Mutation einer Aminosäure dieses Peptids seine Funktion konterkariert (Rahmani *et al.* 2009). Die beiden uORF-Startcodons in *GCA2* befinden sich im gleichen Leseraster, so dass eine Translation der Sequenz zu einem Peptid mit 46 Aminosäuren (27 AS im Falle eines Translationsstarts beim 2. ATG, Sequenz siehe Appendix A4) führen würde. Die Mutation in der *gca2-1* Mutante liegt in diesem uORF und würde zu einer Mutation Pro⁶ → Ser führen. Dies könnte die Funktion eines (möglicher Weise) synthetisierten Peptids und dessen Kontrollfunktion beeinträchtigen.

In der *gca2* Mutante ist weniger die Transkriptionsrate des CPK23 Gens, als vielmehr die Translationsrate erhöht. Für den Menschen konnte gezeigt werden, dass uORFs nur einen moderaten Einfluss auf die mRNA Menge haben, die Proteinexpression jedoch dramatisch beeinflussen (Calvo *et al.* 2009).

In transienten Protoplastenexperimenten ließ sich jedoch auch mit Konstrukten, in denen die Basensequenz am Startcodon des Reporters dem endogenen Kontext im *GCA2*-Gen angeglichen wurde, kein regulatorischer Einfluss der Mutation auf die Reporterexpression erkennen.

Ein mögliches Szenario wäre, dass ein bestimmter Reiz im WT zu einer Verminderung der *GCA2*-Expression führt, wohingegen dieser Effekt durch die Mutation in der *gca2-1* Mutante ausbleibt, was zu einer erhöhten Proteinmenge führt. Wenn jetzt dieser Effekt in Protoplasten nicht greifen kann (zum Beispiel, weil es sich bei Protoplasten um ein vorgestresstes System handelt), würde man den Effekt der Mutation in diesem System nicht sehen. Um diese Hypothese zu testen, müssten die Reporterkonstrukte stabil in Pflanzen eingebracht werden. Zusätzlich kann die mit einer transienten Expression verbundene hohe Kopienzahl des Reporterkonstrukts die Funktionalität regulatorischer Mechanismen aushebeln. Dieses Problem ließe sich ebenfalls mit der Integration des Reporters in die pflanzliche DNA umgehen.

Alternativ gibt es noch Mechanismen, bei denen die Proteinmenge über so genannte *riboswitches*, also molekulare Sensoren auf RNA-Ebene, beeinflusst wird (Bocobza *et al.* 2007). Hier wird angenommen, dass die Sekundärstruktur der RNA eine regulatorische Funktion einnimmt. Die Berechnung möglicher Sekundärstrukturen der *GCA2*-5'UTR

(Abb.3-26), ergibt Strukturen, bei denen sich die Mutation in einer RNA-Schleife befinden würde, die für die Signalerkennung von Bedeutung sein kann. Doch auch dieser Effekt hätte mit den verwendeten Konstrukten in transienten Experimenten nachweisbar sein müssen.

Unter Umständen existiert auch die Möglichkeit, dass durch die Mutation der Spleißvorgang der mRNA beeinflusst wird: Etliche mRNA-prozessierende Enzyme sind eng mit dem ABA-Signalweg verknüpft (siehe 1.1.2) und es konnte gezeigt werden, dass die *GCA2* mRNA einem alternativen Spleißvorgang unterliegt. In der *gca2-1* Mutante war mehr korrekt gespleißte RNA vorhanden, während im WT mehr ungespleißtes Produkt vorlag. Mechanismen, die diesen Prozess beeinflussen, können durch die verwendeten Gen-Konstrukte nicht erschöpfend aufgeklärt werden, da die verwendeten Reportergene keine Introns enthalten und so eine mögliche zusätzliche regulatorische Funktion eines Introns ihre Wirkung nicht zeigen kann.

Zusammenfassend gibt es eine Vielzahl an regulatorischen Mechanismen, welche eine erhöhte Proteinmenge in Folge der Mutation in der 5`UTR der *gca2-1* Mutante erklären könnten. Was jedoch der Mechanismus im konkreten Fall ist, lässt sich anhand der Datenlage nicht endgültig entscheiden. Die Mutation stellt jedoch ein interessantes Modell dar, um die Regulation der Proteinexpression zu analysieren.

Einfluss von GCA2 auf die ABA-Signaltransduktion

Die Expression des mutierten *gca2*-Allels in *Landsberg erecta* verändert die ABA-Sensitivität der transgenen Pflanzen. In einem Keimungsversuch zeigten diese Pflanzen ein ABA-insensitives Verhalten, was der ABA-Insensitivität der *gca2-1* Mutante entspricht. Auch die Überexpression einer Calcium-unabhängigen, konstitutiv aktiven Form der CPK23 unter Kontrolle des p35S-Promotors in Protoplasten zieht eine mit *gca2-1* vergleichbare ABA-Insensitivität der Protoplasten nach sich (Abb.3.37). Dabei ist der Einfluss auf die ABA-Sensitivität direkt von der Konzentration an co-transformiertem Konstrukt abhängig. Die Expression der kompletten Calcium-abhängigen Kinase in Protoplasten, sowohl unter dem endogenen p*GCA2*-, als auch dem konstitutiven p35S-Promotor, hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die ABA-Sensitivität der Protoplasten. Dies lässt vermuten, dass nur die Expression einer aktiven CPK zur ABA-Insensitivität in Protoplasten führt und die Calcium-abhängige Aktivierung der CPK im transienten System beeinträchtigt ist.

Durch diese Versuche konnte klar gezeigt werden, dass eine Überexpression des *CPK23* Gens für den *gca2*-Phänotyp verantwortlich ist, und *CPK23* einen negativen Regulator der ABA-Signaltransduktion darstellt.

Für einige CPKs konnten bereits Verbindungen zur ABA-Signaltransduktion demonstriert werden. Für die beiden Proteine CPK3 und CPK6 wurde gezeigt, dass die ABA-abhängige Stomataregulation in den *knock-out* Mutanten beeinträchtigt ist (Mori *et al.* 2006) und für die *cpk4* und *cpk11* Mutanten wurden pleiotrope, ABA-insensitive Phänotypen beschrieben (Zhu *et al.* 2007). Somit handelt es sich bei diesen vier CPKs um positive Regulatoren des ABA-Signalwegs.

Für GCA2 konnte gezeigt werden, dass es als negativer Regulator der gleichen Prozesse fungiert. So könnte durch unterschiedliche Aktivierung und alternierende Zielgene der Kinasen eine differenzierte Sensibilisierung der Pflanze gegenüber dem Phytohormon erreicht werden und verschiedene externe Stimuli, obwohl ihre Signalweiterleitung jeweils über die Regulation von Calciumkonzentrationen läuft, in unterschiedlichen Anpassungsreaktionen der Pflanzen übertragen werden.

Durch die erhöhte Konzentration des CPK23 Proteins in der *gca2-1* Mutante erhöht sich ebenfalls die Calcium-Bindekapazität in der Zelle. Bei vergleichbaren Calcium-Affinitäten der Proteine, bräuchte es mehr Calcium, um die gleiche Menge an anderen CPKs, die als positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktion dienen, zu aktivieren. So könnte allein durch die Bindung von Calcium an GCA2 ein negativer Effekt auf die ABA-Signaltransduktion eintreten. Allerdings bewirkt auch die Expression eines konstitutiv-aktiven GCA2 Proteins, dass nicht mehr in der Lage ist Calcium zu binden, diesen Effekt. Dies spricht eher für einen direkten Einfluss von GCA2 auf den ABA-Signalweg.

Lokalisation des GCA2 Proteins

Die Lokalisation von Proteinen ist oftmals eng an ihre Funktion geknüpft. Das GCA2 Protein ist in sämtlichen untersuchten Pflanzengeweben mit der Plasmamembran assoziiert. Es weist eine N-Myristoylierungsstelle auf und es konnte für andere CPKs gezeigt werden, dass diese Myristoylierung zu einer Verankerung des Proteins an der Plasmamembran führt (Dammann *et al.* 2003). Die Expression eines Fusionsproteins unter der Kontrolle des endogenen Promotors mit mutierter 5'UTR unterscheidet sich nur hinsichtlich der Intensität, nicht jedoch in der Lokalisation des Fusionsproteins. Auffällig ist, dass in intakten Keimlingen ausschließlich eine membranständige Lokalisation zu beobachten ist, wohingegen in transient GCA2-GFP exprimierenden Protoplasten teilweise *spots* an der Membran festgestellt wurden und die Überexpression in Protoplasten mit dem p35S-Promotor oftmals auch zu einer cytosolischen Lokalisation des Proteins führte. Auffällig ist weiterhin, dass sowohl bei geöffneten als auch bei

geschlossenen Spaltöffnungen weder die Intensität noch die Lokalisation des Signals merklich verändert ist. Auch ist die Expression des GCA2 Proteins nicht nur auf Schließzellen beschränkt. In Epidermiszellen ist ebenfalls ein starkes Signal zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich beispielsweise die Funktion der Anionenkanäle, welche auch durch GCA2 reguliert werden, nicht nur auf Schließzellen beschränkt (Negi *et al.* 2008).

Neben der Mediation von abiotischem und biotischem Stress besitzt Calcium weiterhin eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen, wie z.B. dem Auswachsen der Wurzelhaare (Monshausen *et al.* 2008). In Wurzelhaaren wird das Wachstum durch einen positiven *feedback-loop* zwischen einer NADPH Oxidase, Calcium und ROS koordiniert (Takeda *et al.* 2008). Die starke Expression des Proteins gerade an dieser Stelle deutet auf eine Funktion von GCA2 auch bei diesen Prozessen hin, auch wenn in der *gca2-1* Mutante keine morphologischen Veränderungen des Wurzelhaarwachstums augenscheinlich sind.

Reguliert GCA2 den ABA-Rezeptor ?

Schlüsselkomponenten der ABA-Signaltransduktion sind die Proteinphosphatasen 2C wie ABI1 und ABI2, die negative Regulatoren des Signalwegs darstellen und deren Position am Anfang der Signaltransduktionskaskade vermutet wird (Allen *et al.* 1999). Als positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktion, die ebenfalls alle Facetten der Hormonwirkung treffen, gelten unter anderem Proteinkinasen der SnRK2-Familie (Fujii *et al.* 2007; Fujii und Zhu 2009). Für ein Mitglied dieser Familie (OST1) konnte eine direkte Interaktion mit ABI1 und deren regulatorischer Einfluss aufgezeigt werden (Yoshida *et al.* 2006). Eng verwandt mit diesen SnRK2-Kinasen sind die Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CPKs), die einen wichtigen Teil des Calcium-decodierenden Systems in Pflanzen darstellen. Dabei konnten einige Mitglieder dieser Kinase-Familie ebenfalls als positiver Regulator des ABA-Signalwegs identifiziert werden (Mori *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2007). Dieses scheinbare Paradigma von Phosphatasen als negative und Kinasen als positive Regulatoren ist jedoch nicht konsistent und würde auch nur eine geringe Plastizität des Signalwegs erlauben. So gibt es ebenfalls Phosphatasen (wie z.B. RCN1, eine Proteinphosphatase 2A), die positive Regulatoren darstellen (Kwak *et al.* 2002) und Kinasen, wie z.B. CIPK3, die als negative Regulatoren zu betrachten sind (Kim *et al.* 2003).

In dieser Arbeit konnte die Calcium-abhängige Kinase GCA2 als ein zusätzlicher negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion in *Landsberg erecta* identifiziert werden. GCA2 beeinflusst eine Vielzahl an ABA-abhängigen Prozessen, und die Funktion des GCA2 Proteins wird aufgrund der generellen ABA-Insensitivität der *gca2-1* Mutante

ebenfalls am Anfang der ABA-Signaltransduktion vermutet. Über *Yeast-Two-Hybrid* Interaktionsstudien konnte keine Interaktion mit den Phosphatasen ABI1 oder ABI2 festgestellt werden. Stattdessen konnte eine Interaktion mit den beiden mit ABI1 interagierenden ABA-(Co-)Rezeptoren RCAR1 und RCAR3 (Ma *et al.* 2009) im Hefescreen gezeigt werden (Abb.3-45). Diese Interaktion konnte durch bi-molekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) auch *in vivo* in *Arabidopsis* Protoplasten bestätigt werden. Die Verteilung des Signals in der Zelle deutete eine cytoplasmatische Lokalisation der beiden Proteine an. RCAR1 alleine ist sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (Ma *et al.* 2009), wohingegen GCA2 meist eine membranständige Lokalisation zeigt. Bei Überexpression zeigt sich jedoch auch für GCA2 eine cytoplasmatische Lokalisation. Es ist vorstellbar, dass die Interaktion von GCA2 mit RCAR1 sowohl am Plasmalemma stattfindet als auch zu einer Lokalisationsänderung des GCA2 Proteins führt. Für das ebenfalls Calcium-decodierende CBL/CIPK Netzwerk konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation des Proteins CIPK1 abhängig vom jeweiligen Interaktionspartner ist: So ist der CIPK1/CBL1-Komplex an der Plasmamembran lokalisiert, während der CIPK1/CBL2-Komplex im Tonoplasten akkumuliert (Batistic *et al.* 2008). In Tieren konnte für das neuronale, am Sehprozess beteiligte Protein Recoverin eine direkte Calcium-abhängige Reaktion belegt werden. In diesem Protein wird die Myristylgruppe, die für die Verankerung an der Plasmamembran verantwortlich ist, Calcium-abhängig exponiert oder im Protein verborgen, so dass Calcium hier direkt zu einer intrazellulären Lokalisationsänderung des Proteins führt (Ames *et al.* 1997). CPKs sind in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert (Dammann *et al.* 2003). Für eine CPK aus der Eisblume (*Mesembryanthemum crystallinum*), die ebenfalls eine N-Myristoylierungsstelle aufweist, konnte eine durch Trockenheit ausgelöste reversible Lokalisationsänderung des Proteins von der Plasmamembran zum Zellkern, dem Endoplasmatischen Reticulum und den Actin-Filamenten beobachtet werden (Chehab *et al.* 2004). Durch diese Stress-induzierte Verlagerung des subzellulären Wirkungsorts bietet sich die Möglichkeit unterschiedliche Zielgene über die gleiche Kinase zu verschiedenen Zeitpunkten zu beeinflussen. Die Vermutung liegt nahe, dass auch die Lokalisation des GCA2 Proteins durch bestimmte Mechanismen (Stress-induziert ?) verändert werden kann, so dass eine Interaktion mit den RCAR1 Protein nur unter bestimmten Gegebenheiten möglich ist. Ein Auslöser hierfür konnte bisher nicht identifiziert werden (in dieser Arbeit wurde als möglicher Auslöser allerdings nur ABA getestet).

RCAR1 und RCAR3 (*regulatory components of ABA receptor*) gehören zu einer kleinen Genfamilie mit 14 Mitgliedern in *Arabidopsis*. Eine veränderte Expression des RCAR1 Proteins beeinträchtigt alle Facetten der ABA-Wirkung. Durch die hohe Redundanz in der

Proteinfamilie und überlappende Funktionen zeigen Mutanten in einzelnen RCAR Genen keinen Phänotyp (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009). Die transiente Expression eines p35S::RCAR1 Konstrukts in Protoplasten führt jedoch zu einer klaren ABA-Hypersensitivität in Protoplasten, während kein Einfluss auf die Cytokinin-Sensitivität festzustellen war. Umgekehrt sorgte die Expression eines gegen RCAR1 gerichteten RNAi-Konstrukts für eine ABA-Insensitivität in den transformierten Protoplasten. Die Veränderung der RCAR1-Expression hat also einen direkten Effekt auf die ABA-Sensitivität der transformierten Protoplasten. Für die ektopische Expression in stabilen Pflanzen konnte ebenfalls eine ABA-Hypersensitivität der transgenen Pflanzen für Keimung und Wurzelwachstum beobachtet werden (Ma *et al.* 2009).

RCAR1 und verwandte Proteine beeinflussen die Aktivität der Proteinphosphatasen ABI1, ABI2 und HAB1 in Abhängigkeit von ABA (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009). Diese ABA-abhängige direkte Inhibierung der negativen Regulatoren der ABA-Signaltransduktion ist eine neue Wirkungsweise von ABA-Rezeptoren.

Anhand der Homologien der RCAR Proteine zu dem Protein Bet V 1a aus Birke (*Betula pendula*), für das es eine Kristallstruktur gibt (Gajhede *et al.* 1996), war es möglich die 3-dimensionale-Struktur der RCAR-Proteine zu modellieren. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des RCAR1 Proteins auf die bereits bekannte Kristallstruktur des BetV1a Proteins übertragen (Accession-Number der Bet V 1-Kristallstruktur in der PDB Datenbank: 1bv1). Der Ramachandran-plot, der die erlaubten Phi-Psi-Winkel der atomaren Bindungen im Peptid anzeigt, wies dabei keine Häufung an unerlaubten Winkeln auf, was diese Struktur als wahrscheinliche 3D-Konformation des Proteins unterstützt.

Auffällig an der 3D-Struktur ist eine hydrophobe Nische, welche die Möglichkeit zur Bindung hydrophober Liganden bietet (Radauer *et al.* 2008). Für Bet V 1 konnte unter anderen die Bindung von Cytokinin gezeigt werden (Mogensen *et al.* 2002). In dieser Arbeit konnte die Bindung von S-ABA an RCAR1 mithilfe der isothermalen Kalorimetrie (ITC) experimentell bewiesen werden. Hierbei ergab sich eine Affinität des Proteins für S-ABA im submikromolaren Bereich. Dieser k_d -Wert liegt jedoch mit 960 ± 140 nM für eine physiologische Wirksamkeit relativ hoch. Wird jedoch ein Komplex aus RCAR-Protein und Phosphatase gebildet und S-ABA zu diesem Komplex titriert, zeigt dieser Komplex eine deutliche höhere Affinität für das Phytohormon. Ein Komplex aus RCAR1 und ABI2 hat einen k_d -Wert von 63 nM \pm 8 nM. Ein weiterer Unterschied der thermischen Messung der ABA-Bindung an den Komplex besteht in der Menge an freigesetzter Energie ΔG pro Mol ABA. So erzeugt die niedrig-affine Bindung von ABA an RCAR1 alleine eine Energie von maximal 8 kcal / Mol ABA, was mit der Bindungsenergie eines kleinen Liganden, an ein

Molekül in Einklang steht. Bei der Bindung des Hormons an den RCAR1-ABI2-Komplex wird hingegen eine 30fach höhere Menge an freier Energie pro Mol ABA frei. Diese hohen Änderung der freien Energie (ΔG) könnten sich durch strukturelle Änderungen in den beteiligten Proteinen erklären lassen (Ward und Holdgate 2001).

Dies könnte zum Beispiel durch eine enzymatische Reaktion des Bindeproteins erreicht werden. Dabei stellt eine enzymatische Inaktivierung der Phosphatasen durch das Bindeprotein ein mögliches Szenario dar.

Auch das Enzym Norcoclaurin-Synthase weist eine hohe Homologie zu Bet V 1a auf und katalysiert die Kondensation von Norcoclaurin aus Dopamine und 4-Hydroxy-Phenyllessigsäure (4-HPAA) (Berkner *et al.* 2008). Unter Umständen besitzen auch RCAR-Proteine eine ähnliche enzymatische Aktivität, die nach der Bindung von ABA und Inaktivierung der Phosphatase, den Rezeptorkomplex modifiziert und die Signaltransduktion abschaltet.

Für andere Hormonrezeptoren wie GID1 und TIR1 konnte gezeigt werden, dass das jeweilige Hormon als ‚Kleber‘ die Interaktion der Rezeptoren mit ihren Zielproteinen stabilisiert und so den Abbau von Repressorproteinen erwirkt (Tan *et al.* 2007; Murase *et al.* 2008).

Die molekulare Wirkung der Abscisinsäure an ihrem Rezeptor und die nachgeschalteten Prozesse scheinen sich von diesen beiden Hormonrezeptoren zu unterscheiden, indem die Phosphatasen nicht durch Ubiquitinierung degradiert, sondern durch RCAR inaktiviert werden. Für den ABA-Signalweg gibt es auch einen Einfluss von Ubiquitin-E3 und Sumo (*small ubiquitin-related modifier*)-E3 Ligasen (Stone *et al.* 2006; Miura *et al.* 2009). Inwiefern die Inaktivierung der Phosphatasen reversibel ist und wie der Wirkmechanismus am ABA-Rezeptor auf molekularer Ebene abläuft, bleiben zur Zeit noch offene Fragen.

Für die Perzeption der Abscisinsäure in *Arabidopsis* zeichnet sich, im Unterschied zu anderen Pflanzenhormonen, eine ganze Familie an Rezeptorproteinen ab. Die 14 RCAR-Mitglieder formen mit einer Subgruppe der PP2Cs funktionelle Komplexe, die als ABA-Rezeptoren wirken. Zu vermuten wäre, dass diese verschiedenen Rezeptor-Komplexe zum Teil unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen. Diese Spezifität könnte durch verschiedene Affinitäten gegenüber ABA, einer Expression in verschiedenen Geweben oder zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien, aber auch durch andere Interaktionspartner erreicht werden. Multiple ABA-Bindeproteine, die unterschiedliche Zielgene aktivieren und unterschiedliche Affinitäten für die beiden ABA Enantiomere aufweisen, wurden bereits postuliert (Nambara *et al.* 2002).

GCA2 interagiert mit RCAR1 und RCAR3. Eine Interaktion mit anderen Mitgliedern der RCAR-Proteinfamilie wurde bislang nicht untersucht. Es wäre jedoch nicht verwunderlich,

wenn GCA2 ebenfalls mit anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie interagieren würde. Bemerkenswert ist, dass der hyperstimulierende Effekt auf die ABA-Signaltransduktion durch die RCAR1-Expression in *gca2-1* Protoplasten deutlich abgeschwächt ist. Der gleiche Effekt wird durch die Co-Expression einer Calcium-unabhängigen Form von GCA2 (GCA2-VK) erreicht. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass das GCA2 Protein, welches in *gca2-1* Protoplasten endogen erhöht ist, einen negativen Effekt auf die Wirkung des ABA-Rezeptors RCAR1 ausübt.

In Tieren konnte gezeigt werden, dass die Funktion des Östrogenrezeptors entscheidend von dessen Phosphorylierungszustand abhängt (Murphy *et al.* 2009). Ähnliche Kinase-abhängige Regulationsmechanismen direkt am Rezeptor könnten auch in Pflanzen eine Rolle spielen, sind bis dato jedoch noch nicht beschrieben worden. Für mutierte Versionen des RCAR1 Proteins, bei denen verschiedene potentielle Phosphorylierungsstellen (Ser⁷⁹ oder Thr¹³⁹) in ein Aspartat mutiert wurden, zeigt sich durch die Phosphomimik ein spezifischer Funktionsverlust des mutierten RCAR1 Proteins. Die jeweiligen Kontrollmutationen Ser⁷⁹ → Ala und Thr¹³⁹ → Ala bleiben hingegen ohne merkliche Beeinträchtigung in der Funktion des Proteins. Dieser Befund legt den Schluss einer Regulation des RCAR1 Proteins durch Phosphorylierung nahe.

Weitere Experimente sind nötig um unterscheiden zu können, ob die Modifikation des Bindeproteins die Interaktion mit den PP2Cs oder die ABA-Bindung *per se* beeinträchtigt.

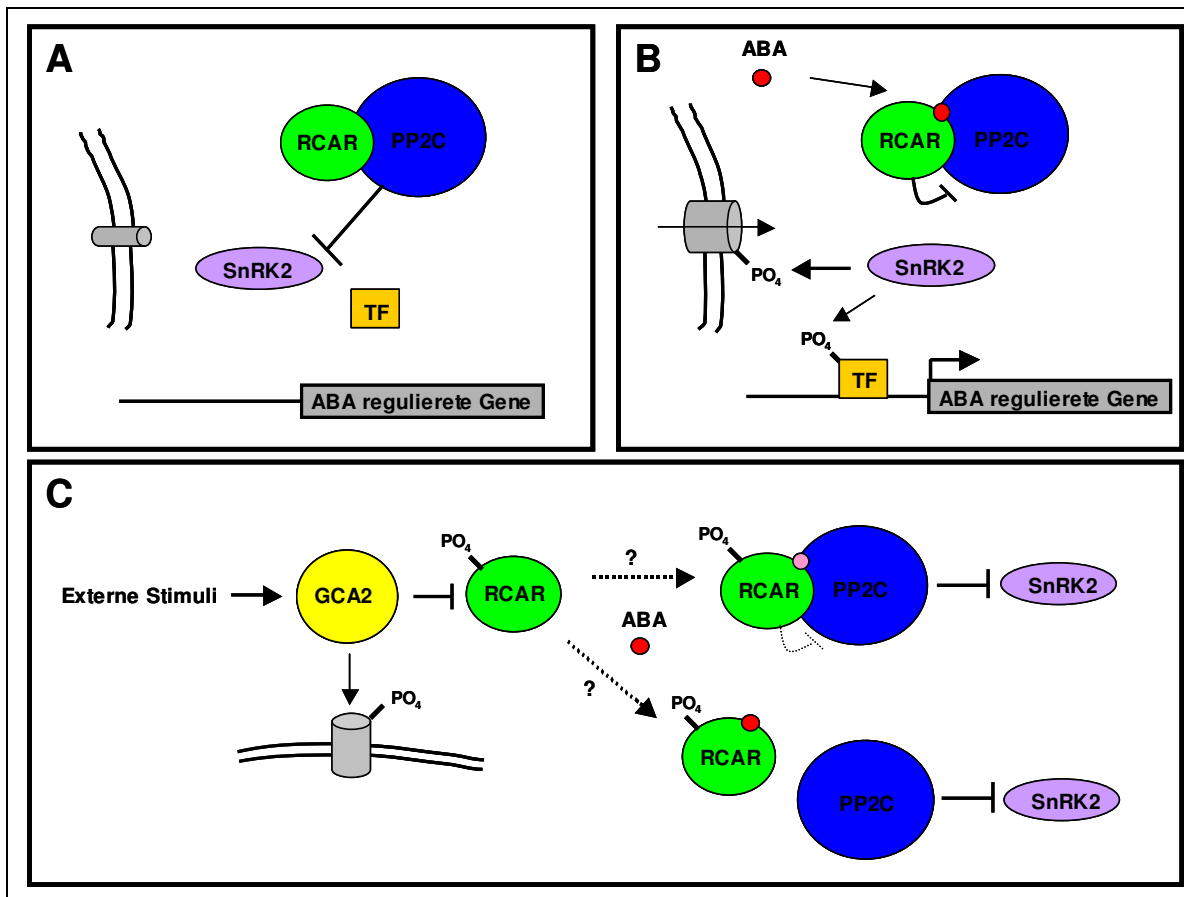


Abb.4-2 Modell für den Mechanismus von GCA2 als Modulator der RCAR Funktion

Modell zur Funktion des ABA-Rezeptors RCAR und einer möglichen regulatorischen Funktion von GCA2. A: Situation ohne ABA, die PP2Cs sind aktiv und verhindern nachgeschaltete Effekte. B: Ist ABA vorhanden, bindet dieses den RCAR-PP2C Komplex, die Phosphatasen werden inaktiviert. C: GCA2 wird durch externe Stimuli aktiviert und blockiert den ABA-Rezeptor. Genaue Beschreibung im Text.

GCA2 stellt einen potentiellen Integrator externer Stimuli (wie CO₂) dar, der durch die enge Verknüpfung mit dem ABA-Rezeptor direkt die ABA-Sensitivität moduliert und so optimale Voraussetzungen für eine spezifische Adaptation der Pflanze an verschiedene Umweltbedingungen schafft. In Abb.4-2 ist die mögliche Wirkweise des ABA-Rezeptors RCAR und ein denkbare Einfluss von GCA2 auf dessen Aktivität graphisch dargestellt. Ist kein (oder nur wenig) ABA in der Zelle vorhanden, sind die Proteinphosphatasen 2C, wie ABI1 und ABI2, weitgehend aktiv und blockieren die Aktivität von nachgeschalteten SnRK2 Kinasen. Dadurch können diese ihren regulatorischen Einfluss weder auf etwaige Ionenkanäle noch ABA-abhängige Transkriptionsfaktoren ausüben: Die Signaltransduktionskaskade ist nicht aktiviert (Abb.4-2A). Wird in der Zelle ABA gebildet, bindet dies an einen Komplex aus RCAR und PP2C. Ob dieser Komplex bereits ohne ABA ausgebildet werden kann (diese Arbeit), oder ABA notwendig ist für die Komplexbildung (Park *et al.* 2009), ist nicht abschließend geklärt und könnte für verschiedene RCAR-PP2C Komplexe durchaus unterschiedlich sein. Durch die Bindung von ABA werden die PP2Cs inaktiviert, was zu einer Aktivierung der SnRK2 Kinasen

führt. Diese können nachgeschaltet ihrerseits sowohl bereits vorhandene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, die dann die Transkription von ABA-regulierten Genen fördern, als auch direkt andere Zielproteine (Ionenkanäle) regulieren (Abb.4-2B). In diesem Modell würde GCA2 als zusätzlicher Faktor externe Stimuli in diese Regulationskaskade integrieren. Zum einen könnte GCA2 direkt die Regulation von Ionenkanälen steuern. Zusätzlich könnte GCA2 durch die Phosphorylierung des ABA-Rezeptors die ABA-Sensitivität in der Zelle verändern (Abb.4-2C). Zwei verschiedene Szenarien wären hier denkbar: Die Affinität des RCAR-PP2C-Komplexes für ABA könnte durch die Phosphorylierung des RCAR Proteins beeinflusst werden. Der Rezeptor würde entweder gar nicht mehr in der Lage sein ABA zu binden, oder zumindest erst bei deutlich höheren ABA-Konzentrationen. Die PP2Cs blieben trotz Anwesenheit des Phytohormons aktiv. Alternativ könnte die Phosphorylierung eine Interaktion zwischen Bindeprotein und Phosphatase verhindern. Auch in diesem Fall wäre trotz ABA, die Signaltransduktion beeinträchtigt.

Verschiedene RCAR-PP2C Komplexe können als ABA-Rezeptoren wirken. Durch gezielte Modifizierung einzelner Komplexe wäre es möglich, spezifisch die ABA-Sensitivität zu verändern und so ein verändertes *fine-tuning* in der Stress-Antwort zu erreichen. Die spezifische Funktion von RCAR1 kann durch Phosphorylierung beeinträchtigt werden. GCA2 als Calcium-abhängige Kinase interagiert mit dem ABA-Rezeptor. Eine direkte Phosphorylierung des Rezeptors durch GCA2 wurde zwar noch nicht gezeigt, doch die beschriebenen Daten lassen eine Regulation des Rezeptors durch GCA2 vermuten.

4.2 Externe Signale und Calcium-Oszillationen

Applikation von ABA führt zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration. Diese spiegelt sich in einem, je nach Stimulus, spezifischen Calcium-Oszillations-Muster wieder (McAinsh *et al.* 1995; Evans *et al.* 2001). Die Beeinträchtigung im Stomataschluß in der *gca2-1* Mutante ist durch eine erhöhte Frequenz der Calcium-Oszillationen bedingt (Allen *et al.* 2001). Diese schnellen Calcium-Oszillation verhindern ein Schließen der Spaltöffnungen. Durch die Calcium-Oszillationen werden die decodierenden Enzyme aktiviert, wobei durch die Oszillation die Aktivierung effizienter und gezielter als durch ein kontinuierliches Calcium-Signal erfolgt (Salazar *et al.* 2008). Den ersten charakterisierten Decoder von Calcium-Oszillationen stellt die Calmodulin-abhängige Kinase CamKII in Tieren dar (De Koninck und Schulman 1998). Für dieses Enzym konnte gezeigt werden, dass die durch eine Autophosphorylierung initiierte enzymatische Aktivität direkt von der Frequenz der Calcium-Oszillationen abhängig ist. Durch verschiedenen Calcium-Affinitäten unterschiedlicher Enzyme können distinkte Frequenzen und Amplituden der Oszillationen optimal in die jeweiligen zellulären Antworten umgesetzt werden (Salazar *et al.* 2008). So wird zum Beispiel die spezifische Expression von drei verschiedenen Transkriptionsfaktoren in T-Lymphozyten direkt durch verschiedene Oszillations-Frequenzen aktiviert (Dolmetsch *et al.* 1998).

Wie entstehen Calcium-Oszillationen ?

Es gibt eine Vielzahl an mathematischen Modellen unterschiedlicher Komplexität die die Entstehung von Calcium-Oszillationen erklären (Meyer und Stryer 1988; Goldbeter *et al.* 1990; Somogyi und Stucki 1991; De Young und Keizer 1992; Dupont und Goldbeter 1993; Borghans *et al.* 1997). Die meisten Modelle beziehen sich dabei auf physiologische Begebenheiten in tierischen Zellen. In diesem System ist mehr über die beteiligten Komponenten bekannt und es ist eine Voraussetzung für die Modellierung die physiologischen Parameter mit den Modellen in Einklang zu bringen und die Modelle anhand dieser Parameter zu testen. Deshalb wird im Folgenden die Entstehung von Calcium-Oszillationen anhand eines tierischen Modells erklärt (siehe Abb.4-3). Die gleichen grundlegenden Mechanismen sind auch in pflanzlichen Zellen gegeben (Nagata *et al.* 2004).

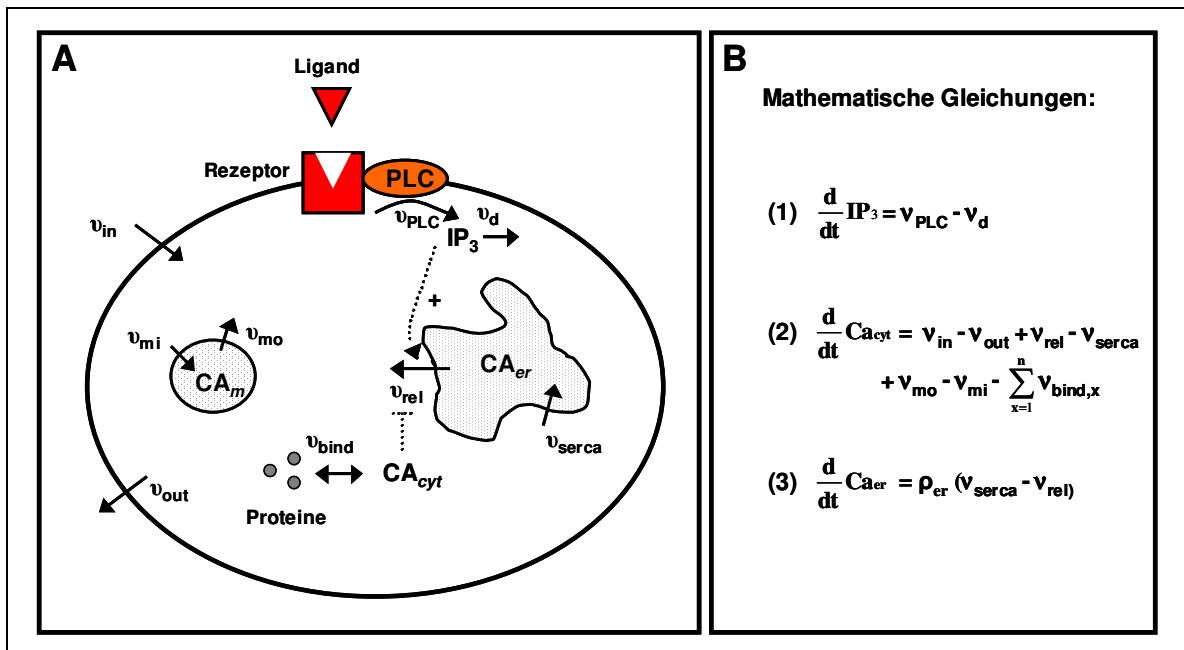


Abb.4-3 Mathematisches Modell zur Entstehung von Calcium-Oszillationen

A: Schematische Darstellung einer tierischen Zelle mit einigen für die Entstehung der Calcium-Oszillationen wichtiger Faktoren: v beschreibt dabei die Umsatzrate für die einzelnen Prozesse. Ca_{cyt} beschreibt die cytosolische Calcium-Konzentration und Ca_{er} , bzw. Ca_m die Konzentration im ER und den Mitochondrien. Genaue Erklärung siehe Text. Abbildung verändert nach (Schuster *et al.* 2002). B: Einige für das Verständnis wichtige mathematische Gleichungen, wobei d/dt die Veränderung der Konzentration nach der Zeit beschreibt und ρ_{er} das Volumenverhältnis des ERs zum Cytoplasma anzeigt.

In tierischen Zellen ist das endoplasmatischen Reticulum (ER) der Hauptspeicherort des zellulären Calciums: Die lokale Calcium-Konzentration ist teilweise bis zu 1000fach höher als im Cytoplasma. Dieser Konzentrationsgradient wird durch die Calcium-ATPase SERCA aufrechterhalten. Viele zelluläre Reize führen Rezeptor-vermittelt zu einer Freisetzung des Calciums ins Cytoplasma (Barritt 1999). Dies führt im tierischen Modell zu einer Bildung von Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP_3) durch die Phospholipase C (PLC) (Berridge 1987). Die Veränderung der IP_3 -Konzentration über die Zeit ist gleich der Geschwindigkeit der Synthese durch die PLC (v_{PLC}) minus der Abbaurate des *second messengers* (v_d) (Gleichung (1) in Abb.4-3B). IP_3 aktiviert ein als IP_3 -Rezeptor bezeichneten Calciumkanal im ER, der daraufhin Calcium freisetzt (v_{rel}). Die Veränderung der cytosolischen Calcium-Konzentration über die Zeit entspricht der Summe aller ins Cytosol gerichteten Calcium-Ströme minus den auswärtsgerichteten Strömen und der Bindung von Calcium an verschiedene Proteine (Gleichung (2) in Abb.4-3B). Die zeitliche Ableitung der Calcium-Konzentration im ER setzt sich aus dem relativen Volumen des ERs (ρ_{er}) multipliziert mit dem Produkt der jeweiligen Calcium-Ströme aus dem ER (v_{rel}) und ins ER (v_{serca}) zusammen (Gleichung (3) in Abb.4-3B). Eine gängige Methode für mathematische Modelle ist die Vereinfachung, weswegen für die Entstehung der Calcium-

Oszillationen ein Minimal-Modell aus den oben beschriebenen Komponenten angewandt wird (Hetherington *et al.* 2006).

Nach Aktivierung des IP₃-Rezeptors wird Calcium aus dem ER freigesetzt, die cytosolische Calcium-Konzentration erhöht sich, während die Calcium-Konzentration im ER geringer wird. Die Rate der Calcium-Freisetzung (v_{rel}) ist direkt abhängig von den Calciumkonzentrationen in den beiden Kompartimenten, da diese von einem Calcium-Gradienten getrieben wird. Zusätzlich wird der IP₃-Rezeptor noch durch verschiedene Faktoren reguliert. Der funktionale Rezeptor besteht aus vier identischen Untereinheiten (Bezprozvanny und Ehrlich 1995). Jede Untereinheit besitzt zumindest eine IP₃- und eine Calcium-Bindestelle. Es wird angenommen, dass es dabei sowohl aktivierende als auch inhibierende Calcium-Bindungsstellen am IP₃-Rezeptor gibt (De Young und Keizer 1992; Bezprozvanny und Ehrlich 1994; Oancea und Meyer 1996). Die einfachste Erklärung zur Entstehung von Oszillationen wäre eine schnelle Bindung von Calcium an die aktivierende Bindestelle und eine vergleichsweise langsame Bindung an die inhibierende Bindungsstelle (Tang *et al.* 1996). Aber auch ein Stufenmodell wäre denkbar: Zuerst muss IP₃ an den Rezeptor binden, erst danach bindet Calcium an die aktivierende Calcium-Bindungsstelle und nach dieser Bindung kann das Calcium-Ion dann die inhibierende Calcium-Bindestelle besetzen (Tang *et al.* 1996). Zusätzlich kann die Aktivität des IP₃-Rezeptors noch durch Phosphorylierung durch Proteinkinase A, Proteinkinase C und CamKII reguliert werden (Bezprozvanny und Ehrlich 1995; LeBeau *et al.* 1999). Das System erreicht einen Punkt, an dem die Aktivität der Calcium-Pumpe SERCA größer ist, als die Calcium-Freisetzung über den IP₃-Rezeptor ($v_{serca} > v_{rel}$). Durch den Nettofluss des Calciums aus dem Cytoplasma wird der Calcium-Gradient wieder groß genug, dass die Inhibition des IP₃-Rezeptors aufgehoben wird und erneut die Calcium-Freisetzung überwiegt.

Dieses Modell stellt ein sehr einfaches Modell für die Erzeugung von Calcium-Oszillationen dar, da nur die Freisetzung aus dem ER in ihm berücksichtigt ist und andere zelluläre Calciumvorräte, wie zum Beispiel in den Mitochondrien (siehe Abb.4-3A) nicht berücksichtigt werden. Weitere Faktoren wie das durch Kaliumkanäle kontrollierte Membranpotenzial spielen ebenfalls eine Rolle bei der Manifestierung der Oszillationen (Fioretti *et al.* 2005).

Durch Integration dieser Faktoren in das Modell, ist es möglich, dass sich eine Zelle in einem Gleichgewichtszustand befindet, in dem bereits kleine Änderungen der Calcium-Konzentration Oszillationen hervorrufen oder beenden können (Sneyd *et al.* 2004).

Für die Calcium-Oszillationen in Pflanzen lassen sich ähnliche Prozesse postulieren, mit dem Unterschied, dass in Pflanzen die Vakuole den Hauptspeicherort von Calcium

darstellt (Schumaker und Sze 1986). Die vakuoläre Calcium-Konzentration ist unter Ruhebedingungen ebenfalls um einen Faktor 1000 höher als die cytoplasmatische Calcium-Konzentration. IP_3 ist auch in Pflanzen ein wichtiger *second messenger* der sowohl Calcium-Oszillation hervorruft, als auch zum Stomataschluss führt (Staxen *et al.* 1999). Neben IP_3 führt in Pflanzen auch cADPR (*cyclic ADP-ribose*) zu einer Calcium-Freisetzung aus der Vakuole (Allen *et al.* 1995). Die Natur der durch IP_3 / cADPR regulierten Ionenkanäle im Tonoplast ist jedoch noch eine offene Frage (Pottosin und Schonknecht 2007).

GCA2 modelliert die Calcium-Oszillationen

Wie im oberen Abschnitt bereits diskutiert, stellen Calcium-Oszillationen im tierischen System ein gut analysiertes System dar. Auch in Pflanzen kommt ihnen eine entscheidende Rolle zu (McAinsh *et al.* 1996; McAinsh und Pittman 2009), obwohl die regulatorischen Mechanismen der Oszillationen weit weniger verstanden sind. Die *gca2-1* Mutante zeigt eine Veränderung im Muster der Calcium-Oszillationen (Pei *et al.* 2000; Allen *et al.* 2001) und stellt so eines der wenigen Systeme zur Analyse pflanzlicher Calcium-Oszillationen dar.

Die Calcium-abhängige Aktivierung von CPKs geht mit einer Autophosphorylierung dieser einher (Chehab *et al.* 2004; Hegeman *et al.* 2006), die dann zu einer Phosphorylierung von nachgeschalteten Zielproteinen führt. Nach einem hypothetischen Modell würde ein phosphorylierungsabhängiger Effekt durch eine ‚Alles oder Nichts‘-Reaktion erst dann ausgelöst werden, wenn eine bestimmte Menge an Zielprotein phosphoryliert ist (Harper und Harmon 2005). Dieses Zielprotein kann sowohl ein Substrat der Kinase als auch die Kinase selbst (Autophosphorylierung) sein. In der *gca2-1* Mutante ist die Konzentration des Calcium-decodierenden Proteins CPK23 erhöht, durch die Calcium-Oszillationen werden pro Zeiteinheit mehr Kinasen aktiviert, folglich wird der *threshold* für die Aktivierung der Zielproteine schneller erreicht. Falls durch GCA2 ins Cytosol gerichtete Calcium-Kanäle aktiviert werden, hätte dies eine Erhöhung von v_{rel} zur Folge: Die Frequenz der Oszillation wäre im Vergleich zum WT erhöht.

Durch die Überexpression eines Calcium-freisetzenden Kanals würde ein ähnlicher Effekt erreicht werden: Auch hier wäre v_{rel} erhöht. In *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des IP_3 -Rezeptors zu einer Erhöhung der Frequenz der Calcium-Oszillationen führt (Dal Santo *et al.* 1999). Dieser experimentelle Befund steht also mit dem aufgestellten Modell in Einklang.

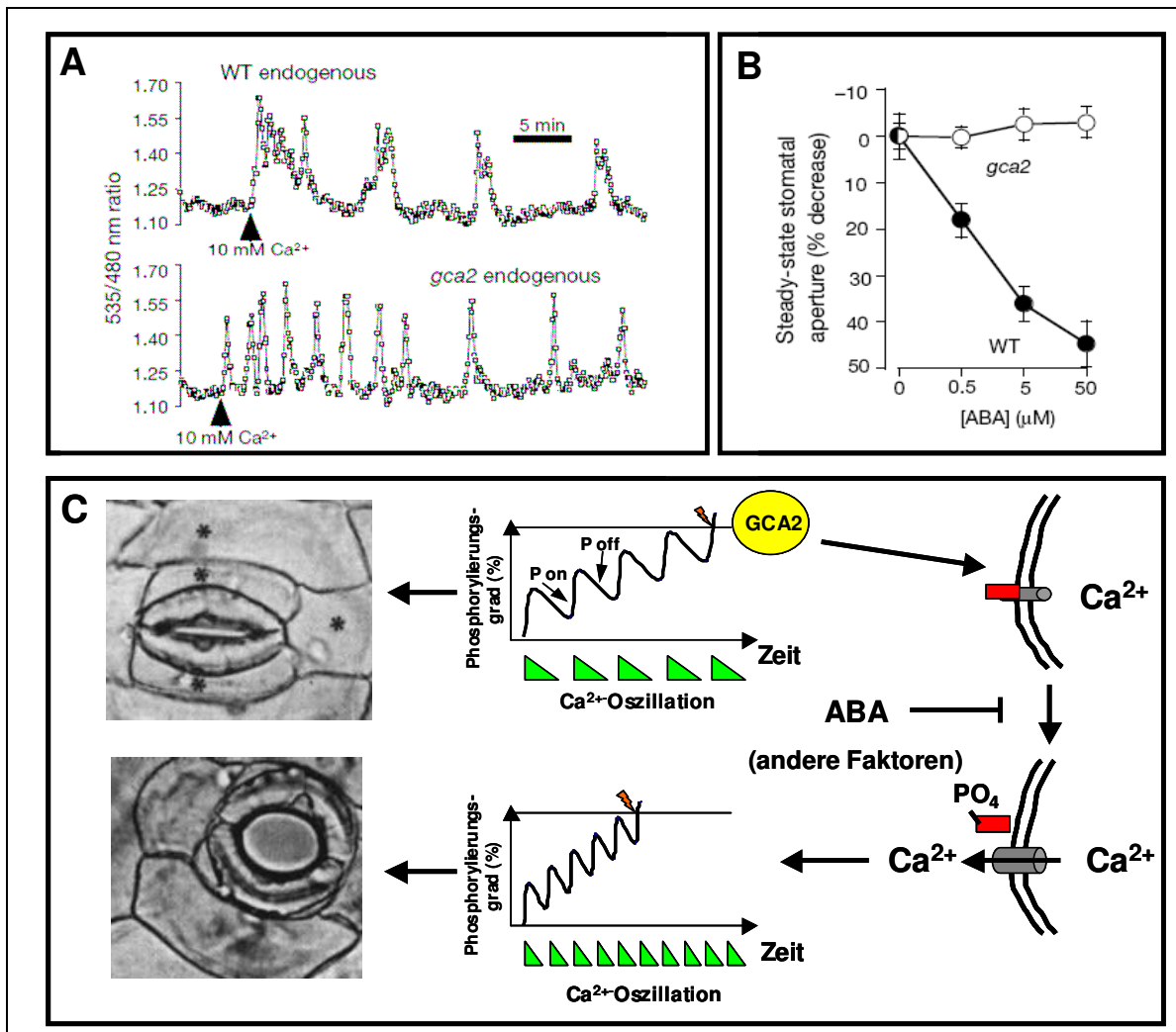


Abb.4-4 Modell zur Regulation der Calcium-Oszillationen durch GCA2

A: Calcium-induzierte Calcium-Oszillation in Schließzellen des WT und der *gca2* Mutante. B: ABA-Insensitivität der Schließzellen in der *gca2* Mutante. C: Modell zur Regulation der Calcium-Oszillationen. Durch cytosolische Calcium-Oszillationen (grüne Dreiecke) werden decodierende Enzyme (in diesem Fall GCA2) aktiviert und phosphorylieren ihre Zielproteine. Der prozentuale Anteil an aktivierter CPK, sowie phosphoryliertem Zielprotein ist direkt abhängig von den Calcium-Oszillationen (Kurve im Diagramm). Ist eine kritische Menge des Proteins phosphoryliert, wird eine nachgeschaltete Reaktion (in diesem Fall Öffnung eines Calcium-Kanals) ausgelöst. Durch den Anstieg der Calcium-Konzentration erhöht sich die Frequenz der Oszillationen. Dabei wird angenommen, dass schnelle Oszillationen den Stomataschluß verhindern, während langsame Oszillationen ihn fördern. Eine erhöhte Menge an GCA2 beschleunigt die Oszillationen, während andere Faktoren, wie z.B. ABA sie dämpfen. Die Abbildungen 4-4A und 4-4B sind der Veröffentlichung von (Allen *et al.* 2001) entnommen. Die Bilder der Spaltöffnungen stammen aus dem Strasburger (Sitte *et al.* 1998).

Es ist bekannt, dass zwischen Calcium-decodierenden Enzymen und der Frequenz der Calcium-Oszillationen *feedback*-Regulationen stattfinden. Diese Rückkopplung kann sowohl negativ wie auch positiv die Oszillationen beeinflussen (Politi *et al.* 2006). Für GCA2 wäre ein positiver Rückkopplungsmechanismus zu postulieren, da die Überexpression die Oszillationen beschleunigt. Die *feedback*-Regulation kann dabei sowohl direkt, über Aktivierung von ins Cytosol gerichteten Calcium-Kanälen oder indirekt erfolgen (vgl. Abb.4-4).

Ein Beispiel einer indirekten Regulation aus dem tierischen System ist der Einfluss der CaMKII, die ein wichtiges Calcium-decodierendes Enzym im tierischen System darstellt. Dieses Enzym phosphoryliert nach seiner Calcium/CaM-abhängigen Aktivierung das Protein Phospholamban welches im dephosphorylierten Zustand den sarkoplasmatischen Calcium-Kanal SERCA blockiert. Durch die Phosphorylierung wird das Phospholamban inaktiviert und SERCA aktiviert: Die cytosolische Calcium-Konzentration erhöht sich und schnellere Calcium-Oszillationen sind die Folge (Kim *et al.* 2008a).

In Abb.4-4C ist dieses Modell schematisch für GCA2 dargestellt und verdeutlicht, wie eine erhöhte Menge an GCA2 Protein zu einer schnelleren Frequenz der Calcium-Oszillationen führen könnte. Ob tatsächlich Calcium-freisetzende Kanäle durch GCA2 reguliert werden, muss jedoch noch experimentell analysiert werden. Ein interessanter Kandidat wäre der vakuoläre, Calcium-freisetzende TPC1-Kanal, der ebenfalls wichtige Bedeutung bei Stomataregulation und Samenkeimung hat (Peiter *et al.* 2005).

Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass GCA2, wenngleich es eine zentrale Komponente darstellt, nur einer von mehreren Modulatoren der Calcium-Oszillationen ist. Zusätzliche Faktoren können ebenfalls die Oszillationen beeinflussen. So konnte zum Beispiel in Schließzellen gezeigt werden, dass ABA spontane Calcium-Oszillationen unterdrückt und zu einer Dämpfung dieser führt, was ein Schließen der Spaltöffnungen nach sich zieht (Klusener *et al.* 2002).

Bei diesem Mechanismus der redundanten Regulation der Calcium-Oszillationen wäre es möglich, dass erst das Erreichen einer kritischen GCA2 Proteinkonzentration (*threshold*) einen Einfluss auf die Ausprägungen der Calcium-Oszillationen zeigt, da die Funktion andere regulatorische Komponenten kompensiert werden muss. Dies würde eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang der CPK Überexpression mit dem rezessiven Phänotyp der *gca2-1* Mutante darstellen.

Calcium-Oszillationen und die Regulation der Schließzellen

Die veränderte Stomataregulation in *gca2* hängt ursächlich mit den veränderten Calcium-Oszillationen zusammen. Die Aktivität von GCA2 verhindert einen Stomataschluß auch in Anwesenheit von ABA. Eine Vermutung wäre, dass durch die erhöhte Proteinkonzentration das ABA-Signal nicht ausreicht, um die Calcium-Oszillationen so weit zu dämpfen, dass es zu einem Schließen der Poren kommt.

Interessant ist weiterhin die Insensitivität der Spaltöffnungen in der *gca2-1* Mutante bei einer Erhöhung der CO₂-Konzentration und bei Dunkelheit.

Die Erhöhung der CO₂-Konzentration von niedrigen Werten (115 ppm) auf 800 ppm geht im WT ebenfalls mit einer Dämpfung der Calcium-Oszillation, also einer geringeren

Anzahl an Schwingungsspitzen (*transients*) einher (Young *et al.* 2006). In der *gca2-1* Mutante hat die Erhöhung der CO₂-Konzentration hingegen keinen Einfluss auf die Calcium-Oszillationen: Sie bleiben unverändert und eine Insensitivität beim Stomataschluß gegenüber CO₂ ist die Folge. Dieser Befund lässt sich mit dem oben aufgestellten Modell, dass GCA2 die Calcium-Oszillationen modifiziert, ebenfalls in Einklang bringen: Auch hier reicht durch die erhöhte GCA2-Konzentration das Signal nicht aus, die Calcium-Oszillationen nachhaltig zu modifizieren.

Die ABA-insensitiven Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* sind hingegen beide in der Lage auf veränderte CO₂-Konzentrationen zu reagieren (Young *et al.* 2006). Damit muss die CO₂-Insensitivität in *gca2-1* nicht mit einer grundsätzlichen ABA-Insensitivität verknüpft werden. Die Menge an GCA2 Protein könnte determinieren, wie empfindlich die Pflanze auf exogene Reize (veränderte CO₂-Konzentration) reagiert.

Eine weitere wichtige Komponente bei der Regulation der Schließzellen ist das mit den S-Typ Anionenkanälen verknüpfte Protein SLAC1. Mutanten in diesem Protein zeigen ebenfalls eine Insensitivität der Schließzellen gegenüber CO₂ und schließen auch in Dunkelheit ihre Spaltöffnungen nicht komplett (Negi *et al.* 2008; Vahisalu *et al.* 2008). Im Labor von J. Schröder konnte gezeigt werden, dass GCA2 und SLAC1 im *Yeast-Two-Hybrid-Screen* interagieren (J.Schröder, unveröffentlichte Daten). Auch die Regulation von SLAC1 könnte also durch GCA2 vermittelt werden.

In einem jüngst vorgestellten Modell der Schließzellregulation wird angenommen, dass physiologische Stimuli wie ABA, CO₂ und Licht die adäquaten Calcium-Sensoren aktivieren (*primen*) und so die spezifischen zellulären Antworten einleiten (Siegel *et al.* 2009). Die erhöhte Konzentration an GCA2 Protein wie in der *gca2-1* Mutante könnte diesen Prozess beeinträchtigen.

Calcium-Oszillationen und die Interaktion mit Mikroorganismen

Auch für die Interaktion mit Mikroorganismen spielen Calcium-Oszillationen eine entscheidende Rolle. Eines der wichtigsten Beispiele stellt die Interaktion von Leguminosen mit Rhizobien dar. Diese Symbiose ermöglicht den Leguminosen die Fixierung von Stickstoff. Diese Interaktion wird hauptsächlich über bakterielle Nodulations-Signale (den sogenannten Nod-Faktor) vermittelt (Fisher und Long 1992). Dabei haben Calcium-Oszillationen auch für die durch den Nod-Faktor aktivierten Prozesse in der Pflanze eine zentrale Rolle (Ehrhardt *et al.* 1996). Eine der wichtigsten Modellpflanzen um diese Pflanzen-Mikroben Interaktion zu untersuchen ist *Medicago truncatula*. Dort konnten mehrere an der Nod-Signaltransduktion beteiligte Komponenten charakterisiert werden. Unter diesen sind die Proteine die an der Entstehung von Calcium-Oszillationen beteiligt

sind (*Mt* DMI1 und *Mt* DMI2), sowie das Protein *Mt* DMI3, bei dem es sich um eine CCaMK (*Calcium/Calmodulin-dependent kinase*) handelt und dessen Wirkung unterhalb der Calcium-Oszillationen vermutet wird (Mitra *et al.* 2004). In der *Mt dmi3* Mutante zeigte sich nach Kontakt der Wurzeln mit Agrobakterien keine Krümmung der Wurzelhaare und keine Infektion, sondern nur ein Schwellen der Wurzelhaarspitze (Wais *et al.* 2000). CCaMKs sind chimäre Proteine, die hohe Homologien zu tierischen CaMKII aufweisen, und bei denen die Aktivierung der Kinase im Gegensatz zu CPKs nicht direkt über Calcium, sondern indirekt über die Bindung von Calmodulin abläuft (Oldroyd und Downie 2004). Wird die Kinase durch Calcium/Calmodulin aktiviert, verändert sich die Struktur der CCaMK, und analog dem für CPKs vorgestellten Modell (siehe 1.2.1) ändert sich die Konformation des Enzyms und die Autoinhibierung wird aufgelöst. Diese Aktivierung ist ausreichend für die Nodulation: Wird die Autoinhibierung der Kinase spezifisch entfernt, aktiviert diese auch ohne Nod-Faktor spezifisch die Nodulations-Signaltransduktion (Gleason *et al.* 2006; Tirichine *et al.* 2006).

Aber auch für eine CPK konnte eine Beteiligung an der Nod-Signaltransduktion in *Medicago* nachgewiesen werden (Gargantini *et al.* 2006).

Somit zeigt sich, dass die Decodierung von Calcium-Oszillationen auch bei der Interaktion zwischen Mikroorganismen und Pflanze eine entscheidende Rolle für die Steuerung der pflanzlichen Prozesse spielt. Mutanten mit einem veränderten Oszillationsmuster zeigen Störungen in dieser Interaktion (Oldroyd und Downie 2004).

Es ist bekannt, dass ein *crossstalk* verschiedener Signalwege auch die Nod-Signaltransduktion modulieren kann. So wurden Effekte von Jasmonsäure und Ethylen (Sun *et al.* 2006), Gibberellin (Maekawa *et al.* 2009), aber auch ABA (Ding *et al.* 2008) als Regulatoren des Nod-Signalwegs in *Medicago truncatula* charakterisiert. Durch diese verschiedenen Modulationen ist eine gezielte Koordination der Interaktion von Pflanzen und Mikroorganismen möglich.

Die *gca2-1* Mutante weist eine Resistenz bei der Transformation mit *A. tumefaciens* auf. Hat das veränderte Calcium-Oszillationsmuster in *gca2-1* einen direkten Zusammenhang mit diesem Phänotyp ?

In *Arabidopsis* gibt eine Vielzahl an charakterisierten *rat* (*resistant to A. tumefaciens*) Mutanten, die mehr oder minder gravierende Defekte bei der Transformation aufweisen (Zhu *et al.* 2003). Die Transformation von *Arabidopsis* mit Agrobakterien, ist gleichfalls eine Interaktion der Pflanze mit einem Mikroorganismus. Auch bei dem durch bakterielle Vir-Proteine vermittelten Transfer des T-DNA-Protein-Komplexes in den Zellkern und der Integration der T-DNA ins Pflanzengenom, existieren Einflussmöglichkeiten der Pflanze (Veena *et al.* 2003).

Die Defekte in den beschriebenen *rat*-Mutanten können unterschiedliche Gene in der Pflanze betreffen und an verschiedenen Stellen mit dem Transformationsprozess intervenieren. Zu dieser Gruppe von Mutanten gehören Pflanzen mit Mutationen in Proteinen des Cytoskeletts, des Kernimports, von Zellwandkomponenten oder auch eine Vielzahl an Histon-modifizierenden Proteinen. Mutanten in Komponenten der Hormon-Signaltransduktion, wie zum Beispiel die Mutante *rcn1*, sind ebenfalls in dieser Ansammlung vertreten. In dieser Mutante zeigt sich eine Reduktion der Transformationseffizienz auf 25 % im Vergleich zum WT (Zhu *et al.* 2003). RCN1 codiert für eine Untereinheit einer Protein Phosphatase 2A (Deruere *et al.* 1999) und ist ein positiver Regulator der ABA-Signaltransduktion. In der Mutante ist sowohl der ABA-induzierte Stomataschluss, als auch die Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle gestört (Kwak *et al.* 2002). Ob in dieser Mutante, deren Phänotyp einige Parallelen zu *gca2-1* aufweist, auch die Calcium-Oszillationen verändert sind, oder andere / zusätzliche Mechanismen für eine Beeinträchtigung bei der Interaktion mit *A. tumefaciens* sorgen ist bis dato nicht genauer analysiert worden.

Zusammenfassend gibt es vielfältige Möglichkeiten die Interaktion zwischen Pflanze und Mikroorganismen zu beeinflussen, die Modifizierung der Calcium-Oszillation durch GCA2 scheint hierbei ein plausibles Szenario zu sein, die schlechte Transformationseffizienz der *gca2-1* Mutante zu erklären. GCA2 zeigt sich also nicht nur als Integrator abiotischer Stimuli wie CO₂ oder Licht, sondern auch als wichtige Komponente für die Mediation von biotischen Interaktionen der Pflanze.

4.3 Natürliche Variation im *GCA2* Gen

Die Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen bringt evolutionäre Unterschiede und die Entwicklung verschiedener Ökotypen innerhalb einer Art mit sich. Dabei zeigt sich die genetische Diversität am deutlichsten in Genen, die für die Wechselbeziehung der Pflanzen mit ihrer Umwelt wichtig sind (Clark *et al.* 2007). ABA ist entscheidend an der Anpassung an externe Stimuli beteiligt ist, deshalb zeigt sich in verschiedenen Ökotypen auch eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Phytohormon. So reagieren *Arabidopsis* Pflanzen des Ökotyps *Landsberg erecta* deutlich sensitiver auf exogene ABA-Applikation als *Columbia* Pflanzen. Die Vermutung liegt nahe, dass die ABA-Sensitivität der unterschiedlichen Ökotypen moduliert wird, um eine differenzierte Anpassung an verschiedene Lebensbedingungen zu ermöglichen. Gene, die für diese unterschiedliche Sensitivität in natürlichen Populationen verantwortlich sind, wurden allerdings noch nicht identifiziert.

Diese Gene müssten zwei verschiedene Bedingungen erfüllen: Erstens sollten die Gene regulatorischen Einfluss auf den ABA-Signalweg nehmen und zweitens wäre zu postulieren, dass es Polymorphismen im Strukturgen und oder seinen Regulatorsequenzen gibt, die eine abweichende Expression bzw. Regulation des Proteins in den jeweiligen Ökotypen ermöglicht.

Calcium-regulierte Kinasen spielen eine zentrale Rolle in der Anpassung an äußere Reize (Harper *et al.* 2004). Die Mitglieder dieser Protein-Superfamilie sind dabei geeignete Kandidaten eine ökotypische Differenzierung auszulösen. So wurde zum Beispiel in der Sonnenblume (*Helianthus spec.*) eine CPK mit einem QTL (*quantitative trait locus*) für Salztoleranz in Verbindung gebracht (Lexer *et al.* 2004).

Eine erhöhte Expression des *GCA2* Proteins in der *gca2-1* Mutante geht mit einer veränderten ABA-Sensitivität in den Mutanten einher. Zusätzlich führt das Ausschalten des *GCA2* Gens in *Landsberg erecta* (*gca2-2*) (zumindest unter bestimmten Bedingungen) zu einer ABA-Hypersensitivität der Pflanzen, während in *Columbia* (*gca2-3*) die ABA-Sensitivität nicht durch das Ausschalten des orthologen Gens beeinflusst wird.

Für das *Columbia*-Allel wurde weiterhin gezeigt, dass die *knock-out* Mutante insensitiv auf Salzstress reagiert und die Spaltöffnungen unter normalen Lichtbedingungen weniger geöffnet sind als im WT (Ma und Wu 2007). Dies steht im Widerspruch zu unveröffentlichten Daten von Prof. Romeis (FU Berlin), die keinen Zusammenhang zwischen der Stomataregulation und dem *CPK23* Gen in *Columbia* erkennen konnten (persönliche Mitteilung).

Diese Daten implizieren, dass das *CPK23* Gen eine unterschiedliche Rolle bei der Stressadaptation in den beiden Ökotypen spielt und somit geeignet erscheint als Auslöser der unterschiedlichen ABA-Sensitivität zu fungieren.

In einer heterogenen F_2 -Population einer *Landsberg erecta* x *Columbia* Kreuzung korreliert die ABA-Sensitivität der Pflanzen in gewissem Maße mit dem *GCA2*-Allel. Statistische Test zeigen hier eine klare Abweichung der Allel-Verteilung von einer Normalverteilung an, während das *ERECTA*-Allel (welches auf Chromosom 2 liegt, im Gegensatz zu *GCA2*, welches auf Chromosom 4 liegt) nur eine geringfügige, nicht-signifikante, Abweichung aufweist. Für das *ERECTA*-Gen wurde zwar ein Einfluss auf die Transpirations-Effizienz der Pflanzen beschrieben (Masle *et al.* 2005), einen direkten Einfluss auf die ABA-Sensitivität, zumindest was das Wurzelwachstum angeht, scheint dieses Gen jedoch nicht zu besitzen.

Im *Arabidopsis*-Genom gibt es eine Reihe polymorpher Regionen, von denen vermutet wird, dass sie durch Selektion als so genannte *balanced polymorphisms* erhalten werden und für ökotypische Unterschiede verantwortlich sind. (Cork und Purugganan 2005). Das *GCA2* Gen weist zwischen den beiden Ökotypen *Columbia* und *Landsberg erecta* etliche SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) auf: So sind von den 1.563 Basen der CDS 97 Basen zwischen den beiden Ökotypen modifiziert. Aber auch in anderen *Arabidopsis* Ökotypen wie *Burren* (*Bur-0*) und *Tsu* (*Tsu-1*) zeigt das Gen etliche SNPs in der CDS und unterscheidet sich so deutlich von den benachbarten Genen *CPK21* und *CPK22*, bei denen die Rate an Polymorphismen deutlich geringer ist (Sequenzdaten der Ökotypen *Bur-0* und *Tsu-1* wurden dem 1001genomes-Projekt (www.1001genomes.org) entnommen, siehe Abb.4-5B). Mit fast einhundert Basenpaarveränderungen zwischen *Landsberg erecta* und *Columbia* im *CPK23* Gen liegt die Mutationsrate in diesem Gen deutlich über dem statistischen Unterschied von ca. 2 Basenpaaraustauschen zwischen den beiden Ökotypen in Calcium-bindenden Proteinen (Prof. Schmid, Universität Hohenheim, unveröffentlicht). Diese DNA-Polymorphismen führen zu einem Protein, bei dem von 521 Aminosäuren 54 verändert sind (Abb.4-5C). Das Verhältnis von nichtsynonymen (K_a) zu synonymen (K_s) Mutationen in der DNA zeigt, dass 54 von 97 Basenpaaraustauschen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins führen. Wenn das Verhältnis $K_a/K_s > 1$ ist, spricht dies für eine beschleunigte Anpassung des Proteins, also eine positive Selektion auf die Funktion des Proteins (Cork und Purugganan 2005; Kosakovsky Pond und Frost 2005). Die veränderte Aminosäuresequenz zeigt zudem eine Anhäufung von nicht konservierten Aminosäureaustauschen: Über 50 % der Substitutionen führen zu Aminosäuren mit deutlich veränderten biochemischen Eigenschaften. Diese Veränderungen beziehen sich hauptsächlich auf den bei CPKs variablen N-Terminus, dessen Funktion nicht komplett verstanden ist, der aber eine wichtige Funktion für die Lokalisation der Proteine über Myristoylierung und Palmytilierung hat (Martin und Busconi 2000). Das homologe *CPK21*

In der genomischen Region von *GCA2* auf Chromosom 4 liegen fünf *CPK* Gene als *cluster* vor. Diese Anordnung macht es leicht möglich, dass von ihnen ähnliche Funktionen übernommen werden können. Dabei stellen Genduplikationen eine ideale Möglichkeit für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen dar (Moore und Purugganan 2005). Das *CPK23* könnte durch Permutationen in *Landsberg erecta* (und anderen Ökotypen) auch eine *neomorphe* Funktion übernehmen, was bereits einen Funktionsgewinn in heterozygoten *Landberg erecta* x *Columbia* bedeuten könnte. Diese Pflanzen würden dann bereits eine (nur geringfügig) veränderte ABA-Sensitivität aufweisen, deren Ausprägung durch zusätzliche Faktoren moduliert wird. Durch das Gen-Cluster von fünf *CPK*-Genen auf 40 kb genomischer DNA in *Arabidopsis* (Abb.4-5A) ist es nicht möglich durch Kreuzungen Doppel- oder Mehrfach-Mutanten dieser CPKs herzustellen, so dass eine mögliche redundante Funktion der verschiedenen CPKs nur schwerlich experimentell überprüft werden kann.

Falls *GCA2* nicht direkt selbst die ABA-Sensitivität beeinflusst, so wäre aufgrund der Segregationsdaten (Abb.3-42) eine Kopplung, sprich physikalische Nähe, des *GCA2*-Locus zum ursächlichen Gen zu postulieren. Würde man, trotz der sehr geringen Anzahl an untersuchten Chromosomen, die molekulare Distanz eines vermeintlichen ABA-QTLs zu *GCA2* berechnen, würde diese Distanz in etwa 5 cM betragen (Bei einer Rekombinationsfrequenz von 5 % , $(D = 25 \ln (100 + 2*r/ 100 -2*r))$ (Kosambi 1944)). Dies entspricht bei ca. 185 Kilobasen pro Centimorgan (Schmidt *et al.* 1995b) ca. 900 Kilobasen. Für eine genaue Eingrenzung des Locus wäre eine deutlich größere Kartierungspopulation unerlässlich.

Durch die oben beschriebenen Eigenschaften des *GCA2* Gens scheint es wahrscheinlich, dass die unterschiedliche ABA-Sensitivität von verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen durch *GCA2* beeinflusst wird. Die Vermutung wäre allerdings, dass zusätzliche Faktoren, die Wirkung des Gens ermöglichen / verstärken und *GCA2* nicht allein für die unterschiedliche Anpassung verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant die RCAR Proteine in Hinblick auf ökotypische Polymorphismen zu prüfen.

Literaturverzeichnis

Abe, H., T. Urao, T. Ito, M. Seki, K. Shinozaki und K. Yamaguchi-Shinozaki (2003). "Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling." Plant Cell **15**(1): 63-78.

Abel, S. und A. Theologis (1998). "Transient gene expression in protoplasts of *Arabidopsis thaliana*." Methods Mol Biol **82**: 209-17.

Acharya, B. und S. Assmann (2009). "Hormone interactions in stomatal function." Plant Molecular Biology **69**(4): 451-462.

Addicott, F. T., J. L. Lyon, K. Ohkuma, W. E. Thiessen, H. R. Carns, O. E. Smith, J. W. Cornforth, B. V. Milborrow, G. Ryback und P. F. Wareing (1968). "Abscisic Acid: A New Name for Abscisin II (Dormin)10.1126/science.159.3822.1493." Science **159**(3822): 1493

Ahlfors, R., S. Lang, K. Overmyer, P. Jaspers, M. Brosche, A. Tauriainen, H. Kollist, H. Tuominen, E. Belles-Boix, M. Piippo, D. Inze, E. T. Palva und J. Kangasjarvi (2004). "Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses." Plant Cell **16**(7): 1925-37.

Ali, G. S., K. V. Prasad, I. Day und A. S. Reddy (2007). "Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an arabidopsis receptor-like kinase." Plant Cell Physiol **48**(11): 1601-11.

Allen, G. J., S. P. Chu, C. L. Harrington, K. Schumacher, T. Hoffmann, Y. Y. Tang, E. Grill und J. I. Schroeder (2001). "A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements." Nature **411**(6841): 1053-7.

Allen, G. J., S. P. Chu, K. Schumacher, C. T. Shimazaki, D. Vafeados, A. Kemper, S. D. Hawke, G. Tallman, R. Y. Tsien, J. F. Harper, J. Chory und J. I. Schroeder (2000). "Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant." Science **289**(5488): 2338-42.

Allen, G. J., K. Kuchitsu, S. P. Chu, Y. Murata und J. I. Schroeder (1999). "*Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* Phosphatase Mutations Reduce Abscisic Acid-Induced Cytoplasmic Calcium Rises in Guard Cells." Plant Cell **11**(9): 1785-1798.

Allen, G. J., S. R. Muir und D. Sanders (1995). "Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose." Science **268**(5211): 735-7.

Ames, J. B., R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer und M. Ikura (1997). "Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches." Nature **389**(6647): 198-202.

Anderson, B. E., J. M. Ward und J. I. Schroeder (1994). "Evidence for an Extracellular Reception Site for Abscisic Acid in *Commelina* Guard Cells 10.1104/pp.104.4.1177." Plant Physiol. **104**(4): 1177-1183.

Barbazuk, W. B., Y. Fu und K. M. McGinnis (2008). "Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: opportunities and challenges." Genome Res **18**(9): 1381-92.

- Barritt, G. J.** (1999). "Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements." Biochem J **337** (Pt 2): 153-69.
- Bartel, D. P.** (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-97.
- Batistic, O. und J. Kudla** (2004). "Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network." Planta **219**(6): 915-24.
- Batistic, O., N. Sorek, S. Schultke, S. Yalovsky und J. Kudla** (2008). "Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis." Plant Cell **20**(5): 1346-62.
- Benning, G.** (1999). Positionelle Klonierung des *GCA2*-Locus aus *Arabidopsis thaliana*. ETH. Zürich.
- Berkner, H., K. Schweimer, I. Matecko und P. Rosch** (2008). "Conformation, catalytic site, and enzymatic mechanism of the PR10 allergen-related enzyme norcochlorogenic acid synthase." Biochem J **413**(2): 281-90.
- Berridge, M. J.** (1987). "Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers." Annu Rev Biochem **56**: 159-93.
- Berridge, M. J.** (1997). "The AM and FM of calcium signalling." Nature **386**(6627): 759-60.
- Bezprozvanny, I. und B. E. Ehrlich** (1994). "Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP₃)-gated Ca channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium." J Gen Physiol **104**(5): 821-56.
- Bezprozvanny, I. und B. E. Ehrlich** (1995). "The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor." J Membr Biol **145**(3): 205-16.
- Billker, O., S. Dechamps, R. Tewari, G. Wenig, B. Franke-Fayard und V. Brinkmann** (2004). "Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite." Cell **117**(4): 503-14.
- Bocobza, S., A. Adato, T. Mandel, M. Shapira, E. Nudler und A. Aharoni** (2007). "Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom." Genes Dev **21**(22): 2874-9.
- Borghans, J. M., G. Dupont und A. Goldbeter** (1997). "Complex intracellular calcium oscillations. A theoretical exploration of possible mechanisms." Biophys Chem **66**(1): 25-41.
- Brault, M., Z. Amiar, A. M. Pennarun, M. Monestiez, Z. Zhang, D. Cornel, O. Dellis, H. Knight, F. Bouteau und J. P. Rona** (2004). "Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent." Plant Physiol **135**(1): 231-43.
- Bright, J., R. Desikan, J. T. Hancock, I. S. Weir und S. J. Neill** (2006). "ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis." Plant J **45**(1): 113-22.

- Brocard, I. M., T. J. Lynch und R. R. Finkelstein** (2002). "Regulation and Role of the *Arabidopsis* Abscisic Acid-Insensitive 5 Gene in Abscisic Acid, Sugar, and Stress Response." Plant Physiol. **129**(4): 1533-1543.
- Bruzzo, S., I. Moreschi, C. Usai, L. Guida, G. Damonte, A. Salis, S. Scarf, E. Millo, A. De Flora und E. Zocchi** (2007). "Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger 10.1073/pnas.0609379104." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(14): 5759-5764.
- Calder, G. M., V. E. Franklin-Tong, P. J. Shaw und B. K. Drobak** (1997). "Ca²⁺ oscillations in plant cells: initiation by rapid elevation in cytosolic free Ca²⁺ levels." Biochem Biophys Res Commun **234**(3): 690-4.
- Calvo, S. E., D. J. Pagliarini und V. K. Mootha** (2009). "Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(18): 7507-12.
- Carol, R. J. und L. Dolan** (2002). "Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1422): 815-21.
- Chandran, V., E. J. Stollar, K. Lindorff-Larsen, J. F. Harper, W. J. Chazin, C. M. Dobson, B. F. Luisi und J. Christodoulou** (2006). "Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition." J Mol Biol **357**(2): 400-10.
- Chehab, E. W., O. R. Patharkar, A. D. Hegeman, T. Taybi und J. C. Cushman** (2004). "Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant." Plant Physiol **135**(3): 1430-46.
- Chen, X.** (2005). "MicroRNA biogenesis and function in plants." FEBS Lett **579**(26): 5923-31.
- Cheng, S. H., M. R. Willmann, H. C. Chen und J. Sheen** (2002a). "Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family." Plant Physiol **129**(2): 469-85.
- Cheng, W. H., A. Endo, L. Zhou, J. Penney, H. C. Chen, A. Arroyo, P. Leon, E. Nambara, T. Asami, M. Seo, T. Koshiba und J. Sheen** (2002b). "A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions." Plant Cell **14**(11): 2723-43.
- Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz und S. Fields** (1991). "The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9578-82.
- Chin, D. und A. R. Means** (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." Trends Cell Biol **10**(8): 322-8.
- Chinnusamy, V., Z. Gong und J. K. Zhu** (2008). "Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses." J Integr Plant Biol **50**(10): 1187-95.
- Chinnusamy, V., K. Schumaker und J. K. Zhu** (2004). "Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants." J Exp Bot **55**(395): 225-36.

- Christmann, A., T. Hoffmann, I. Teplova, E. Grill und A. Müller** (2005). "Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis." Plant Physiol **137**: 209-219.
- Christmann, A., D. Moes, A. Himmelbach, Y. Yang, Y. Tang und E. Grill** (2006). "Integration of abscisic acid signalling into plant responses." Plant Biol (Stuttg) **8**(3): 314-25.
- Christmann, A., E. W. Weiler, E. Steudle und E. Grill** (2007). "A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage." Plant J **52**(1): 167-74.
- Christodoulou, J., A. Malmendal, J. F. Harper und W. J. Chazin** (2004). "Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase." J Biol Chem **279**(28): 29092-100.
- Clark, R. M., G. Schweikert, C. Toomajian, S. Ossowski, G. Zeller, P. Shinn, N. Warthmann, T. T. Hu, G. Fu, D. A. Hinds, H. Chen, K. A. Frazer, D. H. Huson, B. Scholkopf, M. Nordborg, G. Ratsch, J. R. Ecker und D. Weigel** (2007). "Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in Arabidopsis thaliana." Science **317**(5836): 338-42.
- Clough, S. J. und A. F. Bent** (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana." Plant J **16**(6): 735-43.
- Cork, J. M. und M. D. Purugganan** (2005). "High-diversity genes in the Arabidopsis genome." Genetics **170**(4): 1897-911.
- Coursol, S., L. M. Fan, H. Le Stunff, S. Spiegel, S. Gilroy und S. M. Assmann** (2003). "Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins." Nature **423**(6940): 651-4.
- Cutler, A. J. und J. E. Krochko** (1999). "Formation and breakdown of ABA." Trends in Plant Science **4**(12): 472-478.
- Cutler, S., M. Ghassemian, D. Bonetta, S. Cooney und P. McCourt** (1996). "A Protein Farnesyl Transferase Involved in Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis." Science **273**(5279): 1239-1241.
- Dal Santo, P., M. A. Logan, A. D. Chisholm und E. M. Jorgensen** (1999). "The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in C. elegans." Cell **98**(6): 757-67.
- Dammann, C., A. Ichida, B. Hong, S. M. Romanowsky, E. M. Hrabak, A. C. Harmon, B. G. Pickard und J. F. Harper** (2003). "Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis." Plant Physiol **132**(4): 1840-8.
- De Koninck, P. und H. Schulman** (1998). "Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations." Science **279**(5348): 227-30.
- De Young, G. W. und J. Keizer** (1992). "A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca²⁺ concentration." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9895-9.

- Deruere, J., K. Jackson, C. Garbers, D. Soll und A. Delong** (1999). "The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo." Plant J **20**(4): 389-99.
- Desikan, R., R. Griffiths, J. Hancock und S. Neill** (2002). "A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16314-8.
- Dietrich, P., D. Sanders und R. Hedrich** (2001). "The role of ion channels in light-dependent stomatal opening." J Exp Bot **52**(363): 1959-67.
- Ding, Y., P. Kalo, C. Yendrek, J. Sun, Y. Liang, J. F. Marsh, J. M. Harris und G. E. Oldroyd** (2008). "Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*." Plant Cell **20**(10): 2681-95.
- Dolmetsch, R. E., K. Xu und R. S. Lewis** (1998). "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression." Nature **392**(6679): 933-6.
- Donohue, K.** (2009). "Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1520): 1059-74.
- Donohue, K., M. S. Heschel, C. M. Butler, D. Barua, R. A. Sharrock, G. C. Whitelam und G. C. Chiang** (2008). "Diversification of phytochrome contributions to germination as a function of seed-maturation environment." New Phytol **177**(2): 367-79.
- Dupont, G. und A. Goldbeter** (1993). "One-pool model for Ca²⁺ oscillations involving Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate as co-agonists for Ca²⁺ release." Cell Calcium **14**(4): 311-22.
- Ehrhardt, D. W., R. Wais und S. R. Long** (1996). "Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals." Cell **85**(5): 673-81.
- Ehrler, T.** (1997). Genetische und physiologische Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit ABA-insensitivem Primärwurzelwachstum, Ph. D. Thesis, ETH Zürich Nr. 12269.
- Eisenreich, W., A. Bacher, D. Arigoni und F. Rohdich** (2004). "Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway." Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) **61**(12): 1401-1426.
- Erwin, V. G. und A. Korte** (1988). "Brain neurotensin receptors in mice bred for differences in sensitivity to ethanol." Alcohol **5**(3): 195-201.
- Evans, N. H., M. R. McAinsh und A. M. Hetherington** (2001). "Calcium oscillations in higher plants." Curr Opin Plant Biol **4**(5): 415-20.
- Evans, N. H., M. R. McAinsh, A. M. Hetherington und M. R. Knight** (2005). "ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response." Plant J **41**(4): 615-26.
- Fan, L. M., Z. Zhao und S. M. Assmann** (2004). "Guard cells: a dynamic signaling model." Curr Opin Plant Biol **7**(5): 537-46.
- Fang, Y. und D. L. Spector** (2007). "Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants." Curr Biol **17**(9): 818-23.

- Finkelstein, R. R.** (1994). "Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations." *The Plant Journal* **5**(6): 765-771.
- Finkelstein, R. R.** (2006). "Studies of Abscisic Acid Perception Finally Flower." *Plant Cell* **18**(4): 786-791.
- Finkelstein, R. R., S. S. Gampala und C. D. Rock** (2002). "Abscisic acid signaling in seeds and seedlings." *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45.
- Finkelstein, R. R. und T. J. Lynch** (2000). "The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Gene *ABI5* Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor." *Plant Cell* **12**(4): 599-610.
- Finkelstein, R. R., M. L. Wang, T. J. Lynch, S. Rao und H. M. Goodman** (1998). "The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Locus *ABI4* Encodes an APETALA 2 Domain Protein." *Plant Cell* **10**(6): 1043-1054.
- Fioretti, B., F. Franciolini und L. Catacuzzeno** (2005). "A model of intracellular Ca²⁺ oscillations based on the activity of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels." *Biophys Chem* **113**(1): 17-23.
- Fisher, R. F. und S. R. Long** (1992). "Rhizobium--plant signal exchange." *Nature* **357**(6380): 655-60.
- Francis, K. E. und S. Spiker** (2005). "Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations." *Plant J* **41**(3): 464-77.
- Fuglsang, A. T., Y. Guo, T. A. Cuin, Q. Qiu, C. Song, K. A. Kristiansen, K. Bych, A. Schulz, S. Shabala, K. S. Schumaker, M. G. Palmgren und J. K. Zhu** (2007). "Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein." *Plant Cell* **19**(5): 1617-34.
- Fujibe, T., H. Saji, M. K. Watahiki und K. T. Yamamoto** (2006). "Overexpression of the RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 (*RCD1*) gene of *Arabidopsis* causes weak *rcd1* phenotype with compromised oxidative-stress responses." *Biosci Biotechnol Biochem* **70**(8): 1827-31.
- Fujii, H., P. E. Verslues und J. K. Zhu** (2007). "Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **19**(2): 485-94.
- Fujii, H. und J. K. Zhu** (2009). "Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(20): 8380-5.
- Fujioka, Y., M. Utsumi, Y. Ohba und Y. Watanabe** (2007). "Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis*." *Plant Cell Physiol* **48**(9): 1243-53.
- Furihata, T., K. Maruyama, Y. Fujita, T. Umezawa, R. Yoshida, K. Shinozaki und K. Yamaguchi-Shinozaki** (2006). "Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1." *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Gajhede, M., P. Osmark, F. Poulsen, H. Ipsen, J. Larsen, R. Joost van Neerven, C. Schou, H. Lowenstein und M. Spangfort** (1996). "X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy." Nat Struct Biol **3**: 1040 - 1045.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller und K. Ojima** (1968). "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells." Exp Cell Res **50**(1): 151-8.
- Gao, Y., Q. Zeng, J. Guo, J. Cheng, B. E. Ellis und J.-G. Chen** (2007). "Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03291.x." The Plant Journal **52**(6): 1001-1013.
- Gargantini, P. R., S. Gonzalez-Rizzo, D. Chinchilla, M. Raices, V. Giammaria, R. M. Ulloa, F. Frugier und M. D. Crespi** (2006). "A CDPK isoform participates in the regulation of nodule number in *Medicago truncatula*." Plant J **48**(6): 843-56.
- Gleason, C., S. Chaudhuri, T. Yang, A. Munoz, B. W. Poovaiah und G. E. Oldroyd** (2006). "Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition." Nature **441**(7097): 1149-52.
- Gobert, A., S. Isayenkov, C. Voelker, K. Czempinski und F. J. Maathuis** (2007). "The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10726-31.
- Goldbeter, A., G. Dupont und M. J. Berridge** (1990). "Minimal model for signal-induced Ca²⁺ oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1461-5.
- Gonzalez-Guzman, M., N. Apostolova, J. M. Belles, J. M. Barrero, P. Piqueras, M. R. Ponce, J. L. Micol, R. Serrano und P. L. Rodriguez** (2002). "The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde." Plant Cell **14**(8): 1833-46.
- Gosti, F., N. Beaudoin, C. Serizet, A. A. Webb, N. Vartanian und J. Giraudat** (1999). "ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling." Plant Cell **11**(10): 1897-910.
- Grabov, A., J. Leung, J. Giraudat und M. R. Blatt** (1997). "Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid." Plant J **12**(1): 203-13.
- Greene, E. A., C. A. Codomo, N. E. Taylor, J. G. Henikoff, B. J. Till, S. H. Reynolds, L. C. Enns, C. Burtner, J. E. Johnson, A. R. Odden, L. Comai und S. Henikoff** (2003). "Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis." Genetics **164**(2): 731-40.
- Guo, J., Q. Zeng, M. Emami, B. E. Ellis und J. G. Chen** (2008). "The GCR2 gene family is not required for ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis." PLoS ONE **3**(8): e2982.
- Guo, Y., L. Xiong, C. P. Song, D. Gong, U. Halfter und J. K. Zhu** (2002). "A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis." Dev Cell **3**(2): 233-44.

- Hamilton, D. W., A. Hills, B. Kohler und M. R. Blatt** (2000). "Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4967-72.
- Harmon, A. C., M. Gribskov und J. F. Harper** (2000). "CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal?" Trends Plant Sci **5**(4): 154-9.
- Harper, J. F., G. Breton und A. Harmon** (2004). "Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases." Annu Rev Plant Biol **55**: 263-88.
- Harper, J. F. und A. Harmon** (2005). "Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 555-66.
- Hashimoto, M., J. Negi, J. Young, M. Israelsson, J. I. Schroeder und K. Iba** (2006). "Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO(2)." Nat Cell Biol doi:10.1038/ncb1387.
- Hattori, T., M. Totsuka, T. Hobo, Y. Kagaya und A. Yamamoto-Toyoda** (2002). "Experimentally Determined Sequence Requirement of ACGT-Containing Abscisic Acid Response Element." Plant Cell Physiol. **43**(1): 136-140.
- Hayden, C. A. und R. A. Jorgensen** (2007). "Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes." BMC Biol **5**: 32.
- Hedrich, R., H. Busch und K. Raschke** (1990). "Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells." Embo J **9**(12): 3889-92.
- Hegeman, A. D., M. Rodriguez, B. W. Han, Y. Uno, G. N. Phillips, Jr., E. M. Hrabak, J. C. Cushman, J. F. Harper, A. C. Harmon und M. R. Sussman** (2006). "A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases." Proteomics **6**(12): 3649-64.
- Hetherington, J. P., A. Warner und R. M. Seymour** (2006). "Simplification and its consequences in biological modelling: conclusions from a study of calcium oscillations in hepatocytes." J R Soc Interface **3**(7): 319-31.
- Himmelbach, A., T. Hoffmann, M. Leube, B. Hohener und E. Grill** (2002). "Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis." Embo J **21**(12): 3029-38.
- Himmelbach, A., M. Iten und E. Grill** (1998). "Signalling of abscisic acid to regulate plant growth." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1374): 1439-44.
- Hirai, N., R. Yoshida, Y. Todoroki und H. Ohigashi** (2000). "Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi." Biosci Biotechnol Biochem **64**(7): 1448-58.
- Hirayama, T. und K. Shinozaki** (2007). "Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA." Trends Plant Sci.
- Hoffmann, T.** (2002). Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. München, Technische Universität.

- Hosy, E., A. Vavasseur, K. Mouline, I. Dreyer, F. Gaymard, F. Poree, J. Boucherez, A. Lebaudy, D. Bouchez, A. A. Very, T. Simonneau, J. B. Thibaud und H. Sentenac** (2003). "The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5549-54.
- Hoth, S., M. Morgante, J. P. Sanchez, M. K. Hanafey, S. V. Tingey und N. H. Chua** (2002). "Genome-wide gene expression profiling in Arabidopsis thaliana reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the abi1-1 mutant." J Cell Sci **115**(Pt 24): 4891-900.
- Hugouvieux, V., J. M. Kwak und J. I. Schroeder** (2001). "An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis." Cell **106**(4): 477-87.
- Hwang, I. und J. Sheen** (2001). "Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction." **413**(6854): 383-389.
- Hwang, I., H. Sze und J. F. Harper** (2000). "A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6224-9.
- Iida, K., M. Seki, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, T. Toyoda, A. Konagaya und K. Shinozaki** (2004). "Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in Arabidopsis thaliana based on full-length cDNA sequences." Nucleic Acids Res **32**(17): 5096-103.
- Illingworth, C. J. R., K. E. Parkes, C. R. Snell, P. M. Mullineaux und C. A. Reynolds** (2008). "Criteria for confirming sequence periodicity identified by Fourier transform analysis: Application to GCR2, a candidate plant GPCR?" Biophysical Chemistry **133**(1-3): 28-35.
- Inesi, G.** (1985). "Mechanism of calcium transport." Annu Rev Physiol **47**: 573-601.
- Ishida, S., T. Yuasa, M. Nakata und Y. Takahashi** (2008). "A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins." Plant Cell **20**(12): 3273-88.
- Israelsson, M., R. S. Siegel, J. Young, M. Hashimoto, K. Iba und J. I. Schroeder** (2006). "Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis." Current Opinion in Plant Biology Cell Biology / Edited by Laurie G Smith and Ulrike Mayer **9**(6): 654-663.
- Iten, M.** (1992). Identifizierung und Charakterisierung von Abscisinsäure-insensitiven Mutanten von *Arabidopsis thaliana*. ETH Zürich.
- Iuchi, S., M. Kobayashi, T. Taji, M. Naramoto, M. Seki, T. Kato, S. Tabata, Y. Kakubari, K. Yamaguchi-Shinozaki und K. Shinozaki** (2001). "Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis." Plant J **27**(4): 325-33.
- Jadhav, A. S., D. C. Taylor, M. Giblin, A. M. R. Ferrie, S. J. Ambrose, A. R. S. Ross, K. M. Nelson, L. Irina Zaharia, N. Sharma, M. Anderson, P. R. Fobert und S. R. Abrams** (2008). "Hormonal regulation of oil accumulation in Brassica seeds: Metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'- and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of *B. napus*." Phytochemistry **69**(15): 2678-2688.

- Jaillon, O., K. Bouhouche, J. F. Gout, J. M. Aury, B. Noel, B. Saudemont, M. Nowacki, V. Serrano, B. M. Porcel, B. Segurens, A. Le Mouel, G. Lepere, V. Schachter, M. Betermier, J. Cohen, P. Wincker, L. Sperling, L. Duret und E. Meyer** (2008). "Translational control of intron splicing in eukaryotes." Nature **451**(7176): 359-62.
- Jeannette, E., J.-P. Rona, F. Bardat, D. Cornel, B. Sotta und E. Miginiac** (1999). "Induction of *RAB18* gene expression and activation of K^{+} outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells." The Plant Journal **18**(1): 13-22.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh und M. W. Bevan** (1987). "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants." Embo J **6**: 3901-3907.
- Joshi, C. P., H. Zhou, X. Huang und V. L. Chiang** (1997). "Context sequences of translation initiation codon in plants." Plant Mol Biol **35**(6): 993-1001.
- Kim, K.-N., Y. H. Cheong, J. J. Grant, G. K. Pandey und S. Luan** (2003). "CIPK3, a Calcium Sensor-Associated Protein Kinase That Regulates Abscisic Acid and Cold Signal Transduction in Arabidopsis
10.1105/tpc.006858." Plant Cell **15**(2): 411-423.
- Kim, M., G. W. Hennig, T. K. Smith und B. A. Perrino** (2008a). "Phospholamban knockout increases CaM kinase II activity and intracellular Ca^{2+} wave activity and alters contractile responses of murine gastric antrum." Am J Physiol Cell Physiol **294**(2): C432-41.
- Kim, S., J. Y. Yang, J. Xu, I. C. Jang, M. J. Prigge und N. H. Chua** (2008b). "Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs." Plant Cell Physiol **49**(11): 1634-44.
- Kinoshita, T., M. Nishimura und K. Shimazaki** (1995). "Cytosolic Concentration of Ca^{2+} Regulates the Plasma Membrane H^{+} -ATPase in Guard Cells of Fava Bean." Plant Cell **7**(8): 1333-1342.
- Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu und J. C. Sanford** (1987). "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells." **327**(6117): 70-73.
- Klimecka, M. und G. Muszynska** (2007). "Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases." Acta Biochim Pol **54**(2): 219-33.
- Klusener, B., J. J. Young, Y. Murata, G. J. Allen, I. C. Mori, V. Hugouvieux und J. I. Schroeder** (2002). "Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in Arabidopsis guard cells." Plant Physiol **130**(4): 2152-63.
- Kobayashi, M., I. Ohura, K. Kawakita, N. Yokota, M. Fujiwara, K. Shimamoto, N. Doke und H. Yoshioka** (2007). "Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase." Plant Cell **19**(3): 1065-80.
- Koncz, C. und J. Schell** (1986). "The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector." Molecular Genetics and Genomics **204**(3): 383-396.

- Koornneef, M., G. Reuling und C. M. Karssen** (1984). "The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*." Physiol Plant **61**: 377-383.
- Kosakovsky Pond, S. L. und S. D. Frost** (2005). "Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection." Mol Biol Evol **22**(5): 1208-22.
- Kosambi, D.** (1944). "The estimation of map distance from recombination values." Ann. Eugen. **12**: 172-175.
- Krochko, J. E., G. D. Abrams, M. K. Loewen, S. R. Abrams und A. J. Cutler** (1998). "(+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase Is a Cytochrome P450 Monooxygenase 10.1104/pp.118.3.849." Plant Physiol. **118**(3): 849-860.
- Kuhn, J. M., A. Boisson-Dernier, M. B. Dizon, M. H. Maktabi und J. I. Schroeder** (2006). "The Protein Phosphatase AtPP2CA Negatively Regulates Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis, and Effects of abh1 on AtPP2CA mRNA." Plant Physiol **140**(1): 127-39.
- Kwak, J. M., J. H. Moon, Y. Murata, K. Kuchitsu, N. Leonhardt, A. DeLong und J. I. Schroeder** (2002). "Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in Arabidopsis." Plant Cell **14**(11): 2849-61.
- Kwak, J. M., I. C. Mori, Z. M. Pei, N. Leonhardt, M. A. Torres, J. L. Dangl, R. E. Bloom, S. Bodde, J. D. Jones und J. I. Schroeder** (2003). "NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis." Embo J **22**(11): 2623-33.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lang, V. und E. T. Palva** (1992). "The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." Plant Mol Biol **20**(5): 951-62.
- LeBeau, A. P., D. I. Yule, G. E. Groblewski und J. Sneyd** (1999). "Agonist-dependent phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: A possible mechanism for agonist-specific calcium oscillations in pancreatic acinar cells." J Gen Physiol **113**(6): 851-72.
- Lee, J. Y., B. C. Yoo und A. C. Harmon** (1998). "Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean." Biochemistry **37**(19): 6801-9.
- Lee, S. C., W. Z. Lan, B. G. Kim, L. Li, Y. H. Cheong, G. K. Pandey, G. Lu, B. B. Buchanan und S. Luan** (2007). "A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15959-64.
- Leonhardt, N., J. M. Kwak, N. Robert, D. Waner, G. Leonhardt und J. I. Schroeder** (2004). "Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant." Plant Cell **16**(3): 596-615.

- Leube, M. P., E. Grill und N. Amrhein** (1998). "ABI1 of Arabidopsis is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration." FEBS Lett **424**(1-2): 100-4.
- Leung, J., S. Merlot und J. Giraudat** (1997). "The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction." Plant Cell **9**(5): 759-771.
- Levchenko, V., K. R. Konrad, P. Dietrich, M. R. Roelfsema und R. Hedrich** (2005). "Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4203-8.
- Lexer, C., Z. Lai und L. H. Rieseberg** (2004). "Candidate gene polymorphisms associated with salt tolerance in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species." New Phytol **161**(1): 225-233.
- Leymarie, J., A. Vavasseur und G. Lascève** (1998). "CO₂ sensing in stomata of *abi1-1* and *abi2-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiol Biochem **36**: 539-543.
- Li, C., O. Junttila, P. Heino und E. T. Palva** (2003). "Different responses of northern and southern ecotypes of *Betula pendula* to exogenous ABA application." Tree Physiol **23**(7): 481-7.
- Li, J. und S. M. Assmann** (1996). "An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean." Plant Cell **8**(12): 2359-2368.
- Li, J., Y.-R. Julie Lee und S. M. Assmann** (1998). "Guard Cells Possess a Calcium-Dependent Protein Kinase That Phosphorylates the KAT1 Potassium Channel." Plant Physiol. **116**(2): 785-795.
- Li, J., T. Kinoshita, S. Pandey, C. K. Ng, S. P. Gygi, K. Shimazaki und S. M. Assmann** (2002). "Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase." Nature **418**(6899): 793-7.
- Li, S., S. M. Assmann und R. Albert** (2006). "Predicting Essential Components of Signal Transduction Networks: A Dynamic Model of Guard Cell Abscisic Acid Signaling." PLoS Biol **4**(10).
- Lichtenthaler, H. K., J. Schwender, A. Disch und M. Rohmer** (1997). "Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway." FEBS Lett **400**(3): 271-4.
- Liu, X., Y. Yue, B. Li, Y. Nie, W. Li, W. H. Wu und L. Ma** (2007). "A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid." Science **315**(5819): 1712-6.
- Lopez-Molina, L. und N. H. Chua** (2000). "A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell Physiol **41**(5): 541-7.
- Lu, C. und N. Fedoroff** (2000). "A mutation in the *Arabidopsis* *HYL1* gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin." Plant Cell **12**(12): 2351-2366.
- Lu, S. X. und E. M. Hrabak** (2002). "An *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum." Plant Physiol **128**(3): 1008-21.

- Luan, S.** (2009). "The CBL-CIPK network in plant calcium signaling." Trends Plant Sci **14**(1): 37-42.
- Ludwig, A. A., T. Romeis und J. D. Jones** (2004). "CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk." J Exp Bot **55**(395): 181-8.
- Ludwig, A. A., H. Saitoh, G. Felix, G. Freymark, O. Miersch, C. Wasternack, T. Boller, J. D. Jones und T. Romeis** (2005). "Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10736-41.
- Luehrsen, K. R., J. R. De Wet und V. Walbot** (1992). "Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene." Methods Enzymol **216**: 397-414.
- Ma, S. Y. und W. H. Wu** (2007). "AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses." Plant Mol Biol **65**(4): 511-8.
- Ma, Y., I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann und E. Grill** (2009). "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors." Science **324**(5930): 1064-8.
- MacRobbie, E. A. C.** (2000). "Inaugural Article: ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺(Rb⁺) release." PNAS **97**(22): 12361-12368.
- Maekawa, T., M. Maekawa-Yoshikawa, N. Takeda, H. Imaizumi-Anraku, Y. Murooka und M. Hayashi** (2009). "Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*." Plant J **58**(2): 183-94.
- Margueron, R., P. Trojer und D. Reinberg** (2005). "The key to development: interpreting the histone code?" Curr Opin Genet Dev **15**(2): 163-76.
- Martin, M. L. und L. Busconi** (2000). "Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation." Plant J **24**(4): 429-35.
- Martin, M. L. und L. Busconi** (2001). "A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature." Plant Physiol **125**(3): 1442-9.
- Masle, J., S. R. Gilmore und G. D. Farquhar** (2005). "The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis." Nature **436**(7052): 866-70.
- McAinsh, M. R., H. Clayton, T. A. Mansfield und A. M. Hetherington** (1996). "Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress." Plant Physiol **111**(4): 1031-1042.
- McAinsh, M. R. und J. K. Pittman** (2009). "Shaping the calcium signature." New Phytol **181**(2): 275-94.
- McAinsh, M. R., A. Webb, J. E. Taylor und A. M. Hetherington** (1995). "Stimulus-Induced Oscillations in Guard Cell Cytosolic Free Calcium." Plant Cell **7**(8): 1207-1219.
- McCourt, P. und R. Creelman** (2008). "The ABA receptors -- we report you decide." Curr Opin Plant Biol **11**(5): 474-8.

- McCubbin, A. G., S. M. Ritchie, S. J. Swanson und S. Gilroy** (2004). "The calcium-dependent protein kinase HvCDPK1 mediates the gibberellic acid response of the barley aleurone through regulation of vacuolar function." Plant J **39**(2): 206-18.
- Megraw, M., V. Baev, V. Rusinov, S. T. Jensen, K. Kalantidis und A. G. Hatzigeorgiou** (2006). "MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis." RNA **12**(9): 1612-9.
- Meyer, K., M. P. Leube und E. Grill** (1994). "A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana." Science **264**(5164): 1452-5.
- Meyer, P.** (2000). "Transcriptional transgene silencing and chromatin components." Plant Mol Biol **43**(2-3): 221-34.
- Meyer, T. und L. Stryer** (1988). "Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5051-5.
- Meza, T. J., D. Kamfjord, A. M. Hakelien, I. Evans, L. H. Godager, A. Mandal, K. S. Jakobsen und R. B. Aalen** (2001). "The frequency of silencing in Arabidopsis thaliana varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors." Transgenic Res **10**(1): 53-67.
- Mishra, G., W. Zhang, F. Deng, J. Zhao und X. Wang** (2006). "A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in Arabidopsis." Science **312**(5771): 264-6.
- Mitra, R. M., C. A. Gleason, A. Edwards, J. Hadfield, J. A. Downie, G. E. Oldroyd und S. R. Long** (2004). "A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4701-5.
- Miura, K., J. Lee, J. B. Jin, C. Y. Yoo, T. Miura und P. M. Hasegawa** (2009). "Sumoylation of ABI5 by the Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5418-23.
- Moes, D., A. Himmelbach, A. Korte, G. Haberer und E. Grill** (2008). "Nuclear localization of the mutant protein phosphatase abi1 is required for insensitivity towards ABA responses in Arabidopsis." Plant J **54**(5): 806-19.
- Mogensen, J. E., R. Wimmer, J. N. Larsen, M. D. Spangfort und D. E. Otzen** (2002). "The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands." J Biol Chem **277**(26): 23684-92.
- Monshausen, G. B., M. A. Messerli und S. Gilroy** (2008). "Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca²⁺ follow oscillating increases in growth in root hairs of Arabidopsis." Plant Physiol **147**(4): 1690-8.
- Moore, R. C. und M. D. Purugganan** (2005). "The evolutionary dynamics of plant duplicate genes." Curr Opin Plant Biol **8**(2): 122-8.
- Morel, J. B., P. Mourrain, C. Beclin und H. Vaucheret** (2000). "DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis." Curr Biol **10**(24): 1591-4.

- Mori, I. C., Y. Murata, Y. Yang, S. Munemasa, Y. F. Wang, S. Andreoli, H. Tiriac, J. M. Alonso, J. F. Harper, J. R. Ecker, J. M. Kwak und J. I. Schroeder** (2006). "CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure." *PLoS Biol* **4**(10): e327.
- Muller, A. H. und M. Hansson** (2009). "The barley magnesium chelatase 150-kDa subunit is not an abscisic acid receptor." *Plant Physiol.*
- Murase, K., Y. Hirano, T. P. Sun und T. Hakoshima** (2008). "Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1." *Nature* **456**(7221): 459-63.
- Murashige, T. und F. Skoog** (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture." *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Murphy, L. C., G. P. Skliris, B. G. Rowan, M. Al-Dhaheer, C. Williams, C. Penner, S. Troup, S. Begic, M. Parisien und P. H. Watson** (2009). "The relevance of phosphorylated forms of estrogen receptor in human breast cancer in vivo." *J Steroid Biochem Mol Biol* **114**(1-2): 90-5.
- Murray, M. G. und W. F. Thompson** (1980). "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA." *Nucleic Acids Res* **8**(19): 4321-5.
- Mustilli, A. C., S. Merlot, A. Vavasseur, F. Fenzi und J. Giraudat** (2002). "Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production." *Plant Cell* **14**(12): 3089-99.
- Nagata, T., S. Iizumi, K. Satoh, H. Ooka, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki, Y. Otomo, K. Murakami, K. Matsubara und S. Kikuchi** (2004). "Comparative analysis of plant and animal calcium signal transduction element using plant full-length cDNA data." *Mol Biol Evol* **21**(10): 1855-70.
- Nakamura, S., T. J. Lynch und R. R. Finkelstein** (2001). "Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis." *Plant J* **26**(6): 627-35.
- Nambara, E. und A. Marion-Poll** (2005). "Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism." *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165-185.
- Nambara, E., M. Suzuki, S. Abrams, D. R. McCarty, Y. Kamiya und P. McCourt** (2002). "A screen for genes that function in abscisic acid signaling in Arabidopsis thaliana." *Genetics* **161**(3): 1247-55.
- Negi, J., O. Matsuda, T. Nagasawa, Y. Oba, H. Takahashi, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya, M. Hashimoto und K. Iba** (2008). "CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells." *Nature* **452**(7186): 483-6.
- Neill, S., R. Barros, J. Bright, R. Desikan, J. Hancock, J. Harrison, P. Morris, D. Ribeiro und I. Wilson** (2008). "Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress 10.1093/jxb/erm293." *J. Exp. Bot.* **59**(2): 165-176.
- Nemhauser, J. L., F. Hong und J. Chory** (2006). "Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses." *Cell* **126**(3): 467-75.
- Ng, C. K., K. Carr, M. R. McAinsh, B. Powell und A. M. Hetherington** (2001). "Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate." *Nature* **410**(6828): 596-9.

- Ng, D. W., M. B. Chandrasekharan und T. C. Hall** (2006). "Ordered histone modifications are associated with transcriptional poising and activation of the phaseolin promoter." Plant Cell **18**(1): 119-32.
- Nishimura, N., N. Kitahata, M. Seki, Y. Narusaka, M. Narusaka, T. Kuromori, T. Asami, K. Shinozaki und T. Hirayama** (2005). "Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis." Plant J **44**(6): 972-84.
- Nishimura, N., T. Yoshida, N. Kitahata, T. Asami, K. Shinozaki und T. Hirayama** (2007). "ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed." Plant J **50**(6): 935-49.
- Oancea, E. und T. Meyer** (1996). "Reversible desensitization of inositol trisphosphate-induced calcium release provides a mechanism for repetitive calcium spikes." J Biol Chem **271**(29): 17253-60.
- Ohkuma, K., J. L. Lyon, F. T. Addicott und O. E. Smith** (1963). "Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit." Science **142**(3599): 1592-1593.
- Ohta, M., Y. Guo, U. Halfter und J. K. Zhu** (2003). "A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11771-6.
- Okamoto, M., A. Kuwahara, M. Seo, T. Kushiro, T. Asami, N. Hirai, Y. Kamiya, T. Koshiba und E. Nambara** (2006). "CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis 10.1104/pp.106.079475." Plant Physiol. **141**(1): 97-107.
- Okamoto, M., Y. Tanaka, S. R. Abrams, Y. Kamiya, M. Seki und E. Nambara** (2009). "High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in Arabidopsis." Plant Physiol **149**(2): 825-34.
- Oldroyd, G. E. und J. A. Downie** (2004). "Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(7): 566-76.
- Overmyer, K., H. Tuominen, R. Kettunen, C. Betz, C. Langebartels, H. Sandermann, Jr. und J. Kangasjarvi** (2000). "Ozone-sensitive arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death." Plant Cell **12**(10): 1849-62.
- Pandey, S., D. C. Nelson und S. M. Assmann** (2009). "Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis." **136**(1): 136-148.
- Pandey, S., W. Zhang und S. M. Assmann** (2007). "Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction." FEBS Letters **Plant Transporters and Channels** **581**(12): 2325-2336.
- Park, S. Y., P. Fung, N. Nishimura, D. R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T. F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P. L. Rodriguez, P. McCourt, J. K. Zhu, J. I. Schroeder, B. F.**

- Volkman und S. R. Cutler** (2009). "Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins." Science **324**(5930): 1068-71.
- Paszkowski, J., R. D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn und I. Potrykus** (1984). "Direct gene transfer to plants." Embo J **3**(12): 2717-2722.
- Pei, Z. M., K. Kuchitsu, J. M. Ward, M. Schwarz und J. I. Schroeder** (1997). "Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants." Plant Cell **9**(3): 409-23.
- Pei, Z. M., Y. Murata, G. Benning, S. Thomine, B. Klusener, G. J. Allen, E. Grill und J. I. Schroeder** (2000). "Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells." Nature **406**(6797): 731-4.
- Peiter, E., F. J. Maathuis, L. N. Mills, H. Knight, J. Pelloux, A. M. Hetherington und D. Sanders** (2005). "The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement." Nature **434**(7031): 404-8.
- Pical, C., K. M. Fredlund, P. X. Petit, M. Sommarin und I. M. Moller** (1993). "The outer membrane of plant mitochondria contains a calcium-dependent protein kinase and multiple phosphoproteins." FEBS Lett **336**(2): 347-51.
- Pierce, M. M., C. S. Raman und B. T. Nall** (1999). "Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions." Methods **19**(2): 213-21.
- Pilot, G., B. Lacombe, F. Gaymard, I. Cherel, J. Boucherez, J. B. Thibaud und H. Sentenac** (2001). "Guard cell inward K⁺ channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2." J Biol Chem **276**(5): 3215-21.
- Politi, A., L. D. Gaspers, A. P. Thomas und T. Hofer** (2006). "Models of IP₃ and Ca²⁺ oscillations: frequency encoding and identification of underlying feedbacks." Biophys J **90**(9): 3120-33.
- Pottosin, II und G. Schonknecht** (2007). "Vacuolar calcium channels." J Exp Bot **58**(7): 1559-69.
- Radauer, C., P. Lackner und H. Breiteneder** (2008). "The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands." BMC Evolutionary Biology **8**(1): 286.
- Rahmani, F., M. Hummel, J. Schuurmans, A. Wiese-Klinkenberg, S. Smeekens und J. Hanson** (2009). "Sucrose control of translation mediated by a uORF encoded peptide." Plant Physiol.
- Ramagli, L., Rodriguez, L. V.,** (1985). "Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer." Electrophoresis **6**(11): 559-563.
- Rangan, L., C. Vogel und A. Srivastava** (2008). "Analysis of context sequence surrounding translation initiation site from complete genome of model plants." Mol Biotechnol **39**(3): 207-13.
- Raschke, K., M. Shabahang und R. Wolf** (2003). "The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂." Planta **217**(4): 639-50.

- Reddy, A. S.** (2001). "Calcium: silver bullet in signaling." *Plant Sci* **160**(3): 381-404.
- Reyes, J. L. und N. H. Chua** (2007). "ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination." *Plant J* **49**(4): 592-606.
- Risk, J. M., C. L. Day und R. C. Macknight** (2009). "Reevaluation of Abscisic Acid-Binding Assays Shows That G-Protein-Coupled Receptor2 Does Not Bind Abscisic Acid 10.1104/pp.109.135749." *Plant Physiol.* **150**(1): 6-11.
- Risk, J. M., R. C. Macknight und C. L. Day** (2008). "FCA does not bind abscisic acid." *456*(7223): E5-E6.
- Rodriguez, P. L., G. Benning und E. Grill** (1998). "ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis." *FEBS Lett* **421**(3): 185-90.
- Rodriguez-Concepcion, M. und A. Boronat** (2002). "Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics 10.1104/pp.007138." *Plant Physiol.* **130**(3): 1079-1089.
- Rohde, A., M. Van Montagu und W. Boerjan** (1999). "The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3)* gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*." *Plant, Cell and Environment* **22**(3): 261-270.
- Saez, A., N. Apostolova, M. Gonzalez-Guzman, M. P. Gonzalez-Garcia, C. Nicolas, O. Lorenzo und P. L. Rodriguez** (2004). "Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling." *Plant J* **37**(3): 354-69.
- Saez, A., N. Robert, M. H. Maktabi, J. I. Schroeder, R. Serrano und P. L. Rodriguez** (2006). "Enhancement of Abscisic Acid Sensitivity and Reduction of Water Consumption in *Arabidopsis* by Combined Inactivation of the Protein Phosphatases Type 2C ABI1 and HAB1." *Plant Physiol.* **141**(4): 1389-1399.
- Saez, A., A. Rodrigues, J. Santiago, S. Rubio und P. L. Rodriguez** (2008). "HAB1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis." *Plant Cell* **20**(11): 2972-88.
- Saito, S., N. Hirai, C. Matsumoto, H. Ohgashi, D. Ohta, K. Sakata und M. Mizutani** (2004). "Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid." *Plant Physiol* **134**(4): 1439-49.
- Salazar, C., A. Z. Politi und T. Hofer** (2008). "Decoding of calcium oscillations by phosphorylation cycles: analytic results." *Biophys J* **94**(4): 1203-15.
- Sambrook, J. und D. W. Russell** (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Sanders, D., J. Pelloux, C. Brownlee und J. F. Harper** (2002). "Calcium at the crossroads of signaling." *Plant Cell* **14 Suppl**: S401-17.
- Schmidt, C., I. Schelle, Y. J. Liao und J. I. Schroeder** (1995a). "Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9535-9.

- Schmidt, R., J. West, K. Love, Z. Lenehan, C. Lister, H. Thompson, D. Bouchez und C. Dean** (1995b). "Physical map and organization of Arabidopsis thaliana chromosome 4." Science **270**(5235): 480-3.
- Schroeder, J. I., G. J. Allen, V. Hugouvieux, J. M. Kwak und D. Waner** (2001a). "Guard Cell Signal Transduction." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **52**: 627-658.
- Schroeder, J. I. und S. Hagiwara** (1990). "Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(23): 9305-9.
- Schroeder, J. I., J. M. Kwak und G. J. Allen** (2001b). "Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants." Nature **410**(6826): 327-330.
- Schumaker, K. S. und H. Sze** (1986). "Calcium transport into the vacuole of oat roots. Characterization of H⁺/Ca²⁺ exchange activity." J Biol Chem **261**(26): 12172-8.
- Schuster, S., M. Marhl und T. Hofer** (2002). "Modelling of simple and complex calcium oscillations. From single-cell responses to intercellular signalling." Eur J Biochem **269**(5): 1333-55.
- Schwartz, S. H., X. Qin und J. A. Zeevaart** (2001). "Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants." J Biol Chem **276**(27): 25208-11.
- Schweighofer, A., H. Hirt und I. Meskiene** (2004). "Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling." Trends Plant Sci **9**(5): 236-43.
- Seo, M., A. J. Peeters, H. Koiwai, T. Oritani, A. Marion-Poll, J. A. Zeevaart, M. Koornneef, Y. Kamiya und T. Koshiba** (2000). "The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12908-13.
- Shaner, N. C., M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson und R. Y. Tsien** (2008). "Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins." Nat Methods **5**(6): 545-51.
- Shani, U., A. Ben-Gal und L. M. Dudley** (2005). "Environmental implications of adopting a dominant factor approach to salinity management." J Environ Qual **34**(5): 1455-60.
- Sharp, R. E. und M. E. LeNoble** (2002). "ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress." J Exp Bot **53**: 33-37.
- Sheen, J.** (1996). "Ca²⁺-Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants." Science **274**(5294): 1900-1902.
- Sheen, J.** (1998). "Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 975-80.
- Sheen, J.** (2001). "Signal Transduction in Maize and Arabidopsis Mesophyll Protoplasts." Plant Physiol. **127**(4): 1466-1475.
- Shen, Q., P. Zhang und T. Ho** (1996). "Modular Nature of Abscisic Acid (ABA) Response Complexes: Composite Promoter Units That Are Necessary and Sufficient for ABA Induction of Gene Expression in Barley." Plant Cell **8**(7): 1107-1119.

Shen, Y. Y., X. F. Wang, F. Q. Wu, S. Y. Du, Z. Cao, Y. Shang, X. L. Wang, C. C. Peng, X. C. Yu, S. Y. Zhu, R. C. Fan, Y. H. Xu und D. P. Zhang (2006). "The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor." Nature **443**(7113): 823-6.

Shimazaki, K., M. Doi, S. M. Assmann und T. Kinoshita (2007). "Light regulation of stomatal movement." Annu Rev Plant Biol **58**: 219-47.

Shinozaki, K. und K. Yamaguchi-Shinozaki (2007). "Gene networks involved in drought stress response and tolerance." J Exp Bot **58**(2): 221-7.

Shukla, L. I., V. Chinnusamy und R. Sunkar (2008). "The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses." Biochim Biophys Acta **1779**(11): 743-8.

Siegel, R. S., S. Xue, Y. Murata, Y. Yang, N. Nishimura, A. Wang und J. I. Schroeder (2009). "Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in Arabidopsis guard cells." Plant J.

Sirichandra, C., A. Wasilewska, F. Vlad, C. Valon und J. Leung (2009). "The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action 10.1093/jxb/ern340." J. Exp. Bot. **60**(5): 1439-1463.

Sitte, P., H. Ziegler, F. Ehrendorfer und A. Bresinsky (1998). Strasburger, Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag.

Sneyd, J., K. Tsaneva-Atanasova, D. I. Yule, J. L. Thompson und T. J. Shuttleworth (2004). "Control of calcium oscillations by membrane fluxes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1392-6.

Somogyi, R. und J. W. Stucki (1991). "Hormone-induced calcium oscillations in liver cells can be explained by a simple one pool model." J Biol Chem **266**(17): 11068-77.

Spollen, W. G., M. E. LeNoble, T. D. Samuels, N. Bernstein und R. E. Sharp (2000). "Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production." Plant Physiol **122**(3): 967-76.

Staxen, I. I., C. Pical, L. T. Montgomery, J. E. Gray, A. M. Hetherington und M. R. McAinsh (1999). "Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1779-84.

Stone, S. L., L. A. Williams, L. M. Farmer, R. D. Vierstra und J. Callis (2006). "KEEP ON GOING, a RING E3 Ligase Essential for Arabidopsis Growth and Development, Is Involved in Abscisic Acid Signaling 10.1105/tpc.106.046532." Plant Cell: tpc.106.046532.

Stranges, S., J. Notaro, J. L. Freudenheim, R. M. Calogero, P. Muti, E. Farinaro, M. Russell, T. H. Nochajski und M. Trevisan (2006). "Alcohol drinking pattern and subjective health in a population-based study." Addiction **101**(9): 1265-76.

Sun, J., V. Cardoza, D. M. Mitchell, L. Bright, G. Oldroyd und J. M. Harris (2006). "Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation." Plant J **46**(6): 961-70.

- Szyroki, A., N. Ivashikina, P. Dietrich, M. R. Roelfsema, P. Ache, B. Reintanz, R. Deeken, M. Godde, H. Felle, R. Steinmeyer, K. Palme und R. Hedrich** (2001). "KAT1 is not essential for stomatal opening." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2917-21.
- Takeda, S., C. Gapper, H. Kaya, E. Bell, K. Kuchitsu und L. Dolan** (2008). "Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells." Science **319**(5867): 1241-4.
- Tan, X., L. I. Calderon-Villalobos, M. Sharon, C. Zheng, C. V. Robinson, M. Estelle und N. Zheng** (2007). "Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase." Nature **446**(7136): 640-5.
- Tang, Y., J. L. Stephenson und H. G. Othmer** (1996). "Simplification and analysis of models of calcium dynamics based on IP₃-sensitive calcium channel kinetics." Biophys J **70**(1): 246-63.
- Thorsness, P. E. und D. E. Koshland, Jr.** (1987). "Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate." J Biol Chem **262**(22): 10422-5.
- Tirichine, L., H. Imaizumi-Anraku, S. Yoshida, Y. Murakami, L. H. Madsen, H. Miwa, T. Nakagawa, N. Sandal, A. S. Albrechtsen, M. Kawaguchi, A. Downie, S. Sato, S. Tabata, H. Kouchi, M. Parniske, S. Kawasaki und J. Stougaard** (2006). "Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development." Nature **441**(7097): 1153-6.
- Trewavas, A. J. und R. Malhó** (1998). "Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network!" Current Opinion in Plant Biology **1**(5): 428-433.
- Uno, Y., T. Furihata, H. Abe, R. Yoshida, K. Shinozaki und K. Yamaguchi-Shinozaki** (2000). "Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11632-7.
- Uno, Y., M. A. Rodriguez Milla, E. Maher und J. C. Cushman** (2009). "Identification of proteins that interact with catalytically active calcium-dependent protein kinases from Arabidopsis." Mol Genet Genomics **281**(4): 375-90.
- Urao, T., T. Katagiri, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Hayashida und K. Shinozaki** (1994). "Two genes that encode Ca(2+)-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in Arabidopsis thaliana." Mol Gen Genet **244**(4): 331-40.
- Vahisalu, T., H. Kollist, Y. F. Wang, N. Nishimura, W. Y. Chan, G. Valerio, A. Lamminmaki, M. Brosche, H. Moldau, R. Desikan, J. I. Schroeder und J. Kangasjarvi** (2008). "SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling." Nature **452**(7186): 487-91.
- Veena, H. Jiang, R. W. Doerge und S. B. Gelvin** (2003). "Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression." The Plant Journal **35**(2): 219-236.
- Vilela, C. und J. E. McCarthy** (2003). "Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region." Mol Microbiol **49**(4): 859-67.

- Vitart, V., J. Christodoulou, J. F. Huang, W. J. Chazin und J. F. Harper** (2000). "Intramolecular activation of a Ca(2+)-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase." Biochemistry **39**(14): 4004-11.
- Voinnet, O.** (2009). "Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs." Cell **136**(4): 669-87.
- Wais, R. J., C. Galera, G. Oldroyd, R. Catoira, R. V. Penmetsa, D. Cook, C. Gough, J. Denarie und S. R. Long** (2000). "Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13407-12.
- Walter, M., C. Chaban, K. Schutze, O. Batistic, K. Weckermann, C. Nake, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schumacher, C. Oecking, K. Harter und J. Kudla** (2004). "Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation." Plant J **40**(3): 428-38.
- Wan, B., Y. Lin und T. Mou** (2007). "Expression of rice Ca(2+)-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses." FEBS Lett **581**(6): 1179-89.
- Wang, L. und S. R. Wessler** (1998). "Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene." Plant Cell **10**(10): 1733-46.
- Wang, X. Q., H. Ullah, A. M. Jones und S. M. Assmann** (2001). "G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells." Science **292**(5524): 2070-2.
- Ward, W. H. und G. A. Holdgate** (2001). "Isothermal titration calorimetry in drug discovery." Prog Med Chem **38**: 309-76.
- Webb, A. A. und A. M. Hetherington** (1997). "Convergence of the abscisic acid, CO₂, and extracellular calcium signal transduction pathways in stomatal guard cells." Plant Physiol **114**(4): 1557-60.
- Wiese, A., N. Elzinga, B. Wobbes und S. Smeekens** (2005). "Sucrose-induced translational repression of plant bZIP-type transcription factors." Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 272-5.
- Wu, Y., J. P. Sanchez, L. Lopez-Molina, A. Himmelbach, E. Grill und N. H. Chua** (2003). "The *abi1-1* mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action." Plant J **34**(3): 307-15.
- Xie, X., Y. Wang, L. Williamson, G. H. Holroyd, C. Tagliavia, E. Murchie, J. Theobald, M. R. Knight, W. J. Davies, H. M. Leyser und A. M. Hetherington** (2006). "The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity." Curr Biol **16**(9): 882-7.
- Xie, Z., E. Allen, N. Fahlgren, A. Calamar, S. A. Givan und J. C. Carrington** (2005). "Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes." Plant Physiol **138**(4): 2145-54.
- Xiong, L., Z. Gong, C. D. Rock, S. Subramanian, Y. Guo, W. Xu, D. Galbraith und J. K. Zhu** (2001). "Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*." Dev Cell **1**(6): 771-81.

- Xu, Z.-J., M. Nakajima, Y. Suzuki und I. Yamaguchi** (2002). "Cloning and Characterization of the Abscisic Acid-Specific Glucosyltransferase Gene from Adzuki Bean Seedlings 10.1104/pp.001784." Plant Physiol. **129**(3): 1285-1295.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und K. Shinozaki** (1993). "Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants." Mol Gen Genet **236**(2-3): 331-40.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und K. Shinozaki** (2006). "Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses." Annu Rev Plant Biol **57**: 781-803.
- Yamamoto, H., M. Inomata, S. Tsuchiya, M. Nakamura, T. Uchiyama und T. Oritani** (2000). "Early Biosynthetic Pathway to Abscisic Acid in *Cercospora cruenta*." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **64**(10): 2075-2082.
- Yang, L., Z. Liu, F. Lu, A. Dong und H. Huang** (2006a). "SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*." Plant J **47**(6): 841-50.
- Yang, T. und B. W. Poovaiah** (2003). "Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants." Trends Plant Sci **8**(10): 505-12.
- Yang, Y., R. Sulpice, A. Himmelbach, M. Meinhard, A. Christmann und E. Grill** (2006b). "Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(15): 6061-6.
- Yoshida, R., T. Umezawa, T. Mizoguchi, S. Takahashi, F. Takahashi und K. Shinozaki** (2006). "The Regulatory Domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 Interacts with ABI1 and Integrates Abscisic Acid (ABA) and Osmotic Stress Signals Controlling Stomatal Closure in *Arabidopsis*." J. Biol. Chem. **281**(8): 5310-5318.
- Young, J. J., S. Mehta, M. Israelsson, J. Godoski, E. Grill und J. I. Schroeder** (2006). "CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant." PNAS **103**(19): 7506-7511.
- Zhai, J., J. Liu, B. Liu, P. Li, B. C. Meyers, X. Chen und X. Cao** (2008). "Small RNA-directed epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*." PLoS Genet **4**(4): e1000056.
- Zhu, J. K.** (2002). "Salt and drought stress signal transduction in plants." Annu Rev Plant Biol **53**: 247-73.
- Zhu, S. Y., X. C. Yu, X. J. Wang, R. Zhao, Y. Li, R. C. Fan, Y. Shang, S. Y. Du, X. F. Wang, F. Q. Wu, Y. H. Xu, X. Y. Zhang und D. P. Zhang** (2007). "Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*." Plant Cell **19**(10): 3019-36.
- Zhu, Y., J. Nam, J. M. Humara, K. S. Mysore, L. Y. Lee, H. Cao, L. Valentine, J. Li, A. D. Kaiser, A. L. Kopecky, H. H. Hwang, S. Bhattacharjee, P. K. Rao, T. Tzfira, J. Rajagopal, H. Yi, Veena, B. S. Yadav, Y. M. Crane, K. Lin, Y. Larcher, M. J. Gelvin, M. Knue, C. Ramos, X. Zhao, S. J. Davis, S. I. Kim, C. T. Ranjith-Kumar, Y. J. Choi, V. K. Hallan, S. Chattopadhyay, X. Sui, A. Ziemienowicz, A. G. Matthyse, V. Citovsky, B. Hohn und S. B. Gelvin** (2003). "Identification of *Arabidopsis* rat mutants." Plant Physiol **132**(2): 494-505.

Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction 10.1093/nar/gkg595." Nucl. Acids Res. **31**(13): 3406-3415.

gaatcataagctagacaaagagaatggttttaacaaggtttacctgatctatcaagaatgagaaagatccatcatgacttgagcaagatcggttactgat
tcaagaacctgtagacaaagttagcaacttgcctaatgcaactctctgactctaccgtaattctctctgctcatTTTTTTTcttggctcatctggtctcgca
aactgaaaagaagatttcaggtatagcttgcacatataaagtacatagaggaatgatggctataaactgaaagaataaaacacatataagaagttggactat
cgcaaaatcatctctcaggtctatctgcttctccgatctcagaaatctcagattatctatctatccatcaggtatagatcatagagctgtaaat
aaagttttgagctcaaaaggtttctaaggtatgtagaaagttagcaagatcaaggttatctaaagttaaacactcaaatcaaatctctttgac
ttttcagatcatcttctgataatgtagtatttgacaacagtaggaaaaagccaatcagaagcatataacaacatcacagtgcatcaataaataagattctct
taagagattggagaatagtacaagaatgcatacctcagagatttaacatcatggaagggcacaatggcaagcaccacaaatgtaagccagctcataggtgt
cctagcttctctacaatttgcctaaacaactcaataggaactgacttcaagatttctgcaagctcaatagaacatggaataatgcaaacatctcaaatcaac
tcttttacctgaatctccttaaaattcgcaagagatgaaatctctacctagaaaactttcatgaatccatcatcctaaacacaaatcaagaatccttgta
gactatccaatgcaaaaacacacaaatagtataatctaccatccaactctatcagatttccgagcaatggaagagaaactctcgacagaattagcaaacac
atgatctgattgagatgttttttacctcatccagaagatcgatttcatagaactcagatgcgaaatccacaaaagcttcggataagcttccatctatcat
cttataatgcaatctccataaagatccagcgtgacttgagatctatctcaaatatgtctgcaacagcagcagcctgaagtgcaaacgacctcaatgtttat
cttccaaagcagctctctgggtgagctaggtttctgtaaatctctggaagaagattataaacggcaatctttatcatcaagccgactgttaagcactggaagat
ataaacctctctcagatctgtttgtgtaactctggaactctatctgcaagctcaatctctgcaagggcacaagatgagcaagctggatctctcaatctaaa
acaactatttccctcttcaagcagtgtagcacaagctctcatgattgctatctgctcogacatattcaattttacctaacgcaacctctctcatgatttc
cactggagataaagctcaaaatgtccacaaatctcagctcatctcactcagaatattgactttcattgagagaagagctgaattcgaagctgtattgtgtg
cacatactgtccagtttgcacacttcogataatctccactgataatctcogaaactgagatggggttgaagcaggtgtgcaaatctgttgaagctttgg
ttgattcatctttgcaaccgctggtttgagtttccatggttaagaatactctccggtggatctatgtagcttggTCAGTGGGAATGGATACTGTTCCCTT
TTGGTTGGTGGTGGCCACTCTCATCATCGCAGAAAATTCCTCAAAGTTTATTTTCCATCctgtaacatagttcctttcaaggtttcattacaagccggtt
tactgtttgagattttgattttgtagagagtgccacttaccATTGCGGTGTCACACTTCGGATATAACTTCTTTGATGCTAGCTTCACATCTCCCATTT
CCTTCATGGCACTTCCAACATCATCCCTAGTTATGTGCTattggattaccaaatagcattaaacattggtgctcataatagttacacacatttgaatctaat
cctcttgcaaaaaaaagaagaatgattgattcgtacactgaaaatgtaagaactctaccATTTTGTCTTTATCTAAGTGTGGAAATGCTTTGTGTACGTGCT
CATCTTGATGATAATTTGATCTATGCATTTGCGCAGAGATAAACTCATAGTAGTCAATTTGTTCCATACCACATCAGACTgaaagttatcatcatgtgt
ttcaaacctgtcttttcaagatcttaattcggcaaaaagagaagcaagatgctgaagataactcACGCTTCAACGAGTGTCTGAACTTCAGTTTCAGAGAGTC
TAGATCTAAGTCTACTTAGCCAGTTGGAGTTGTCATAAGTGATTGTCGGCTCTTATGGTATCCATATTCGAAACAAGGTTTTAAGACCTTTGATCTCT
TCTTCGGATAGACTCACCGGCTAACCTgcaaacagaaacacacaaattagatccccaaagttccggcactagtagatagagattttcaactgttagagaaaca
caagagatggaaagcctataagcagatgcataaattagtaataaagaagatttatttcaataattttgagctacgtgattacCTTTAGGGCTAGCTTCTT
LAGCTTTCTTAGCTCGGAATGTCTCATACTGATGATAACACAGTGTCTCAATAGGCTTGTCCGGTGTCTTCCCTTTGATCCAAAGGATGTTTataaac
ataagattgctacatattagtaaacattactcggtagacgacataaacctcaagctggtattcacattctctcaCAAGAACCCTGTCAGAGCTTAGCTGT
CTCTTAGGCTTCTCGTTAGCATCTCTTAAACAAGTCTTTCGGCTTTCAGATATAGAAGGCCATGGTTGGCTTTCAAAATCAATTTTCGATTTTAGAATCTC
ATCGAATATTTCTATCTGTCTacaaaaatagcatagattacagatcaaacctaaagaaagaagaagaaaaatcaagaatgtgtagctggaaggtctggt
accGGGCAAAAAGGAGGACTACCCGAGAGTAACTGATATAAACTCACTGCAACTCAAAATGTCGATTTCTTTCCGTAATCTCCGCTTAATCTAGGAG
CAACGTAGTAAGGACTCCAGCCACATCTCGGTAACCTTTTCctgtaattttggtttcacaacagataaacataaaaatcaaaaataaacgaaacataaacat
agtaaaactgtacaataataagaataaacctgattctatataaagatgagatcccactccctatgcatggaacataagtcaccaatctagctcatg
aataaagcaaaagctcagattttctgattcgttcaagacagctacatagaacacacaaatataaaacacactcogattcaaacactcaaacacactaataca
tcaatacactgaaagaatagatcaatctcaatgaacagagaacccccaaatcogattgcttggagcacaacagctctcatcgttactcgaacaaacagtagt
atactaaaagattttggttagacaactctatagaatccaaactaaataaacactttgattcgaacacactcaaacgcaacgcaatcatcaatacact
aagaatagatcaatgctcagctcactttctcaatgaaacacagaaactttcaaatcggattcctttatgcataaaccttcttctgctcagatgataatga
catcaagattcaatgaactcogtaagatgaattttagatctaaagagactctcogaagaacatctatagattctatagctaacCTTCTTCGATGAACCGGACAA
CCCGAAATCGGTTACTTTAAGCATGTCATTTCTCTTACTCGAGACAAGAATACTCAGGCTTGAGATCTCGATGAATCACACCCTCAAAATGCAAACTTC
GAACAACACTCACAAATAGACCTAATGATACCAGCAGCAGCTCTCTCAGAGTAATGACCCCGAGCTATAATCCTATCAAACTCACACCAGCACACAACCTC
ATAACCAAATGATATATTTGCTATCTCATAGCACTTTGATCTCAACAACTTTGGTTGTCCAAACAATGCTGATATCTGAATCTCTGTTTCACAT
TTCTTACTCCGCTGCTACTAATTAGCTTCTCTTGAGAACTGATTGCAAGCGTAAATGTTCCCACTGAAATCTCTTTACACATACGTAACTCAAACTCAACAC
CTCGACCTAATTTCTTTCCCAAGCTGTAATAATTTCTGATGCTTTCGAAGGTTTACCTAAAATCCTAATGCTTTCCCTTACTAAAATTTGCTCTGATAT
CGAATGAGATGGGTGTCGATGGAGTTGGGACTGATCAACGATATGGTTTGGAGTGGATTGATCGGAATTTGTTCTTTCCGGCCGCTGTTTGGATTTCGG
GTGTTACTGCTGAAGCAACCATtagtaaaagggagacttttctctctctgattgaaagaatagaagaagatLAGCTTgaggaattgattgagaaca
cattttgggtggtttagatgattgactggaactggaattgaaattatcagctctcaatcagctcctcaggtcttctgcaaatgtaattgaaatgaggaattg
gaattgtcggaaagtttgaattttgagctgatttttggataccccgaataaataatagaggtctctcagattgggctgctcagagctcctaaattgggctt
agatgccttaactcgggctttagattgattgattgattgataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataa
aattttggtagaagcaaaaagaataaagattttggtaataataaacggtttatttccaggttccggagtttagatttattcagtagaataataaagttc
gagctacaatacaaaatgatttccgatcagatttgaatatttttagctcagattatacaaaagtttacttaaaataatgaaattaaagtttaacttttaaaat
ctttaaattggttaagtttaaaaaaaatcattaaactatgaacacagaaatcgaattcagtttagttttggtttattcagtagtaccacaaactttcagttg
aatagtgtaacattcaagaacatgggacaacgggttagactcgtctacactttagaagctgggaaaaactagcacaacatctccttagatcaactattcgc
caaatgagacaaactatagctcactacacaacacacacacactccagcgtcacaactcttttggttcogataatcttccaaatcagcggatataatcaactttg
cgtgagcgaacgcacgggcatgggaaactccagctcccaacactcggctcaaaaataatcgacaagatagtcgcaacggcactcactcaatcaaacac
cagagatctcacactcgcagcagcggcctaaagctttggttctccatccactcaacatataaacctctattggtttattttcccaattccatgcttatcatt
ctttcaaaacttttaagcaaacagttgcatctcagtaactggtttttgtagaataatatttcaactcttcaaaaaacaaaatgtaactcgaactcgaactcaa
tactgtagcagttctgataattttggtttagtgctcacaagccaaatcaagtttggcaaaaaatcgctatagattataaaggattataaacctataaaaaac
tattgtaaatttactactaataaaaaaaacaaatttagLAGCTTannnnnaaaatttggttgattgctcacaagcgaattcaaatttggcaaaaatgct
gaactatagactataaaaatacaaaatagcagttgaaactaaatgcaacttttaactcttaaatcatagctcatcaaaaactatgacatgataaaaacaaag
aaagaattagaggtcaaacctcaccacaacatcogtaagtcacgggttaaaagggctaatggcttgaatagatgatacaaaactaaagacggcagcagatcgt
gattgaggaatgagttatgtaggcatgctcggctcttacagcttttccagctctcttccacacacatcogtttccatttattacattgaaattatattatta
catgagttataatataaattcgtatataatttccaaaatattagtaacaaaagcgtgtaacgcaattacaactatttttccctcgtcatgcttttaggggtgag
aatatcatgagtttttggcttgggaagaaacaaaatttaggtataaacattggttttataatgctctcogacatagtgagcagctacattatataaggaagct
caactccaaaacgtagaattttcaaacaggtctcogacatctacctgctatataacttaggattatgctgtagaagcgaatagctatagcatggt
gatataactttagtagagcgttagagcatataaattcgttcatccagtttaactgcttttccacaactataaattgtaaatagctatagctgcatatgca
gaaaattttctcagcaagtagatacatgtagcaacaaaacaaatatttggctctcttttggtagcagactcgtgcaactgaggaagcagcagcagatggt
tgacgaaattttgcttagctcagtgtaacaaaaaaacagatttattggtttgctttttagaatttagaactggtatttcatcaaatattataatcca
ttttgacatagtttaattatctatgtagctgtcacttaaaatagctatttttaataataaattaaacatcacataatttttgataaaaacatatttttcaac
ttctcogactgcttaacotaaatccccagcctaaataaacagcctatgcaaggttttttgtagcogactgtttccacaaaatcaatttcaatatacactc
gacaaatcaatcttagatctttccatgcttcaagtttttagccggagctccccaaatcaacgcaacttcccttttttttttttttgaataccggaagttc
tggaaactcgtaatccctcagggcccgaactacatcatgtaataatagttttgcaaaaacgtcaatcgaacggggcactctLAGCTTcgcttagggctctat
accaattgagctcagggcacttgggtatttttaaccgaacttccagactacacaaaataatttatttggttccacaaaatttaagtagattataaaaatataagaca
aaaaaaatcaagttcaTCAAACTTGAAGAGAGAAGAGGAGGAGGAAAGTACAGAGATAGTTCGAGAAGAAGAAGTGAAGAAGAAGAACACAGAACACCTTTAA
AGATTTGAGGAAACGAGTGAAGAATATTGTCATGATACAGTGTGGTCTTCCCTCAGCTTCTGAGCTTCTTACCAATCTCATTTATCCCAACTCTTGA
TCATAATCAACGGTCCAGATGATCTCCCTCTGTTGATGCTGTCTGGCTTCTGCTTACGGCTCGTTTAAAACCTTTTGAATAGAAATGCAAGCTCTGTGTA
ATTAGCTTTGAGGGTCTCTTCTCCATCTTTGTTGACTCGTATGACTATTCTCACCATTAAATGCATtagattctatctctttttttaggtctcttctct
atataattgtagtataagaagaatgagtagaactaaatcaacagcagaagatataatagtgaaagatgggagagaagaagagacacatcagtaggattta
ttaattgagattataaataattatgtagtgcataacactgtaggatttagtaaaaattttccagttgggttggcaagctataatctctacacagga
gagttgtagcgttagtttttagagtagaataacttggaacaaaatgagatattggcttgaaaaaaacatcccaaggggtaaaaatgtttatttactatttta
gattgaaaaattatagtttatttatacaaatattcaacatattggaattaaagtagatttataacgtttacaacaaacatctattttttagatggaag
aagattcaatttgcacacataatgaataatcagtagataaccttcaactcagaagagtttctgaattaaaataataatataatctcaataaaaatctc
tcaaaatcaattgactctatttccaaataaagaaggagagaaagaataatatttttaattttttggtttatctgtagtagtataactggaacaaag
ttgaagtaatttagttttagtttcttattctaaaagcatattcaatgatttctctattttcttatttttagatatttttttagagagggcact
ttgttccaaaaatagactaatctctattgattttctatttttagagaaatcaactagtagtaaaatcaactcaattttctcaaaataaagaagaatataag
tgtgcaattagagatggtctaaattctaatgttttaaacaaatagaccatataattgtagtttatacaagataaaaacatattagagggcggccatcacat
caagaacttaaatttggttgcactcaaatgattataaacatcaacttttaacttttaattttagatatttttagtcaattttgctttgctttt
ggccttcaactttggtggtatttttaggcaactctgtagcagctcttttctaaagtacogtaggagcgaacatgataaagattctctcagct
aatagtagtagcagtagaatttataatcatgattgatttttaactcgtctcaacgttcogataatgatttaactagtagcaccatgataaaaacttataacta
ctcttctggttcttttctgataaaatttaaaatcccttcaactcttcaaatcogtagcagttttgagattttagattttccacacattttaagaataatcaat

A3 Sequenzalignment der CPK23 und CPK21 Protein-Sequenz

Alignment der Aminosäuresequenz der CPK23 Proteine aus *Landsberg erecta* und *Columbia* sowie des CPK21 Proteins

	B	A	D	AVG	GOOD
*					
Col	:	99			
Ler	:	99			
CDPK_21	:	99			
Col		M	G	C	F
Ler		M	G	C	F
CDPK_21		M	G	C	F
Cons		*	*	*	*
Col		S	I	P	I
Ler		S	T	P	I
CDPK_21		S	N	P	V
Cons		*	*	*	*
Col		G	L	G	I
Ler		G	L	G	I
CDPK_21		Q	F	G	I
Cons		.	*	*	*
Col		V	V	E	K
Ler		V	I	K	G
CDPK_21		I	V	E	K
Cons		.	*	*	*
Col		V	Q	I	C
Ler		V	Q	I	C
CDPK_21		V	Q	I	C
Cons		.	*	*	*
Col		G	S	P	Y
Ler		G	S	P	Y
CDPK_21		G	S	A	Y
Cons		*	*	*	*
Col		K	C	E	I
Ler		K	C	E	I
CDPK_21		K	C	E	I
Cons		*	*	*	*
Col		E	K	P	I
Ler		E	K	P	I
CDPK_21		E	K	P	I
Cons		.	*	*	*
Col		R	S	G	T
Ler		R	S	G	T
CDPK_21		R	S	G	T
Cons		.	*	*	*
Col		H	R	Y	K
Ler		H	R	Y	K
CDPK_21		H	R	Y	K
Cons		.	*	*	*
Col		E	V	D	T
Ler		E	V	D	T
CDPK_21		E	V	D	T
Cons		.	*	*	*

A4 Proteinsequenz des CPK23 uORFs

MRLIIPVVPVKHIQPPQMCSQSNSSKLIFFFNPRRTKSLLLY*

Das Prolin⁶ verändert sich durch die *gca2* Mutation in ein Serin.

A5 Aminosäuresequenz von RCAR1

MMDGVEGGTAMYGGLETVQYVRTHHQHLCRENQCTSALVKHIKAPLHLVW^{S51}L
VRRFDQPQYKPFVSRCTVIGDPEIG^{S79}LREVNKSGLPATTSTERLELLDDEEHIL
GIKIIGGDHRLKNYSSILTVHPEIIEGRAG^{T139}MVIES^{S144}FVVDVPQGNTKDETCYFVE
ALIRCNLKSLADVSERLASQDITQ*

Die im Rahmen dieser Arbeit mutierten Aminosäuren sind rot gekennzeichnet

B1 Verwendete Primer und ihre Registrierungsnummer in der Primerliste

Name	Sequenz	Verwendung	Primerliste #
T4B21_15A for	5'-gaa gtt gga caa tat cgc-3'	Sequenzierung	4
T4B21_15A rev	5'-agt gct taa caa tgc ggc-3'	Sequenzierung	5
T4B21 15.1 for	5'-aat tgc tgc aca gaa cgc-3'	Sequenzierung	6
T4B21 15.1 rev	5'-ctg aaa ctg aag ttc agc-3'	Sequenzierung	7
T4B21_15B for	5'-tcg aag gct gta ttg tgc-3'	Sequenzierung	8
T4B21 15.2 for	5'-tca aga tct taa ttg cgg-3'	Sequenzierung	9
T4B21 15.2 for new	5'-aga cta taa gcg aga tgc-3'	Sequenzierung	10
T4B21 15.2 rev	5'-agt gta ttg atg att gcg-3'	Sequenzierung	11
T4B21 15.2 rev new	5'-tat aca tcc tac tct gcg-3'	Sequenzierung	12
T4B21_15C for	5'-aga gtc cca tct cta tgc-3'	Sequenzierung	13
T4B21_15C rev	5'-gag aat ttc ttg ttc tcg-3'	Sequenzierung	14
T4B21 15.3 for	5'-tat agc taa cct tct tcg-3'	Sequenzierung	15
T4B21 15.3 rev	5'-agt cta cga aaa gtc tcc-3'	Sequenzierung	16
14Prom_for	5'-aga gct atc agt cat ttg-3'	Sequenzierung	50
14Prom_1rev.	5'-ctc tat act aac gtt agt c-3'	Sequenzierung	51
14Prom_2rev.	5'-tca agg aca aag tta tgc-3'	Sequenzierung	52
MF_for	5'-gac taa cgt tag tat aga g-3'	Sequenzierung	53
MF_rev	5'-atc tga gat tct gag gat c-3'	Sequenzierung	54
14.1_for	5'-tct aac ttt ctc atc agc-3'	Sequenzierung	58
14.1_rev	5'-tct tgg caa acc aac tgg-3'	Sequenzierung	59
14.2_for	5'-aag cta ata aca tga agc-3'	Sequenzierung	60
14.2_rev	5'-atc att tga agt caa agc-3'	Sequenzierung	61
RT13+15_rev.	5'-aag aaa ttc tca ggc ttg-3'	RT-PCR	81
RT15_for	5'-tcg act ggg aac aat tac-3'	RT-PCR	82
RT13_for	5'-cat cag cag att tca ac-3'	RT-PCR	83
GCA2_DeCap_for	5'-gag ttt tcc ggt gtt tac tgc tga agc aac-3'	DeCAP-Marker	102
GCA2_DeCap_rev	5'-caa aga ccg tag gac ttg atg aga ctg aga att-3'	DeCAP-Marker	103
Act_for	5'-tgg gat gac atg gag aag at-3'	RT-PCR	108
Act_rev	5'-ata cca atc ata gat ggc tgg-3'	RT-PCR	109
GCA2_pure_for	5'-ttg tag tcg acc aaa gtc tta ggc cgt cg-3'	Klonierung	110
GCA2_pure_rev	5'-ttg tag tcg aca tcc cat cag gat agt ac-3'	Klonierung	111
CAPCPK23_for	5'-ttc agc agt aaa cac cgg-3'	CAPS-Marker	114
CAPCPK23_rev	5'-gtc ttc aca tct tct cta c-3'	CAPS-Marker	115
Lücke_for	5'-tgt ttg atg tgt cac aag cc-3'	Sequenzierung	118
Lücke_rev	5'-gtt cga ttg acg ttt gtg ac-3'	Sequenzierung	119
GCA2_RT_for	5'-cat cga cac cca tct cag-3'	RT-PCR	124
GCA2_RT_rev	5'-cgt agt aag gac tcc cag-3'	RT-PCR	125
GCA2_AscI_for	5'-ttg ggc gcg cca aag tct tag gcc gtc gtc g-3'	Klonierung	126
GCA2_AscI_for	5'-ttg ggc gcg cca aag tct tag gcc gtc gtc g-3'	Klonierung	126
GCA2_AscI_rev	5'-ttg ggc gcg ccg tcg aca tcc cat cag gat ag-3'	Klonierung	127

Name	Sequenz	Verwendung	Primerliste #
CAP_er(Ddel)_for	5'-gag ttt att ctg tgc caa gtc cct g-3'	CAPS-Marker	128
CAP_er(Ddel)_rev	5'-cta atg tag tga tct gcg agg taa tc-3'	CAPS-Marker	129
mut_stopa_for	5'-gct tgc aaa tcg att ctc tag agg aag cta att agt gag cag g-3'	Klonierung	132
mut_stopa_rev	5'-cct gct cac taa tta gct tcc tct aga gaa tcg att tgc aag c-3'	Klonierung	133
GCA2_Intron_rev	5'-aac cta tca aac gca cgc-3'	RT-PCR	134
Seq_new_for	5'-gac ttt ggt tct cca tcc ac-3'	Sequenzierung	135
Seq_new_rev	5'-tac caa gtg cgg tga gct c-3'	Sequenzierung	136
Gca2_mut1_for	5'-ccg tag gac tcy aty aga ccy ata att tca att cca gtt cca gtc- 3'	Klonierung	137
Gca2_mut1_rev	5'-gac cyg acy tcy aat cya aat tat cag tct cat caa gtc cta cgg- 3'	Klonierung	138
GCA2_Intron_2_rev	5'-aat gtg tta gct tga agg tc-3'	RT-PCR	141
pGCA2_for(SacII)	5'-ttg tac cgc gga gaa cca aag tct tag g-3'	Klonierung	165
pGCA2_rev(BamHI)	5'-ttg tag gat cct aaa gga gga gac ttt tcg-3'	Klonierung	166
FT_for	5'-aag cag agt tgt tgg aga cg-3'	RT-PCR	173
Ft_rev	5'-aga tat tct cgg agg tga gg-3'	RT-PCR	174
Mod_LUC_for	5'-ttg tag gat cct aaa atg gaa gac gcc aaa aac ata-3'	Klonierung	207
Mod_LUC_rev	5'-aag gaa ttc caa gct cgg at-3'	Klonierung	208
DS5-1	5'-acg gtc ggg aaa cta gct cta c- 3'	T-DNA spezifisch	265
GCA2_35S(SalI)_for	5'- ttg tag tcg aca tgg gtt gct tca gca g-3'	Klonierung	293
GCA2_BamHI_for	5'-ttg tag gat tca tgg gtt gct tca gca gta a-3'	Klonierung	301
GCA2_noStop_Smal_r	5' - ttg tac ccg gcc gtg gaa tgg ata ctg ttt cc-3'	Klonierung	303
GCA2_SacI_rev	5'-ttg tag agc tct cag tgg aat gga tac tgt t-3'	Klonierung	309
GCA2_VK_SacI_rev	5'-ttg tag agc tct tac ttc ata cg	Klonierung	399
LUC_BamHI_for	5'-ttg tag gat ccc gcc aaa aac at	Klonierung	400
35s_SacII_for	5'-ttg tac cgc ggt ccc cag att ag	Klonierung	402
35s_XbaI_rev	5'-ttg tat cta gat aga gtc ccc cg	Klonierung	403
5'UTR_XbaI_for	5'-ttg tat cta gac aaa att caa aa	Klonierung	404
5'UTR_BamHI_rev	5'-ttg tag gat cca tta gta aag ga	Klonierung	405
Nos_ter_SalI_rev	5'-ttg tag tcg act cat cta tgt ta	Klonierung	425
T4B21-15_for	5'- cta aaa act ccc taa tat c-3'	Mapping	nicht in der Primerliste
T4B21-15_rev	5'- caa tgt aat aaa tgg aaa atg-3	Mapping	nicht in der Primerliste
T4B21-M_for	5' -tag att gaa gat agt ctc g-3'	Mapping	nicht in der Primerliste
T4B21-M_rev	5'-gat ctt caa ggt tta tgc c-3'	Mapping	nicht in der Primerliste
T19J18-M_for	5'- aga aga ctt cta ttg tcg g- 3'	Mapping	nicht in der Primerliste
T19J18-M_rev	5' - cac cca aga tat acc agc-3'	Mapping	nicht in der Primerliste
2G3_for	5'-cgc gta tct aat ctt atc g-3'	Mapping	nicht in der Primerliste
2G3_rev	5'- tat tgc cct gtc ttt tag c -3'	Mapping	nicht in der Primerliste

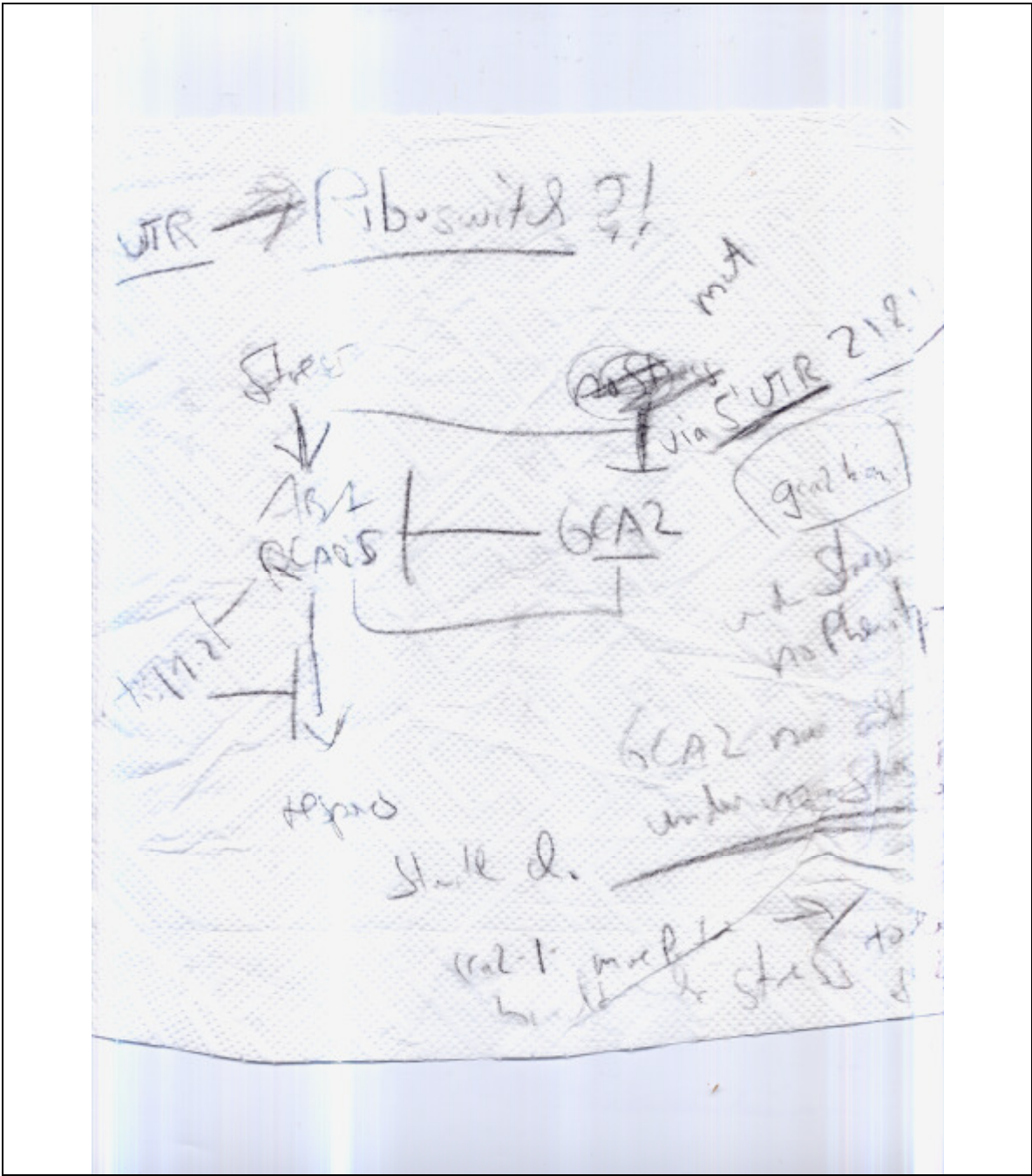
B2 Klonierte / verwendete Konstrukte und Registrierung in der Stammsammlung

Konstrukt	Verwendung	Stammsammlung #
leere DH5a-Zellen	Herstellung kompetente Zellen	62
leere XL1 blue-Zellen	Herstellung kompetente Zellen	120
pSK	Klonierung	400
pSKAscl	Klonierung	425
pBI121Ascl	Klonierung	427
pSK35SS1LUC	Klonierung, Reporterplasmid	665
pBI121	Klonierung	812
pBI221	Klonierung	813
pMP90	Kontrollplasmid zum `floral dip`	845
pSKAsclRAB18::LUC	Reporterplasmid für transiente Expression	878
pSKAsclRD29B::LUC	Reporterplasmid für transiente Expression	880
pSK35S::GUS	DH5a, EC	883
pQE30::RCAR1	Proteinexpression	1168
pSPYCE-35S/pUC-SPYCE	Split-YFP-Interaktion	1238
pSPYNE-35S/pUC-SPYNE	Split-YFP-Interaktion	1240
pARR6::LUC	Reporterplasmid für transiente Expression	1280
pBI221-35S::RCAR1	Effektorplasmid für die transiente Expression	1289
pSpyNe::35S::RCAR1	Klonierung, Split-YFP-Interaktion	1316
pSpyCe::35S::RCAR1	Klonierung, Split-YFP-Interaktion	1317
pSKAscl::pRD29b::GUS	Klonierung	1323
pSK::GCA2	Effektorplasmid für die transiente Expression	1333
pSK::35S::EGFP	Klonierung	1338
pSK::GCA2mutSTOP	Kontrollplasmid für transiente Expression	1344
pSK::gca2	Effektorplasmid für die transiente Expression	1346
pBI121Ascl::GCA2	Komplementationsanalyse	1348
pBI121Ascl::gca2	Komplementationsanalyse	1351
pBI121Ascl::GCA2	gleiches Konstrukt wie 1348 in <i>A. tumefaciens</i>	1352
pBI121Ascl::gca2	gleiches Konstrukt wie 1348 in <i>A. tumefaciens</i>	1353
pSKAscl::EGFPocs	Klonierung	1400
pSK::pGCA2::GUS	Klonierung	1409
pSK::pgca2::GUS	Klonierung	1411
pSKAscl::pGCA2::GCA2::GFP	transient Lokalisation von Fusionsproteinen	1424
pSKAscl::pGCA2::gca2::GFP	transient Lokalisation von Fusionsproteinen	1426
pBI112::PGCA2::GCA2::GFP	Expression von Fusionsproteinen in Pflanzen	1436
pBI112::PGCA2::GCA2::GFP	Expression von Fusionsproteinen in Pflanzen	1438
pSK::pGCA2::LUC	Reporterplasmid für transiente Expression	1440
pSK::pgca2::LUC	Reporterplasmid für transiente Expression	1442
pBI112::PGCA2::GCA2::GFP	selbes Plsmid wie 1436 in <i>A. tumefaciens</i>	1466
pBI112::PGCA2::GCA2::GFP	selbes Plsmid wie 1436 in <i>A. tumefaciens</i>	1467

Konstrukt	Verwendung	Stammsammlung #
pBI121bar::GCA2	Komplementationsanalyse	1543
pBI121bar::GCA2	Komplementationsanalyse	1545
pBI121bar::gca2	gleiches Konstrukt wie 1543 in <i>A. tumefaciens</i>	1547
pBI121bar::gca2	gleiches Konstrukt wie 1545 in <i>A. tumefaciens</i>	1548
5IC15	Cosmid	1560
pQE70::ABI2	Proteinexpression	2023
pGAD::GCA2	Y2H	2102
pGAD::RCAR3	Y2H	2103
pGAD::RCAR1	Y2H	2104
pGBT::ABI1	Y2H	2122
pGBT::ABI2	Y2H	2123
pBridge::GCA2	Y2H	2124
pSpyNe::35S::GCA2	Split-YFP-Interaktion	2140
pSpyCe::35S::GCA2	Split-YFP-Interaktion	2143
pSK::35S::GCA2::GFP	transient Lokalisation von Fusionsproteinen	2146
pBI221-35S::RCAR1-S51D	Effektorplasmid für die transiente Expression	2167
pBI221-35S::RCAR1-S79D	Effektorplasmid für die transiente Expression	2169
pBI221-35S::RCAR1-T139D	Effektorplasmid für die transiente Expression	2170
pBI221-35S::RCAR1-S144D	Effektorplasmid für die transiente Expression	2171
pBI221-35S::RCAR1-S51A	Effektorplasmid für die transiente Expression	2172
pBI221-35S::RCAR1-S79A	Effektorplasmid für die transiente Expression	2173
pBI221-35S::RCAR1-T139A	Effektorplasmid für die transiente Expression	2174
pBI221-35S::RCAR1-S144A	Effektorplasmid für die transiente Expression	2175
pHannibal::RCAR1	RNAi-Konstrukt für transiente Expression	2192
pHannibal::ACO2	RNAi-Konstrukt für transiente Expression	2232
pSK::p35S::GCA2-5' UTR::LUC	Reporterplasmid für transiente Expression	2392
pSK::pGCA2::LUCmod	Reporterplasmid für transiente Expression	2448
pSK::pgca2::LUC mod	Reporterplasmid für transiente Expression	2450
pBI221::35S::GCA2	Effektorplasmid für die transiente Expression	2452
pBI221::35S::GCA2-VK	Effektorplasmid für die transiente Expression	2454
psK::p35S::gca2-5' UTR::LUC	Reporterplasmid für transiente Expression	2456

C Modell

Die vorläufige Version des in dieser Arbeit diskutierten Modells



LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name :	Arthur Stephan Korte
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	07.03.1976
Geburtsort:	Hamburg

Ausbildung

1986 – 1995	Stormarnschule, Gymnasium der Stadt Ahrensburg
Juni 1995	Abitur
1996 – 1997	Zivildienst, Jugendherberge Auf dem Stindtfang, HH
1997 – 2004	Studium der Biologie an der Universität Freiburg Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, (AG Prof. P. Nick) Thema: „Charakterisierung von kGAP, ein Interaktionspartner von RanGAP in <i>Arabidopsis thaliana</i> “
Juni 2004	Abschluss als Diplombiologe
Feb 2005 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Botanik der TU München (AG Prof. E. Grill)

Publikationen

Blum, R., A. Beck, A. Korte, A. Stengel, T. Letzel, K. Lenzian und E. Grill (2007). "Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates." Plant J **49**(4): 740-9.

Ma, Y., I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann und E. Grill (2009). "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors." Science **324**(5930): 1064-8.

Moes, D., A. Himmelbach, A. Korte, G. Haberer und E. Grill (2008). "Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis*." Plant J **54**(5): 806-19.

Riemann, M., C. Gutjahr, A. Korte, B. Danger, T. Muramatsu, U. Bayer, F. Waller, M. Furuya und P. Nick (2007). "GER1, a GDLS motif-encoding gene from rice is a novel early light- and jasmonate-induced gene." Plant Biol (Stuttg) **9**(1): 32-40.

Riemann, M., A. Müller, A. Korte, M. Furuya, E. W. Weiler und P. Nick (2003). "Impaired induction of the jasmonate pathway in the rice mutant *hebiba*." Plant Physiol **133**(4): 1820-30.

DANKSAGUNG

Nachdem dies wahrscheinlich die meist gelesene Seite der ganzen Arbeit sein wird, will ich mich bemühen, trotz der doch knapp bemessenen Zeit, mich noch mal bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, in angemessener Weise zu bedanken. Sollte der Eine oder Andere sich in der folgenden Aufzählung nicht wieder finden, ist dies keiner persönlichen Antipathie geschuldet, sondern einzig meiner derzeitigen Geisteslage....

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Dr. Erwin Grill für die Überlassung des spannenden Themas, obschon es sich mehr gewehrt hat, als zu Beginn der Arbeit angekündigt wurde. Ich hatte immer ein offenes Ohr bei Ihm, auch wenn ich diverse Angebote eines Freiflugs zum Mond (*one way*) bekommen habe.

Großer Dank gilt auch Dr. Alex Christmann, ohne den das ABA-Labor nicht das wäre, was es ist. Er hatte immer Zeit für meine Fragen und mit seiner ruhigen und gelassenen Art stellte er einen für mich unerlässlichen Gegenpool dar.

Meinen Kollegen Dr. Jana Wünschmann und Dr. Danièle Moes: Bald hab ich es auch geschafft.

Beate, die mir immer hilfsbereit zur Seite stand.

Aber auch allen anderen Kollegen im Labor, ob Wissenschaftler, TA, Klonierer, Gärtner.... Besonders erwähnen will ich in diesem Zusammenhang:

Welli, dass ich nicht mehr alleine im GCA2-Universum umherirren muss.

Simone Demmel für die vielen verpassten Chancen eines Wochenendes im Romantikhotel und den Polen für genügend Stoff. In einer Studie zeigte sich, dass sowohl das physische, als auch das psychische Wohlbefinden deutlich durch den Konsum von Alkohol zunimmt (Stranges *et al.* 2006). Aber man sollte nie mehr als 2,9 drinks/day konsumieren, gell....

Einigen zeitgenössischen russischen Fantasy-Autoren möchte ich für ihre Übereinstimmung mit diesem Befund danken...

Meinen Kletterkumpels (Gerhadt, Aric, Olli etc...), ohne das dienstägliche Training wäre ich völlig aus der Form gekommen.

Jana und Pamela für die Beseitigung der vielen Störungen in dieser Arbeit .

Meiner Frau und meinen Kindern. Während der Doktorarbeit noch ein guter Familienvater sein zu wollen ist nicht immer einfach und verlangt viel Toleranz von der Familie (wie viel schöne Wochenenden haben wir nicht gemeinsam draußen in der Natur, sondern ich im Labor verbracht ?). Und trotzdem würde ich es immer wieder so machen. Ein Leben ohne meine Familie kann ich mehr nicht mehr vorstellen.

Und für alle die es noch nicht wissen, habe ich nebenbei noch mit Erwin die Wirkung von Alkohol analysiert (Erwin und Korte 1988).

Der Schluss soll, auf Wunsch meiner Kinder, eine Hommage an ein Gespenst meiner Heimatstadt Ahrensburg werden:

Ich geh jetzt in die (freie) Wirtschaft und trink ein Bier, jawohl!