

**DIE ROLLE DER *ARABIDOPSIS THALIANA*
PROTEINPHOSPHATASE PP2C5
IN DER PFLANZLICHEN ANTWORT AUF
BIOTISCHEN UND ABIOTISCHEN STRESS**

der Fakultät für Biologie

der **EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN**

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

von

ANITA KATRIN BROCK

aus Freiberg

vorgelegte

DISSERTATION

2009

Tag der mündlichen Prüfung:	12.11.2009
Dekan:	Prof. Dr. Hanspeter A. Mallot
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thorsten Nürnberger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Harter

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Hormonelle Steuerung der Anpassung von Pflanzen an Umweltbedingungen	1
1.2	Signaltransduktion als Voraussetzung für pflanzliche Stressantworten	3
1.2.1	Die Rolle von Hormonen in Signaltransduktionsnetzwerken am Beispiel von Ethylen	3
1.2.2	Signaltransduktionskaskaden nach PAMP-Erkennung.....	6
1.2.3	„Mitogen-activated protein kinase“ (MAP-Kinase)-Kaskaden.....	9
1.2.4	Protein-Phosphatasen	10
1.3	Ziel dieser Arbeit.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide und Isotope	16
2.1.2	Nährmedien	16
2.1.3	Bakterienstämme	18
2.1.4	Vektoren	19
2.1.5	Oligonukleotide.....	19
2.1.6	Arabidopsis thaliana Linien	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Anzucht von Arabidopsis thaliana	20
2.2.2	Anzucht von <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
2.2.3	Kultivierung von Bakterien.....	21
2.2.4	Kultivierung von Hefen.....	21
2.2.5	DNA-Analytik.....	21
2.2.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	21
2.2.5.2	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen nach Edwards.....	22
2.2.5.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	22
2.2.5.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.5.5	Genotypisierung	23
2.2.5.6	Mutagenese-PCR.....	23
2.2.5.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.2.5.8	Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.2.5.9	Klonierung.....	25
2.2.5.10	Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	25
2.2.5.11	Sequenzierung	26
2.2.6	RNA-Analytik	26
2.2.6.1	RNA-Isolierung.....	26
2.2.6.2	Semiquantitative RT-PCR.....	26
2.2.6.3	Real-Time-PCR.....	27
2.2.7	Protein-Analytik	27
2.2.7.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	27
2.2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.2.7.3	Western Blot.....	27
2.2.7.4	MAP-Kinase Assay	28
2.2.7.5	Hefe-2-Hybrid-System	29
2.2.7.6	Split-YFP-System	30
2.2.7.7	Transiente Expression von Proteinen in <i>Nicotiana benthamiana</i>	31

2.2.7.8	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.2.8	Behandlung von Pflanzen.....	32
2.2.8.1	Infiltration von Substanzen in Pflanzen	32
2.2.8.2	Pathogenassay mit <i>Pseudomonas syringae</i>	32
2.2.8.3	Pathogenassay mit <i>Alternaria brassicicola</i>	32
2.2.8.4	Pathogenassay mit <i>Botrytis cinerea</i>	33
2.2.8.5	Pathogenassay mit <i>Erysiphe pisi</i>	33
2.2.8.6	Keimungsassay	33
2.2.8.7	Trockenstressexperiment.....	33
2.2.8.8	Messen der Stomataöffnungen	34
2.2.8.9	Behandlung von Keimlingen mit ABA.....	34
2.2.8.10	Wurzellängenmessungen.....	34
2.2.8.11	Kreuzungen	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Identifizierung von negativen Regulatoren der stressinduzierten MAP-Kinasen MPK3, MPK4 und MPK6.....	36
3.2	Transkriptionelle Expression verschiedener PP2Cs.....	36
3.3	Interaktion der Phosphatase PP2C5 mit stressinduzierten MAPKs	40
3.3.1	Co-Lokalisationsstudien.....	40
3.3.2	Interaktionsstudien mittels Split-YFP	41
3.3.3	Interaktionsstudien mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems.....	44
3.4	Charakterisierung von PP2C-Knockoutlinien.....	46
3.5	Charakterisierung weiterer Knockoutlinien	52
3.6	Regulation von MAPKs durch die PP2C5 und AP2C1	59
3.7	Funktion der PP2C5 in der pflanzlichen Immunantwort	63
3.8	Funktion der PP2C5 in der Antwort auf abiotischen Stress.....	67
4	Diskussion	75
4.1	Die Rolle der PP2C5 in der Regulation von stressinduzierten MAPKs	75
4.2	Die Rolle der PP2C5 und der AP2C1 in der Pathogenabwehr von <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
4.3	Die Rolle der PP2C5 und AP2C1 in ABA-Signalwegen.....	80
5	Zusammenfassung.....	86
6	Literatur.....	88
7	Anhang	A

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1:	Modell des Ethylen-Signaltransduktionswegs in Arabidopsis.....	5
Abbildung 1-2:	Modell der Flagellin-Erkennung und Signaltransduktion in Pflanzen.....	8
Abbildung 1-3:	Topographisches Kladogramm und Domänenstruktur der <i>Arabidopsis</i> PP2Cs, basierend auf Sequenzvergleichen (Schweighofer <i>et al.</i> 2004)...	12
Abbildung 2-1:	Lokalisation einer T-DNA-Insertion sowie der Genotypisierungsprimer.....	23
Abbildung 3-1:	Relative Transkriptakkumulation der Phosphatasen <i>PP2C5</i> (<i>At2g40180</i>), <i>AP2C1</i> (<i>At2g30020</i>), <i>AP2C2</i> (<i>At1g07160</i>) und <i>AP2C4</i> (<i>At1g67820</i>) nach Behandlung mit PAMPs (A), verschiedenen Pathogenen (B), Pflanzenhormonen (C) und abiotischem Stress (D).....	37
Abbildung 3-2:	Analyse der Transkriptlevel der Phosphatasen <i>PP2C5</i> (A), <i>AP2C1</i> (B), <i>AP2C2</i> (C) und <i>AP2C4</i> (D) durch quantitative Real-Time-PCR.....	39
Abbildung 3-3:	Lokalisationsstudien der <i>PP2C5</i> sowie der MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten.....	41
Abbildung 3-4:	Interaktion von PP2Cs mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 im Split-YFP-System.	42
Abbildung 3-5:	Aminosäuresequenz des möglichen Kinaseinteraktionsmotivs (KIM) der <i>PP2C5</i> sowie verschiedene Mutationen.	43
Abbildung 3-6:	Interaktion der <i>PP2C5</i> mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 im Hefe-2-Hybrid-System.....	45
Abbildung 3-7:	Charakterisierung der <i>pp2c5-1</i> und <i>pp2c5-2</i> T-DNA-Insertionslinien. ...	47
Abbildung 3-8:	Charakterisierung der <i>ap2c1-1</i> und <i>ap2c1-2</i> T-DNA-Insertionslinien. ...	49
Abbildung 3-9:	Charakterisierung des <i>pp2c5-1/ap2c1-1</i> Doppelknockouts.	51
Abbildung 3-10:	Charakterisierung der <i>ap2c2</i> T-DNA-Insertionslinie.....	52
Abbildung 3-11:	Charakterisierung der <i>ap2c4</i> T-DNA-Insertionslinie.....	53
Abbildung 3-12:	Charakterisierung der <i>dsptp1-1</i> und <i>dsptp-2</i> T-DNA-Insertionslinien. ...	55
Abbildung 3-13:	Charakterisierung der <i>phs1</i> T-DNA-Insertionslinie.....	56
Abbildung 3-14:	Charakterisierung der <i>ibr5</i> T-DNA-Insertionslinie.....	57
Abbildung 3-15:	Western-Blot gegen die MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 zur Feststellung der Bandenlokalisierung.	59
Abbildung 3-16:	MAPK-Aktivierung in Wildtyp- und <i>pp2c5-1</i> -Knockoutpflanzen.....	60
Abbildung 3-17:	MAPK-Aktivierung in Wildtyp-, <i>ap2c1-1</i> und <i>pp2c5-1</i> -Knockoutpflanzen, der <i>ap2c1-1/pp2c5-1</i> -Knockoutline sowie der komplementierten Linie <i>pp2c5-1/PP2C5</i>	61
Abbildung 3-18:	Effekt einer transienten Überexpression der <i>PP2C5</i> auf die Aktivierung von MAPKs in Tabakblättern.	62
Abbildung 3-19:	Infektion von <i>PP2C</i> -Knockouts mit verschiedenen <i>Pseudomonas</i> -Stämmen.....	64

Abbildung 3-20:	Symptomatik nach Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i>	66
Abbildung 3-21:	Symptomatik nach Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i>	67
Abbildung 3-22:	Reaktion von Wildtyp- und Knockout-Arabidopsispflanzen auf Trockenstress.....	68
Abbildung 3-23:	Bestimmung von Wurzellängen der Wildtyp- und Knockoutpflanzen....	69
Abbildung 3-24:	Einfluss von ACC auf die Keimung von Wildtyp und Knockout- pflanzen.....	70
Abbildung 3-25:	Einfluss von Abszisisäure (ABA) auf die Aktivierung ABA- responsiver Gene.....	71
Abbildung 3-26:	Keimungsassay von Arabidopsis-Samen auf verschiedenen ABA- Konzentrationen.....	72
Abbildung 3-27:	Messung der Stomataöffnungen.....	74
Abbildung 7-1:	Genmodell der PP2C5.....	D
Abbildung 7-2:	Genmodell der AP2C1.....	E
Abbildung 7-3:	Alignment der Proteinsequenzen der PP2C5, AP2C1, AP2C2 und AP2C4.....	F

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Abkürzungen der Aminosäuren	VIII
Tabelle 1-2: Abkürzungen der organischen Basen	VIII
Tabelle 2-1: Zusammensetzung von Nährmedien.....	17
Tabelle 2-2: Antibiotikazusätze zu Selektionsmedien	17
Tabelle 2-3: Bakterienstämme	18
Tabelle 2-4: Vektoren.....	19
Tabelle 2-5: Arabidopsis T-DNA-Insertionslinien	20
Tabelle 2-6: Ortsspezifische Mutagenese	24
Tabelle 3-1: Stand der Kreuzungen zwischen verschiedenen Phosphatasen.....	58
Tabelle 7-1: Oligonukleotide	A

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABA	Abszisionsäure (<i>abscisic acid</i>)	ETI	<i>effector triggered immunity</i>
<i>abi-1</i>	ABA-insensitiv 1-1	ETR1/2	<i>ethylene response 1/2</i>
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure	ETS	<i>effector triggered susceptibility</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FCA	<i>flowering time control protein A</i>
Avr	Avirulenzfaktor	Flg22	Peptid aus Flagellin mit der Sequenz QRLSTGSRINSAKDDAAG LQIA
bp	Basenpaare	FLS2	<i>Flagellin sensitive 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin	g	Gramm
cDNA	<i>complementary DNA</i>	GA	Gibberellinsäure
cfu	koloniebildende Einheiten	GAL4	Hefetranskriptionsfaktor
Col-0	Columbia-0, Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>	GAL4-AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
CTR1	<i>constitutive triple response 1</i>	GAL4-BD	GAL4-Bindedomäne
DEX	Dexamethason	GCR2	<i>G-protein coupled receptor 2</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
DTT	Dithiothreitol	h	Stunde
EBF1/2	<i>EIN3-binding F box protein 1/2</i>	HR	hypersensitive Reaktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	hrc	<i>hypersensitive response and conserved</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure	Hrp	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>
EER	<i>enhanced ethylene response</i>	IAA	Auxin
EFR	Elongationsfaktor-Tu Rezeptor	JA	Jasmonsäure
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu	kb	Kilobase
EIL1	<i>EIN3-like 1</i>	kBq	Kilobecquerel
EIN3/4	<i>ethylene insensitive 3/4</i>	kDa	Kilodalton
elf18	Peptid aus EF-Tu mit der Sequenz SKEKFERTKPHVNVGTIG	KIM	Kinaseinteraktionsmotiv
ER	Endoplasmatisches Retikulum	LB	Luria-Bertani-Medium
Erd10	<i>early responsive to dehydration 10</i>	LPS	Lipopolysaccharid
ERF1/2	<i>ethylene response factor 1/2</i>	LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
ERS1/2	<i>ethylene sensor 1/2</i>		
ET	Ethylen		

M	Mol/L	<i>Psph</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>	PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
MAPK/ MPK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>	<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase	pv.	Pathovar
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase	PYR1	<i>pyrabactin resistance 1</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>	RD29A	<i>responsiveness to drought 29A</i>
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure	R-Gen	Resistenzgen
mg	Milligramm	RNA	Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm	rpm	Umdrehungen pro Minute
min	Minute	R-Protein	Resistenzprotein
ml	Milliliter	RCAR1	<i>regulatory component of ABA receptor 1</i>
µl	Mikroliter	RLK	<i>receptor-like Kinase</i>
µm	Mikrometer	RPM1	resistent to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicula1</i>
mM	Millimol/Liter	RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
µM	Mikromol/Liter	SA	Salizylsäure
MeJa	Methyljasmonsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin Dinukleotid(Phosphat), reduziert	SIPK	Salizylsäure-induzierte Proteinkinase
NB-LRR	<i>nucleotide-binding leucine-rich receptor-like kinase</i>	ss	einzelsträngig
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>	TCA	Trichloressigsäure
NPP1	<i>necrosis-inducing Phytophthora protein 1</i>	T-DNA	Transfer-DNA
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
PEG	Polyethylenglykol	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
PGN	Peptidoglycan	U	Unit
pH	pondus Hydrogenii	UV	Ultraviolett
PR	<i>pathogenesis-related</i>	V	Volt
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>	v/v	Volumen pro Volumen

w/v	Gewicht pro Volumen
WIPK	Wundinduzierte Proteinkinase
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Dextrose-Medium (Hefe)

Tabelle 1-1: Abkürzungen der Aminosäuren

Code	Aminosäure	Code	Aminosäure
A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Tabelle 1-2: Abkürzungen der organischen Basen

Purine		Pyrimidine	
A	Adenin	C	Cytosin
G	Guanin	T	Thymin

1 EINLEITUNG

Pflanzen sind in der Natur Umweltbedingungen ausgesetzt, die sich ständig verändern und Stresssituationen auslösen können. Im Gegensatz zu Tieren können Pflanzen durch ihre sessile Lebensweise suboptimalen Umweltfaktoren nicht durch Ortswechsel entkommen. Man bezeichnet Pflanzen als gestresst, wenn sie bedingt durch ungünstige Umweltbedingungen in ihrem Wachstum oder in ihrer Reproduktionsfähigkeit eingeschränkt sind. Zu den potentiellen Stressfaktoren zählen zum Beispiel tägliche Veränderungen in Temperatur, Licht, Tageslänge sowie extreme Stresssituationen, verursacht durch hohe Ozonkonzentrationen in der Luft, eine Trockenperiode, plötzlichen Kälteeinbruch, einen hohen Salzgehalt im Boden, Nährstoffmangel oder auch durch Befall von Krankheitserregern und Fraßinsekten. Um unter diesen Bedingungen zu überleben haben Pflanzen komplexe Mechanismen entwickelt, solche externe Signale zu erkennen und infolgedessen diesen Umwelteinflüssen optimal begegnen zu können. Sofern die Pflanze durch die Stresseinwirkung nicht irreparabel geschädigt wurde, reagiert diese dabei mit morphologischen, physiologischen und biochemischen Veränderungen (Fujita *et al.* 2006). Dabei überlappen die Antworten auf biotischen und abiotischen Streß teilweise. So reguliert sowohl biotischer als auch abiotischer Stress die Expression von verschiedenen, doch teilweise auch den gleichen Genen. Auch dienen ROS (*reactive oxygen species*) bei biotischem und abiotischem Stress häufig als Signalmolekül, um eine Abfolge von Stressantworten auszulösen (Narusaka *et al.* 2004).

1.1 Hormonelle Steuerung der Anpassung von Pflanzen an Umweltbedingungen

Viele zelluläre Antworten auf biotischen und abiotischen Stress werden durch Phytohormone reguliert. Abszisinäure (ABA) ist das Phytohormon, welches besonders in Reaktionen auf abiotischen Stress wie Trockenheit, Kälte und osmotischen Stress involviert ist. In Wechselwirkungen mit den wachstumsfördernden Phytohormonen wie Gibberellinsäure (GA) reguliert ABA Prozesse wie Samenkeimung, Samenruhe und Stomatabewegungen (Kende und Zeevaart 1997). Als wichtiges Stresshormon induziert ABA das Schließen der Stomata z. B. bei Trockenheit (Kende und Zeevaart 1997). Im Gegensatz dazu spielen die Phytohormone Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) eine wichtige Rolle in Signalwegen, die durch biotischen Stress ausgelöst werden (Fujita *et al.* 2006). Ethylen (ET) ist dabei bei der Abwehr von Pathogenen und abiotischen Stressfaktoren beteiligt (Brodersen

et al. 2006, Fujita *et al.* 2006). Jasmonsäure (JA) spielt weiterhin eine Rolle bei der Seneszenz und bei Verwundungen und dient als Signal bei der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress (Browse 2005). Salicylsäure (SA) führt bei der Abwehrreaktion gegen Pathogene zu lokaler und systemischer Resistenz (Dempsey *et al.* 1999). Weiterhin wurde für SA eine Rolle bei der Entwicklung einer „Systemic Acquired Restistance“ (SAR) gezeigt (Enyedi *et al.* 1992). Brassinosteroide werden ebenfalls als Antwort auf Stress gebildet (Belkhadir *et al.* 2006).

In vielen Fällen agiert ABA aber auch als negativer Regulator von Pathogenresistenz (Mauch-Mani und Mauch 2005). Zum Beispiel ist die ABA-defiziente *sitiens*-Mutante von Tomate resistenter gegenüber Pathogenen und exogene Applikation von ABA stärkt die Anfälligkeit von *sitiens*-Pflanzen. Auf der anderen Seite löst SA in der *sitiens*-Mutante verstärkte Antworten aus, was vermuten lässt, dass hohe ABA-Konzentrationen SA-abhängige Abwehrantworten in Tomate inhibieren (Audenaert *et al.* 2002, Thaler und Bostock 2004). Weiterhin wurden in Tabak nach Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus erhöhte ABA-Konzentrationen gemessen und eine erhöhte ABA-Applikation erhöhte wiederum die Resistenz gegenüber dem Virus (Whenham *et al.* 1986). Auf der anderen Seite wurde in *Arabidopsis* festgestellt, dass ABA-Behandlung oder Trockenstress zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber avirulenten Bakterien führte (Mauch-Mani und Mauch 2005). Es wird daher davon ausgegangen, dass das Signalnetzwerk nach abiotischem Stress durch ABA und das nach biotischem Stress durch SA, JA und ET kontrolliert wird, beide Netzwerke jedoch auf verschiedenen Ebenen miteinander verbunden sind (Mauch-Mani und Mauch 2005).

ABA und JA können auch antagonistisch wirken. Dies zeigen *jar1-* (*jasmonic acid resistance1*) und *jin4* (*jasmonic acid insensitive4*)-Mutanten, welche hypersensitiv auf ABA bezüglich der ABA-vermittelten Keimungsinhibierung reagieren (Lorenzo und Solano 2005, Anderson *et al.* 2004). Außerdem resultiert exogene Applikation von ABA bei Wildtyppflanzen in verminderter Transkription von JA- und ET-responsiven Abwehrgenen, wohingegen in ABA-defizienten Mutanten höhere Expressionslevel dieser Abwehrgene beobachtet wurden (Anderson *et al.* 2004). Da weiterhin festgestellt wurde, dass exogene Applikation von Methyl-JA und ET nicht die Abwehrgen-Expression wiederherstellen kann, die durch die exogene Applikation von ABA supprimiert wurde, kann man von einem dominanten Prozess der ABA-vermittelten abiotischen Stress-Antwort ausgehen (Anderson *et al.* 2004).

1.2 Signaltransduktion als Voraussetzung für pflanzliche Stressantworten

Komplexe Signaltransduktionsnetzwerke sind notwendig, um abiotischem und biotischem Stress optimal begegnen zu können, was wiederum zu einer erhöhten Resistenz gegenüber den suboptimalen externen Faktoren führt.

1.2.1 Die Rolle von Hormonen in Signaltransduktionsnetzwerken am Beispiel von Ethylen

Das gasförmige Hormon Ethylen wird in den meisten pflanzlichen Geweben und Zelltypen produziert und beeinflusst Wachstums- und Entwicklungsprozesse wie Samenkeimung, Samenwachstum, Blatt-, Wurzel-, Stängel- und Blütenentwicklung, Fruchtreifung, Seneszenz sowie Abszission (Wang *et al.* 2002). Die Regulation von Ethylen-Signalwegen erfolgt über eine Vielzahl von Komponenten und Feedback-Mechanismen und stellt damit ein dynamisches und komplexes Netzwerk dar (Abbildung 1-1) (Wang *et al.* 2002, Alonso und Stepanova 2004, Chen *et al.* 2005, Guo und Ecker 2004, Kendrick und Chang 2008). Fünf membranständige Ethylen-Rezeptoren wurden in *Arabidopsis* identifiziert. Dabei handelt es sich um ETR1 (*ethylene response 1*), ETR2 (*ethylene response 2*), ERS1 (*ethylene sensor 1*), ERS2 (*ethylene sensor 2*) und EIN4 (*ethylene insensitive 4*), welche Ethylen an ihrer N-terminalen Domäne im Endoplasmatischem Retikulum (ER) binden können (O'Malley *et al.* 2005, Wang *et al.* 2006). In Abwesenheit von Ethylen leitet der Rezeptor konstitutiv Signale weiter, während die Signalweiterleitung abgeschaltet wird, wenn Ethylen gebunden ist (Hua und Meyerowitz 1998, Wang *et al.* 2003, O'Malley *et al.* 2005, Wang *et al.* 2006, Xie *et al.* 2006, Qu *et al.* 2007). Diese Rezeptoren agieren somit als negative Regulatoren über einen weiteren Regulator, CTR1 (*constitutive triple response 1*), welcher für eine Raf-ähnliche MAP-Kinase-Kinase-Kinase codiert (Kieber *et al.* 1993). CTR1 ist dabei hauptsächlich mit dem Rezeptor-Protein-Komplex über ETR1 und ERS1 assoziiert (Kieber *et al.* 1993, Clark *et al.* 1998, Huang *et al.* 2003). Der Membran-Metall-Transporter EIN2 hat währenddessen eine wichtige Rolle in Ethylen-Signalwegen unterhalb von CTR1 (Alonso *et al.* 1999), indem er die Verfügbarkeit des Transkriptionsfaktors EIN3 reguliert (Chao *et al.* 1997, Guo und Ecker 2003). Die F-Box-Proteine EBF1 (*EIN3-Binding F box protein 1*) und EBF2 (*EIN3-Binding F box protein 2*) interagieren mit EIN3 und fördern somit dessen Degradation über das 26S Proteasom (Guo und Ecker 2003, Yanagisawa *et al.* 2003, Potuschak *et al.* 2003, Gagne *et al.* 2004). In Anwesenheit von Ethylen wird EIN3 stabilisiert

und akkumuliert im Nukleus, um die Transkription verschiedener hormoninduzierbarer Gene auszulösen (Guo und Ecker 2003, Yanagisawa *et al.* 2003, Potuschak *et al.* 2003, Gagne *et al.* 2004). Weiterhin aktivieren die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 (*EIN3-like1*) ERF1 (*ethylene response factor 1*) und ERF2 (*ethylene response factor 2*), welche EIN3-Bindestellen in ihren Promotorregionen aufweisen (Alonso und Stepanova 2004, Guo und Ecker 2004, Guo und Ecker 2003, Potuschak *et al.* 2003, Solano *et al.* 1998, Konishi und Yanagisawa 2008). Daraufhin wird die Expression von Genprodukten ausgelöst, welche möglicherweise für das Überleben der Pflanze notwendig ist (Wang *et al.* 2002, Alonso und Stepanova 2004, Klee 2004, Chen *et al.* 2005, Guo und Ecker 2004, Kendrick und Chang 2008). Viele Komponenten des Ethylen-Signaltransduktionsweges werden bereits auf dem Transkriptlevel durch Ethylen kontrolliert, um negative wie positive Feedbackschleifen zu ermöglichen. So erhöhen sich die Level der *ERS1*-, *ERS2*- und *ETR2*-Transkripte durch die Erkennung von Ethylen (Hua *et al.* 1995, Sakai *et al.* 1998, Gao *et al.* 2008). Die neu-synthetisierten Rezeptoren, welche noch nicht Ethylen gebunden haben, supprimieren wiederum Ethylen-Signalwege und stellen somit einen negativen Feedback-Mechanismus dar. Andererseits kann Ethylen-Bindung die Proteasom-abhängige Degradation von ETR2 im ER bei hohen Ethylenkonzentrationen auslösen und die Sensitivität der Pflanzen gegenüber Ethylen erhöhen (Chen *et al.* 2007). Weiterhin wurden EER (*enhanced ethylene response*)-Proteine identifiziert, die sowohl als negative Regulatoren in Ethylen-ausgelöster Wachstumsrepression als auch als positiver Regulator in Ethylen-vermittelter Genaktivierung agieren (Christians und Larsen 2007, Robles *et al.* 2007, Christians *et al.* 2008). Es bleibt unklar, über welchen Signalweg der Rezeptor-CTR1-Komplex mit dem nuklearen EIN3 verbunden ist. Da es sich bei CTR1 vermutlich um eine MAPKKK handelt, scheint ein Signaltransduktionsweg über eine MAPK-Kaskade wahrscheinlich, in die möglicherweise auch die MKK9 und die MPK6 und MPK3 involviert sind (Yoo *et al.* 2008). Auf MAPK-Kaskaden wird im Kapitel 1.2.3 näher eingegangen.

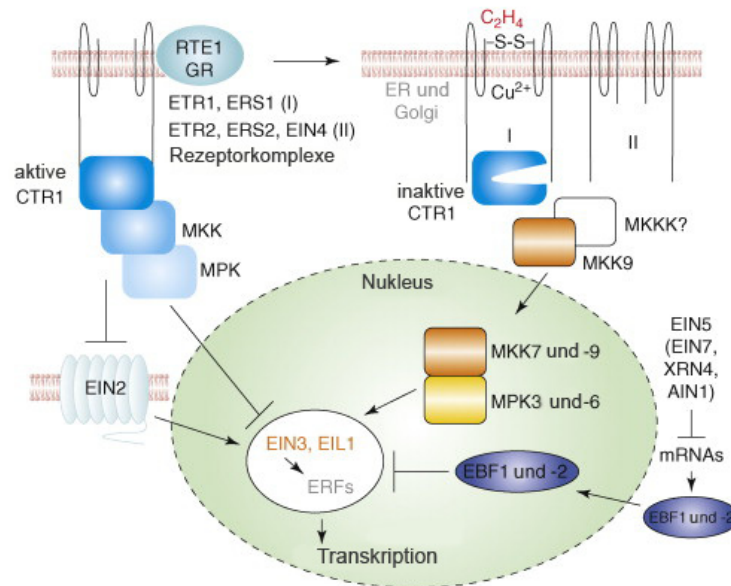


Abbildung 1-1: Modell des Ethylen-Signaltransduktionswegs in *Arabidopsis*.

Die Ethylen-Rezeptor-Komplexe aktivieren CTR1 im ER. RTE1 ist ein negativer Regulator von Ethylen-Signaltransduktionswegen und ist ebenfalls im ER sowie im Golgi lokalisiert. Die putative MAPKKK CTR1 aktiviert verschiedene MAPKKs als Teil von MAPK-Kaskaden. Am Ende dieser Kaskaden werden im Nucleus die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 phosphoryliert. Die CTR1-abhängige Phosphorylierung von EIN3 und EIL1 verstärkt möglicherweise ihre Interaktion mit den F-Box-Proteinen EBF1 und EBF2, wodurch Proteindegadation über den 26S-Proteasom-Weg stimuliert wird und schließlich Ethylensignalwege supprimiert werden. Wenn Ethylen an die Rezeptoren bindet, wird CTR1 inaktiviert, was eine simultane Suppression des CTR1-MAPK-Wegs und die Aktivierung der MKK9-MPK3/6-Kaskade zur Folge hat, welche wiederum EIN3 und EIL1 phosphoryliert. MKK9-MPK3/6-abhängige Phosphorylierung von EIN3 und EIL1 erhöht vermutlich ihre Stabilität durch eine Reduktion ihrer Interaktion mit EBF1 und EBF2. Es ist noch unklar, ob MKK9-MPK3/6 durch CTR1 oder eine andere MAPKKK aktiviert wird. Die Expression von MKK7 wird durch Ethylen aktiviert und agiert möglicherweise in Langzeitantworten. EIN2 ist ein Membranprotein, welches für die Akkumulation von EIN3 ausschlaggebend ist. EIN5 beeinflusst indirekt das Transkriptlevel von *EBF1* und *EBF2*. (nach Yoo *et al.* 2009)

Die Mechanismen von Perzeption und Transduktion von ABA-Signalen sind noch weitgehend unklar. Es wurden jedoch bereits vier ABA-Bindeproteine als mögliche Rezeptoren identifiziert: das RNA-Bindeprotein FCA (*flowering time control protein A*, Razem *et al.* 2006), die Mg-Chelatase H Subunit CHLH (Shen *et al.* 2006), welche in den ersten Schritt der Chlorophyll-Synthese involviert ist, GCR2 (*G-protein coupled receptor 2*, Liu *et al.* 2007), sowie RCAR1 (*regulatory component of ABA receptor 1*, Ma *et al.* 2009). RCAR1 wurde unabhängig von Park *et al.* (2009) als PYR1 (*pyrabactin resistance 1*) identifiziert und gilt am wahrscheinlichsten als ABA-Bindeprotein. RCAR1/ PYR1 reguliert ABA-Antworten indem es ABA bindet, was wiederum zur Interaktion mit den in ABA-Antworten involvierten PP2Cs ABI1, ABI2 und HAB1 führt, wodurch diese inhibiert werden (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009). Es wurden außerdem molekulare Mechanismen von „second messenger“-Produktion, Proteinphosphorylierungen sowie regulatorische Mechanismen von Genexpressionen in ABA-Antworten aufgedeckt (Hirayama und Shinozaki

2007). Die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Reaktionen müssen jedoch noch näher untersucht werden.

1.2.2 Signaltransduktionskaskaden nach PAMP-Erkennung

Pflanzen sind in der Natur einer Reihe von Pathogenen, wie Bakterien, Oomyceten, Pilzen, Viren oder Nematoden ausgesetzt. Im Rahmen einer Nichtwirtsresistenz stellen diese Organismen für die Pflanze jedoch meistens keine Gefahr dar (Heath 2000). Dies liegt an physischen Barrieren der Pflanze, wie der Kutikula oder der durch Lignin verstärkten Zellwand, die diese Pathogene in der Regel nicht überwinden können (Dangl und Jones 2001). Weiterhin werden an der Zelloberfläche der Mikroorganismen bestimmte Moleküle, sogenannte „PAMPs“ (*pathogen associated molecular patterns*) exponiert, mit denen die Pflanze das Pathogen erkennt und infolgedessen Abwehrreaktionen einleitet (Gomez-Gomez und Boller 2002, Parker 2003).

Eine der wichtigsten Voraussetzung für die Erkennung von Pathogenen ist, dass die Pflanze zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden kann. Hierbei spielen die „PAMPs“ eine zentrale Rolle. Dieser Begriff wurde aus dem tierischen System übernommen (Medzhitov und Janeway 1997). PAMPs weisen eine hochkonservierte, für den Lebenszyklus des Pathogens essentielle, Struktur auf und kommen ausschließlich in Mikroorganismen vor, nicht aber in der pflanzlichen Wirtszelle (Nürnberger und Lipka 2005). Nach erfolgreicher Bindung des PAMP am PRR werden entsprechende Abwehrgene induziert (Aderem und Ulevitch 2000, Medzhitov und Janeway 2002, Gomez-Gomez und Boller 2000, Zipfel *et al.* 2006). Nicht nur pathogene, sondern auch nicht-pathogene Mikroorganismen besitzen diese hochkonservierten PAMPs. Daher werden PAMPs mitunter auch als mikrobeassoziierte molekulare Strukturen (MAMPs, *microbe-associated molecular patterns*) bezeichnet.

Es gibt eine Reihe von PAMPs, die sowohl im tierischen als auch im pflanzlichen System Abwehrreaktionen auslösen (Nürnberger und Brunner 2002). Beispiele dafür sind Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien (Dow *et al.* 2000), Peptidoglykane (PGN) aus der bakteriellen Zellhülle von hauptsächlich Gram-positiven Bakterien (Akira *et al.* 2006, Gust *et al.* 2007) oder auch Flg22, ein 22-Aminosäuren-langes Peptid, welches das Minimalmotiv des bakteriellen Flagellins bei der Erkennung in Pflanzen darstellt (Felix *et al.* 1999). Die Erkennung der PAMPs erfolgt an der Zelloberfläche durch PRRs. Dabei scheint das LRR (*leucine rich repeat*)-Motiv eine wichtige Rolle zu spielen, denn die meisten bisher

beschriebenen PRRs besitzen diese Domäne (Hayashi *et al.* 2001, Inohara und Nunez 2003). In *Arabidopsis* sind über 240 rezeptorähnliche Kinasen (RLKs, *receptor-like kinases*) mit LRR-Domänen bekannt. Ein Mitglied dieser Proteinfamilie ist FLS2 (*flagellin sensing 2*) (Gomez-Gomez und Boller 2000), das für die Erkennung von Flagellin verantwortlich ist (Asai *et al.* 2002; Zipfel *et al.* 2004; Chinchilla *et al.* 2006). Ein weiteres Beispiel für eine LRR-RLK, die für die PAMP-Perzeption verantwortlich ist, ist EFR, der Elongationsfaktor Tu-Rezeptor (Zipfel *et al.* 2006). Die pflanzlichen RLKs weisen eine hohe strukturelle Homologie zu den tierischen TLRs (*Toll-like-receptors*) auf. Der erste TOLL-Rezeptor wurde in *Drosophila* entdeckt, wo er an der Erkennung von Pathogenen der Fruchtfliege eine Rolle spielt (Lemaitre *et al.* 1996). Erstaunlicherweise ist die Sequenzhomologie zu pflanzlichen TLRs allerdings sehr gering, was bei der Entwicklung von PAMP-Rezeptoren auf eine konvergente Evolution schließen lässt (Ausubel 2005).

Nach Erkennung der Pathogene durch entsprechende PAMP-Rezeptoren wird eine komplexe Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, mit dem Ziel mögliche Pathogene abzuwehren. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die bereits erwähnte Flagellin-Perzeption (Abbildung 1-2). Nachdem Flg22 durch den Flagellin-Rezeptor FLS2 an der Plasmamembran erkannt wird, erfolgt eine Autophosphorylierung von FLS2 (Gomez-Gomez und Boller 2002). Dies geschieht analog im tierischen System mit TLR5 als dem entsprechenden Flagellin-Rezeptor (Hayashi *et al.* 2001). Durch noch unbekannte Signaltransduktionswege wird außerdem eine sehr schnelle Phosphorylierung diverser „downstream“-Targetproteine induziert. Dies schließt Calciumkanäle und andere Ionenkanäle sowie den NADPH Oxidase Komplex, welcher gemeinsam mit der Superoxiddismutase (SOD) in die Wasserstoffperoxidfreisetzung während des „oxidative burst“ involviert ist, mit ein (Blume *et al.* 2000; Gomez-Gomez und Boller 2002). Eine Kinase-assoziierte Protein Phosphatase (KAPP) ist ein negativer Regulator in diesem Signalweg, in dem FLS2 durch KAPP dephosphoryliert wird (Williams *et al.* 1997; Gomez-Gomez und Boller 2002). Weiterhin wird eine MAPK-Kaskade angeregt, worauf im nächsten Kapitel näher eingegangen wird (siehe 1.2.3). Die phosphorylierten MAP-Kinasen aktivieren anschließend Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel WRKY22 und WRKY29 (Eulgem *et al.* 2000), woraufhin Abwehrgene induziert werden (Asai *et al.* 2002). Diese MAPK-Kaskaden laufen sehr schnell ab, was zur Bekämpfung von Pathogenbefall enorm wichtig ist. Innerhalb weniger Minuten wurde in einer *Arabidopsis*-Zellkultur eine Alkalisierung des Mediums beobachtet (Felix *et al.* 1999). Weiterhin erfolgt die Induktion der Abwehrgene PR1, PR5 und PDF1.2 (Gomez-Gomez *et al.* 1999). Eine zusätzliche

Abwehrstrategie ist die Akkumulation von verschiedenen Stress-assoziierten Phytohormonen, wie Ethylen, Jasmonsäure, Salicylsäure und auch Abszisionsäure.

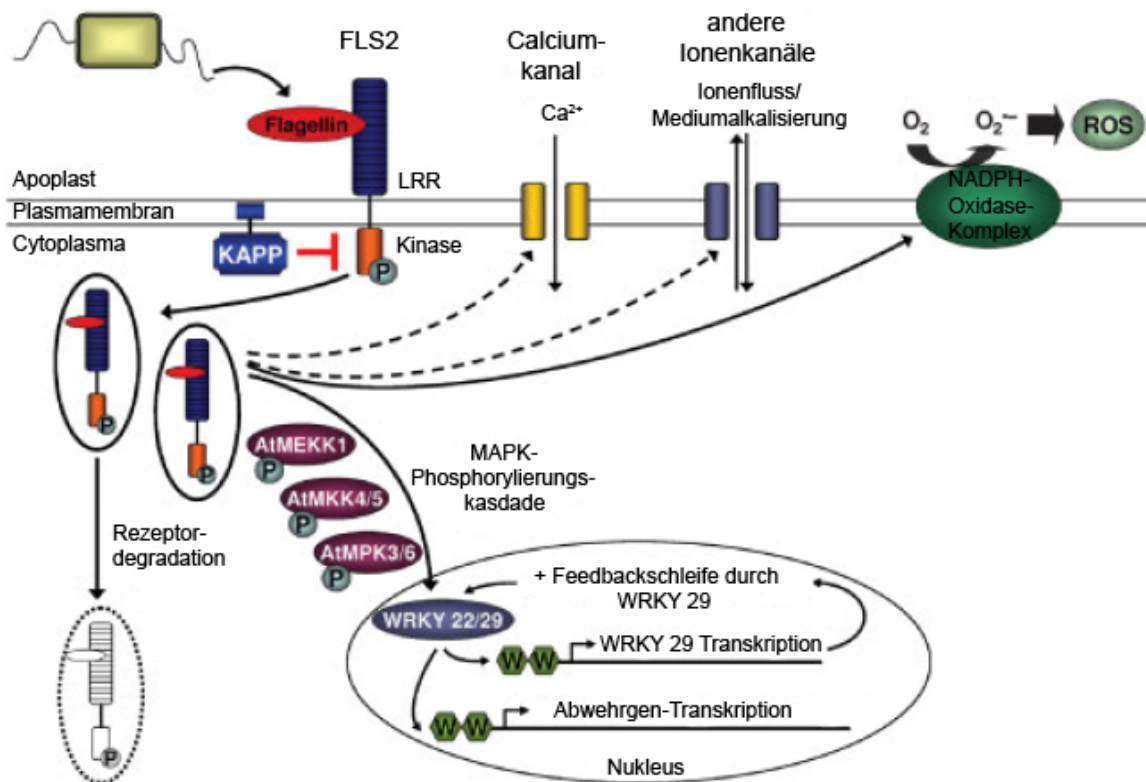


Abbildung 1-2: Modell der Flagellin-Erkennung und Signaltransduktion in Pflanzen.

Flagellin interagiert mit der extrazellulären LRR-Domäne des FLS2-Rezeptors. Die Autophosphorylierung der intrazellulären Kinasedomäne ist dabei entscheidend für die Ligandenbindung sowie der Signaltransduktion. KAPP agiert als negativer Regulator des Flagellin-Signaltransduktionswegs. Nach Bindung von Flagellin akkumuliert FLS2 in mobilen intrazellulären Vesikeln und wird anschließend degradiert. Durch Calciumeinträge, welche durch die Flagellinbindung ausgelöst werden, erhöht sich die freie Calciumkonzentration im Zellkern und im Cytoplasma. Weiterhin erfolgt als Antwort auf Flagellin eine Mediumalkalisierung und über den NADPH-Oxidase-Komplex die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Kinaseaktivität von FLS2 ist für die Aktivierung einer Flagellin-responsiven MAPK-Kaskade essentiell. Die phosphorylierte AtMEKK1 phosphoryliert AtMKK4 und AtMKK5, welche wiederum AtMPK3 und AtMPK6 phosphorylieren. Dies führt zur Expression der Transkriptionsfaktoren WRKY22 und WRKY29. WRKY22 und WRKY29 regulieren die Expression von Flagellin-induzierten Abwehrgenen. WRKY29 ist zusätzlich in einer positiven Feedbackschleife involviert, in welcher WRKY29 seine eigene Expression induziert. (nach Ingle *et al.* 2006)

1.2.3 „Mitogen-activated protein kinase“ (MAP-Kinase)-Kaskaden

Molekulare und biochemische Studien zeigen, dass MAPK-Aktivierung mit Einflüssen wie Pathogeninfektionen, Verwundung, Kälte, Trockenheit, Hyper- und Hypo-Osmose, hohem Salzgehalt und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies korreliert (Tena *et al.* 2001, Zhang und Klessig 2001, Romeis 2001). Im *Arabidopsis*-Genom sind 60 MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKKs), 10 MAPK-Kinasen-Kinasen (MAPKKs) und 20 MAP-Kinasen (MAPKs) bekannt (TheMAPKgroup 2002). MAPK-Kaskaden sind in Pflanzen in vielerlei Antworten auf biotischen und abiotischen Stress sowie Hormonbehandlungen, Zellteilungs- und Entwicklungsprozessen beteiligt.

Die 60 in *Arabidopsis* bekannten MAPKKK variieren sehr stark in ihrer Primärstruktur und Domänenkomposition. Durch Vergleich der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne der MAPKKKs fallen zwei Gruppen auf: MEKKs wie MEKK1/STE11/BCK1 und RAF-ähnliche. Die MEKK1/STE11/BCK1 gehört der A-Gruppe an, die wiederum in fünf Untergruppen unterteilt werden kann (TheMAPKgroup 2002). Die AtMEKK1, die zur Untergruppe A1 gehört, wird zum Beispiel bei Trockenheit, hohem Salzgehalt und Berührung aktiviert (Mizoguchi *et al.* 1996). Die Gruppen B und C stellen RAF-Kinasen dar. Die Mitglieder der Gruppe B weisen N-terminal verlängerte Domänen auf. „Constitutive triple response 1“ (CTR1, Kieber *et al.* 1993) und „enhanced disease resistance 1“ (EDR1, Frye *et al.* 2001) sind zum Beispiel in Ethylensignalwegen involviert. Die Funktionen der Gruppe C sind noch weitgehend unklar (TheMAPKgroup 2002).

Da es doppelt so viele MAPKs wie MAPKKs gibt, ist es naheliegend, dass MAPKKs mehrere MAPKs aktivieren und dass an dieser Stelle der Transduktionskaskade die verschiedenen Signalwege zusammenlaufen (TheMAPKgroup 2002). Die Sequenz der Phosphorylierungsstelle der pflanzlichen MAPKKs unterscheidet sich von der tierischen. Pflanzliche MAPKKs weisen eine S/TxxxxxS/T-Sequenz und tierische ein S/TxxxS/T-Motiv auf. „X“ bezeichnet dabei eine beliebige Aminosäure (TheMAPKgroup 2002). Aufgrund von Sequenzunterschieden werden die pflanzlichen MAPKKs in vier Gruppen (A-D) unterteilt. Die *Arabidopsis* C- und D-Gruppe weist keine Introns auf. Am N-Terminus haben pflanzliche MAPKKs putative MAPK-Andockstellen [K/R][K/R][K/R]_{x(1-5)}[L/I]_x[L/I]. Diese sind ähnlich denen, die in tierischen MAPKKs gefunden wurden (Bardwell und Thorner 1996). Beispiele für Gruppe A-MAPKKs sind MKK1 und MKK2, welche oberhalb der MPK4 wirken (Huang *et al.* 2000, Ichimura *et al.* 1998, Mizoguchi *et al.* 1998, Matsuoka *et al.*

2002). *Arabidopsis* MKK3, welche zur B-Gruppe gehört, weist eine NTF2 (nuclear transport factor 3)-Domäne am C-Terminus auf. MAPKKs der Gruppe C agieren oberhalb der Gruppe A der MAPKs. Funktionen der Gruppe D MAPKKs sind noch nicht bekannt (TheMAPKgroup 2002).

Die 20 identifizierten MAPKs können in vier Gruppen (A-D) unterteilt werden. Anhand des hochkonservierten TxY-Aminosäuremotives, welches durch die MAPKKs phosphoryliert wird, werden die *Arabidopsis* MPKs in zwei Untergruppen unterteilt: den TEY-Typ sowie den TDY-Typ. Der TEY-Typ wird wiederum in die drei Gruppen A, B und C untergliedert, wohingegen der TDY-Typ die Gruppe D bildet (TheMAPKgroup 2002). Gruppe-A-MAPKs sind überwiegend in Antworten auf Umweltfaktoren sowie auf Hormone involviert. Die MPK6 sowie Orthologe anderer Spezies und die MPK3 werden durch zahlreiche Umweltfaktoren sowie ABA aktiviert (Kovtun *et al.* 2000, Nühse *et al.* 2000, Ichimura *et al.* 2000, Mizoguchi *et al.* 1996). Zusätzlich reagiert die MPK3 auch auf oxidativen Stress (Kovtun *et al.* 2000) und wird sowohl durch ABA als auch durch H₂O₂ in Keimlingen aktiviert (Lu *et al.* 2002). Die MPK4, die zur Gruppe B der MAPKs gehört, wird sowohl durch biotischen als auch durch abiotischen Stress wie ABA-Applikation aktiviert (Ichimura *et al.* 2000, Desikan *et al.* 2001). Aus der Gruppe C wurde die tageszyklusabhängige MPK7 identifiziert (Schaffer *et al.* 2001). Die TDY1 aus *Alfalfa* gehört zur Gruppe D und ist überwiegend durch Pilzinfektion und Verwundung induziert (He *et al.* 1999, Schoenbeck *et al.* 1999). Interessanterweise ist keine pflanzliche MAPK bekannt, die ein TGY-Motiv besitzt, welches in der Hefe Hog1 sowie der p38 MAPKs in Säugetieren vorhanden ist (Gustin *et al.* 1998, Widmann *et al.* 1999). Ebenfalls findet man kein TPY-Motiv der tierischen JNK MAPKs in pflanzlichen MAPKs (TheMAPKgroup 2002).

1.2.4 Protein-Phosphatasen

Die Hauptaufgabe von Protein-Phosphatasen zusammen mit Proteinkinasen besteht in der Regulation von reversiblen Proteinphosphorylierungen. Proteinphosphatasen kommen in sehr unterschiedlichen Strukturen vor. Sie können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen. Protein-Tyrosin-Phosphatasen umfassen neben PTPs auch dualspezifische Phosphatasen (DSPTPs). Auf der anderen Seite stehen die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen, zu denen die Protein-Phosphatasen P (PPP)- und Protein-Phosphatasen M (PPM) gehören. Zur PPP-Familie gehören die sogenannten „Signatur-Phosphatasen“ des Typs 1 (PP1), 2A (PP2A) und 2B

(PP2B), wohingegen die PPM-Familie die Typen 2C (PP2C) und die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen mit einschließen (Schweighofer *et al.* 2004). In *Arabidopsis* wurden mehr als 1000 Kinasegene identifiziert, jedoch nur 112 Gene für Phosphatasen (Kerk *et al.* 2002). Dies führte zu der allgemein vertretenen Ansicht, dass Proteinkinasen wesentlich spezifischer sind als Phosphatasen, was anhand einiger Beispiele inzwischen teilweise widerlegt wurde, da zum Beispiel bei den PP2Cs Spezifitäten zumindest innerhalb einer Gruppe gefunden wurden (Zhou *et al.* 2002).

Die 76 identifizierten PP2C-Phosphatasen in *Arabidopsis* (Kerk *et al.* 2002) untergliedern sich in zehn Gruppen (A - J). Zusätzlich gibt es noch 10 weitere Gene, die sich nicht zuordnen lassen.

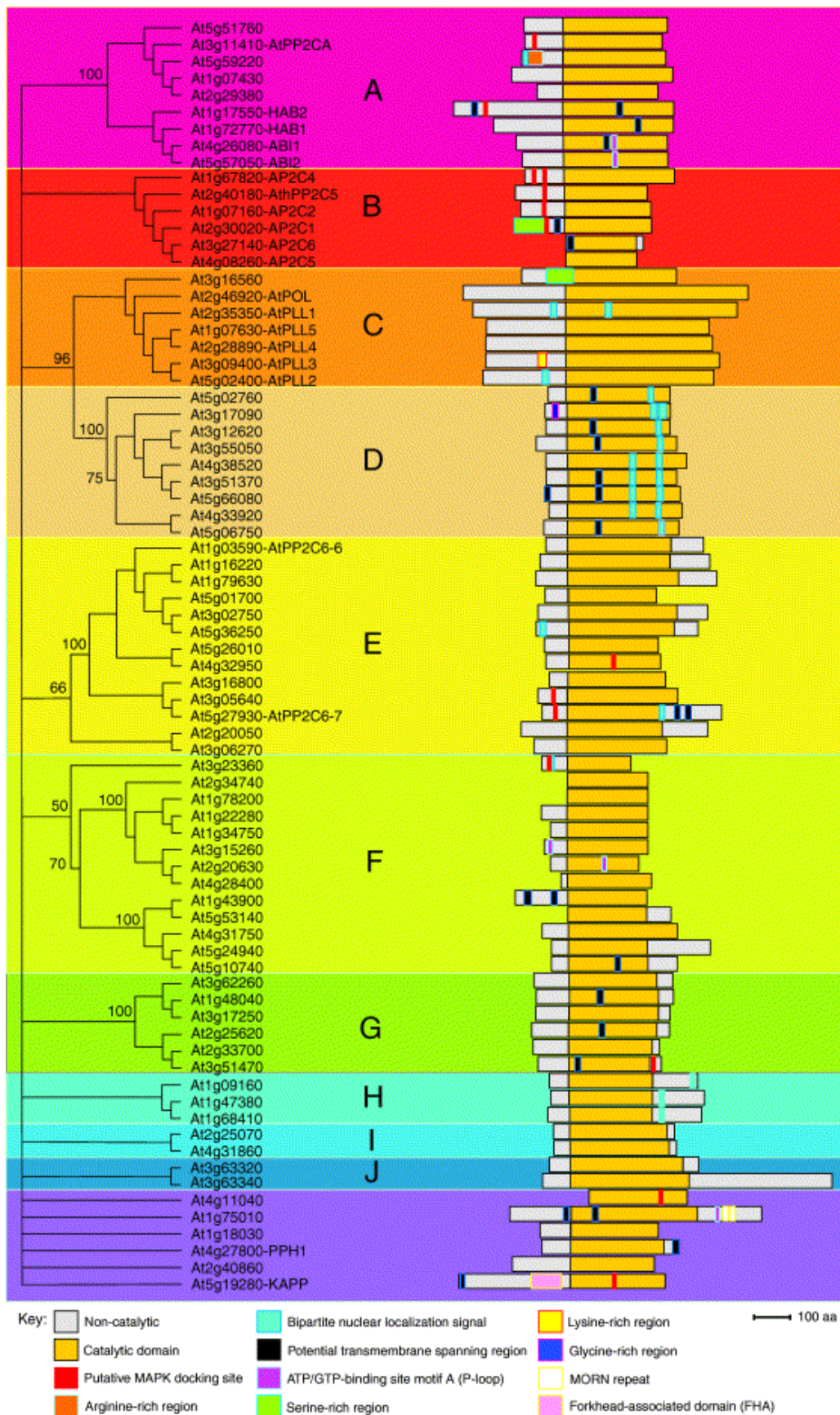


Abbildung 1-3: Topographisches Kladogramm und Domänenstruktur der *Arabidopsis* PP2Cs, basierend auf Sequenzvergleichen (Schweighofer *et al.* 2004).

Die Gruppe A enthält Phosphatasen wie ABI1, ABI2, AtPP2CA und HAB1, die in ABA-Signalwegen involviert sind (Rodriguez *et al.* 1998a, Rodriguez *et al.* 1998b, Gosti *et al.* 1999, Robert *et al.* 2006). In der Gruppe B findet sich die AP2C1, die als negativer Regulator der MPK4 und MPK6 identifiziert wurde (Schweighofer *et al.* 2007). Die POL-Phosphatase gehört zur Gruppe C und spielt eine Rolle in der Blütenbildung (Yu *et al.* 2003).

Über die Mitglieder der anderen Gruppen ist noch sehr wenig bekannt. 44 der 76 *Arabidopsis* PP2Cs tragen ihre katalytische Domäne am C-Terminus, die anderen am N-Terminus. Einige PP2Cs besitzen noch weitere Domänen, die für die Regulation und Substratspezifität eine Rolle spielen könnten (Schweighofer *et al.* 2004). Interessanterweise enthalten einige PP2Cs ein Kinaseinteraktionsmotiv (KIM) [(K/R)₃₋₄X₁₋₆(L/I)X(L/I)], das denen in tierischen MAPKs oder MAPK-Phosphatasen ähnlich ist (Ho *et al.* 2003), sowie in MAPK-aktivierenden Kinasen in Pflanzen gefunden wurde (Kiegerl *et al.* 2000). Die MP2C aus Alfalfa und vier ihrer Homologen in der B-Gruppe der *Arabidopsis* PP2C-Phosphatasen tragen zum Beispiel ein KIM in der nicht-katalytischen Region.

In Eukaryoten sind PP2Cs in vielfältige zelluläre Signaltransduktionswege involviert. In Hefe und in menschlichen Zelllinien wurde zum Beispiel eine Rolle der PP2Cs in der Zellzyklusregulation durch Dephosphorylierung von Zyklin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs) nachgewiesen. CDKs werden durch eine CDK-aktivierende Kinase (CAK) wiederum phosphoryliert. Eine Überexpression der menschlichen PP2C α führt zum G₂-M-Phase Zellzyklus-Arrest und zur Apoptose durch Induktion des p53 Transkriptionsfaktors und des p53-abhängigen Genes *p21* (Ofek *et al.* 2003).

Sehr gut untersuchte PP2Cs in Pflanzen sind *Arabidopsis* ABI1 und ABI2. Die *abil-1* und *abi2-1* Mutanten wurden in einem Screen mit mutagenisierten *Arabidopsis*-Samen isoliert (Koornneef *et al.* 1984). Sie zeichnen sich durch eine ABA-Insensitivität aus. Das heißt, die Keimung sowie die Entwicklung von Keimlingen werden durch ABA, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht gehemmt. Weiterhin weisen diese Mutanten eine reduzierte Stratifikationszeit, untypische Stomata-Regulation sowie veränderte Reaktion auf Trockenstress auf (Allen *et al.* 1999, Finkelstein und Somerville 1990, Koornneef *et al.* 1984, Leung und Giraudat 1998). ABI1 und ABI2 sind homologe Proteine, deren Transkription durch ABA stimuliert wird. Mutationen im katalytischen Teil von ABI1 oder ABI2 führen zum Funktionsverlust der Proteine mit stark verminderter Phosphataseaktivität. Analysen einer Doppelmutante ergaben, dass ABI1 und ABI2 zu etwa 50 % zu der ABA-induzierten PP2C-Aktivität beitragen, was

vermuten lässt, dass auch andere PP2Cs in ABA-Signalwegen involviert sind (Merlot *et al.* 2001). Eine Interaktion mit der Proteinkinase PKS3 wurde für ABI2 und etwas schwächer auch für ABI1 nachgewiesen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die PKS3 Kinaseaktivität transient durch ABA reduziert wurde. ABI1 interagiert außerdem mit dem ABA-induzierbaren Transkriptionsfaktor ATHB6 (Himmelbach *et al.* 2002) sowie mit der OST1-Kinase, welche ein positiver Regulator des ABA-induzierten Stomataöffnungsmechanismus ist (Yoshida *et al.* 2006a). Ein weiterer Interaktionspartner von ABI2 ist die SOS2-Proteinkinase, welche zur Salztoleranz in *Arabidopsis* beiträgt (Ohta *et al.* 2003).

HAB1, ein weiteres Mitglied der Gruppe A der *Arabidopsis* PP2Cs, ist am nächsten mit ABI1 und ABI2 verwandt. Das Gen wird in der Wurzel, im Stängel, in Blättern, in den Blüten und Schoten exprimiert, ist ebenfalls durch ABA induziert und wurde als negativer Regulator von ABA-Signalwegen identifiziert (Rodriguez 1998, Rodriguez *et al.* 1998a).

Die AtPP2CA, die ebenfalls zur A-Gruppe der PP2Cs gehört, ist ein Gegenspieler der Proteinkinase A (PKA). *AtPP2CA* ist vorwiegend in Blättern exprimiert und wird durch Kälte, Trockenheit, Salz und ABA induziert (Tahtiharju und Palva 2001). In Hefe interagiert AtPP2CA mit den Calciumkanälen AKT2 und AKT3 (Vranova *et al.* 2001) über die katalytische Domäne der Phosphatase. Die Genexpression von *AKT2* wird ebenso wie *AtPP2CA* durch ABA reguliert (Cherel *et al.* 2002).

Wie schon erwähnt enthalten einige *Arabidopsis* PP2Cs ein KIM. Tatsächlich gibt es sowohl in Tieren als auch in Pflanzen zahlreiche Beispiele dafür, dass PP2Cs auch MAPK-Kaskaden negativ regulieren können. Zum Beispiel wird in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* der HOG (high-osmolarity glycerol)-MAPK-Weg negativ reguliert, indem Hog1 durch Ptc1 und Ptc3 dephosphoryliert und somit deaktiviert wird (Warmka *et al.* 2001, Nguyen und Shiozaki 1999). Menschliche PP2C α inhibiert die Aktivierung von p28 und von JNK MAPK-Kaskaden, welche durch Umweltstress induziert werden. Die PP2C α dephosphoryliert und inaktiviert MAKks (MKK6 und SEK1) und die p38 MAPK (Takekawa *et al.* 1998). In Alfalfa reguliert die MP2C die wundinduzierte SAMK („stress-activated MAPK“) und SIMK („stress-induced MAPK), welche homolog zur MPK6 ist (Schweighofer *et al.* 2004). In *Arabidopsis* wurde die AP2C1 der B-Gruppe besonders gut studiert, welche die stressinduzierten MPK4 und MPK6 negativ reguliert und in der angeborenen Immunität eine Rolle spielt (Schweighofer *et al.* 2007).

1.3 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Rolle der PP2C5 als einem Mitglied der B-Gruppe von *Arabidopsis* PP2Cs in der Regulation von stressinduzierten MAPKs untersucht werden. Dabei wurde zunächst ein besonderer Fokus auf den Nachweis einer möglichen Interaktion der PP2C5 mit den stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 gelegt. Dieser Nachweis sollte mit zwei unabhängigen Methoden geschehen. Bei einer positiven Interaktion sollte dann untersucht werden, ob die PP2C5 die MPK3, MPK4 und MPK6 dephosphorylieren und somit inaktivieren kann. Dazu sollten Knockout- und Überexpressionslinien hergestellt und charakterisiert werden. Um die biologische Relevanz dieser regulatorischen Funktion zu untersuchen, sollte basierend auf Mikroarray-Daten die Beteiligung von PP2C5 bei PAMP- bzw. Pathogenabwehrreaktionen fokussiert werden. Da aufgrund der Mikroarray-Daten ebenfalls eine Beteiligung der PP2C5 in abiotischen Stressantworten in Frage kommt, sollte weiterhin die Rolle der PP2C5 in der pflanzlichen Anpassung an Umweltfaktoren untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide und Isotope

Die benutzten Chemikalien stammen soweit nicht anders angegeben von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Duchefa (Haarlem, Niederlande, Qiagen (Hilden), Formedium (Norwich, Großbritannien) und Oxoid (Basingstoke, Hampshire, Großbritannien). Enzyme für molekularbiologische Arbeiten (Restriktionsenzyme, Pfu-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase) sowie Nukleotide wurde von der Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Radioaktive Verbindungen ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$) stammen von GE Healthcare (Freiburg) oder Hartmann Analytic (Braunschweig). Antikörper lieferten die Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und New England Biolabs (Beverly, USA).

2.1.2 Nährmedien

Die Tabelle 2-1 fasst alle verwendeten Nährmedien zusammen. Zur Herstellung der Nährmedien wurde deionisiertes Wasser verwendet. Alle Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen des sterilisierten Mediums auf ca. 60 °C wurden sofern benötigt die entsprechenden Antibiotika (Tabelle 2-2) zugegeben.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung von Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung (pro Liter)	Nährmedium für
LB	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, (15 g Agar für Platten)	<i>Escherichia coli</i>
King's B	20 g Glycerin, 40 g Proteose-Pepton 3, nach dem Autoklavieren 10 ml 10 % $K_2H_2PO_4$, 10 ml 10 % $MgSO_4$ zugeben	<i>Pseudomonas syringae</i>
½ MS	2,2 g MS-Fertigmedium, (0,5 g MES), pH 5,7 mit KOH einstellen, (8 g Select-Agar für Platten)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
YPD	20 g Bacto Proteose Pepton, 20 g Glukose, 10 g Hefeextrakt, (20g Agar für Platten)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CSM-LW	6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Glukose, 1546 mg -Leu, -Trp Kaiser-dropout (20 g Oxoid-Agar für Platten)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CSM-LWA	6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Glukose, 1546 mg -Ade, -His, -Leu, -Trp Kaiser-dropout, 76 mg L-Histidin, (20 g Oxoid-Agar für Platten)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PD	12 g/l PD (Kartoffel-Glukose, Duchefa)	<i>Botrytis cinerea</i>

Tabelle 2-2: Antibiotikazusätze zu Selektionsmedien

Bezeichnung	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Lösungsmittel
Carbenicillin	100	Wasser
Kanamycin	50	Wasser
Rifampicin	50	Methanol
Tetracyclin	50	Ethanol
Cycloheximid	50	Wasser

2.1.3 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2-3: Bakterienstämme

Art	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> -M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	Rif ^r
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000avrRpm1	pVSP61-avrRpm1, Rif ^r Tet ^r
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000 Δ avrPto/PtoB	Rif ^r , Kan ^r , Δ avrPto, Δ PtoB
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3661	Rif ^r , Kan ^r , cor ⁻
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3103:pMP90	T-DNA ⁻ vir ⁺ Rif ^r , pMP90 Gen ^r

Weiterhin wurden die nekrotrophen Pilze *Alternaria brassicicola* (MUCL 20297), *Botrytis cinerea* (B05-10) sowie der biotrophe Pilz *Erysiphe pisi* (von Volker Lipka, Göttingen) verwendet.

2.1.4 Vektoren

Alle verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2-4 aufgelistet.

Tabelle 2-4: Vektoren

Vektor	Wesentliche Merkmale	Referenz/Herkunft
pGADT7	MCS, Amp ^r , GAL4-AD, HA-Tag, T7-Promoter	Clontech Laboratories
pGBKT7	MCS, Kan ^r , GAL4-DNABD, Myc-Tag, T7-Promoter	Clontech Laboratories
pACT2	P _{ADH1} , T _{ADH1} , Col E1 ori, 2μ ori fl, ori LEU2, Amp ^R , SV40-NLS, GAL4-AD MCS	Clontech Laboratories
pUC-SPYNE	MCS, Amp ^r , N-terminaler Teil von YFP (aa1-155), HA-Tag, 35S-Promoter	Walter <i>et al.</i> 2004
pUC-SPYCE	MCS, Amp ^r , C-terminaler Teil von YFP (aa156-239), c-myc-Tag, 35S-Promoter	Walter <i>et al.</i> 2004
pK7FWG2.0	P _{32S} , T _{35S} , eGFP, attR1, attR2, ccdB, Cm ^r , Kan ^r	VIB
pK7WGF2.0	P _{32S} , T _{35S} , eGFP, attR1, attR2, ccdB, Cm ^r , Kan ^r	VIB

2.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 7-1 aufgelistet. Sie wurden für Genotypisierungen, RT-PCRs, Real-Time-PCRs und für Sequenzierungen verwendet.

2.1.6 *Arabidopsis thaliana* Linien

Für alle Experimente wurden Col-0 sowie Ws-4 Wildtyppflanzen verwendet sowie in diesen Ökotypen hergestellte Knockoutlinien. Alle verwendeten Knockoutlinien sind T-DNA-Insertionslinien und stammen vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC) (Alonso *et al.* 2003). Die verwendeten Knockoutlinien sowie deren Bezeichnungen (Schweighofer *et al.* 2004) sind in Tabelle 2-5 aufgeführt.

Tabelle 2-5: *A. thaliana* T-DNA-Insertionslinien

AGI-Nummer	T-DNA-Insertionslinie	Bezeichnung in dieser Arbeit	Lokalisation der T-DNA-Insertion
At2g40180	Salk_109987	<i>pp2c5-1</i>	2. Exon
At2g40180	SM_3_15467	<i>pp2c5-2</i>	1. Intron
At2g40180	Salk_015191	<i>pp2c5-3</i>	Promotor
At2g30020	Salk_065126	<i>ap2c1-1</i>	2. Exon
At2g30020	Salk_104446	<i>ap2c1-2</i>	2. Exon
At1g07160	FLAG_023H08	<i>ap2c2</i>	Promotor
At1g67820	Salk_064063	<i>ap2c4</i>	1. Exon
At3g55270	mkp1	<i>mkp1</i> (von Roman Ulm)	Promotor
At3g23610	Salk_081540	<i>dsptp1-1</i>	Promotor
At3g23610	Salk_092811	<i>dsptp1-2</i>	4. Intron
At5g23720	Salk_096827	<i>phs1</i>	3. Exon
At2g04550	Salk_039359C	<i>ibr5</i>	2. Exon

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana Samen wurden entweder auf GS90-Erde (Gebr. Patzer) im Gemisch mit Vermikulit ausgesät oder durch Chlorbegasung über Nacht oberflächensterilisiert und auf ½-MS-Medium ausgelegt. In beiden Fällen erfolgte anschließend eine Kälteruhe für mindestens 2 Tage bei 4 °C. Für alle Versuche wurden die Pflanzen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit, 150 µmol/m²s, 22 °C, 40 - 60 % Luftfeuchtigkeit) angezogen. Zur Blütenbildung erfolgte nach ca. 7-8 Wochen ein Transfer zu Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit, 150 µmol/m²s, 22 °C, 40 - 60 % Luftfeuchtigkeit).

2.2.2 Anzucht von *Nicotiana benthamiana*

N. benthamiana Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 13 h Licht und 11 h Dunkelheit bei ca. 23 °C (Lichtmenge: 40 kLux) angezogen. Die Aussaat erfolgte in Mischerde (Einheitserde P, Einheitserde T und Sand, 2:2:1 und 0,1 % Konfidor).

2.2.3 Kultivierung von Bakterien

E. coli-Stämme wurden in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37 °C und 230 rpm für ca. 16 h geschüttelt bzw. für ca. 20 h auf LB-Platten bei ebenfalls 37 °C angezogen. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C. Zur längeren Aufbewahrung wurden 500 µl Flüssigkultur mit 500 µl 40 %igem (v/v) sterilen Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Pseudomonas-Stämme wurden in King's B-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 28 °C und 230 rpm für ca. 16 h geschüttelt bzw. für 30 - 48 h auf LB-Platten bei 28 °C inkubiert. Zur längeren Aufbewahrung wurden die *Pseudomonas*-Stämme auf King's B-Platten für 48 h bei 28 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte auf LB-Platten mit den spezifischen Antibiotika bei 28 °C für etwa 48 h. Die Flüssigkultur wurde in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 28 °C und 180 rpm inkubiert.

2.2.4 Kultivierung von Hefen

S. cerevisiae wurde auf YPD-Agarplatten bei 30 °C oder in YPD-Flüssigmedium bei 30 °C und 230 rpm über Nacht angezogen. Zur Selektion erfolgte die Kultivierung in den entsprechenden Dropout-Medien (Formedium) (Bergman 2001, Kaiser 1994).

2.2.5 DNA-Analytik

2.2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde aus einer Bakterien-Übernachtskultur nach dem Prinzip der alkalischen Lyse präpariert (nach Birnboim und Doly 1979). Für Protoplastentransformationen oder Sequenzierungen wurde die Plasmid-DNA über Säulchen mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert. Wurden große Mengen reiner Plasmid-DNA benötigt, erfolgte die Präparation unter Verwendung eines QIAfilter[™] Plasmid Midi Kits (Qiagen, Hilden).

2.2.5.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen nach Edwards

Blattmaterial wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Edwards-Puffer (0,2 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 % (w/v) SDS, Edwards *et al.* 1991) homogenisiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm erfolgte die Fällung des Überstandes mit 200 µl Isopropanol für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die präzipitierte DNA wurde anschließend bei 4 °C für 15 min bei 13.000 rpm pelletiert und das DNA-Pellet anschließend für 5 min bei 13.000 rpm mit 500µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Trocknung an der Luft wurde die DNA je nach Größe des Blatts in 20-50 µl 10mM Tris/HCl pH 8,5 gelöst, entweder über Nacht bei 4 °C oder 10 min bei 65 °C. Die Aufbewahrung von genomischer DNA für einige Wochen fand bei 4 °C statt.

2.2.5.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden über die Extinktion bei 260 nm spektrophotometrisch bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml bei dsDNA und 40 µg/ml bei RNA.

2.2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten fand der „DNA Engine PTC-200“-Thermocycler (MJ Research, Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) Einsatz. In der Regel wurden Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.2.5.1), cDNA (siehe Kapitel 2.2.6.2), genomische DNA (siehe 2.2.5.2) oder Bakterienkolonien als Matritze, 0,5 µM der jeweiligen Oligonukleotide (Tabelle 7-1), 0,06-0,1 mM dNTPs, 1x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % (v/v) Triton-X-100, pH 9,0) und 1-5 U Taq-DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Für Klonierungen wurde anstelle von Taq-Polymerase die „proofreading“ Pfu-Polymerase mit dem entsprechenden Puffer eingesetzt. Nach einer Denaturierungsphase (94 °C) von 2 min folgte für jedes Primerpaar eine spezifische Anzahl von Zyklen. Ein Zyklus setzte sich aus einer Denaturierungsphase (94 °C, 15 - 30 s), einer Hybridisierungsphase (Temperaturen siehe Tabelle 7-1, 30 s) und einer Polymerisationsphase (72 °C, 30 - 240 s) zusammen. Anschließend wurde die Elongation bei 72 °C für 10 min fortgesetzt und die Reaktion zuletzt auf 12 °C gekühlt.

2.2.5.5 Genotypisierung

Zur Überprüfung der T-DNA Insertionen in den einzelnen *A. thaliana* T-DNA-Insertionslinien wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, mit denen zwischen Wildtyp und Knockout-Pflanzen unterschieden werden konnte (Abbildung 2-1). Folgende Primerpaarkombinationen wurden dazu verwendet:

- 1.) LP/RP Primer, die die vorhergesagte T-DNA-Insertionsstelle genspezifisch umschließen
- 2.) LP/lba-Primer (T-DNA spezifischer Primer)
- 3.) lba/RP-Primer

Die PCR-Ansätze mit den Primerpaaren 2.) und 3.) sollten zeigen, welche Orientierung die T-DNA hat. Im PCR-Ansatz mit den Primerpaaren 1.) sollte im Falle von homozygoten Knockout-Pflanzen kein PCR-Produkt entstehen.

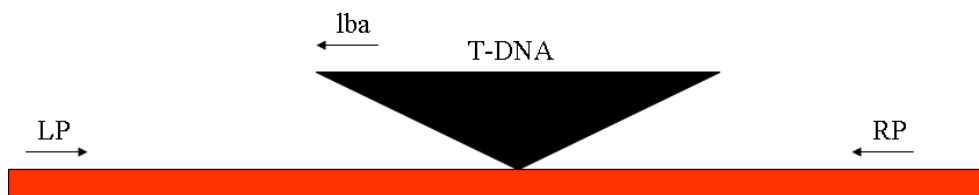


Abbildung 2-1: Lokalisation einer T-DNA-Insertion sowie der Genotypisierungsprimer

2.2.5.6 Mutagenese-PCR

Für den Austausch bestimmter Aminosäuren einer Sequenz wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Dafür sind drei Schritte notwendig, die in Tabelle 2-6 aufgezeigt sind. Die erste PCR wird mit Primern, welche die gewünschte Mutation tragen sowie mit Primern, die die Enden des zu amplifizierenden Fragments tragen, durchgeführt. Das Ergebnis sind zwei Fragmente, die in der Region der Mutation komplementär zueinander sind. Der zweite PCR-Schritt dient der Anlagerung der beiden Fragmente und der Vervollständigung des gesamten DNA-Doppelstranges. Im dritten Schritt wird dieser neue Doppelstrang amplifiziert.

Tabelle 2-6: Ortsspezifische Mutagenese

	Komponente	Menge	Programm
1. PCR	10x Pfu-Puffer	5 µl	1.) 94 °C, 2 min
	2,5 mM dNTPs	5 µl	2.) 94 °C, 30 sec
	10 µM forward-Primer	2,5 µl	3.) 60 °C, 30 sec
	10 µM reverse-Primer	2,5 µl	4.) 72 °C, 2 min/kb
	Pfu	1 µl	5.) 30 x zu 2.)
	cDNA oder Plasmid	1 µl	6.) 72 °C, 10 min
	Wasser	33 µl	7.) 12 °C für immer
2. PCR	10x Pfu-Puffer	4 µl	1.) 94 °C, 2 min
	2,5 mM dNTPs	4 µl	2.) 94 °C, 15 sec
	Fragment 1 von 1. PCR	2 µl	3.) 45 °C, 30 sec
	Fragment 2 von 1. PCR	2 µl	4.) 72 °C, 2 min/kb
	Pfu	1 µl	5.) 5 x zu 2.)
	Wasser	25 µl	6.) 72 °C, 10 min
			7.) 12 °C für immer
3. PCR	10x Pfu-Puffer	5 µl	1.) 94 °C, 2 min
	2,5 mM dNTPs	5 µl	2.) 94 °C, 30 sec
	10 µM forward-Primer	2,5 µl	3.) 60 °C, 30 sec
	10 µM reverse-Primer	2,5 µl	4.) 72 °C, 2 min/kb
	2. PCR	10 µl	5.) 30 x zu 2.)
	Fragment 1 von 1. PCR	2,5 µl	6.) 72 °C, 10 min
	Fragment 2 von 1. PCR	2,5 µl	7.) 12 °C für immer
	Pfu	1 µl	
	Wasser	19 µl	

2.2.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau sowie PCR-Produkte wurden mit Probenpuffer (5 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 1 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt und auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen (enthielt 0,5µg/ml Ethidiumbromid). Anschließend erfolgte die Auftrennung der einzelnen Fragmente bei 130 V

für 30 – 60 min in TAE-Puffer (2 M Tris/Acetat pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0). Als Größenstandard dienten 2,5 µg des GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder-Markers von Fermentas. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele auf dem UV-Transilluminator (Infinity-3026 WL/26 MX, Peqlab) fotografiert.

2.2.5.8 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen

Das durch Ethidiumbromid gefärbte und unter UV-Licht sichtbar gemachte gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des "QIAquick gel extraction kit" der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.5.9 Klonierung

Die Klonierung von Konstrukten erfolgte über eine Ligation. Dafür wurde zunächst das Insert mithilfe eines Restriktionsverdau aus einem anderen Vektor ausgeschnitten oder in einer PCR wurden durch verlängerte Primer Schnittstellen an das gewünschte Fragment angefügt und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Der zu verwendende Vektor wurde mit gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Entsprechende Schnittstellen waren in der „multiple cloning site“ lokalisiert. In einem Gesamtvolumen von 20 µl erfolgte der Verdau nach Herstellerangaben für 1 h bei 37 °C. Der Ligationsansatz hatte ebenfalls ein Endvolumen von 20 µl und enthielt 150 - 200 ng Insert-DNA, 50-100 ng Vektor-DNA, 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl ATP (10 mM), 2 µl T4-DNA-Ligase (Fermentas) sowie Wasser. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 12 °C. Die Ligationsreaktion wurde anschließend bei 65 °C für 10 min gestoppt und in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert.

2.2.5.10 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Kompetente *E. coli* Zellen des Stamms DH5α wurden mit Hilfe der Calciumchlorid- Methode (Inoue *et al.* 1990) hergestellt.

200 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend für 30 min mit Plasmid-DNA weiterhin auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 90 sec bei 42 °C. Sofort wurde 1 ml eiskaltes LB-Medium zugegeben. Nach einstündigem Schütteln bei 37 °C

wurde der Transformationsmix auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum als Selektionsmarker ausplattiert.

2.2.5.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit 1 µg getrockneter Plasmid-DNA aus einer Plasmidpräparation mittels Säulchen oder mit PCR-Fragmenten (hier wurden 20 ng/100 bp Länge des Fragments eingesetzt), welche aus einem Agarosegel extrahiert wurden. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG durchgeführt, entweder mit Standard-Primern oder mit mitgelieferten genspezifischen Primern.

2.2.6 RNA-Analytik

2.2.6.1 RNA-Isolierung

Aus etwa 100 mg Blattmaterial wurde nach der Trizol-Methode (modifiziert nach Chomczynski und Sacchi 1987) Gesamt-RNA isoliert. Das in Stickstoff eingefrorene Blattmaterial wurde gemörsert und im noch gefrorenen Zustand mit 1 ml Trizol-Reagenz (0,8 M Guanidiniumthiozyanat, 0,4 M Ammoniumthiozyanat, 0,1 M Na-Azetat, pH 5,0, 5 % (v/v) Glycerin, 38 % (v/v) saures Phenol) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min bei 13.000 rpm). Die RNA in der oberen wässrigen Phase wurde anschließend mit dem gleichen Volumen Isopropanol für 1 Stunde bei Raumtemperatur gefällt. Nach der Präzipitation (10 min bei 4 °C und 13.000 rpm) wurde das RNA-Pellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.6.2 Semiquantitative RT-PCR

Die reverse Transkription von PolyA⁺-RNA und anschließende Amplifikation der cDNA zur Analyse der Transkriptakkumulation erfolgte mittels RT-PCR. Die reverse Transkription erfolgte mit 1 µg Gesamt-RNA mit Hilfe der RevertAidTM M-MuLV Reversen Transkriptase (MBI Fermentas, St Leon-Roth) nach Herstellerangaben. 1 µl cDNA wurde anschließend in die PCR eingesetzt.

2.2.6.3 Real-Time-PCR

Für die Real-Time-PCR wurde die mittels reverser Transkription gewonnene cDNA noch 3- bis 5-fach verdünnt und dann 1 µl cDNA pro Ansatz verwendet. Jeder Ansatz erfolgte in Duplikaten bzw. Triplikaten. Für die Durchführung wurde ein BioRad IQ5-Cycler verwendet. Die Berechnung der ΔC_T -Werte und der x-fachen Induktion erfolgte nach der Livak-Methode (Livak und Schmittgen 2001).

2.2.7 Protein-Analytik

2.2.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach Bradford (1976) mit Hilfe der gebrauchsfertigen Roti-Quant-Lösung (Roth) nach Herstellerangaben und der Formel

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = \text{OD}_{595} / (0,0283 \times \text{eingesetztes Volumen [ml]})$$

abgeschätzt.

2.2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Gelapparaturen der Firma Biorad (München) wurden 10%ige SDS-Polyacrylamidgele nach Protokollen von Laemmli (1970) hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 130 V für 10 min und anschließend für ca. 45 bis 60 min bei 200 V. Als Größenstandard diente der Protein Molecular Weight Marker oder der Prestained Protein Ladder Marker (beide Fermentas).

2.2.7.3 Western Blot

Zur Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden diese nach der SDS-Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Dies erfolgte mittels Elektroblot (Mini Trans-Blot Cell von Biorad) bei 100 V für 1 h. Der Proteintransfer wurde durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau S Rot-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S Rot, 5 % (v/v) Essigsäure) kontrolliert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Es folgten drei Waschschrte mit TBST für jeweils 5 min. Die Inkubation der Membran mit

dem primären Antikörper in der jeweiligen Konzentration erfolgte über Nacht bei 4 °C in TBST/5 % (w/v) BSA. Wieder folgten drei Waschschrte mit TBST für jeweils 5 min. Der sekundäre anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase (Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:3000 in TBST verwendet und es wurde für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten mit TBST für jeweils 5 min erfolgte eine Aquälibrierung der Membran in Tris pH 9,5-Puffer (150 mM Tris/HCl pH 9,5; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) für 2 min. Die Färbereaktion wurde mit BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat; vorgelöst 50 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid) und NBT (Nitrobluetetrazoliumchlorid; vorgelöst 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid) durchgeführt. Die Stocklösungen wurden je 1:200 in Tris pH 9,5-Puffer verdünnt. Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgte durch mehrmaliges Spülen der Membran mit Wasser.

2.2.7.4 MAP-Kinase Assay

Die Durchführung des in-gel-MAP-Kinase-Assays zum Nachweis von aktivierten MAP-Kinasen erfolgte nach Romeis *et al.* 1999. Dafür wurde das in Stickstoff eingefrorene Blattmaterial zu Pulver gemörsert und mit 100 - 150 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 100 mM β-Glycerophosphat, 10 mM Natriumvanadat, 10 mM Natriumfluorid, 10 mM Pefablock (AEBSF, 4-[2-Aminoethyl]-Benzensulfonylfluorid), 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Antipain, 2 µg/ml Leupeptin) versetzt. Nach einem 20minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung des Überstands. Für jede Probe wurden gleich viele µg Protein (etwa 10 - 15 µg) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach dem Lauf dreimal für je 30 min in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 mM DTT, 0,1 mM Natriumvanadat, 5 mM Natriumfluorid, 0,5 mg/ml BSA, 0,1% (v/v) TritonX100 bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Renaturierung der Proteine erfolgte dreimal eine Inkubation des Gels bei 4 °C in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM DTT, 0,1 mM Natriumvanadat, 5 mM Natriumfluorid für je 30 min, die letzte Waschung über Nacht. Nach Aquälibrierung des Gels für 30 min in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mM Natriumvanadat erfolgte die Zugabe von 200 nM ATP. Nach einigen Minuten wurden 5 µl [γ -³²P]ATP zugegeben (entspricht 1850 kBq) und bei Raumtemperatur 90 min bei 50 rpm inkubiert. Anschließend folgten sechs Waschschrte für je 30 min mit 5 % (w/v) Trichloressigsäure, 1 % (v/v) Phosphorsäure. Das Gel wurde nach dem Trocknen auf einer Phosphoimagerplatte über Nacht exponiert und danach ausgewertet.

2.2.7.5 Hefe-2-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine *in-vivo*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in Hefe. Grundlage hierfür ist ein zur Genregulation benötigter Transkriptionsfaktor. In *Saccharomyces cerevisiae* bedient man sich normalerweise des GAL4-Transkriptionsfaktors. Dieser besitzt eine DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) und eine Aktivierungsdomäne (GAL4-AD). Obwohl sich die beiden Domänen auf derselben Polypeptidkette befinden, sind diese auch dann wirksam, wenn sie von zwei unterschiedlichen Proteinen über nonkovalente Protein-Protein-Interaktionen zusammengebracht werden. Dazu bedient man sich zweier in Hefe kompatibler Expressionsvektoren, pGADT7 und pGBKT7 des Matchmaker-Systems (Clontech Laboratories). Jedes der beiden Plasmide trägt jeweils ein für das entsprechende Experiment konstruierte Fusionsgen. Dieses kodiert im ersten Fall für ein Hybridprotein, das aus der GAL4-BD besteht und an der sich die Aminosäuresequenz anschließt, für die ein potentieller Bindungspartner gefunden werden soll („Bait-Protein“, Köderprotein). Das zweite Plasmid kodiert ein Hybridprotein, das sich aus der GAL4-AD und im Anschluss aus einem möglichen Bindungspartner für das Bait-Protein zusammensetzt („Prey-Protein“, Beuteprotein).

2.2.7.5.1 Hefetransformation

Die *S. cerevisiae* Hefestämme PJ69-4A bzw. AH109 wurden nach der Lithiumacetat-Methode (Gietz und Woods 2002) transformiert. Eine Vorkultur, die in 5 ml YPD bei 30 °C und 230 rpm über Nacht inkubiert wurde, wurde anschließend in 100 ml vorgewärmtes YPD gegeben und weiter bei 30 °C und 230 rpm für ca. 4 h inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 erreicht wurde. Es folgte die Ernte der Zellen mittels Zentrifugation (3 min bei 4000 rpm). Das Pellet wurde mit sterilem Wasser gewaschen und in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei 13.000 rpm erfolgte die Aufnahme des Pellets in 800 µl Lithiumacetat und eine anschließende Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Pro benötigter Plasmidkombination wurden 15 µl der vorbereiteten Hefe mit 70 µl 50 % (w/v) PEG 3000, 10,5 µl 1 M Lithiumacetat, 1,5 µl aufgekochte Lachssperma-DNA (10 mg/ml) und 3 µl 1x TE (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) sowie jeweils 1 µl der beiden Plasmide gemischt. Es erfolgte eine Inkubation des Mixes für 30 min bei 30 °C. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 2000 rpm) wurde das Pellet mit Wasser gewaschen und anschließend in 150 µl 2%iger (w/v) Glucoselösung resuspendiert. Das Ausplattieren der Zellsuspension fand dann auf CSM-LW Dropoutplatten (Formedium) statt.

2.2.7.5.2 Protein-Protein-Interaktionstests

Transformierte Hefen (siehe 2.2.7.5.1) wurden in je 5 ml CSM-LW Flüssigmedium bei 30 °C für 20 - 24 h angezogen und auf die gleiche optische Dichte (OD_{600}) verdünnt.

Für den Tropftest erfolgte die Vereinigung von je 100 µl dreier parallel angezogenen Kulturen (mit jeweils dem gleichen Konstrukt transformiert). Verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:100 sowie 1:1000) wurden zur Kontrolle auf CSM-LW und für den Interaktionstest auf CSM-LWA aufgetropft. Nach ca. 3 Tagen bei 30 °C konnte dann ein Wachstum der Hefen bei den Konstrukten mit positiver Protein-Interaktion auf CSM-LWA festgestellt werden.

Für den oNPG-Test erfolgte zunächst die Ernte (2 min bei 13.000 rpm) von je 2 ml der auf die gleiche OD_{600} eingestellten Kulturen. Nach Einfrieren der Pellets in flüssigem Stickstoff wurden sie mit 650 µl H-Puffer (100 mM HEPES/KOH pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1% (w/v) BSA) resuspendiert. Anschließend folgte der Aufschluss der Zellen mit 50 µl Chloroform und 50 µl 0,1 % (w/v) SDS. Nach der Zugabe von 125 µl oNPG-Lösung (0,5 mg oNPG (Fluka) in H-Puffer) erfolgte eine Inkubation bei 30 °C für 20 - 60 min bis eine Gelbfärbung erreicht wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl 1M Na_2CO_3 abgestoppt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.000 rpm. Die OD_{420} des klaren Überstandes wurde bestimmt und die β -Galaktosidaseaktivität nach der Formel $[1000 \times OD_{420}] / [V \times T \times OD_{600}]$ (V: Volumen der Kultur, T: Reaktionszeit in min) bestimmt. Aus den drei parallelen Kombinationen wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

2.2.7.6 Split-YFP-System

Das Split-YFP-System von Walter *et al.* (2004) ermöglicht die Untersuchung von Interaktionen zwischen zwei Proteinen in pflanzlichen Zellen wie z. B. Protoplasten. Es sind zwei Vektoren verfügbar, pUC-SPYCE und pUC-SPYNE, die jeweils den C-terminalen (pUC-SPYCE) bzw. den N-terminalen Teil (pUC-SPYNE) des gelb fluoreszierenden YFP tragen. Nur bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine, deren Sequenz als Fusion mit YFP-C bzw. YFP-N exprimiert wird, kommen die beiden Teile des YFP-Proteins in ausreichend räumliche Nähe, so dass deren Funktion wieder hergestellt werden kann. Nachdem die beiden Plasmide in *A.thaliana*-Protoplasten transformiert wurden (durchgeführt von Caterina Brancato, nach Negrutiu *et al.* 1987), konnte im Falle einer Interaktion der zu untersuchenden Partner eine Fluoreszenz mithilfe der Konfocalen Laserscan-Mikroskopie (Leica) festgestellt werden.

2.2.7.7 Transiente Expression von Proteinen in *Nicotiana benthamiana*

Die transiente Expression von Proteinen in *N. benthamiana* erfolgte über *Agrobacterium tumefaciens*, welches zunächst mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert wurde. Dafür wurden 50 µl elektrokompente Agrobakterien (Stamm GV3103) mit ca. 1 µg Plasmid-DNA versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation. Es wurden 600 µl LB-Medium zugegeben und dieser Ansatz für 1 h bei 28 °C und 230 rpm inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Die Anzucht der transformierten Agrobakterien erfolgte über Nacht bei 28 °C und 230 rpm in 25 ml LB-Medium. Nach der Ernte der Bakterien durch Zentrifugation (15 min bei 5000 rpm) wurde das Pellet in 10 mM MgCl₂ aufgenommen und auf eine OD₆₀₀=1 eingestellt. Jeder Ansatz wurde dann zu gleichen Teilen mit einer Kultur von Agrobakterien, die das Konstrukt zur Expression des p19-Proteins (Voinnet *et al.* 2003) enthalten, vermischt. Nach Zugabe von 150 µM Acetosyringon erfolgte eine Inkubation der Kulturen für ca. 6 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend die Infiltration in Blätter drei Wochen alter *N. benthamiana*-Pflanzen (Romeis 2001). Nach zwei Tagen wurden die infiltrierten Blätter unter dem Fluoreszenzmikroskop auf den Erfolg der Transformation hin untersucht.

2.2.7.8 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation in *A. thaliana* erfolgte ebenfalls über *Agrobacterium tumefaciens*, welches wie in 2.2.7.7 beschrieben mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert wurde. Eine Vorkultur der transformierten Agrobakterien wurde in 500 ml LB mit den entsprechenden Antibiotika überimpft und für weitere 18 - 24 h bei 28 °C und 250 rpm inkubiert. Die Kultur wurde anschließend abzentrifugiert (20 min bei 5000 rpm) und in frischer 5 % (w/v) Saccharose so resuspendiert, dass eine Optische Dichte von 0,8 erreicht wurde. Nach Zugabe von 0,02 % (v/v) Silwet wurden die Blütenstände der zu transformierenden Pflanzen für 1 min in die vorbereitete Suspension getaucht (Bechtold *et al.* 1993, Clough und Bent 1998). Für 24 h wurden die benetzten Pflanzen unter einer Glasglocke inkubiert. Anschließend ließ man die transformierten Pflanzen im Gewächshaus abreifen. In der T1 Generation erfolgte schließlich das Screening nach tatsächlich transformierten Pflanzen mittels Antibiotika-Selektion und anschließender Genotypisierung.

2.2.8 Behandlung von Pflanzen

2.2.8.1 Infiltration von Substanzen in Pflanzen

PAMPs wie Flg22 (22 Aminosäuren langes Peptid aus Flagellin, Felix *et al.* 1999), Peptidoglycan, Chitin, Lipopolysaccharide und elf18 (18 Aminosäuren langes Peptid aus dem Elongationsfaktor Tu, (Kunze *et al.* 2004, Zipfel *et al.* 2006) sowie Bakteriensuspensionen wurden in Blätter von *A. thaliana*- oder *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert. Dafür wurde die Substanz mit einer Spritze ohne Kanüle durch die Spaltöffnungen in der Blattunterseite gedrückt. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte die Ernte der Blätter, welche sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren wurden.

2.2.8.2 Pathogenassay mit *Pseudomonas syringae*

Die Anzucht verschiedener Stämme von *Pseudomonas syringae* erfolgte über Nacht bei 28 °C in King's B-Medium mit entsprechenden Antibiotika. Das Einstellen auf die benötigte Zelldichte nach Waschen der Bakteriensuspension mit 10 mM MgCl₂ fand ebenfalls mit 10 mM MgCl₂ statt. Zum Infiltrieren wurden 10⁴ cfu/ml verwendet. Für die Sprühinfektion wurden die Bakterien auf eine Dichte von 5x10⁸ verdünnt, mit 0,02 % (v/v) Silwet versetzt und gleichmäßig auf die Pflanzen gesprüht. Die Ernte der Blätter erfolgte an den Tagen 0, 1, 2 und 4. Pro Tag wurden 6 Blätter geerntet. Aus jedem Blatt wurden 2 Blattscheiben ausgestochen (Durchmesser 0,5 cm) und mit 200 µl 10 mM MgCl₂ homogenisiert. Jeweils 10 µl von verschiedenen Verdünnungen wurden dann auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 30 - 48 h bei 28 °C inkubiert. Die Ermittlung des Bakterienwachstums erfolgte anhand der ausgezählten Kolonien.

2.2.8.3 Pathogenassay mit *Alternaria brassicicola*

Für die Applikation von *Alternaria brassicicola* auf *A. thaliana* wurden zunächst wässrige Lösungen von 5x10⁵ Sporen pro ml hergestellt. Von dieser Sporenlösung wurden 5 µl-Tropfen auf die Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen aufgebracht, und zwar 6 Tropfen pro Blatt. Eine Inkubation der Pflanzen in feuchter Atmosphäre (abgeklebter transparenter Deckel, 100% Luftfeuchtigkeit) fand für mehrere Tage statt. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurden die Blätter anhand der Symptome bonitiert.

2.2.8.4 Pathogenassay mit *Botrytis cinerea*

Für den Botrytisinfektionstest wurden 5×10^5 Sporen (in $\frac{3}{4}$ -Kartoffel-Dextrose-Medium (PD)) verdünnt und auf 6 Wochen alte Pflanzen aufgetropft (2 Tropfen a $5 \mu\text{l}$ pro Blatt). Eine Inkubation der Pflanzen in feuchter Atmosphäre fand für mehrere Tage statt. Es folgte eine Auswertung der makroskopisch sichtbaren Symptome.

2.2.8.5 Pathogenassay mit *Erysiphe pisi*

Der auf *A. thaliana* inkompatible Erbsenmehltau *Erysiphe pisi* wurde auf seiner Wirtspflanze Erbse kultiviert. Auf die ca. 4 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden möglichst gleichmäßig Sporen des biotrophen Pilzes verteilt, indem ein offener Karton über das Minigewächshaus gestülpt und darüber Sporen von den infizierten Erbsen abgeschüttelt wurden (settling tower-Methode, Lipka *et al.* 2005). Das Gewächshaus wurde nach einigen Minuten mit einem transparenten Deckel abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen durch Vergleich der makroskopisch sichtbaren sowie mikroskopisch beobachteten Symptome.

2.2.8.6 Keimungsassay

Zur Untersuchung der Keimungsrate von *A. thaliana*-Samen wurden diese nach der Oberflächensterilisation (siehe Kapitel 2.2.1) auf $\frac{1}{2}$ -MS-Platten (mit verschiedenen Abszissinsäurekonzentrationen) ausgelegt. Dabei fand die Unterteilung der Platten so statt, dass die Samen aller zu untersuchenden Linien auf derselben Platte Platz hatten. Es wurden 15 bis 30 Samen pro Linie pro Platte mit Hilfe eines Zahnstochers ausgelegt. In der Regel wurden pro Behandlung drei gleiche Platten parallel angefertigt. Nach drei Tagen bei 4°C erfolgte die Belichtung der Platten unter Kurztagbedingungen in der Phytokammer. Zur Auswertung wurden alle die Samen als gekeimt gezählt, die eine eindeutige Wurzelspitze aufwiesen.

2.2.8.7 Trockenstressexperiment

Um das Verhalten von *A. thaliana* auf Trockenstress zu untersuchen, wurden die Rosetten sechs Wochen alter Pflanzen am Wurzelansatz abgeschnitten und alle 30 min für die Dauer von vier Stunden gewogen. Pro Linie wurden 12 verschiedene Pflanzen ähnlichen Ausgangsgewichts verwendet.

2.2.8.8 Messen der Stomataöffnungen

Zum Messen der Stomataöffnungen wurden die Pflanzen ohne Deckel angezogen und stets feucht gehalten. Pro Linie und Behandlung wurden zwei Blätter von zwei unterschiedlichen Pflanzen geerntet und deren Blattunterseite sofort dünn mit Klebstoff („Uhu hart“) bestrichen. Nach wenigen Minuten ließ sich der getrocknete Klebstofffilm abziehen. Die so entstandenen Abdrücke wurden mit dem 40er Objektiv am Lichtmikroskop (Nikon Eclipse 80i) mikroskopiert. Mithilfe eines digitalen Lineals (Scion Image Software) ließen sich anschließend die Stomataöffnungen ausmessen.

2.2.8.9 Behandlung von Keimlingen mit ABA

Zur Untersuchung des Einflusses von ABA auf Keimlinge wurden zunächst Samen auf ½-MS-Medium ausgesät und anschließend für zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Es folgten weitere 48 h unter Langtagbedingungen. Jeweils 40 Keimlinge pro Linie und Behandlung wurden in sterilem Wasser mit 50 µM ABA und zur Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen Methanol für weitere 24 h unter Langtagbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Keimlinge mit Filterpapier getrocknet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraus RNA für eine RT-PCR-Analyse (siehe Kapitel 2.2.6.2) isoliert.

2.2.8.10 Wurzellängenmessungen

Zur Bestimmung des Wurzellängenwachstum über einen Zeitraum von 12 Tagen wurden oberflächensterilisierte Samen (siehe Kapitel 2.2.1) der zu betrachteten Linien auf ½-MS-Platten ausgelegt, zwei Tage bei 4 °C inkubiert und anschließend hochkant bei Langtagbedingungen inkubiert. Nach sieben Tagen wurden die Keimlinge mit möglichst gleich langen Wurzeln auf ½-MS-Platten mit entsprechenden Stressoren sowie Kontrollplatten überführt. Auf jeder Platte wurden alle Linien platziert. Es wurden immer drei parallele Platten pro Behandlung mit Keimlingen in unterschiedlicher Anordnung angefertigt um Positionseffekte zu vermeiden. Nach 0, 1, 3, 5, 7, 9 und 12 Tagen wurde das Längenwachstum der Wurzeln markiert und anschließend mit einem digitalen Lineal (Scion Image Software) ausgewertet.

2.2.8.11 Kreuzungen

Für das Kreuzen zweier *A. thaliana*-Linien wurden der Fruchtknoten und die Narbe einer mittelgroßen Knospe freipräpariert. Dabei wurden Kronblätter und Staubblätter entfernt. Die reifen, voll entwickelten Staubblätter einer Blüte der anderen Linie wurden anschließend über die Narbe der ersten Blüte gestrichen, sodass einige Pollen auf der Narbe liegen blieben und eine Befruchtung erfolgen konnte. Diese Prozedur wurde mit ca. 5 Blüten derselben Mutterpflanze wiederholt. Es folgten zwei Tage Inkubation unter einer Glasglocke bei hoher Luftfeuchtigkeit. Bei erfolgreicher Befruchtung entwickelte sich eine Schote, deren Samen getrocknet oder sofort auf Erde ausgesät wurden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung von negativen Regulatoren der stressinduzierten MAP-Kinasen MPK3, MPK4 und MPK6

Die *Arabidopsis* MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 können durch Pathogene bzw. PAMPs aktiviert werden (Tena *et al.* 2001, Nühse *et al.* 2000, Ichimura *et al.* 2000, Desikan *et al.* 2001). Durch die Migration der stressinduzierten MAPKs in den Zellkern können dort bestimmte Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und so verschiedene Abwehrgene verstärkt transkribiert werden (Ahlfors *et al.* 2004, Lee *et al.* 2004, Feilner *et al.* 2005). Ist eine zelluläre Abwehrantwort ausgelöst, erfolgt eine Inaktivierung dieser MAPKs. Mögliche Kandidaten sind hierbei PP2Cs der Subgruppe „B“, welche homolog zur MP2C aus Alfalfa sind. Für die MP2C wurde eine Inaktivierung der entsprechenden Alfalfa-MAPKs bereits nachgewiesen (Meskiene *et al.* 2003). Als besonders interessant galt in dieser Arbeit die PP2C5 (At2g40180), da PP2C5 als GFP-Fusion in *A. thaliana* Protoplasten hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist (Cabrillac 2005). Da die stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 ebenfalls nach Aktivierung in den Zellkern wandern (Ahlfors *et al.* 2004, Lee *et al.* 2004), ist somit eine wichtige Voraussetzung für eine Interaktion mit der PP2C5 und somit eine Inaktivierung durch diese erfüllt. Ein weiterer Grund für die Auswahl der PP2C5 als Kandidaten für einen Gegenspieler der MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 ist das Vorhandensein eines Kinase-Interaktions-Motivs (KIM). Dieses findet sich ebenfalls in den stark homologen und ebenfalls der B-Gruppe der PP2C Phosphatasen zugehörigen Phosphatasen AP2C1 (At2g30020), AP2C2 (At1g07160) und AP2C4 (At1g67820).

3.2 Transkriptionelle Expression verschiedener PP2Cs

Microarray-Experimente werden durchgeführt, um die Transkriptlevel aller Gene eines Genoms nach einer bestimmten Behandlung festzustellen. Ein erhöhtes Transkriptlevel eines bestimmten Gens kann so ein erster Hinweis dafür sein, dass dieses Gen eine Rolle in einem Signaltransduktionsweg spielt, der durch den entsprechenden Stimulus aktiviert wurde. Beispielsweise sind in Hefe und im Menschen bestimmte Phosphatasen als negative Regulatoren von MAPKs in Microarrays transkriptionell durch den gleichen Stimulus aktiviert wie ihre Substrate, die entsprechenden MAPKs (Alessi *et al.* 1993, Doi *et al.* 1994). Im Rahmen der AtGenExpress Initiative wurden *A. thaliana*-Pflanzen verschiedenen Behandlungen unterzogen und mit entsprechend aufgearbeitetem RNA-Material Microarrays

durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in der Genevestigator Microarraydatenbank (www.genevestigator.ethz.ch) zusammengefasst. Um das Expressionsmuster der *PP2C5* sowie deren engster Homologe *AP2C1*, *AP2C2* und *AP2C4* darzustellen, wurden die Daten von den Behandlungen mit PAMPs, verschiedenen Pathogenen, Pflanzenhormonen und abiotischem Stress ausgewertet (Abbildung 3-1).

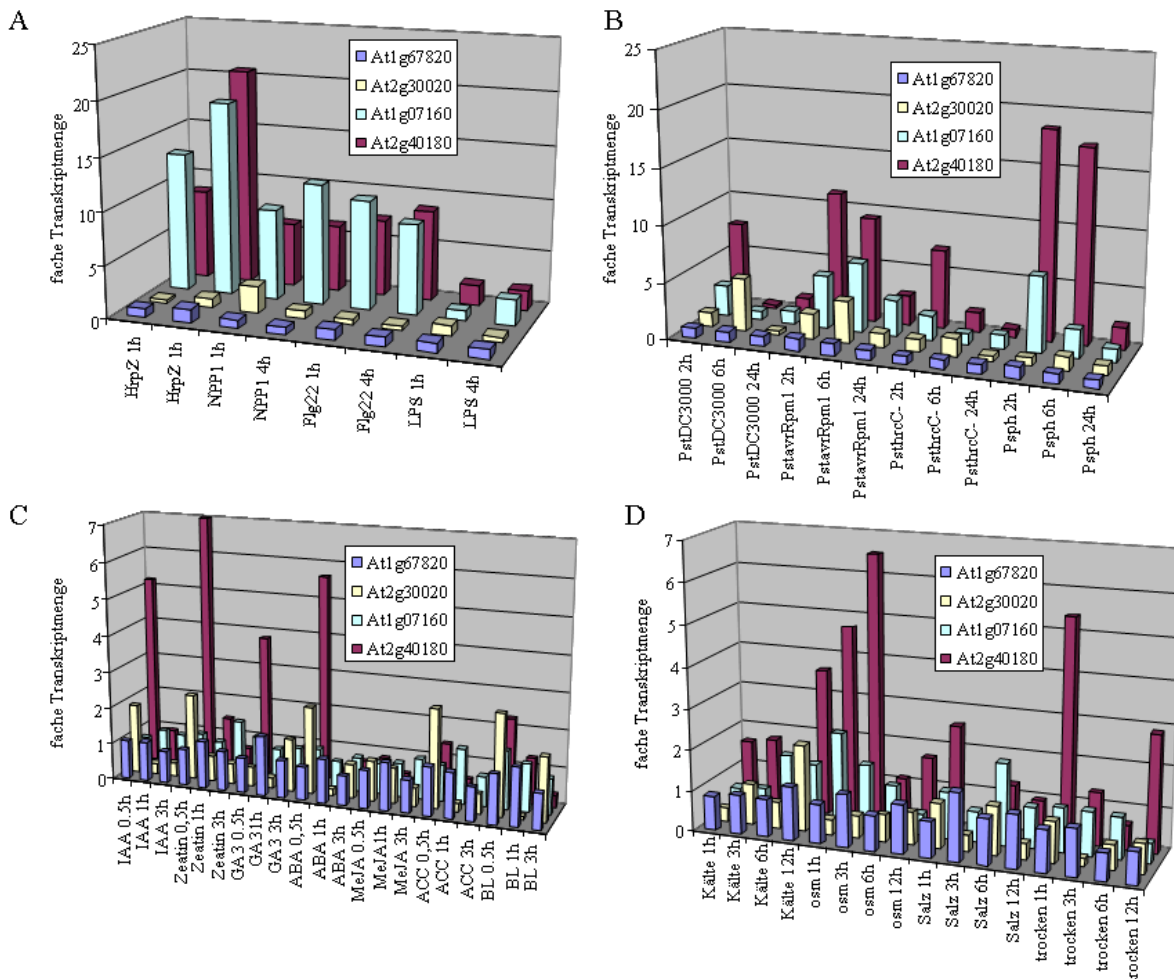


Abbildung 3-1: Relative Transkriptakkumulation der Phosphatasen *PP2C5* (*At2g40180*), *AP2C1* (*At2g30020*), *AP2C2* (*At1g07160*) und *AP2C4* (*At1g67820*) nach Behandlung mit PAMPs (A), verschiedenen Pathogenen (B), Pflanzenhormonen (C) und abiotischem Stress (D).

Nach den Behandlungen wurde das Pflanzenmaterial zu den angegebenen Zeiten geerntet und die daraus isolierte RNA zur Microarray-Analyse verwendet. Die Microarray-Daten stammen aus der AtGenExpress Initiative und wurden mit dem Genevestigator-Programm aufgearbeitet. Die aus der Genevestigator Datenbank gewonnenen Signalstärken wurden jeweils auf die Signalstärken der Kontrollen bezogen und so Werte für die relative Induktion der Transkription der einzelnen Gene erhalten. Es wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit HrpZ (10 μ M), NPP1 (1 μ M), Flg22 (1 μ M) und LPS (100 μ g/ml) elicitiert (A) sowie mit den *Pseudomonas*-Stämmen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*PtoDC3000*), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000AvrRpm1 (*PtoAvrRpm1*), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000hrcC (*PtohrC*) und *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*PspH*) behandelt (B). Weiterhin wurden *Arabidopsis*-Keimlinge mit den Pflanzenhormonen Auxin (IAA, 1 μ M), Zeatin (1 μ M), Gibberelinsäure (GA, 1 μ M), Abszissinsäure (ABA, 10 μ M), Methyljasmonat (MeJA, 10 μ M), der Ethylen-Vorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC, 10 μ M) sowie Brassinolid (BL, 10 nM) behandelt (C), sowie den abiotischen Stressfaktoren Kälte, osmotischem Stress, Salz und Trockenheit (D) unterzogen.

In Abbildung 3-1 A ist deutlich zu erkennen, dass die Transkripte der Phosphatasen *PP2C5* und *AP2C2* nach Behandlung mit den PAMPs HrpZ und Flg22 stark akkumulierten. Die Erhöhung der Transkriptspiegel durch LPS ist deutlich schwächer. Akkumulierte mRNA-Level der *AP2C1* und *AP2C4* durch die verwendeten Elicitoren sind kaum feststellbar. Die Transkriptakkumulationen der *PP2C5* nach Inokulation mit den pflanzlichen Pathogenen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*DC3000), *Pto* DC3000AvrRpm1 (*Pto*AvrRpm1), *Pto* DC3000hrcC⁻ (*Pto*hrcC⁻) und *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*h) werden in Abbildung 3-1 B deutlich. Die Transkriptmengen von *AP2C1* und *AP2C2* sind bei diesen Behandlungen gegenüber denen der *PP2C5* nur leicht erhöht, die der Phosphatase *AP2C4* gegenüber der entsprechenden Kontrollbehandlung gar nicht. Auch die Behandlung mit Pflanzenhormonen hat einen Einfluss auf das Transkriptlevel der *PP2C5* (Abbildung 3-1 C). Nach Applikation von Auxin, Zeatin, Gibberelinsäure und Abszisionsäure sind jeweils nach 0,5 h erhöhte mRNA-Mengen feststellbar. Die übrigen getesteten Hormone wie Methyljasmonat, die Ethylenvorstufe ACC sowie Brassinolid zeigen dabei keinen Einfluss. Für alle weiteren betrachteten Phosphatasen zeigt die Behandlung mit Pflanzenhormonen keinen deutlichen Einfluss auf die jeweilige Transkriptmenge. Auch in Bezug auf abiotischen Stress zeigt nur die *PP2C5* von allen PP2Cs der B-Gruppe mit KIM eine deutliche Erhöhung des Transkriptspiegels (Abbildung 3-1 D), z. B. nach Behandlung von *A. thaliana*-Pflanzen mit Kälte, osmotischem Stress sowie Trockenheit.

Um die Microarray-Daten aus den Experimenten nach PAMP-Behandlung zu verifizieren, wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt (Abbildung 3-2).

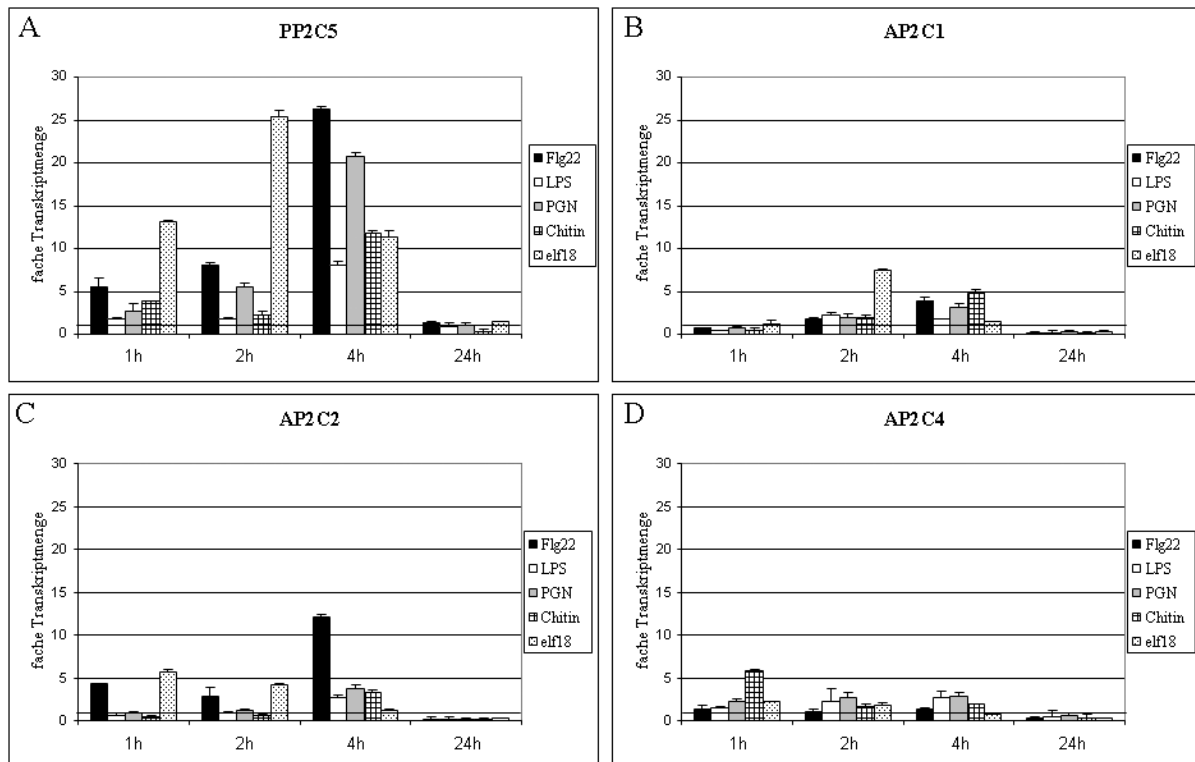


Abbildung 3-2: Analyse der Transkriptlevel der Phosphatasen *PP2C5* (A), *AP2C1* (B), *AP2C2* (C) und *AP2C4* (D) durch quantitative Real-Time-PCR.

A. thaliana-Blätter wurden mit Wasser sowie den Elicitoren Flg22 (1 μ M), LPS (100 μ g/ml), PGN (100 μ g/ml), Chitin (100 μ g/ml) und elf18 (1 μ M) infiltriert und nach 1 h, 2 h, 4 h sowie 24 h geerntet. Nach der Isolation von RNA und der cDNA-Synthese wurden die Real-Time-PCRs mit spezifischen Primern für die entsprechenden Phosphatasen sowie dem Referenzgen eF1 α durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der LIVAK-Methode. Dabei wurden die c_T -Werte von der Wasserkontrolle und des Elicitors sowohl für EF1 α als auch für die *PP2C5* (A), *AP2C1* (B), *AP2C2* (C) und der *AP2C4* (D) ins Verhältnis gesetzt. Aus den resultierenden Δc_T -Werten wurde der $\Delta\Delta c_T$ -Wert bestimmt, indem die Δc_T -Werte für EF1 α und die für die *PP2C5*, *AP2C1*, *AP2C2* bzw. *AP2C4* ins Verhältnis gesetzt wurden. Durch die Berechnung $2^{-\Delta\Delta c_T}$ -Wert ergeben sich die x-fachen Transkriptmengen nach den PAMP-Behandlungen im Verhältnis zu den entsprechenden Kontrollen. Die durchgezogenen Linien in den jeweiligen Abbildungen A-D kennzeichnen die Basistranskriptmenge. Werte darüber können also als erhöhte Transkriptakkumulation angesehen werden.

Es ist deutlich in Abbildung 3-2 A erkennbar, dass durch das Infiltrieren der PAMPs Flg22, LPS, PGN, Chitin und elf18 *A. thaliana* stark erhöhte *PP2C5*-Transkriptmengen aufweist. Bereits nach 1 h ist eine Genaktivierung erkennbar, die nach 2 bis 4 h noch zunimmt. Die *AP2C1*-Genaktivierung nach der PAMP-Behandlung fällt deutlich schwächer aus (Abbildung 3-2 B). Für elf18 ist diese nach 2 h und für Flg22, LPS, PGN und Chitin nach 4 h erkennbar. Für *AP2C2* ist besonders die Transkriptakkumulation nach Behandlung mit Flg22 hervorzuheben (Abbildung 3-2 C). Doch auch die Elicitierung mit LPS, PGN, Chitin und elf18 führt im Zeitraum von 1 bis 4 h zur verstärkten Transkription der *AP2C2*. Die *AP2C4* wird insgesamt am schwächsten von allen betrachteten PP2Cs transkribiert (Abbildung 3-2 D). Ihre stärkste Transkription fand durch Chitin nach 1 h statt. Nach 24 h ist bei allen

Behandlungen das Grundlevel von *PP2C5*, *AP2C1*, *AP2C2* und *AP2C4* mRNA wieder erreicht.

Die Microarray-Analysen bzw. die quantitative Real-Time-PCR zeigen eine starke transkriptionelle Induktion der *PP2C5* nach Inokulation mit PAMPs und Pathogenen sowie verschiedenen Hormon- und abiotischen Stress Behandlungen. Die Phosphatasen *AP2C1*, *AP2C2* und *AP2C4* sind nach den genannten Behandlungen insgesamt schwächer aktiviert und könnten daher eine untergeordnete Rolle bei der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress spielen. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Untersuchung der *PP2C5* fokussiert.

3.3 Interaktion der Phosphatase PP2C5 mit stressinduzierten MAPKs

Für die MPK3, MPK4 und MPK6 wurde oft gezeigt, dass diese durch PAMPs, Pathogene sowie durch Hormone aktiviert werden, was wiederum zur Transkription von Abwehrgenen führt (Asai *et al.* 2002). Da die *PP2C5* bei ähnlichen Behandlungen verstärkt transkribiert wird, wurde die Interaktion der PP2C5 mit den stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 untersucht.

3.3.1 Co-Lokalisationsstudien

Für eine mögliche Interaktion der stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK 6 mit der *PP2C5* ist eine räumliche Nähe innerhalb der Pflanzenzelle erforderlich. Dafür wurden am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle in Kooperation mit Gerit Bethke Co-Lokalisationsuntersuchungen durchgeführt (Abbildung 3-3).

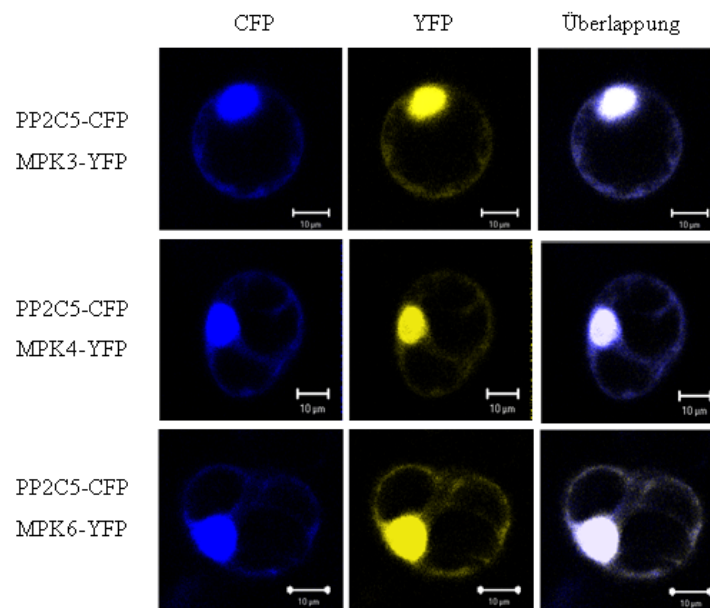


Abbildung 3-3: Lokalisationsstudien der *PP2C5* sowie der MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 in *A. thaliana*-Protoplasten.

Die Co-Expressionsuntersuchungen der *PP2C5* mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 in *A. thaliana*-Protoplasten erfolgte durch Gerit Bethke (Leibniz-Institut, Halle). Dabei wurde die *PP2C5* mit CFP (blaue Fluoreszenz) fusioniert und die MPK3, MPK4 und MPK6 jeweils mit YFP (gelbe Fluoreszenz). Nach der Co-Transformation beider Plasmide in Protoplasten wurde die Co-Lokalisation (weiß) beider Proteine hauptsächlich im Zellkern durch Konfokale Laserscann-Mikroskopie festgestellt.

In Expressionsvektoren wurden dabei die für *PP2C5* und CFP kodierenden DNA-Sequenzen fusioniert und die für die MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 jeweils mit YFP. Nach der Co-Transformation beider Plasmide in *A. thaliana*-Protoplasten und anschließender Konfokaler Laserscanning-Mikroskopie konnte eine Co-Lokalisation der *PP2C5* mit MPK3, MPK4 und MPK6 hauptsächlich im Zellkern festgestellt werden. Eine schwächere Fluoreszenz ist außerdem im Zytoplasma erkennbar. Die erforderliche räumliche Nähe für eine mögliche Interaktion der *PP2C5* mit MPK3, MPK4 und MPK6 ist damit gegeben.

3.3.2 Interaktionsstudien mittels Split-YFP

Durch die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation oder das „Split-YFP“ ist es möglich, die Interaktion zweier Proteine innerhalb von pflanzlichen Protoplasten *in vivo* zu untersuchen (Walter *et al.* 2004). Diese Methode beruht darauf, dass eine Fluoreszenz des komplementierten YFP-Proteins nur zustande kommt, wenn die zu untersuchenden Proteine jeweils fusioniert mit einer Hälfte des YFP miteinander interagieren (siehe Kapitel 2.2.7.6). Es wurden die Phosphatasen *PP2C5*, *AP2C1* und *AP2C4*, mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 auf eine mögliche Interaktion untersucht (Abbildung 3-4).

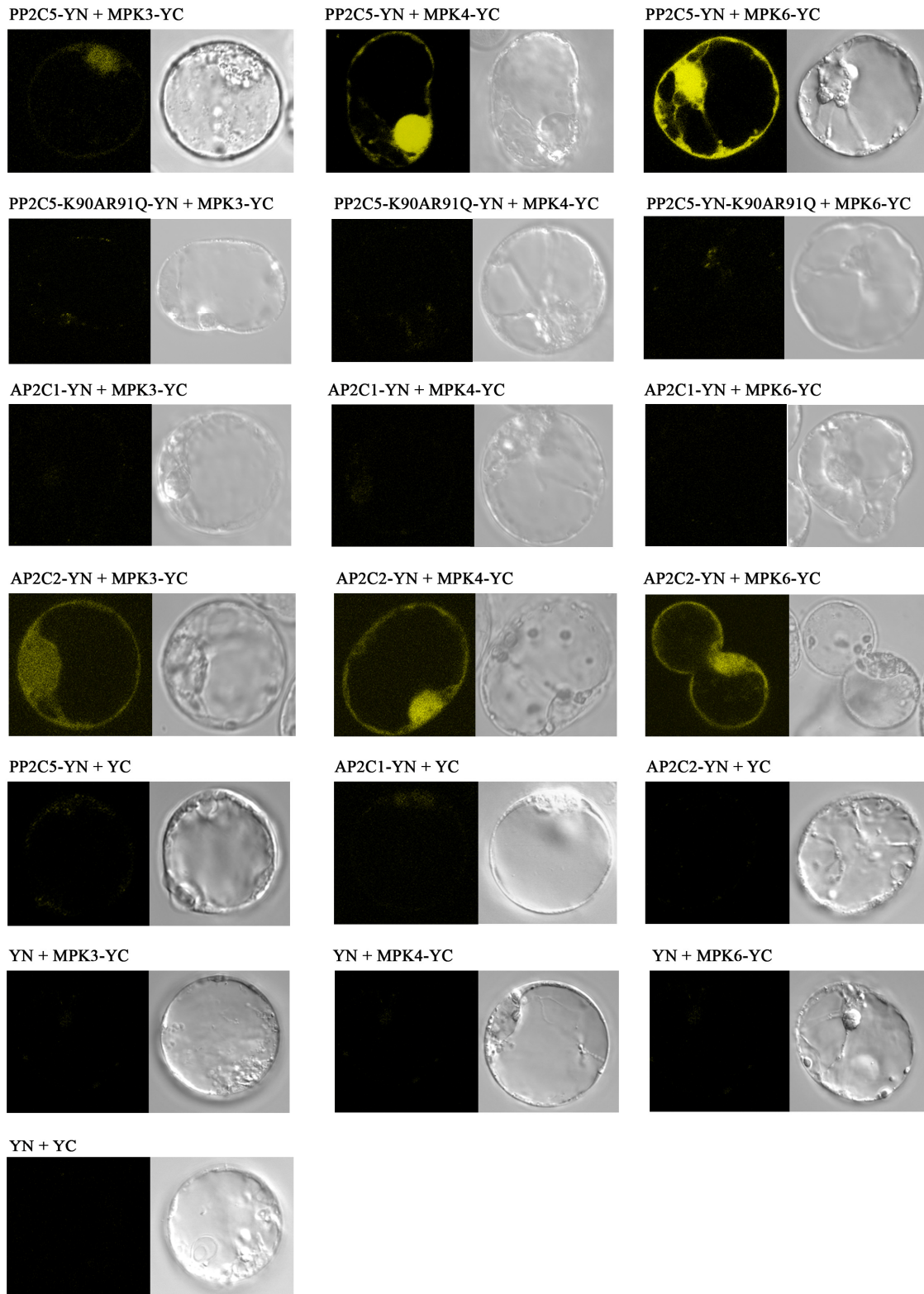


Abbildung 3-4: Interaktion von PP2Cs mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 im Split-YFP-System.

Die DNA von *PP2C5*, *AP2C1* und *AP2C2* wurden in den pUC-SPYNE-Vektor (YN) und die der MAPKs in den pUC-SPYCE-Vektor (YC) kloniert. Neben der Wildtyp *PP2C5*-DNA wurde außerdem eine veränderte *PP2C5*-DNA verwendet, die im Kinaseinteraktinsmotiv (KIM) die beiden Aminosäureaustausche K90A und R91Q trägt. Als Kontrollen wurden die ursprünglichen pUC-SPYCE und pUC-SPYNE-Vektoren verwendet. Eine Kombination der angegebenen Plasmide wurde in Protoplasten transformiert und diese 24 h später mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert.

Eine YFP-Fluoreszenz und somit eine Interaktion der Transformationspartner konnte zwischen der *PP2C5* und den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 beobachtet werden. Die YFP-Fluoreszenz war vor allem im Zellkern sowie im Zellplasma lokalisiert. Im Falle der *PP2C5* mit MPK3 fiel die beobachtete Fluoreszenz schwächer aus als mit MPK4 und MPK6.

Um zu untersuchen, ob das KIM tatsächlich für die Interaktion zwischen der *PP2C5* und den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 verantwortlich ist, wurden verschiedene Mutationen in dieses Motiv eingeführt (Abbildung 3-5).

WT-KIM	K R K R P P M L D L
L95A	K R K R P P M A D L
L97A	K R K R P P M L D A
K88A-R89A-K90A	A A A R P P M L D L
K90A-R91Q	K R A Q P P M L D L

Abbildung 3-5: Aminosäuresequenz des möglichen Kinaseinteraktionsmotivs (KIM) der *PP2C5* sowie verschiedene Mutationen.

In schwarz sind die Wildtyp-Aminosäuren des KIM dargestellt, in rot die ausgetauschten Aminosäuren. Der Aminosäureaustausch wurde mittels Mutagenese-PCR (siehe Kapitel 2.2.5.6) durchgeführt.

Die Aminosäureaustausche L95A, L97A und K88A-R89A-K90A wurden aufgrund einer Veröffentlichung von Ho *et al.* (2003) gewählt. Ebendiese Mutationen in der stark homologen JNK-Bindestelle der menschlichen MKK4 reduzierten drastisch die JNK-Bindung an die MKK4. Aufgrund der starken Konservierung dieses Motivs wurden diese Mutationen in die *PP2C5* eingeführt und im Split-YFP-System getestet. Es konnte jedoch keine reduzierte Fluoreszenz und damit keine reduzierte Interaktion im Gegensatz zur Wildtyp-*PP2C5* festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Schweighofer *et al.* (2007) zeigten, dass eine Mutation des zweiten Lysins und des zweiten Arginins dieses Motivs zu einer Reduktion der Interaktion der *AP2C1* mit den MAPKs MPK4 und MPK6 führt. Aufgrund der starken Homologie der *AP2C1* zur *PP2C5* wurden die entsprechenden Mutationen K90A-R90Q in die *PP2C5* eingeführt. Der Aminosäureaustausch K90A-R91Q im hochkonservierten KIM führte zu einem vollständigen Verlust der YFP-Fluoreszenz und somit zu einer Reduktion der Interaktion zwischen *PP2C5*-K90A-R91Q mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 (Abbildung 3-4).

Um zu testen, ob weitere stressinduzierte PP2Cs der B-Gruppe mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 interagieren können, wurden außerdem die *AP2C1* und *AP2C2* mit den genannten MPKs im Split-YFP-System getestet. Für die *AP2C2* wurde ebenfalls wie für die *PP2C5* eine Interaktion mit MPK3, MPK4 und MPK6 festgestellt. Für die *AP2C1* konnte dies allerdings nicht beobachtet werden, obwohl die Veröffentlichung von Schweighofer *et al.* (2007) eine Interaktion der *AP2C1* mit MPK4 und MPK6 beschreibt. Möglicherweise ist die Interaktion der *AP2C1* mit den MAPKs MPK4 und MPK6 deutlich schwächer als die mit der *PP2C5* bzw. der *AP2C2*. Auch Unterschiede in der experimentellen Handhabung bei der Herstellung der Protoplasten und deren Transformation sowie der Inkubationszeit bis zum Mikroskopieren könnten dazu führen, dass in dieser Arbeit keine Fluoreszenz nach Cotransformation der *AP2C1* mit den MAPKs MPK4 bzw. MPK6 beobachtet werden konnte. Aufgrund der Veröffentlichung von Schweighofer *et al.* (2007) ist aber anzunehmen, dass die *AP2C1* unter bestimmten Bedingungen doch mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 interagieren kann.

Mithilfe des Split-YFP-Systems wurden Interaktionen der *PP2C5* und der *AP2C2* mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 nachgewiesen. Für die *PP2C5* konnte durch Aminosäureaustausche außerdem gezeigt werden, dass das KIM eine essentielle Funktion bei der Interaktion der *PP2C5* mit MPK3, MPK4 und MPK6 hat.

3.3.3 Interaktionsstudien mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems

Um die im Split-YFP-System gezeigte Interaktion der *PP2C5* mit den stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 durch eine weitere unabhängige Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen zu überprüfen, wurde das Hefe-2-Hybrid-System verwendet (Abbildung 3-6). Dieses System basiert auf der Fähigkeit zweier Hybridproteine miteinander zu interagieren und somit die Transkription der durch den Transkriptionsfaktor GAL4 regulierten Reportergene zu induzieren. Eines der Hybridproteine enthält dabei die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) und das andere die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD). Die DNA der Ersteren wurde im Expressionsvektor mit der *PP2C5*-DNA (Selektionsmarker Tryptophan, W) und die DNA der Letzteren wurde im Expressionsvektor mit der DNA der MAPKs MPK3, MPK4 bzw. MPK6 fusioniert (Selektionsmarker Leucin, L). Eine Interaktion zwischen den *PP2C5*-BD- und MAPK-AD-Fusionsproteinen würde zur vollständigen Erlangung der Funktionalität des GAL4-Transkriptionsfaktors und somit zur Transkriptionsaktivierung der unter Kontrolle der *gal*-

Promotoren stehenden Reportergene *Ade2* und *LacZ* führen. Das *Ade2*-Gen komplementiert einen Defekt in der Adeninbiosynthese und das *LacZ*-Gen kodiert das Enzym β -Galaktosidase. Die transformierten Hefestämme PJ69-4A bzw. AH109 wurden kultiviert und mit der Hefesuspension ein Tropftest sowie ein oNPG-Test durchgeführt (Abbildung 3-6).

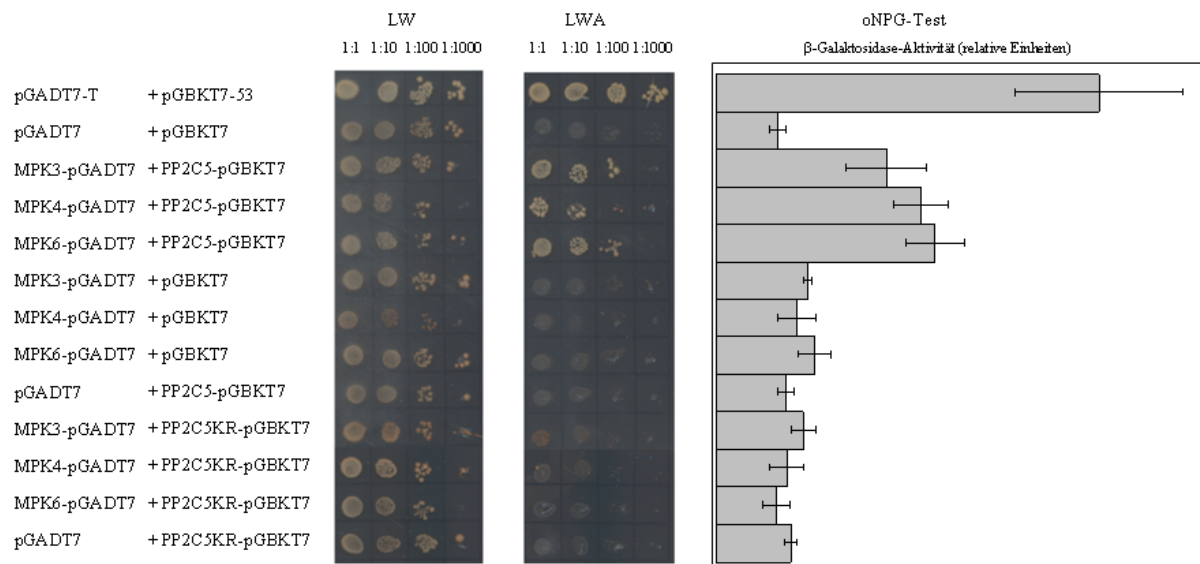


Abbildung 3-6: Interaktion der PP2C5 mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 im Hefe-2-Hybrid-System.

Die *PP2C5*-DNA bzw. die DNA der MPK3, MPK4 und MPK6 wurden in die angezeigten Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert und in den Hefestamm AH109 transformiert. Neben der Wildtyp *PP2C5*-DNA wurde außerdem eine veränderte *PP2C5*-DNA verwendet, die im Kinaseinteraktinsmotiv (KIM) die beiden Aminosäureaustausche K90A und R91Q trägt. Verschiedene Verdünnungen der transformierten Hefekulturen wurden auf das Kontrollmedium CSM-LW sowie dem Selektionsmedium CSM-LWA aufgetropft und 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Für den oNPG-Assay wurden 2 ml Hefekulturmedium eingesetzt. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung von jeweils 3 parallelen Messungen.

Auf LW-Selektionsmedium konnten alle transformierten Hefekulturen wachsen (Abbildung 3-6). Dies beweist eine erfolgreiche Transformation beider Konstrukte in die gleiche Hefezelle. Zur Analyse der Protein-Protein-Interaktion wurden die Hefekulturen außerdem auf LWA-Testplatten angezogen. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen dem Maus-Tumorsuppressorgen p53 und dem großen T-Antigen des SV40-Tumorvirus (Li und Fields 1993), die entsprechend auf LWA-Platten starkes Wachstum zeigte. In Abbildung 3-6 ist außerdem ein Wachstum der Hefekulturen feststellbar, die mit *PP2C5*-pGBKT7 und MPK3-pGADT7, MPK4-pGADT7 bzw. MPK6-pGADT7 transformiert wurden. Also interagiert die *PP2C5* auch im Hefe-2-Hybrid-System mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6. Ein unspezifisches Zellenwachstum bei Negativkontrollen, wie den zu untersuchenden Proteinen mit Leervektoren sowie den beiden Leervektoren untereinander, konnte nicht festgestellt werden. Weiterhin konnte kein Hefewachstum auf der LWA-

Testplatte für die KIM-mutierte *PP2C5* (K90A/R91Q) mit den MAPKs MPK3, MPK4 oder MPK6 beobachtet werden. Mit den transformierten Hefekulturen wurde parallel ein oNPG-Assay durchgeführt. Auch dieser zeigte eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität nur für die Positivkontrolle sowie die Kombinationen PP2C5/MPK3, PP2C5/MPK4 und PP2C5/MPK6. Es bleibt zu erwähnen, dass zu 50 % bei den durchgeführten unabhängigen Transformationen und anschließenden Tropftests sowie oNPG-Tests die gezeigte Interaktion der *PP2C5* mit der MPK3 schwächer bzw. gar nicht beobachtet werden konnte. Es kann also nur die Interaktion der *PP2C5* mit MPK4 und MPK6 sowie die Reduktion dieser Interaktion durch Mutation des KIM als sicher angesehen werden.

3.4 Charakterisierung von PP2C-Knockoutlinien

Zur Analyse der biologischen Funktionen der *PP2C5* wurden Knockoutlinien verwendet, die eine Insertion im *PP2C5*-Gen tragen und somit kein funktionelles Protein bilden sollten. Beim Vergleich dieser mit der entsprechenden Wildtyplinie lässt sich auf eine mögliche Rolle des ausgeschalteten Gens schließen. Die in dieser Arbeit gezeigten T-DNA-Insertionslinien wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen und teilweise von Irute Meskiene (Universität Wien) bzw. Roman Ulm (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Nach Segregation der heterozygoten Ausgangspflanzen wurde in den Tochterpopulationen nach homozygoten Pflanzen mittels PCR-basierter Genotypisierung gesucht.

In Abbildung 3-7 sind die Charakterisierungen der beiden *pp2c5* T-DNA-Insertionslinien *pp2c5-1* (Salk_109987) sowie *pp2c5-2* (SM_3_15467) gezeigt. Die *pp2c5-2* Knockoutlinie wurde mit dem Wildtyp Col-0 rückgekreuzt, um zusätzliche T-DNA-Insertionen in unbekanntem Genen zu minimieren. Es fand eine Segregation statt und es wurde erneut nach homozygoten Pflanzen mithilfe der Genotypisierung gesucht.

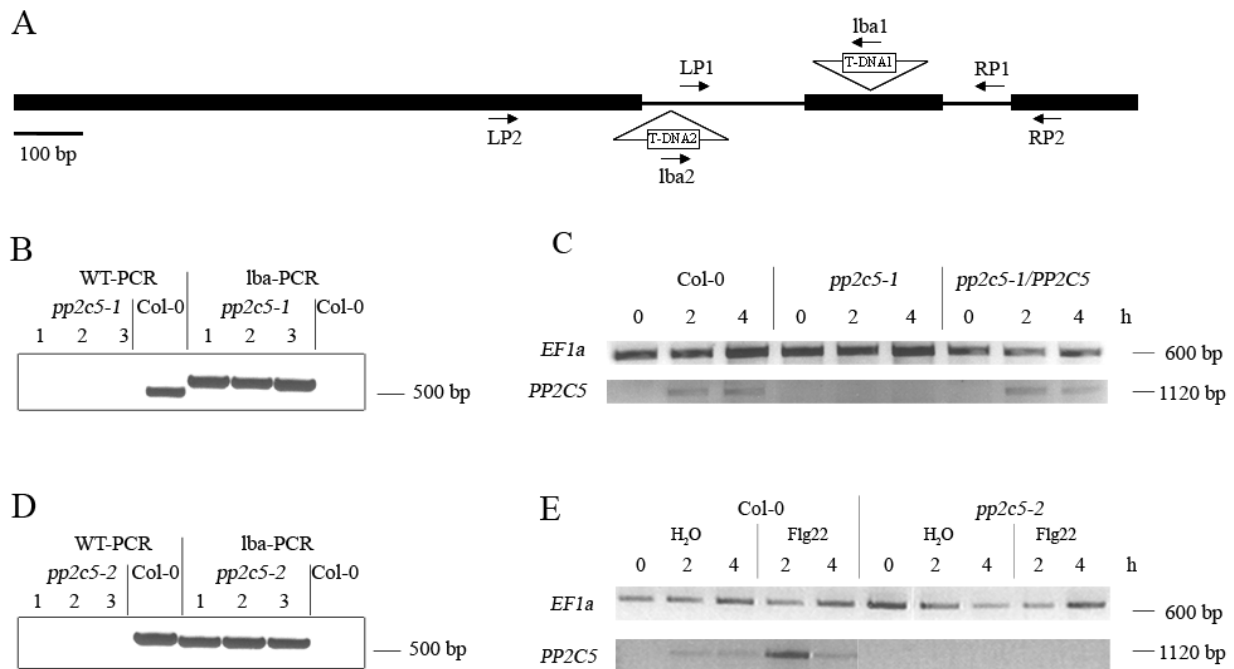


Abbildung 3-7: Charakterisierung der *pp2c5-1* und *pp2c5-2* T-DNA-Insertionslinien.

A: Genstruktur von *PP2C5*. Die schwarzen Balken symbolisieren die Exons und die dazwischen liegenden Linien die Introns der Phosphatase *PP2C5*. Die Pfeile symbolisieren die Genotypisierungsprimer: LP1: 609987LP, RP1: 609987RP, lba1: Salk_lba, LP2: N103698LP2, RP2: N103698RP, lba2: Exotic_lb_spm32. B/D: Genotypisierung der *pp2c5-1* (B) bzw. der *pp2c5-2* (D). Aus Blattmaterial von drei verschiedenen Pflanzen (1-3) der *pp2c5-1* (B) bzw. *pp2c5-2* (D) sowie einer Wildtyppflanze (Col-0) wurde genomische DNA isoliert. Für die Wildtyp-PCR wurde mit den Primern N609987LP und N609987RP ein 424 bp großes Fragment (B) bzw. mit den Primern N103698LP2 und N103698RP ein 583 bp großes Fragment (D) amplifiziert. Im Falle einer T-DNA-Insertion an der in A angegebenen Stelle wurde mit den Primern N609987LP und Salk_lba ein Fragment von 550 bp (B) und mit N103698LP2 und Exotic_lb_spm32 ein Fragment von 600 bp (D) amplifiziert. C/E: Transkript-Analyse der *pp2c5-1* und *pp2c5-2*: In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Col-0), *pp2c5-1*- und *pp2c5-2*-Knockoutpflanzen sowie komplementierten Knockoutpflanzen *pp2c5-1/PP2C5* wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. Sofort bzw. nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *PP2C5*-Transkriptmengen die Primer 40180-fw und 40180-R. Letztere binden am Anfang des ersten bzw. am Ende des dritten Exons und umschließen somit die T-DNA-Insertion. Dies ergab ein Fragment der Größe von 1120 bp.

In Abbildung 3-7 A ist das Genmodell der *PP2C5* mit seinen T-DNA-Insertionen *pp2c5-1* und *pp2c5-2* im zweiten Exon bzw. im ersten Intron dargestellt. Drei unterschiedliche Pflanzen der Knockoutlinien wurden mit den angegebenen Primern genotypisiert. Es ist in Abbildung 3-7 B und D zu erkennen, dass nur von der Wildtyp-DNA das genspezifische 424 bp bzw. 583 bp große Fragment amplifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu lässt sich das T-DNA-spezifische 550 bp große Amplifikat im Falle der *pp2c5-1* und das 600 bp große Fragment für die *pp2c5-2* nur in der *PP2C5*-defizienten Linie erhalten, was zeigt, dass die getesteten Pflanzen homozygot den Knockout tragen. Um zu überprüfen, ob die T-DNA-Insertionen tatsächlich auch zum Verlust des *PP2C5*-Transkriptes führt, wurde die Resttranskriptmenge bestimmt (Abbildung 3-7 C und E). Dafür wurde für semiquantitative

RT-PCRs in fünf Wochen alte Col-0, *pp2c5-1* und *pp2c5-2* Pflanzen 1 μ M Flg22 infiltriert, was in Col-0 die transkriptionelle Aktivierung der *PP2C5* zur Folge hat (siehe Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Für die sich anschließende PCR von cDNA wurden die *PP2C5*-spezifischen Primer so gewählt, dass sie die T-DNA-Insertion einschließen und im Falle von Vorhandensein von funktionellem Transkript ein Fragment von 1120 bp amplifizieren. Wie erwartet war dies für den Col-0-Wildtyp der Fall, nicht aber für die *pp2c5-1*- und *pp2c5-2*-Mutanten. Um nachzuweisen, dass ein möglicher Phänotyp tatsächlich auf das Fehlen der *PP2C5* zurückzuführen ist, wurde der *pp2c5-1* Knockout durch Transformation mit einem genomischen Fragment komplementiert. Die Insertion der entsprechenden Kasette ins Genom der *pp2c5-1* Knockoutpflanze wurde durch Genotypisierung mit den in Abbildung 3-7 A angegebenen Primern überprüft (nicht gezeigt). Mit der *pp2c5-1/PP2C5* komplementierten Linie wurde ebenfalls eine *PP2C5*-Transkriptanalyse durchgeführt (Abbildung 3-7 C). Die *pp2c5-1* Knockoutlinie konnte erfolgreich komplementiert werden, da das *PP2C5*-Transkript nun wieder nachgewiesen werden konnte.

Eine dritte T-DNA-Insertionslinie der *PP2C5* (Salk_015191) wurde ebenfalls charakterisiert (Daten nicht gezeigt). Da diese Mutante jedoch noch Resttranskript aufwies, fand diese Linie in der vorliegenden Arbeit keine weitere Berücksichtigung. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde vorwiegend mit der Linie *pp2c5-1* gearbeitet, da diese in Southern Blot Analysen nur eine Insertion aufwies (Daten nicht gezeigt) und somit weiteres Rückkreuzen unnötig war. Nur Experimente zu Anfang dieser Arbeit wurden mit dem zweiten Allel *pp2c5-2* durchgeführt, da dieser Knockout zuerst charakterisiert, allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht rückgekreuzt, war. Die Nutzung nur eines Knockout-Allels im weiteren Verlauf der Arbeit ist durch die zusätzliche Verwendung der komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5* legitimiert.

Da in Schweighofer *et al.* (2007) für die *AP2C1* ebenfalls eine Interaktion mit den stressinduzierten MAPKs MPK4 und MPK6 nachgewiesen wurde und außerdem verstärkt *AP2C1*-Transkript durch PAMP-Behandlungen und Pathogen-Infektionen gebildet wird (Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2), sollten die *ap2c1-1* (Salk_065126) und die *ap2c1-2* (Salk_104446) T-DNA-Insertionslinien ebenfalls charakterisiert werden, um anschließend einen möglichen veränderten Phänotypen dieser Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-0 festzustellen (Abbildung 3-8).

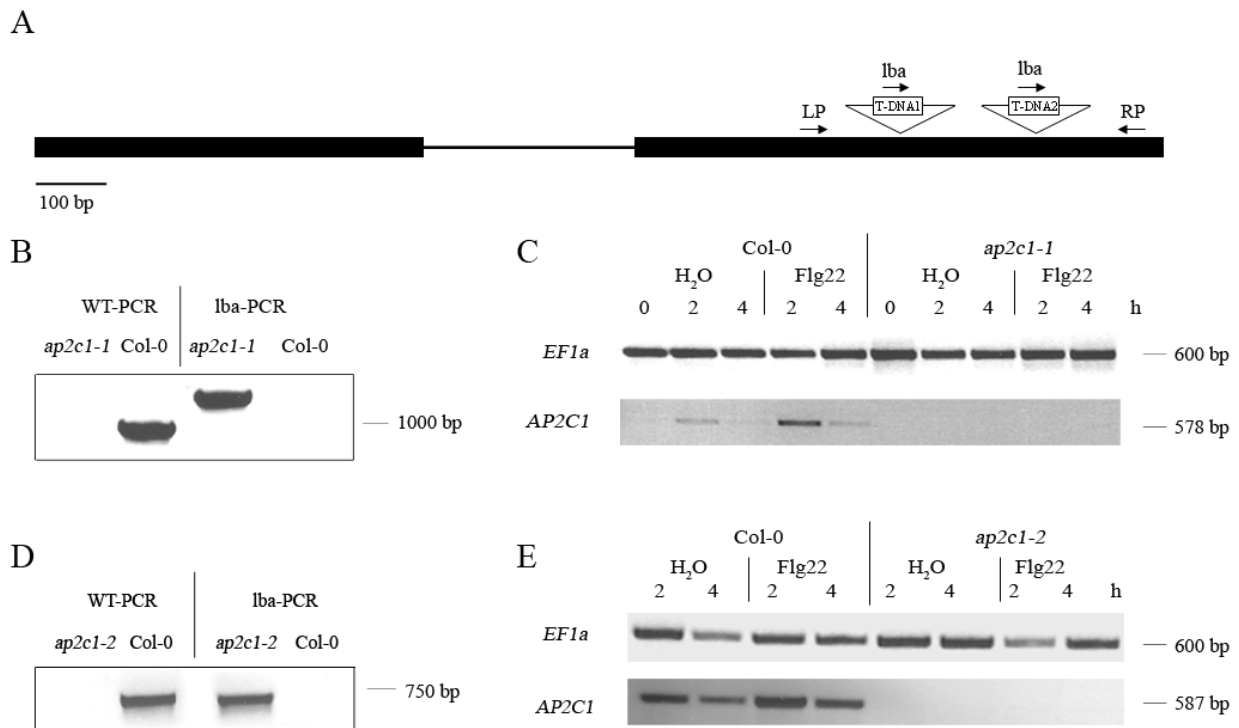


Abbildung 3-8: Charakterisierung der *ap2c1-1* und *ap2c1-2* T-DNA-Insertionslinien.

A: Genstruktur der *AP2C1*. Die schwarzen Balken symbolisieren die Exons und die dazwischen liegenden Linien die Introns der Phosphatase *AP2C1*. Die Pfeile symbolisieren die Genotypisierungsprimer: LP: N565126LP, RP: N565126RP2, lba: *salk_lba*. B/D: Genotypisierung. Aus Blattmaterial der *ap2c1-1*, der *ap2c1-2* sowie einer Wildtyppflanze (Col-0) wurde genomische DNA isoliert. Für die Wildtyp-PCR wurde mit den Primern N565126LP und N565126RP2 jeweils ein 710 bp großes Fragment amplifiziert. Im Falle einer T-DNA-Insertion an der in A angegebene Stelle wurde für *ap2c1-1* mit den Primern N565126RP2 und *Salk_lba* ein Fragment von 1250 bp (B) und bei der *ap2c1-2* ein Fragment von 700 bp (D) amplifiziert. C/E: Transkript-Analyse. In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und *ap2c1-1* und *ap2c1-2*-Knockoutpflanzen wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltrierte. Sofort bzw. nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *AP2C1*-Transkriptmengen die Primer 30020-F und N565126RP3. Letztere binden in der Mitte des ersten Exons bzw. im zweiten Exon direkt hinter der Insertion. Die T-DNA-Insertionsstelle ist somit umschlossen. Dies ergab ein Fragment der Größe von 578 bp.

In Abbildung 3-8 A ist das Genmodell der *AP2C1* mit seiner T-DNA-Insertionen *ap2c1-1* und *ap2c1-2* im zweiten Exon dargestellt. Jeweils eine Pflanze dieser Knockoutlinien wurde mit den angegebenen Primern genotypisiert. In Abbildung 3-8 B und D ist zu erkennen, dass nur von der Wildtyp-DNA das genspezifische 710 bp große Fragment amplifiziert wurde. Die T-DNA-spezifischen 1250 bp bzw. 700 bp großen Fragmente ließen sich hingegen nur von den *AP2C1*-defizienten Linien erhalten, was zeigt, dass diese getesteten Pflanzen homozygot die entsprechende Insertion tragen. Um zu überprüfen, ob die T-DNA-Insertionen tatsächlich auch zur Inaktivierung von *AP2C1*-Transkript-Synthese führt, wurde eine Resttranskriptanalyse durchgeführt (Abbildung 3-8 C und E). Dafür wurde für semiquantitative RT-PCRs in fünf Wochen alte Col-0, *ap2c1-1* und *ap2c1-2* Pflanzen Wasser

bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert, was vor allem nach 2 h nach der Infiltration von Flg22 in Col-0 die transkriptionelle Aktivierung der *AP2C1* zur Folge hat (siehe auch Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Für die sich anschließende PCR von cDNA wurden die *AP2C1*-spezifischen Primer so gewählt, dass sie die T-DNA-Insertion einschließen und im Falle von Vorhandensein von funktionellem Transkript ein Fragment von 578 bp amplifizieren. Wie erwartet war dies für den Wildtyp Col-0 der Fall, nicht aber für *ap2c1-1* und *ap2c1-2*.

Für alle Experimente dieser Arbeit, bei denen ein *AP2C1*-Knockout getestet werden sollte, wurde die *ap2c1-1*-Mutante verwendet, da diese als erste charakterisiert und so wie die *pp2c5-1* T-DNA-Insertionslinie in Southern Blot Analysen nur eine Insertion aufwies (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde diese schon näher in Schweighofer *et al.* (2007) charakterisiert.

Die Phosphatasen *PP2C5* und *AP2C1* sind sich in ihrer Proteinsequenz stark homolog. Eine Redundanz in ihrer Funktion kann daher nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die Linien *ap2c1-1* und *pp2c5-1* miteinander gekreuzt. In der T2-Generation segregierten dann die in der vorherigen Generation heterozygot vorliegenden Pflanzen. Es wurden insgesamt 250 Pflanzen mittels Genotypisierung analysiert, bis schließlich eine Pflanze gefunden wurde, die beide T-DNA-Insertionen homozygot trug (Abbildung 3-9).

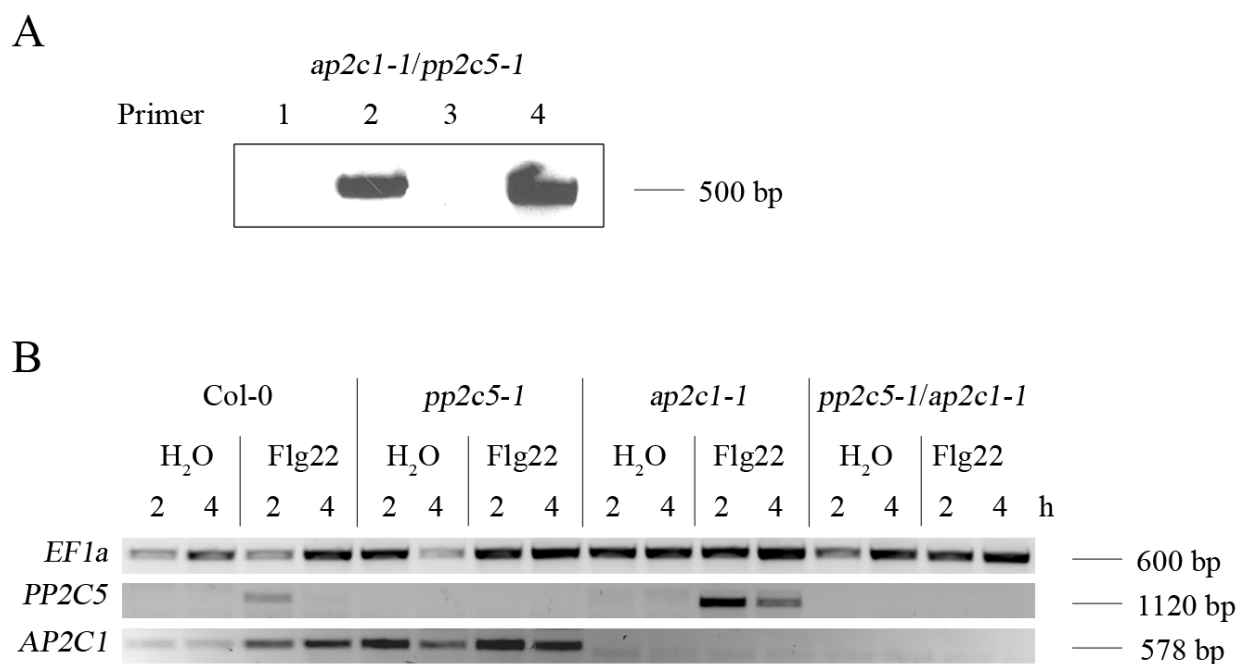


Abbildung 3-9: Charakterisierung des *pp2c5-1/ap2c1-1* Doppelknockouts.

A: Genotypisierung. Aus Blattmaterial der *pp2c5-1/ap2c1-1* sowie einer Wildtyppflanze (Col-0) wurde genomische DNA isoliert. Für die PCRs wurden folgende Primerkombinationen verwendet: 1: N609987LP und N609987RP, 2: N609987LP und Salk_lba, 3: N565126LP und N565126RP2 und 4: N565126LP und Salk_lba. B: Transkript-Analyse. In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und *ap2c1-1*, *pp2c5-1* sowie *ap2c1-1/pp2c5-1*-Knockoutpflanzen wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. Nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *PP2C5*-Transkriptmengen die Primer 40180-fw und 40180-R und für *AP2C1* die Primer 30020-F und N565126RP3.

Abbildung 3-9 A zeigt die Genotypisierung der *pp2c5-1/ap2c1-1* T-DNA-Insertionslinie. Es ist deutlich zu sehen, dass für die T-DNA-spezifischen Primerkombinationen (2 und 4) ein Fragment von 550 bp bzw. 500 bp amplifiziert werden konnte, nicht jedoch mit den entsprechenden Wildtypprimerpaaren (1 und 3). Um zu überprüfen, ob die T-DNA-Insertionen sich tatsächlich auch in der Inaktivierung von *PP2C5*- bzw. *AP2C1*-Transkript widerspiegeln, wurden die entsprechenden Transkriptmengen analysiert (Abbildung 3-9 B). Dafür wurde für eine semiquantitative RT-PCR in fünf Wochen alte Col-0, *pp2c5-1*, *ap2c1-1* und *pp2c5-1/ap2c1-1* Pflanzen Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. In Col-0 wurde, wie erwartet, sowohl *PP2C5*-Transkript als auch *AP2C1*-Transkript nachgewiesen, in *pp2c5-1* wurde nur *AP2C1*-Transkript amplifiziert und in *ap2c1-1* nur *PP2C5*-Transkript. Die Tatsache, dass in dem Doppelknockout *pp2c5-1/ap2c1-1* weder *PP2C5*- noch *AP2C1*-Transkript nachweisbar ist, bestätigte zusätzlich zur Genotypisierung die erfolgreiche Kreuzung der Einzelknockoutlinien.

3.5 Charakterisierung weiterer Knockoutlinien

Für phänotypische Analysen wurden hauptsächlich die *pp2c5*-Knockouts und teilweise *ap2c1*-Knockouts sowie der Doppelknockout aus beiden verwendet. Für zukünftige Experimente wurden außerdem Knockoutlinien der beiden anderen PP2Cs der B-Gruppe mit KIM, der *AP2C2* und *AP2C4*, vorbereitet.

Die Charakterisierung des *ap2c2*-Knockouts (FLAG_023H08) ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

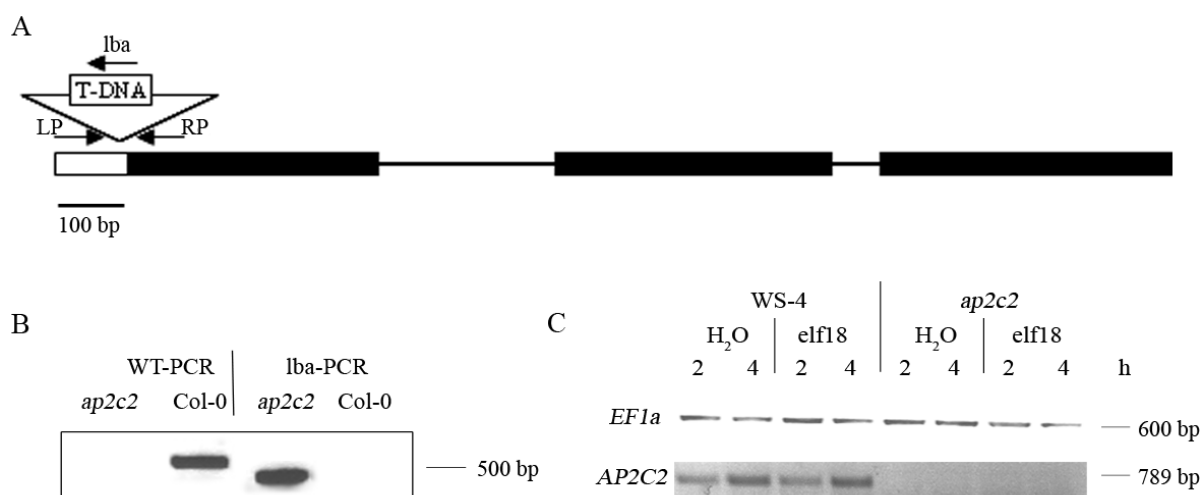


Abbildung 3-10: Charakterisierung der *ap2c2* T-DNA-Insertionslinie.

A: Genstruktur der *AP2C2*. Der weiße Balken symbolisiert die Promotorregion, die schwarzen Balken stellen die Exons dar und die dazwischen liegenden Linien die Introns der Phosphatase *AP2C2*. Die Pfeile symbolisieren die Genotypisierungsprimer: LP: FLAG_023H08LP, RP: FLAG_023H08RP2, lba: FLAG_LB4. B: Genotypisierung. Aus Blattmaterial der *ap2c2* sowie einer Wildtyppflanze (Ws-4) wurde genomische DNA isoliert. Für die Wildtyp-PCR wurde mit den Primern FLAG_023H08LP und FLAG_023H08RP2 ein 469 bp großes Fragment amplifiziert. Im Falle einer T-DNA-Insertion an der in A angegebenen Stelle wurde mit den Primern FLAG_023H08LP und FLAG_LB4 ein Fragment von 300 bp amplifiziert. C: Transkript-Analyse. In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Ws-4) und *ap2c2*-Knockoutpflanzen wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. Nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *AP2C2*-Transkriptmengen die Primer 07160RTfor und 07160rev. Letztere binden am Anfang des ersten bzw. am Ende des dritten Exons. Dies ergab ein Fragment der Größe von 789 bp.

Im Genmodell der *AP2C2* wird die in der Promotorregion lokalisierte T-DNA-Insertion *ap2c2* dargestellt (Abbildung 3-10 A). Eine Pflanze dieser Knockoutlinie wurde mit den angegebenen Primern genotypisiert (Abbildung 3-10 B). Im Falle der Wildtyp-PCR konnte nur für Ws-4 das genspezifische 469 bp große Fragment amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu lässt sich das T-DNA-spezifische 300 bp große Fragment nur in der *ap2c2*-Mutante erhalten, was zeigt, dass diese getestete Pflanze homozygot den Knockout trägt. Wildtyp- und

Knockoutpflanzen wurden daraufhin auf die Menge von *AP2C2*-Transkript untersucht (Abbildung 3-10 C). Dafür wurde für eine semiquantitative RT-PCR in fünf Wochen alte Ws-4 und *ap2c2* Pflanzen 1 μ M elf18 infiltriert, was in Ws-4 die transkriptionelle Aktivierung der *AP2C2* zur Folge hat. Elf18 wurde hier anstelle von Flg22 verwendet, da Ökotypen Ws-0 und Ws-4 natürliche Mutanten für FLS2 und somit Flg22-insensitiv sind (Gomez-Gomez und Boller 2000). Für die sich anschließende PCR von cDNA wurden die *AP2C2*-spezifischen Primer so gewählt, dass sie hinter der T-DNA-Insertionstelle liegen und im Falle von Vorhandensein von funktionellem Transkript ein Fragment von 789 bp amplifizieren. Wie erwartet war dies für den Ws-4-Wildtyp der Fall, nicht aber für die *ap2c2*-Mutante.

Als letzter Vertreter der B-Gruppe der PP2C-Phosphatasen wurde eine T-DNA-Insertionslinie für *AP2C4* (Salk_064063) charakterisiert (Abbildung 3-11).

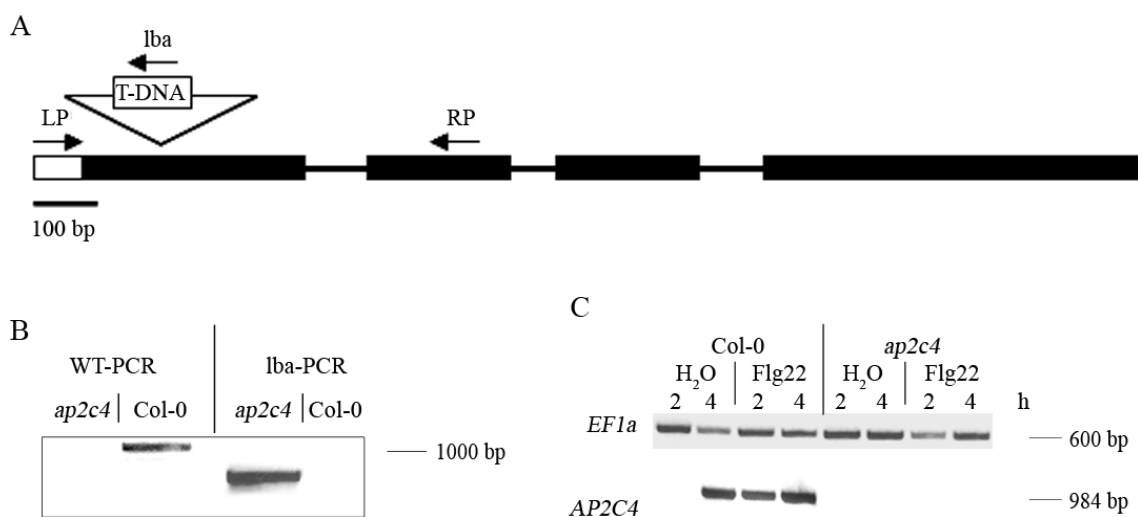


Abbildung 3-11: Charakterisierung der *ap2c4* T-DNA-Insertionslinie.

A: Genstruktur der *AP2C4*. Der weiße Balken symbolisiert die Promotorregion, die schwarzen Balken stellen die Exons dar und die dazwischen liegenden Linien die Introns der Phosphatase *AP2C4*. Die Pfeile symbolisieren die Genotypisierungsprimer: LP: N564063LP, RP: N564062RP, lba: Salk_lba. B: Genotypisierung. Aus Blattmaterial der *ap2c4* sowie einer Wildtyppflanze (Col-0) wurde genomische DNA isoliert. Für die Wildtyp-PCR wurde mit den Primern N564063LP und N564063RP ein 1085 bp großes Fragment amplifiziert. Im Falle einer T-DNA-Insertion an der in A angegebenen Stelle wurde mit den Primern N564063LP und Salk_lba ein Fragment von 700 bp amplifiziert. C: Transkript-Analyse. In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und *ap2c4*-Knockoutpflanzen wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. Nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *AP2C4*-Transkriptmengen die Primer N564063LP und N564063RP. Dies ergab ein Fragment der Größe von 984 bp.

In Abbildung 3-11 A ist die Genstruktur der *AP2C4* mit seiner *ap2c4*-T-DNA-Insertionslinie im ersten Exon dargestellt. Eine Pflanze dieser Knockoutlinie wurde mit den dargestellten Primern genotypisiert. Wie in Abbildung 3-11 B zu erkennen ist, konnte nur von der Wildtyp-DNA das genspezifische 1085 bp große Fragment amplifiziert werden. Das T-DNA-spezifische 700 bp große Amplifikat lässt sich hingegen nur von der *AP2C4*-defizienten Linie erhalten, was bedeutet, dass diese getestete Pflanze homozygot den Knockout trägt. Um zu überprüfen, ob die T-DNA-Insertion tatsächlich auch zum Verlust des *AP2C4*-Transkriptes führt, wurde die Transkriptmenge bestimmt (Abbildung 3-11 C). Dafür wurden für eine semiquantitative RT-PCR in fünf Wochen alte Col-0 und *ap2c4* Pflanzen Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. Für die sich anschließende PCR von cDNA wurden die *AP2C4*-spezifischen Primer so gewählt, dass sie die T-DNA-Insertion einschließen und im Falle von Vorhandensein von funktionellem Transkript ein Fragment von 984 bp amplifizieren. Dies war wie erwartet für Col-0 der Fall, nicht aber für *ap2c4*.

Neben den PP2Cs der B-Gruppe sind auch dualspezifische Phosphatasen Kandidaten für negative Regulatoren von MAPKs (Lee und Ellis 2007). Für zukünftige phänotypische Analysen wurden daher Knockouts dieser Phosphatasen charakterisiert. Die Rolle der *MKP1* in Salzstress und genotoxischem Stress sowie der Interaktion dieser mit MPK3, MPK4 und MPK6 wurde bereits durch Ulm *et al.* (2002) beschrieben. Die bereits charakterisierte *mkl1*-Knockoutlinie wurde von Roman Ulm (Universität Freiburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden weitere dualspezifische Phosphataseknockouts vom NASC-Stockcenter bestellt, nach homozygoten Knockoutpflanzen gescreent und diese anschließend charakterisiert.

Für die dualspezifische Phosphatase *DSPTP1* wurden zwei T-DNA-Insertionslinien charakterisiert. Die Charakterisierung der *dsptp-1* (Salk_081540) und *dsptp-2* (Salk_092811) Knockouts ist in Abbildung 3-12 dargestellt.

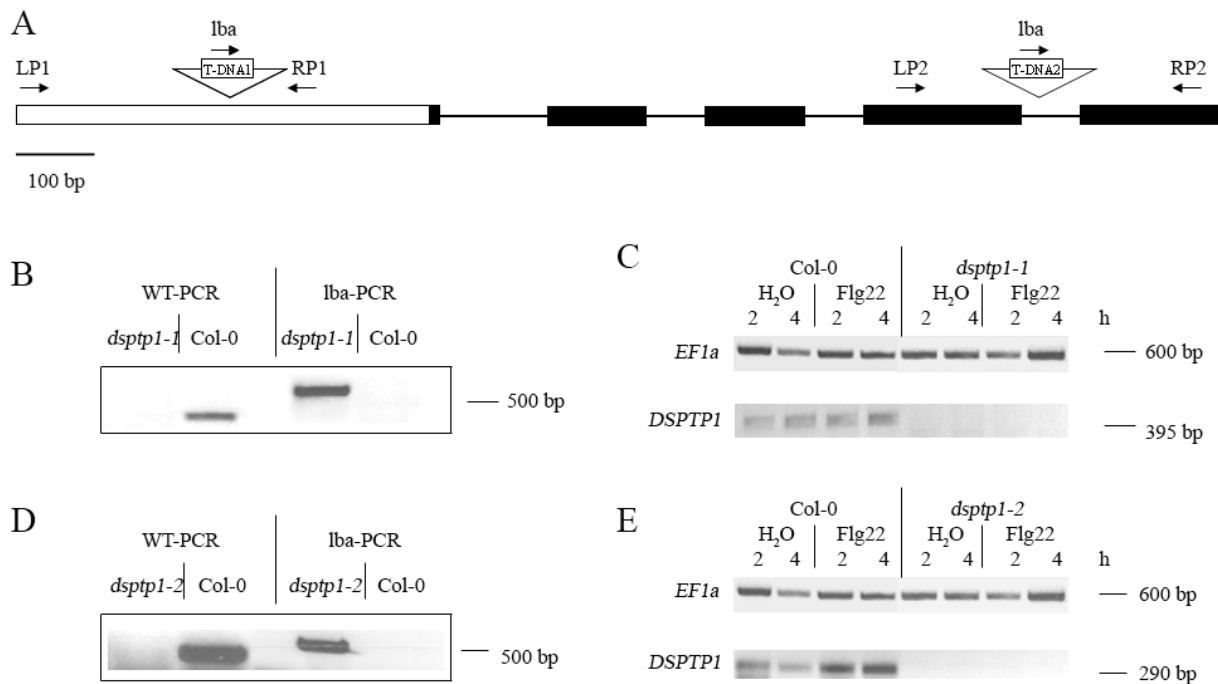


Abbildung 3-12: Charakterisierung der *dsptp1-1* und *dsptp2* T-DNA-Insertionslinien.

A: Genstruktur der *DSPTP1*. Der weiße Balken symbolisiert die Promotorregion, die schwarzen Balken symbolisieren die Exons und die dazwischen liegenden Linien die Introns der Phosphatase *DSPTP1*. Die Pfeile symbolisieren die Genotypisierungsprimer: LP1: N581540LP, RP1: N581540RP, LP2: N592811LP, RP2: N592811RP, lba: salk_lba. B/D: Genotypisierung. Aus Blattmaterial der *dsptp1-1* und *dsptp2* sowie einer Wildtyppflanze (Col-0) wurde genomische DNA isoliert. Für die Wildtyp-PCRs wurde mit den Primern N581540LP und N581540RP ein 395 bp großes Fragment (B) und mit dem Primerpaar N592811LP und N592811RP ein 386 bp großes Fragment (D) amplifiziert. Im Falle einer T-DNA-Insertion an der in A angegebenen Stelle wurde für die *dsptp1-1* mit den Primern N581540LP und Salk_lba ein Fragment von 600 bp (B) und für die *dsptp2* mit den Primern N592811RP und Salk_lba ein Fragment von ebenfalls 600 bp (D) amplifiziert. C/E: Transkript-Analyse. In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und *dsptp1-1*- sowie *dsptp2*-Knockoutpflanzen wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. Nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *DSPTP1*-Transkriptmengen die Primer N581540LP und N581540RP (C) bzw. N592811LP und N592811RP (E). Dies ergab Fragmente der Größe von 395 bp (C) bzw. von 290 bp (E).

In Abbildung 3-12 A ist das Genmodell der *DSPTP* mit den T-DNA-Insertionslinien *dsptp1-1* in der Promotorregion und *dsptp1-2* im vierten Intron dargestellt. Pflanzen der Knockoutlinien wurden mit den angegebenen Primern genotypisiert. Es ist in Abbildung 3-12 B und D zu erkennen, dass nur von der Wildtyp-DNA das genspezifische 395 bp bzw. 386 bp große Fragment amplifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu lassen sich die T-DNA-spezifischen 600 bp großen Amplifikate nur von den *DSPTP1*-defizienten Linien erhalten, was zeigt, dass diese getesteten Pflanzen homozygot die Insertion tragen. Um zu überprüfen ob die T-DNA-Insertionen tatsächlich auch zur Inaktivierung von *DSPTP1*-Transkript führt, wurde das eventuelle Vorhandensein von Resttranskript überprüft (Abbildung 3-12 C). Dafür wurde für eine semiquantitative RT-PCR in fünf Wochen alte Col-0, *dsptp1-1* und *dsptp1-2*

Pflanzen Wasser bzw. 1 μM Flg22 infiltriert, was nach der Infiltration von Flg22 in Col-0 die transkriptionelle Aktivierung der *DSPTP1* zur Folge hat. Für die sich anschließende PCR von cDNA wurden die *DSPTP1*-spezifischen Primer so gewählt, dass sie die T-DNA-Insertion einschließen und im Falle von Vorhandensein von funktionellem Transkript ein Fragment von 395 bp bzw. von 290 bp amplifizieren. Wie erwartet war dies für Col-0 der Fall, nicht aber für *dsptp1-1* und *dsptp1-2*.

Weiterhin wurde die *phs1*-Knockoutlinie (Salk_096827) charakterisiert (Abbildung 3-13).

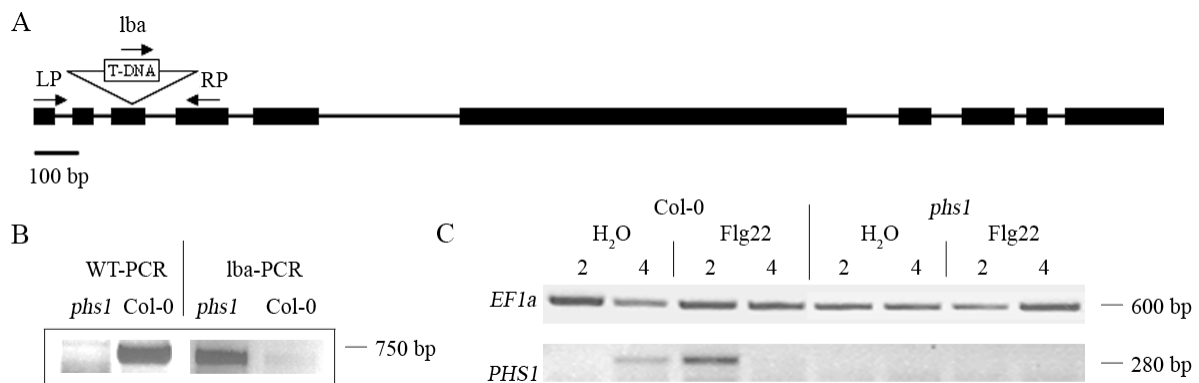


Abbildung 3-13: Charakterisierung der *phs1* T-DNA-Insertionslinie.

A: Genstruktur der *PHS1*. Die schwarzen Balken symbolisieren die Exons und die dazwischen liegenden Linien die Introns der Phosphatase *PHS1*. Die Pfeile symbolisieren die Genotypisierungsprimere: LP: N596835LP, RP: N596835RP, lba: salk_lba. B: Genotypisierung. Aus Blattmaterial der *phs1* sowie einer Wildtyppflanze (Col-0) wurde genomische DNA isoliert. Für die Wildtyp-PCR wurde mit den Primern N596835LP und N596835RP ein 675 bp großes Fragment amplifiziert. Im Falle einer T-DNA-Insertion an der in A angegebenen Stelle wurde mit den Primern N596835LP und Salk_lba ein Fragment von 700 bp amplifiziert. C: Transkript-Analyse. In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und *phs1*-Knockoutpflanzen wurde Wasser bzw. 1 μM Flg22 infiltriert. Nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *PHS1*-Transkriptmengen die Primer N596835LP und N596835RP. Dies ergab ein Fragment der Größe von 280 bp.

In Abbildung 3-13 A ist das Genmodell der *PHS1* mit seiner im dritten Exon lokalisierten T-DNA-Insertionslinie *phs1* dargestellt. Eine Pflanze dieser Knockoutlinie wurde mit den angegebenen Primern genotypisiert (Abbildung 3-13 B). Nur von der Wildtyp-DNA ließ sich dabei das genspezifische 675 bp große Fragment amplifizieren und nur von der *PHS1*-defizienten Linie das T-DNA-spezifische 700 bp große Amplifikat was zeigt, dass diese getestete Pflanze homozygot die T-DNA trägt. Zum Messen von *PHS1*-Resttranskript (Abbildung 3-13 C) wurde für eine semiquantitative RT-PCR in fünf Wochen alte Col-0 und *phs1* Pflanzen Wasser bzw. 1 μM Flg22 infiltriert, was in Col-0 die transkriptionelle Aktivierung der *PHS1* zur Folge hat. Es schloss sich eine PCR von cDNA an, für die die

PHS1-spezifischen Primer so gewählt wurden, dass sie die T-DNA-Insertion einschließen und im Falle von Vorhandensein von funktionellem Transkript ein Fragment von 280 bp amplifizieren. Wie erwartet war dies für Col-0 der Fall, nicht aber für *phs1*.

Von der Phosphatase *IBR5* wurde ebenfalls eine Knockoutlinie, *ibr5* (Salk_039359C), charakterisiert (Abbildung 3-14).

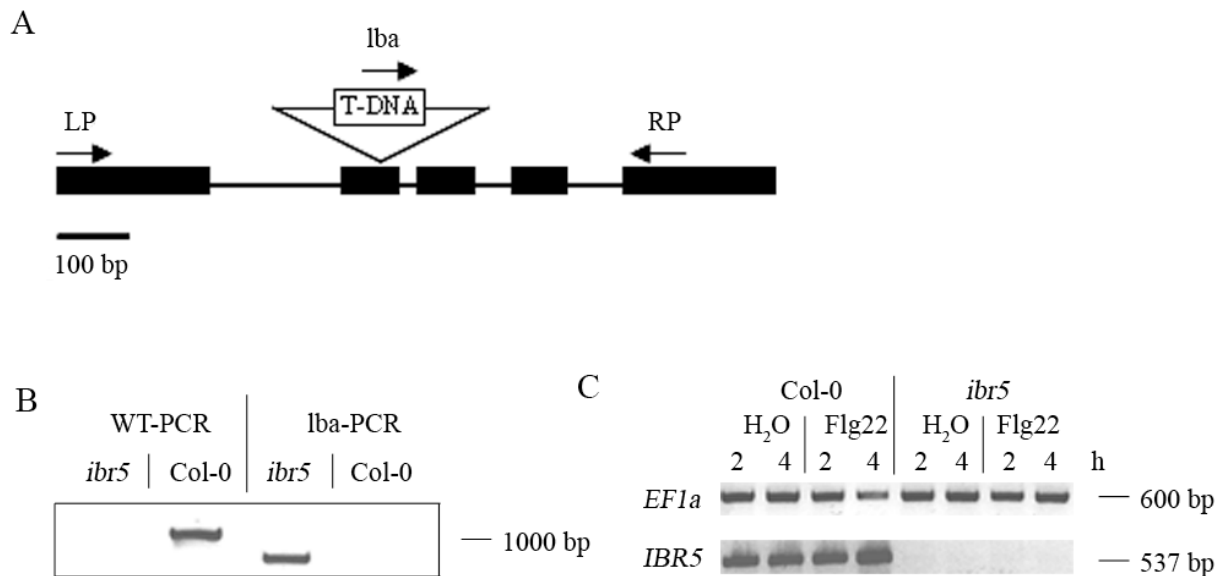


Abbildung 3-14: Charakterisierung der *ibr5* T-DNA-Insertionslinie.

A: Genstruktur der *IBR5*. Die schwarzen Balken symbolisieren die Exons und die dazwischen liegenden Linien die Introns der Phosphatase *IBR5*. Die Pfeile symbolisieren die Genotypisierungsprimer: LP: N653151LP, RP: N653151RP, lba: *salk_lba*. B: Genotypisierung. Aus Blattmaterial der *ibr5* sowie einer Wildtyppflanze (Col-0) wurde genomische DNA isoliert. Für die Wildtyp-PCR wurde mit den Primern N653151LP und N653151RP ein 1064 bp großes Fragment amplifiziert. Im Falle einer T-DNA-Insertion an der in A angegebenen Stelle wurde mit den Primern N653151RP und *Salk_lba* ein Fragment von 700 bp amplifiziert. C: Transkript-Analyse. In fünf Wochen alte Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und *ibr5*-Knockoutpflanzen wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert. Nach 2 h und 4 h wurden die entsprechenden Blätter geerntet und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese und die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer *eF1a-s* und *eF1a-as* zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet, für die *IBR5*-Transkriptmengen die Primer N653151LP und N653151RP. Dies ergab ein Fragment der Größe von 537 bp.

Das Genmodell der *IBR5* mit seiner T-DNA-Insertionslinie *ibr5* im zweiten Exon ist in Abbildung 3-14 A dargestellt. Bei der Genotypisierung einer Pflanze mit den angegebenen Primern (Abbildung 3-14 B) ist zu erkennen, dass nur von der Wildtyp-DNA das genspezifische 1064 bp große Fragment amplifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu lässt sich das T-DNA-spezifische 700 bp große Amplifikat nur von der *IBR5*-defizienten Linie erhalten, was zeigt, dass diese getestete Pflanze homozygot die T-DNA trägt. Um zu überprüfen, ob die T-DNA-Insertion tatsächlich auch zur Inaktivierung von *IBR5*-Transkription führt, wurde die Resttranskriptmenge bestimmt (Abbildung 3-14 C). Dafür

wurde für eine semiquantitative RT-PCR in fünf Wochen alte Col-0 und *ibr5* Pflanzen Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert, was in Col-0 die transkriptionelle Aktivierung der *IBR5* zur Folge hat. Für die sich anschließende PCR von cDNA wurden die *IBR5*-spezifischen Primer so gewählt, dass sie die T-DNA-Insertion einschließen und im Falle von Vorhandensein von funktionellem Transkript ein Fragment von 537 bp amplifizieren. Wie erwartet war dies für Col-0 der Fall. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass nach Infiltration von Wasser eine genauso starke Genexpression der *IBR5* wie nach der 1 μ M Flg22-Behandlung besteht, *IBR5* also nicht durch Flg22 induziert wird. Diese Genexpression konnte in der *ibr5*-Linie nicht beobachtet werden.

Neben der Charakterisierung dieser weiteren Einzel-Knockoutlinien, wurden für zukünftige Experimente außerdem Kreuzungen vorbereitet, um die Wahrscheinlichkeit des Ausbleibens eines Phänotyps durch Redundanz zwischen den verschiedenen Phosphatasen zu minimieren. Der Stand der Kreuzungen beim Anfertigen dieser Arbeit ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Stand der Kreuzungen zwischen verschiedenen Phosphatasen.

Kreuzung	Stand
<i>pp2c5-1/ap2c1-1</i>	homozygot für <i>pp2c5-1</i> und <i>ap2c1-1</i>
<i>pp2c5-1/mkp1</i>	homozygot für <i>pp2c5-1</i> und <i>mkp1</i>
<i>ap2c1-1/mkp1</i>	homozygot für <i>ap2c1-1</i> , heterozygot für <i>mkp1</i>
<i>pp2c5-1/ap2c2-1</i>	homozygot für <i>pp2c5-1</i> , heterozygot für <i>ap2c2-1</i>
<i>ap2c2-2/mkp1</i>	heterozygot
<i>pp2c5-1/ap2c1-1/ap2c2-1</i>	heterozygot
<i>pp2c5-1/ap2c1-1/mkp1</i>	heterozygot

3.6 Regulation von MAPKs durch die PP2C5 und AP2C1

Zum Nachweis von aktivierten MAPKs wurden Western-Blots mit einem Antikörper gegen aktivierte MAPKs durchgeführt. Der ursprüngliche gegen tierische MAPKs gerichtete anti-phospho-p44/42-Antikörper erkennt dabei auch die MPK3, MPK4 und MPK6. Auf der Grundlage von Berechnungen anhand ihrer Aminosäuresequenz wurde für die MPK3 eine Größe von 42,7 kDa, für die MPK4 eine Größe von 42,9 kDa und für die MPK6 eine Größe von 45,1 kDa festgestellt. Um herauszufinden, bei welcher Größe die entsprechenden MPKs 3, 4 und 6 jeweils tatsächlich im Gel laufen, wurde zunächst eine Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen die einzelnen MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 durchgeführt (Abbildung 3-15).

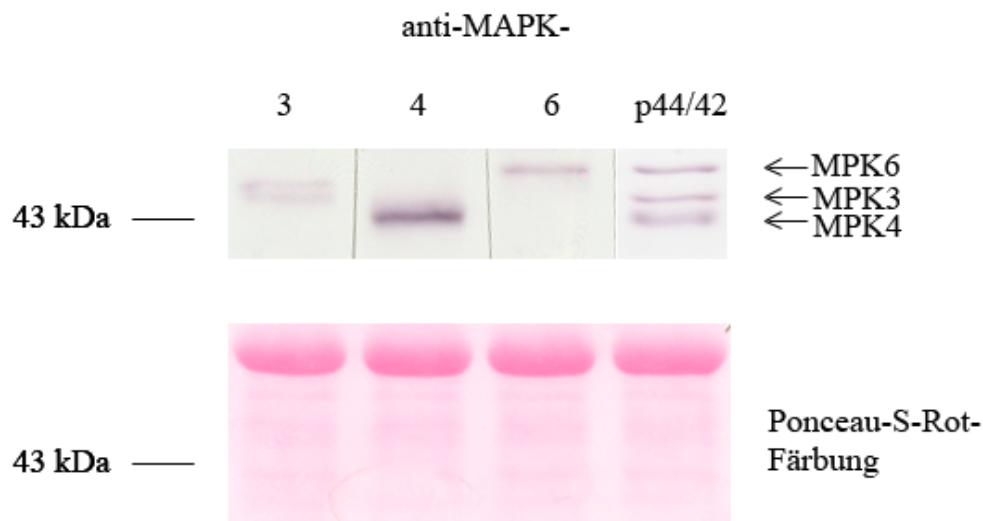


Abbildung 3-15: Western-Blot gegen die MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 zur Feststellung der Bandenlokalisierung.

Es wurden *A. thaliana*-Proteinextrakte auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach dem Lauf auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Zur Ladekontrolle wurde eine Ponceau-S-Rot-Färbung durchgeführt. Die Membran wurde anschließend zerschnitten und jeder Streifen mit einem anderen primären Antikörper inkubiert. Die erste Spur mit anti-MPK3 (1:5000-Verdünnung), die zweite Spur mit anti-MPK4 (1:5000-Verdünnung), die dritte Spur mit anti-MPK6 (1:5000-Verdünnung) und die vierte Spur mit anti-phospho-p44/42-MAPK (1:3000-Verdünnung). Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, wurde die NBT/BCIP-Farbreaktion durchgeführt und die Membranfragmente wieder aneinander gelegt.

In Abbildung 3-15 ist zu erkennen, dass die MPK3, MPK4 und MPK6 jeweils bei unterschiedlichen Größen im SDS-Gel laufen. Die MPK6 ist die größte, die MPK3 die mittelgroße und die MPK4 die kleinste der drei MAPKs. Somit kann später aufgrund der Größe festgestellt werden, welche der drei MAPKs aktiviert wurde.

Nachdem eine Interaktion der PP2C5 mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-6), wurde die Rolle der PP2C5 in der Regulation der genannten MAPKs untersucht (Abbildung 3-16).

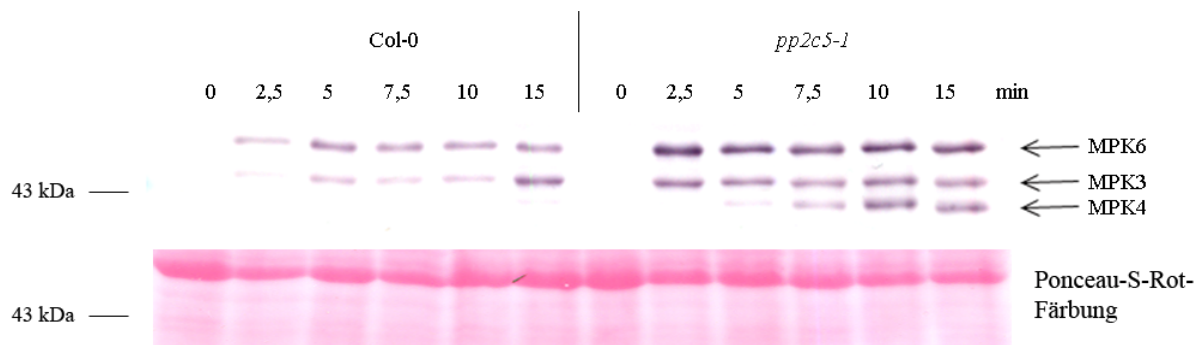


Abbildung 3-16: MAPK-Aktivierung in Wildtyp- und *pp2c5-1*-Knockoutpflanzen.

In Blätter von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen bzw. *pp2c5-1*-Knockoutpflanzen wurde Wasser infiltriert und diese nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach Isolation von Gesamtprotein wurde ein Western-Blot durchgeführt, bei dem ein Antikörper gegen aktivierte MAPKs (anti-phospho p44/42 MAPK, 1:3000-Verdünnung) verwendet wurde. Als Kontrolle diente die Ponceau-S-Rot-Färbung, die nach dem Blotten auf die Nitrozellulose-Membran durchgeführt wurde.

Die MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 werden schon sehr schnell nach verschiedenen Stresseinwirkungen aktiviert (Asai *et al.* 2002). Deshalb wurden *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen sowie *pp2c5-1*-Knockoutpflanzen mit Wasser infiltriert um Verwundungsstress zu induzieren und die Blätter bereits nach sehr kurzen Zeitabständen geerntet (Abbildung 3-16). Mit Extrakten des Blattmaterials wurde ein Western-Blot durchgeführt. Es wurde dabei der anti-phospho-p44/42-MAPK-Antikörper verwendet, der nur an das phosphorylierte TEY-Motiv in aktivierten MAPKs bindet. Als Kontrolle für gleiche Proteinmengen wurde nach dem Blotten eine Ponceau-S-Rot-Färbung mit der Membran durchgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass zu vergleichbaren Zeitpunkten die MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 in der *pp2c5-1*-Knockoutpflanze stärker aktiviert sind als im Wildtyp. Vor allem für die MPK4 ist dieser Unterschied besonders nach 7,5 bis 15 min deutlich. Diese Beobachtung ist ein starker Hinweis dafür, dass die PP2C5 ein negativer Regulator der stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 ist.

Nachdem auch die Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* sowie die komplementierte Linie *pp2c5-1/PP2C5* zur Verfügung standen, wurde das Experiment mit den Linien Col-0, *ap2c1-1*, *pp2c5-1*, *ap2c1-1/pp2c5-1* und *pp2c5-1/PP2C5* wiederholt (Abbildung 3-17). Dabei wurden nur die Zeitpunkte von 7,5 bis 15 min betrachtet, da hier der Einfluss auf die MPK4 am deutlichsten erkennbar war.

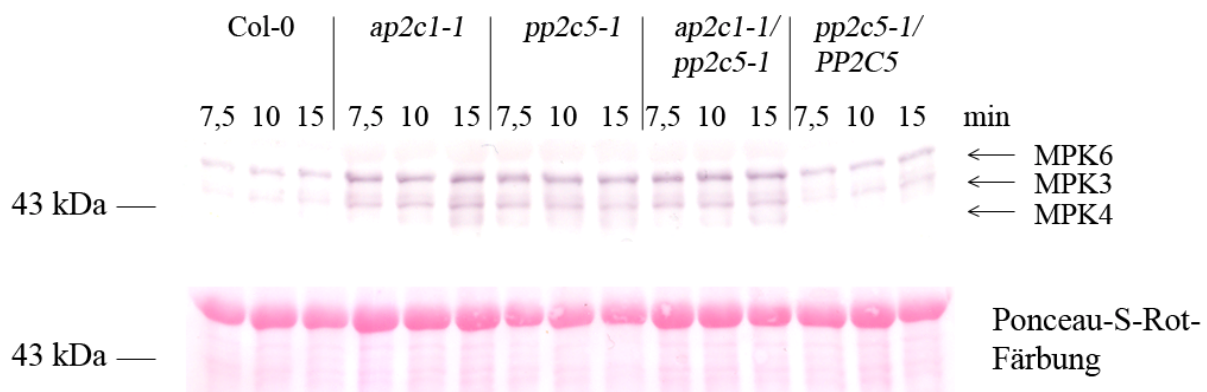


Abbildung 3-17: MAPK-Aktivierung in Wildtyp-, *ap2c1-1* und *pp2c5-1*-Knockoutpflanzen, der *ap2c1-1/pp2c5-1*-Knockoutline sowie der komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5*.

In Blätter von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen, den Knockoutpflanzen sowie der komplementierten Linie wurde 1 μ M Flg22 infiltriert und diese nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach Isolation von Gesamtprotein wurde ein Western-Blot durchgeführt, bei dem ein Antikörper gegen aktivierte MAPKs (anti-phospho p44/42 MAPK, 1:3000-Verdünnung) verwendet wurde. Als Kontrolle dient die Ponceau-S-Rot-Färbung, die nach dem Blotten auf die Nitrozellulose-Membran durchgeführt wurde.

Nicht nur für die Linie *pp2c5-1* wie in Abbildung 3-16 beobachtet, sondern auch für die Linie *ap2c1-1* und für die Doppelknockoutline *ap2c1-1/pp2c5-1* konnte eine deutlich stärkere Aktivierung der MPK3, MPK4 und MPK6 im Vergleich zu Col-0 und zur komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5* beobachtet werden (Abbildung 3-17). Eine Verstärkung des Effekts von *ap2c1-1* und *pp2c5-1* in der Doppelmutante *ap2c1-1/pp2c5-1* konnte allerdings nicht festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass PP2C5 und AP2C1 im gleichen Signalweg benötigt werden und jedes Protein alleine schon für die MAPK Dephosphorylierung ausreichend ist.

In *pp2c5-1*-Knockoutpflanzen sind die MPK3, MPK4 und MPK6 stärker aktiviert als im Wildtyp und der *pp2c5-1/PP2C5* komplementierten Linie. Dies deutet die Dephosphorylierung der genannten MAPKs durch die PP2C5 an. Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, sollten außerdem PP2C5-Überexpressionspflanzen untersucht werden. Es war während dieser Arbeit leider nicht möglich, *Arabidopsis*-Pflanzen stabil mit einem PP2C5-Überexpressionskonstrukt zu transformieren. Auch eine transiente Expression der PP2C5 durch Dexamethason in *A. thaliana*, die ein PP2C5-Konstrukt mit einem DEX-induzierbaren Promotor enthalten, konnte nicht erreicht werden. Es wurden zwar jeweils transformierte Pflanzen mittels ihres Selektionsmarkers gefunden, doch eine Überexpression der PP2C5 in *Arabidopsis* schlug bei beiden Ansätzen fehl (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde die PP2C5 in *N. benthamiana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation transient überexprimiert (Abbildung 3-18).

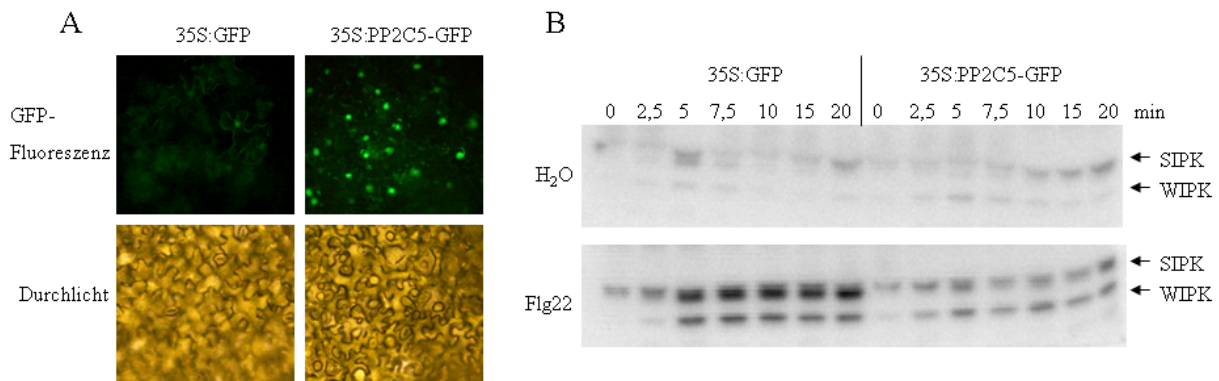


Abbildung 3-18: Effekt einer transienten Überexpression der PP2C5 auf die Aktivierung von MAPKs in Tabakblättern.

A: *N. benthamiana* Blätter wurden mit Agrobakterien transformiert, die die Konstrukte für 35S:GFP bzw. 35S:PP2C5-GFP tragen. Nach 2 Tagen wurde die Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. B: Die in A gezeigten *N. benthamiana* Blätter wurden mit Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert und Blattscheiben nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach Isolation von Gesamt-Protein wurde ein In-Gel-MAPK-Assay mit MBP als artifiziellm Substrat durchgeführt.

Verwendet wurde hierfür ein Konstrukt, das die PP2C5 C-terminal mit GFP fusioniert und unter Kontrolle des starken 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus steht (Cabrillac 2005). *Agrobacterium tumefaciens* überträgt dabei dieses Konstrukt in *N. benthamiana*. Die erfolgreiche Expression lässt sich durch GFP-Fluoreszenz im Zellkern, dort wo die PP2C5 auch in *Arabidopsis* hauptsächlich lokalisiert ist, zwei Tage später nachweisen (Abbildung 3-18 A). In diese PP2C5-überexprimierenden Tabakblätter wurde Wasser bzw. 1 μ M Flg22 infiltriert und nach den angegebenen kurzen Zeitpunkten Blattscheiben ausgestochen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend ein In-Gel-Kinase-Assay durchgeführt (Abbildung 3-18 B). Da die Tabak-MAPKs nur schlecht von dem p44/42-MAPK-Antikörper erkannt wurden (Daten nicht gezeigt), wurde nicht wie in den vorherigen *Arabidopsis*-Experimenten ein Western-Blot durchgeführt. Der In-Gel-MAPK-Assay bedient sich des Myelin Binding Proteins (MBP) als artifiziellm Substrat. Durch MBP-Phosphorylierung mithilfe von radioaktiv markiertem ³²P-ATP lässt sich die MAPK-Aktivierung darstellen. In Abbildung 3-18 B ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivierung der Tabak MAPKs SIPK (homolog zur MPK6) und WIPK (homolog zur MPK3) durch Flg22 in den Tabakblättern, die mit 35S:PP2C5-GFP transformiert wurde, wesentlich schwächer ausfällt als in der Kontrollpflanze, die mit 35S-GFP transformiert wurde. Es wurde also der umgekehrte, d. h. komplementierte Effekt zu der *pp2c5-1*-Knockoutlinie beobachtet.

Durch Untersuchungen der MAPK-Aktivierung in *pp2c5*-Knockoutpflanzen und Überexpression der *PP2C5* in Tabak im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen kann festgestellt werden, dass die *PP2C5* eine wichtige Rolle in der Dephosphorylierung und damit bei der Inaktivierung der stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 spielt.

3.7 Funktion der *PP2C5* in der pflanzlichen Immunantwort

Aufgrund der besonders starken transkriptionellen Induktion der *PP2C5* nach Infiltration von Flg22, LPS, PGN und elf18 sowie Pathogen-Infektion (Abbildung 3-2), wurde zunächst eine mögliche Rolle der *PP2C5* in der pflanzlichen Immunantwort untersucht. Um die Funktion der *PP2C5* und der bereits in Schweighofer *et al.* (2007) beschriebenen *AP2C1* innerhalb der Pathogenabwehr untersuchen zu können, wurden *pp2c5-1*, *ap2c1-1*, *ap2c1-1/pp2c5-1* bzw. Wildtyppflanzen und *pp2c5-1/PP2C5*-Pflanzen mit Bakterien des Stammes *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) mit unterschiedlicher Pathogenizität infiziert (Abbildung 3-19). Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelte es sich um das virulente Pathogen *Pto* DC3000 (Abbildung 3-19 A), das ein Avirulenzgen exprimierende Pathogen *Pto* DC3000avrRpm1 (Bisgrove *et al.* 1994, Abbildung 3-19 B), das avirulente Pathogen *Pto* Δ avrPto/PtoB (Lin und Martin 2005), welchem zwei Effektorproteine fehlen (Abbildung 3-19 C) und die Coronatin-defiziente Mutante *Pto* DC3661 (Block *et al.* 2005, Abbildung 3-19 D). Es wurde das bakterielle Wachstum nach Infektion über vier Tage betrachtet.

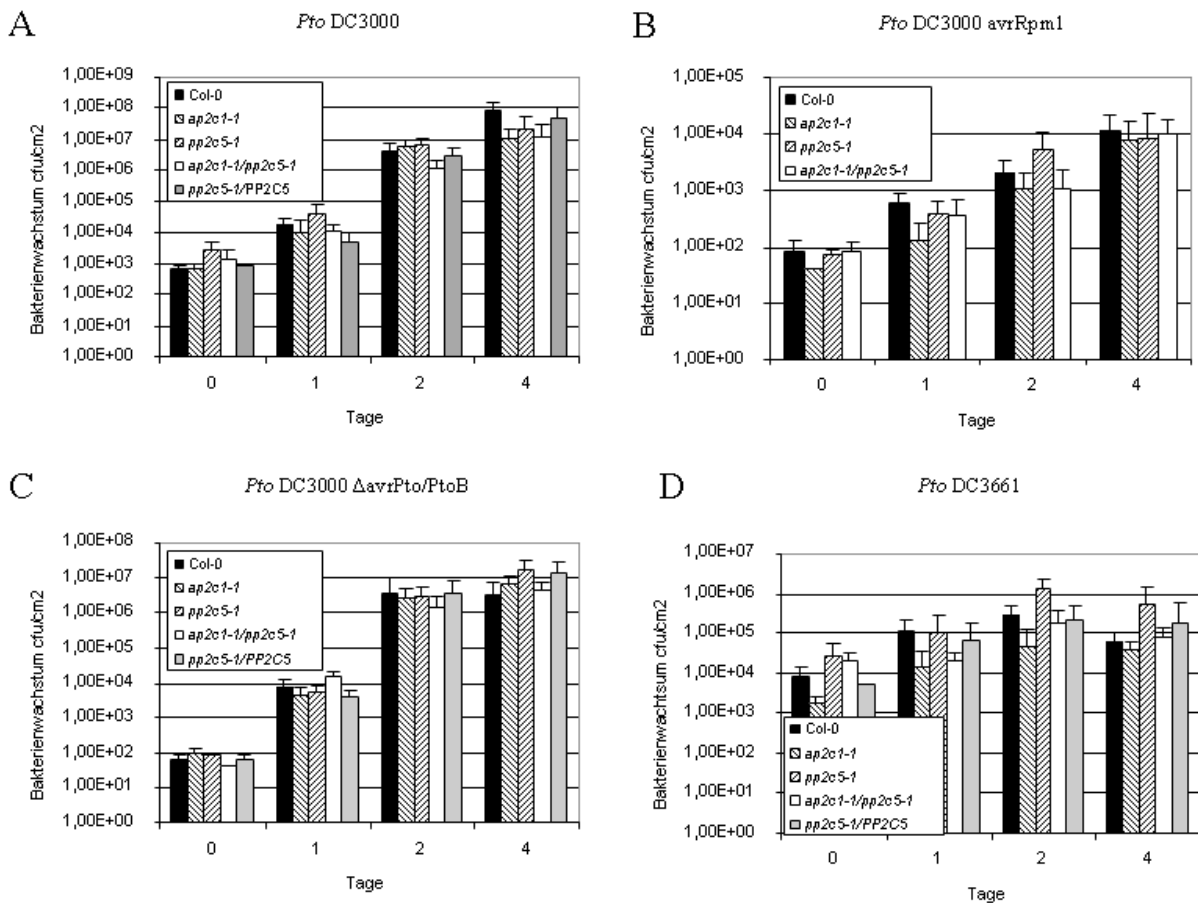


Abbildung 3-19: Infektion von PP2C-Knockouts mit verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen.

In den Abbildungen ist das bakterielle Wachstum von (A) *Pto* DC3000, (B) *Pto* DC3000 *avrRpm1*, (C) *Pto* DC3000 Δ *avrPto/PtoB* und (D) *Pto* DC3661 dargestellt. Für die Versuche wurden fünf Wochen alte Pflanzen der Linien Col-0, *ap2c1-1*, *pp2c5-1*, *ap2c1-1/pp2c5-1* und *pp2c5-1/PP2C5* verwendet. Die Bakteriensuspension wurde auf die Pflanzen gesprüht (A und D) bzw. in Blätter infiltriert (B und C).

In Abbildung 3-19 A ist über den Zeitraum von vier Tagen eine starke Vermehrung von *Pto* DC3000 sowohl im Wildtyp und *pp2c5-1/PP2C5* als auch in den Knockouts *ap2c1-1*, *pp2c5-1* und *ap2c1-1/pp2c5-1* zu beobachten. Am Tag 2 zeigt der Doppelknockout und an Tag 4 zusätzlich die beiden Einzelknockouts ein geringfügig schwächeres Wachstum als die anderen Linien. In 5 von 8 durchgeführten unabhängigen Experimenten konnte dieser, wenn auch schwache, Effekt beobachtet werden. In den anderen Fällen war kein Unterschied zwischen Wildtyp und den Knockouts erkennbar. Bei der Betrachtung des Bakterienwachstums von *Pto* DC3000 *avrRpm1* (B) und *Pto* DC3000 Δ *avrPto/PtoB* (C) konnte ebenfalls eine Vermehrung der Bakterienstämme in den infiltrierten Linien über einen Zeitraum von vier Tagen festgestellt werden. Es war jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockouts erkennbar. Nach dem Besprühen der zu betrachtenden Linien mit *Pto* DC3661 (D) konnte sich dieser Stamm in allen untersuchten Pflanzen deutlich schlechter vermehren als der virulente Bakterienstamm. Beim Vergleich einer Vielzahl durchgeführter

unabhängiger Experimente konnte kein einheitlicher Phänotyp bezüglich unterschiedlicher Bakterienvermehrung in Wildtyp und Knockouts festgestellt werden. Von insgesamt 13 durchgeführten *Pto* DC3661 Wachstumskurven konnte an Tag 4 in 7 Fällen ein vermehrtes Wachstum von *Pto* DC3661 in *pp2c5-1* im Gegensatz zu Col-0 beobachtet werden. In 5 Fällen war kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante feststellbar und in einem Fall konnten in der *pp2c5-1*-Mutante eine etwas schwächere Bakterienvermehrung als im Col-0-Wildtyp festgestellt werden.

Da nur ein sehr schwacher Phänotyp mit dem virulenten Stamm *Pto* DC3000 festgestellt werden konnte, ist es eher unwahrscheinlich die zentrale Rolle der *PP2C5* in der pflanzlichen Immunität bezüglich Abwehr von bakteriellen Pathogenen zu suchen. Aufgrund der starken Homologie der PP2Cs der B-Gruppe ist eine damit verbundene mögliche funktionelle Redundanz von Phosphataseaktivitäten aber nicht auszuschließen.

Weiterhin wurde der Einfluss des *PP2C5*- und *AP2C1*-Gendefekts auf die Infektiösität des nekrotrophen Pilzes *Alternaria brassicicola* getestet (Abbildung 3-20).

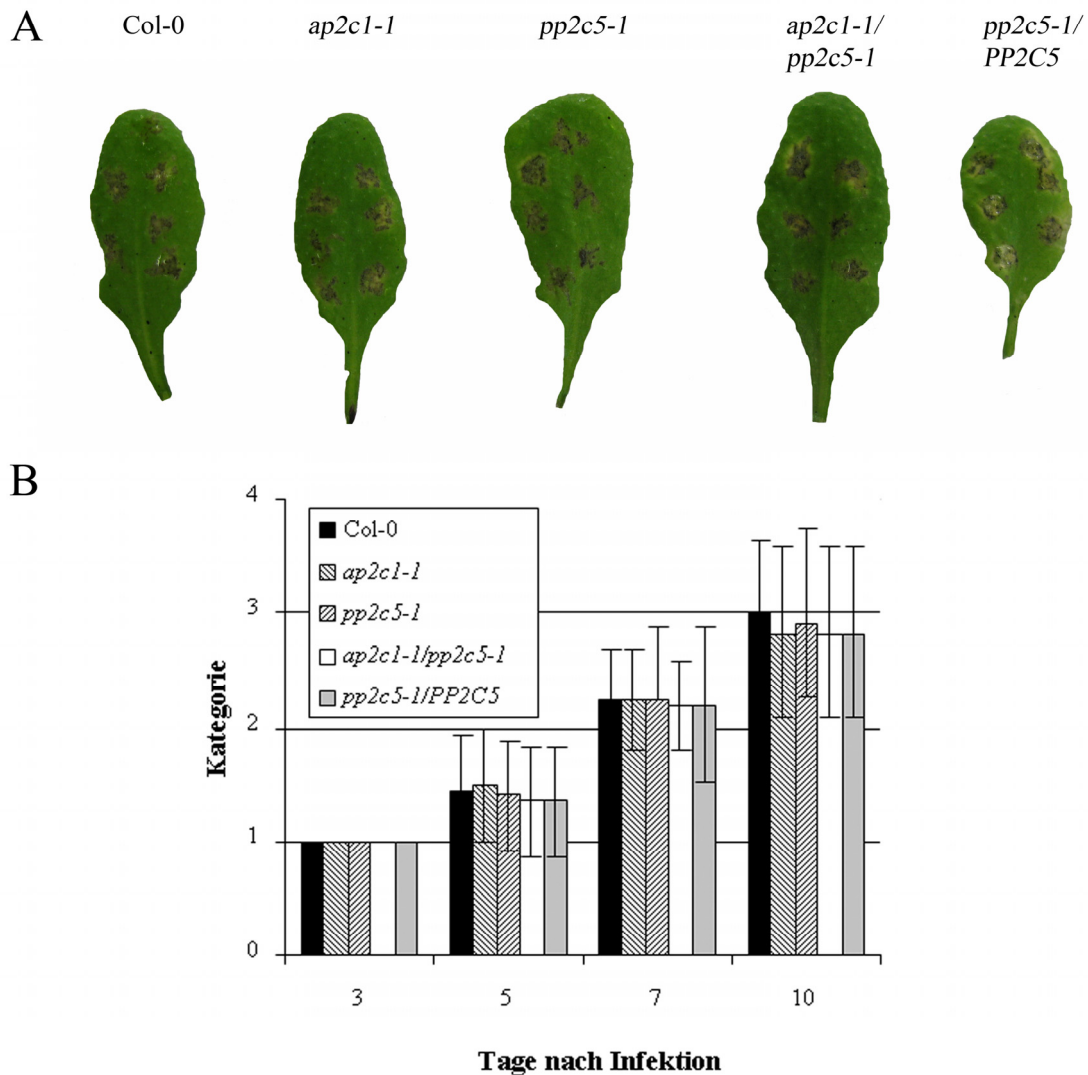


Abbildung 3-20: Symptomatik nach Infektion mit *Alternaria brassicicola*.

Für die Infektionen mit *Alternaria brassicicola* wurden 6 Wochen alte Pflanzen verwendet. Von einer Sporenlösung mit 5×10^5 Sporen pro ml wurden je 6 Tropfen zu je $5 \mu\text{l}$ pro Blatt aufgetropft. A: Nach 10 Tagen unter Kurztagbedingungen und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Blätter von den Pflanzen abgeschnitten und fotografiert. B: Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurden die Blätter anhand der Symptome bonitiert. Die Fehlerbalken ermitteln sich aus der Standardabweichung von jeweils 24 Blättern.

Nach Infektion mit *Alternaria brassicicola* wurden die behandelten Pflanzen bei 100 % Luftfeuchtigkeit für 10 Tage unter Kurztagbedingungen inkubiert. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurden die einzelnen Blätter anhand ihrer Symptome bonitiert (Abbildung 3-20 B). Nach 10 Tagen wurden representative Blätter abgeschnitten und fotografiert (Abbildung 3-20 A). Es konnte innerhalb der 10 Tage kein Unterschied in der Infektiösität von *Alternaria brassicicola* zwischen Wildtyp- und *ap2c1-1*-, *pp2c5-1*- und *ap2c1-1/pp2c5-1*-Knockoutpflanzen sowie *pp2c5-1/PP2C5* festgestellt werden.

Als weiteres Beispiel für einen nekrotrophen Pilz wurde die Infektiosität von *Botrytis cinerea* getestet (Abbildung 3-21). In Schweighofer *et al.* (2007) wurde beschrieben, dass die *AP2C1*-Überexpressionslinie eine veränderte Reaktion auf *Botrytis cinerea* zeigten.

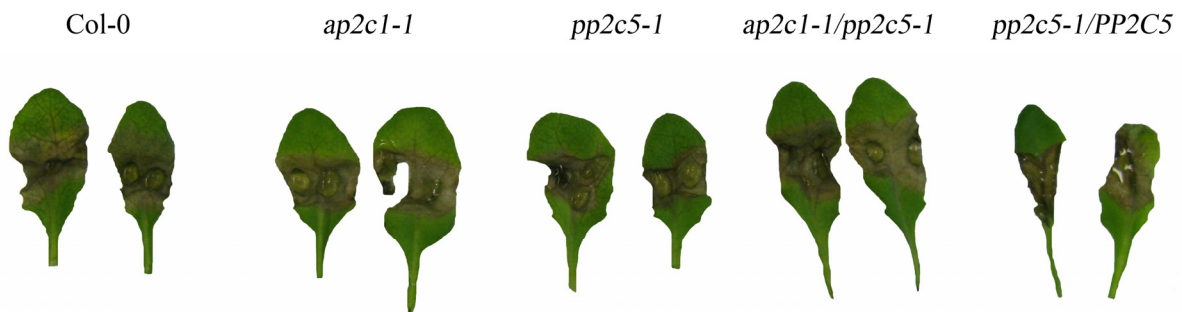


Abbildung 3-21: Symptomatik nach Infektion mit *Botrytis cinerea*.

Für die Infektionen mit *Botrytis cinerea* wurden 6 Wochen alte Pflanzen verwendet. Von einer Sporenlösung mit 5×10^5 Sporen pro ml wurden je 2 Tropfen zu je $5 \mu\text{l}$ pro Blatt aufgetropft. Nach 4 Tagen unter Kurztagbedingungen und 100% Luftfeuchtigkeit wurden die Blätter von den Pflanzen abgeschnitten und fotografiert.

Arabidopsis-Pflanzen der Linien Col-0, *ap2c1-1*, *pp2c5-1*, *ap2c1-1/pp2c5-1* und *pp2c5-1/PP2C5* wurden mit *Botrytis cinerea*-Sporen infiziert und über einen Zeitraum von vier Tagen bei 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Beim Vergleich aller parallel infizierten Pflanzen konnte kein Unterschied der Symptome zwischen Wildtyp und den Knockoutpflanzen festgestellt werden.

Im Weiteren wurde der Einfluss des *PP2C5*-Knockouts auf die Virulenz des biotrophen Pathogens *Erysiphe pisi* untersucht. Dieses Pathogen verursachte jedoch keine von der Wildtyp-Kontrolle abweichende Symptome in den *pp2c5-2*-Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

Aus den Infektionsexperimenten dieser Arbeit mit *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* lässt sich schließen, dass die *PP2C5* und die *AP2C1* keine entscheidende Rolle bei der Abwehr von nekrotrophen Pilzen spielen. Auch bei der Abwehr des biotrophen Pathogens *Erysiphe pisi* scheint die *PP2C5* keine essentielle Funktion zu haben.

3.8 Funktion der *PP2C5* in der Antwort auf abiotischen Stress

Die Microarray-Analysen zeigten erhöhte Transkriptlevel der *PP2C5* bei Trockenstress (siehe Kapitel 3.2). In einem Trockenstressexperiment wurde daher untersucht, ob sich die T-DNA-Insertionslinien *ap2c1-1*, *pp2c5-1* und *ap2c1-1/pp2c5-1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 anders verhalten.

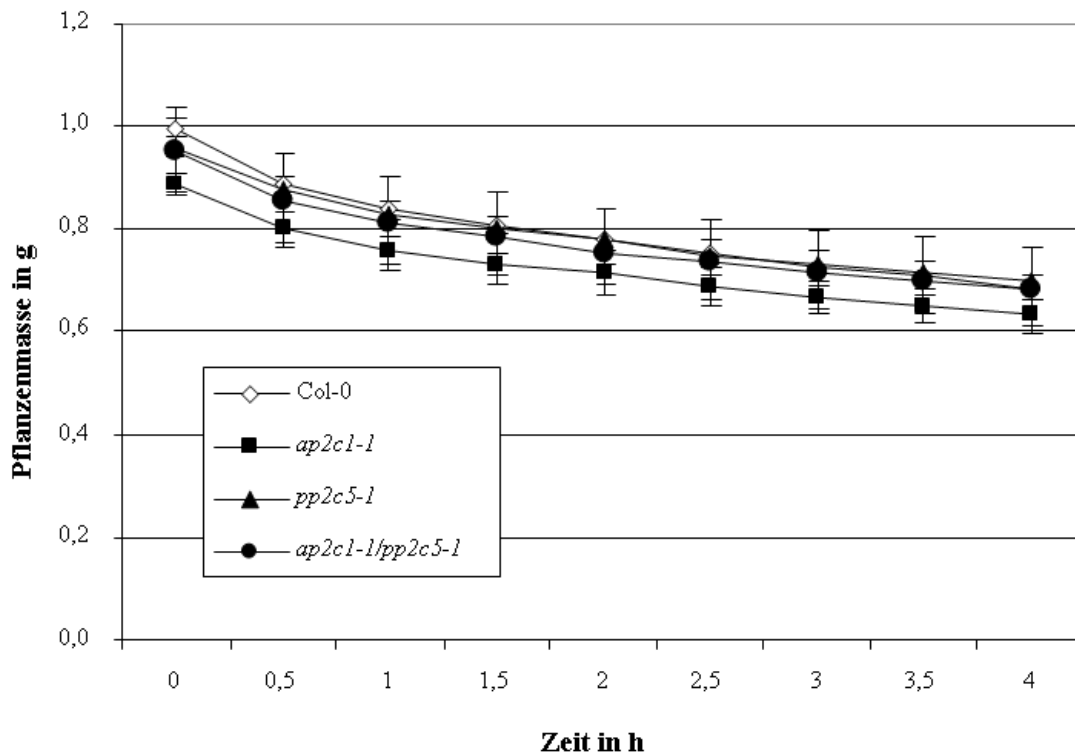


Abbildung 3-22: Reaktion von Wildtyp- und Knockout-*Arabidopsis*-Pflanzen auf Trockenstress.

Die Rosetten von 6 Wochen alten *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen, der Knockoutlinien *ap2c1-1* und *pp2c5-1* sowie des Doppelknockouts *ap2c1-1/pp2c5-1* wurden abgeschnitten und der Wasserverlust über den Verlauf von 4 Stunden durch die Bestimmung der Masse festgestellt.

Deshalb wurden die Rosetten von je 12 Pflanzen pro Linie abgeschnitten und deren Wasserverlust über die Dauer von 4 Stunden halbstündlich durch Messung der Gewichtsabnahme bestimmt (Abbildung 3-22). Der Vergleich des Wildtyps Col-0 mit den Knockoutlinien *ap2c1-1*, *pp2c5-1* und *ap2c1-1/pp2c5-1* zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den Linien bezüglich des Wasserverlusts.

Wie bereits erwähnt, wurde verstärkt *PP2C5*-Transkriptakkumulation ebenfalls während Salzstress und osmotischen Stress festgestellt (siehe Kapitel 3.2). Daher wurde zu Beginn der Arbeit ein Wurzellängenassay durchgeführt, bei dem Col-0 und die zunächst nur verfügbare *PP2C5*-Knockoutlinie *pp2c5-2* (Abbildung 3-7) auf Kontrollmedium bzw. auf Medium, welches NaCl oder Sorbitol enthält, umgesetzt und das Wurzelwachstum über die Dauer von 12 Tagen beobachtet (Abbildung 3-23).

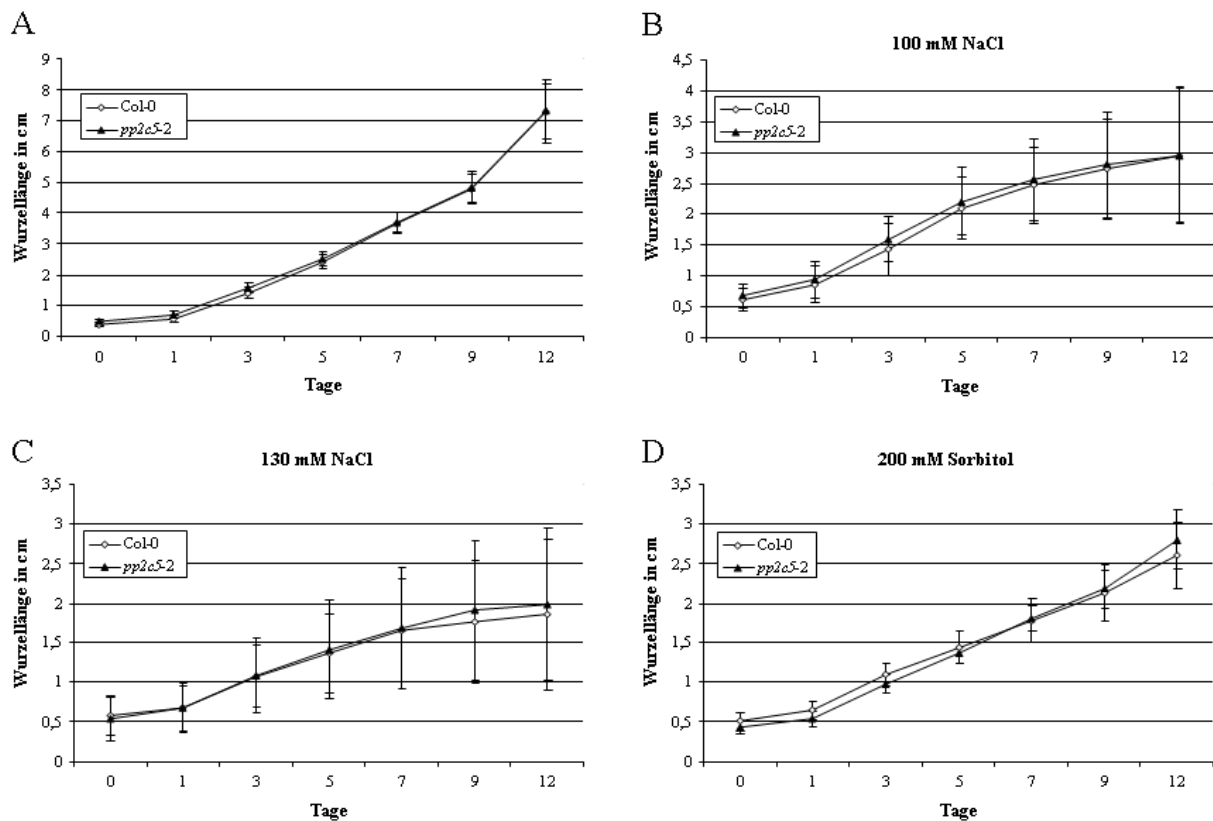


Abbildung 3-23: Bestimmung von Wurzellängen der Wildtyp- und Knockoutpflanzen.

Col-0 und *pp2c5-2* Keimlinge wurden für 7 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten angezogen und anschließend zur Kontrolle auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten (A), auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit 100 mM NaCl (B), mit 130 mM NaCl (C) sowie mit 200 mM Sorbitol (D) übertragen. Nach den angegebenen Zeitabständen wurde das Wachstum der Wurzeln jeweils markiert und anschließend mithilfe eines digitalen Lineals ausgemessen. Pro Linie und Behandlung wurden 21 Wurzeln ausgemessen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Vergleicht man das Wurzellängenwachstum von Col-0 und *pp2c5-2*, wird eine stetige Elongation der Wurzeln innerhalb der 12 betrachteten Tage erkennbar (Abbildung 3-23). Die Wurzeln von Wildtyp- als auch von Knockoutpflanzen erreichen in diesem Zeitraum eine Länge von 7,2 cm. Die Wurzelwachstumskurven von Col-0 und *pp2c5-2* sind dabei nahezu identisch. Bei der Zugabe von 100 mM bzw. 130 mM NaCl zum Medium, werden nur noch Wurzellängen von ca. 3 cm bzw. von ca. 2 cm erreicht. Die Streuung der einzelnen Wurzellängen erhöht sich beim Salzstress, was zu großen Standardabweichungen führt. Bei der Betrachtung der jeweiligen Mittelwerte ist jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockoutlinie zu beobachten. Ebenso gibt es keinen signifikanten Unterschied im Wurzelwachstum auf 200 mM Sorbitol. Hier erreichen die Wurzeln nach 12 Tagen eine ungefähre Durchschnittslänge von 2,7 cm.

Im Wurzellängenexperiment lässt sich kein Unterschied zwischen Col-0 und *pp2c5-2* bezüglich Salzstress oder osmotischem Stress feststellen.

Da die *PP2C5* in Mikroarrayanalysen auch durch die Ethylenvorstufe ACC schwach transkriptionell aktiviert war (siehe 3.2), sollte nun überprüft werden, ob die *PP2C5* oder *AP2C1* im Signalweg dieses Hormons eine Rolle spielen. Deshalb wurden Keimlinge mit der Ethylenvorstufe ACC behandelt und die so genannte „Triple Response“ untersucht (Abbildung 3-24).

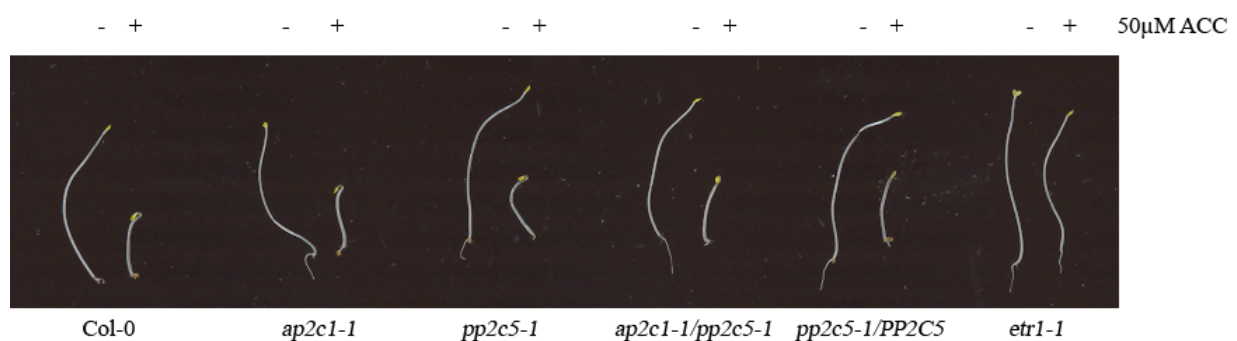


Abbildung 3-24: Einfluss von ACC auf die Keimung von Wildtyp und Knockoutpflanzen.

Wildtyp-Samen, Samen der Knockoutlinien *ap2c1-1* und *pp2c5-1* sowie Samen des Doppelknockouts *ap2c1-1/pp2c5-1*, der komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5* und *etr1-1* als Positivkontrolle wurden auf 1/2-MS-Agar plus/minus der Ethylenvorstufe ACC ausgelegt. Nach zwei Tagen Stratifikation erfolgte eine Inkubation in der Dunkelheit bei Raumtemperatur. Vier Tage später wurden die Keimlinge fotografiert.

Dafür wurden Keimlinge auf 1/2-MS-Platten mit und ohne 50 µM ACC im Dunkeln angezogen. Der Effekt der „Triple Response“ besteht darin, dass die etiolierten Keimlinge ein verdicktes Hypokotyl ausbilden, die Wurzelelongation verhindert wird und ein apikaler Haken ausgebildet wird (Hall *et al.* 1999). Sowohl Wildtypkeimlinge als auch Keimlinge der Knockoutlinien und der komplementierten Linie zeigten eine ausgeprägte „Triple Response“. *etr1-1* ist eine Ethylen-insensitive Mutante, die die genannten „Triple-Response“-Merkmale nicht ausbildet (Hall *et al.* 1999) und wurde deshalb als Kontrolle verwendet. Also zeigten Keimlinge der Linien *ap2c1-1*, *pp2c5-1* und *ap2c1-1/pp2c5-1* die gleiche ACC-Sensitivität wie Col-0- und *pp2c5-1/PP2C5*-Keimlinge.

In Microarray-Analysen (siehe Kapitel 3.2) wurde bereits gezeigt, dass Transkript der *PP2C5* und etwas schwächer auch der *AP2C1* durch das Pflanzenhormon ABA nach 0,5 h akkumuliert.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Zugabe von ABA auf *Arabidopsis*-Keimlinge hat, wurden Keimlinge der Linien Col-0, *ap2c1-1*, *pp2c5-1*, *ap2c1-1/pp2c5-1* und *pp2c5-1/PP2C5* für 24 h mit 50 μ M ABA inkubiert und anschließend die Transkriptmenge der ABA-responsiven Gene *RD29A* und *Erd10* bestimmt (Abbildung 3-25).

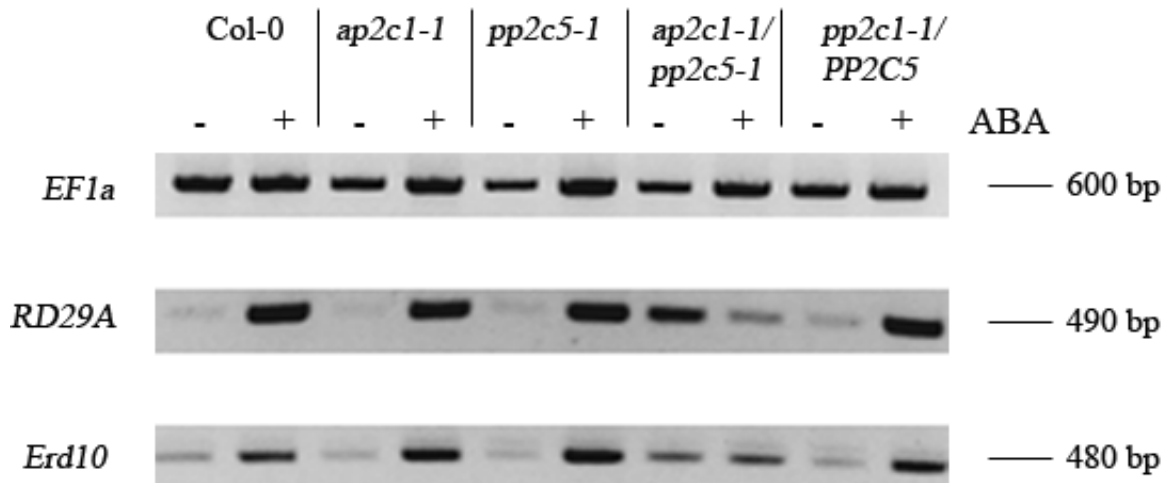


Abbildung 3-25: Einfluss von Abszisionsäure (ABA) auf die Aktivierung ABA-responsiver Gene.

Col-0, *ap2c1-1*, *pp2c5-1*, *ap2c1-1/pp2c5-1* und *pp2c5-1/PP2C5* wurden nach zweitägiger Stratifikation für 48 h unter Dauerlicht auf $\frac{1}{2}$ -MS-Medium angezogen. Jeweils 40 Keimlinge pro Linie und Behandlung wurden in sterilem Wasser mit 50 μ M ABA und zur Kontrolle mit dem gleichen Volumen Methanol für weitere 24 h unter Langtagbedingungen inkubiert. Aus den abgetrockneten Keimlingen wurde RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Zur Bestimmung der *EF1a*-Transkriptmenge als interne Kontrolle wurden die Primer eF1a-s und eF1a-as zur Amplifikation eines 600 bp großen Fragmentes verwendet. Zur Amplifikation der ABA-responsiven Gene *RD29A* und *Erd10* wurden die Primerkombinationen *RD29A-f/RD29A-r* bzw. *Erd10-f/Erd10-r* verwendet, um Fragmente von 490 bp sowie 480 bp zu erhalten. Zwei der insgesamt vier unabhängig durchgeführten Experimente mit ähnlichen Ergebnissen wurden von Dagmar Kolb durchgeführt.

Wie erwartet sind beim Wildtyp die gewählten ABA-responsiven Gene *RD29A* und *Erd10* in mit 50 μ M ABA behandelten Keimlingen deutlich höher exprimiert als die Kontrollkeimlinge. Dies trifft ebenfalls für die Linien *ap2c1-1*, *pp2c5-1* und *pp2c5-1/PP2C5* zu. *RD29A* ist bei den Kontrollen sogar fast gar nicht exprimiert, bei Inkubation mit ABA jedoch sehr stark induziert. Im Falle der Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* trat jedoch ein ganz anderes Muster auf. Hier wurden die ABA-responsiven Gene *RD29A* und *Erd10* auch ohne Zugabe von ABA exprimiert, und zwar in vergleichbarer Transkriptmenge, wie für die anderen Linien erst nach ABA-Zugabe beobachtet wurde. In 3 von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten konnte bei der Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* im Vergleich zu den anderen Linien nach Inkubation mit ABA kein Unterschied bezüglich der Transkriptmenge von *RD29A* und *Erd10* festgestellt werden. In dem gezeigten Experiment (Abbildung 3-25) war nach ABA-Behandlung eine geringere Transkriptmenge von *RD29A* und *Erd10* in *ap2c1-1/pp2c5-1* im Vergleich zu den anderen Linien beobachtet worden.

Aufgrund der festgestellten Deregulation der ABA-responsiven Gene in der Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* sollte untersucht werden, ob auch andere Prozesse, die im Zusammenhang mit ABA stehen, in der Doppelmutante gestört sind. Dafür wurde der Einfluss von ABA auf die Keimung von Wildtyp- und Knockoutsamen untersucht (Abbildung 3-26).

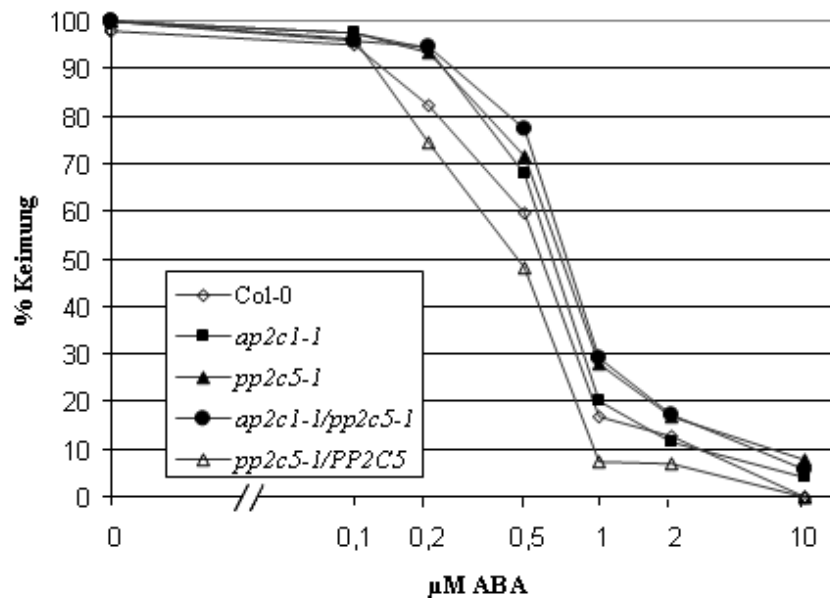


Abbildung 3-26: Keimungsassay von *Arabidopsis*-Samen auf verschiedenen ABA-Konzentrationen.

Wildtyp-Samen, Samen der Knockoutlinien *ap2c1-1* und *pp2c5-1* sowie Samen des Doppelknockouts *ap2c1-1/pp2c5-1* und der komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5* wurden auf $\frac{1}{2}$ -MS-Agar mit steigenden ABA-Konzentrationen ausgelegt. Nach zwei Tagen Stratifikation erfolgte eine Inkubation bei Kurztagbedingungen für 3 Tage. Anschließend wurden die Wurzelspitzen ausgezählt und zu ungekeimten Samen ins Verhältnis gesetzt. Pro Linie wurden mindestens 40 Samen betrachtet.

Arabidopsis-Samen wurden auf $\frac{1}{2}$ -MS-Platten ausgelegt, die verschiedene ABA-Konzentrationen beinhalteten. Nach zweitägiger Stratifikation bei 4 °C und anschließender Inkubation für drei Tage bei Kurztagbedingungen wurden die Platten ausgewertet. Dabei wurden gekeimte zu nicht gekeimten Samen ins Verhältnis gesetzt. Als gekeimt wurden alle Samen gewertet, die eine eindeutig ausgeprägte Wurzelspitze aufwiesen. Ohne Zusatz von ABA wiesen alle getesteten Linien eine Keimungsrate von nahezu 100 % auf. Mit steigender ABA-Konzentration ließ bei allen Linien die Keimungsfähigkeit nach, da ABA die Samenkeimung inhibiert (Kende und Zeevaart 1997). Am schnellsten sanken die Keimungsraten des Wildtyps Col-0 und der komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5*. Bereits bei 0,2 μ M ABA keimen nur noch 82 % der Col-0-Samen und 75 % der *pp2c5-1/PP2C5*-Samen. Die Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* wies bei dieser ABA-Konzentration noch eine Keimungsrate von 95 % auf. Am deutlichsten war der Unterschied bei 0,5 μ M ABA. Col-0-Samen wiesen hier eine Keimungsrate von 60 % und *pp2c5-1/PP2C5* von 48 % auf.

Die Keimungsrate von *ap2c1-1*-Samen lag bei 68 %, die von *pp2c5-1*-Samen bei 72 % und die von *ap2c1-1/pp2c5-1*-Samen bei 77 %. Auch bei einer ABA-Konzentration von 1 μ M ABA lag die Keimungsrate der Doppelmutante *ap2c1-1/pp2c5-1* am höchsten. Bei 10 μ M glich sich die Keimungsrate bei allen betrachteten Linien wieder an und lag dann nahezu bei Null. Bei allen insgesamt acht unabhängig durchgeführten Experimenten wiesen die Linien ähnliche Keimungsraten auf.

Besonders die Doppelmutante *ap2c1-1/pp2c5-1* und etwas reduzierter auch die Einzelknockouts *ap2c1-1* und *pp2c5-1* wiesen also eine partielle ABA-Insensitivität auf.

Da ABA nicht nur die Keimung von *Arabidopsis*-Samen negativ beeinflusst, sondern auch eine zentrale Rolle beim Öffnungs- und Schließmechanismus der Stomata spielt (Kende 1997), wurde der Öffnungszustand der Stomata von Wildtyp- und Knockoutpflanzen untersucht (Abbildung 3-27).

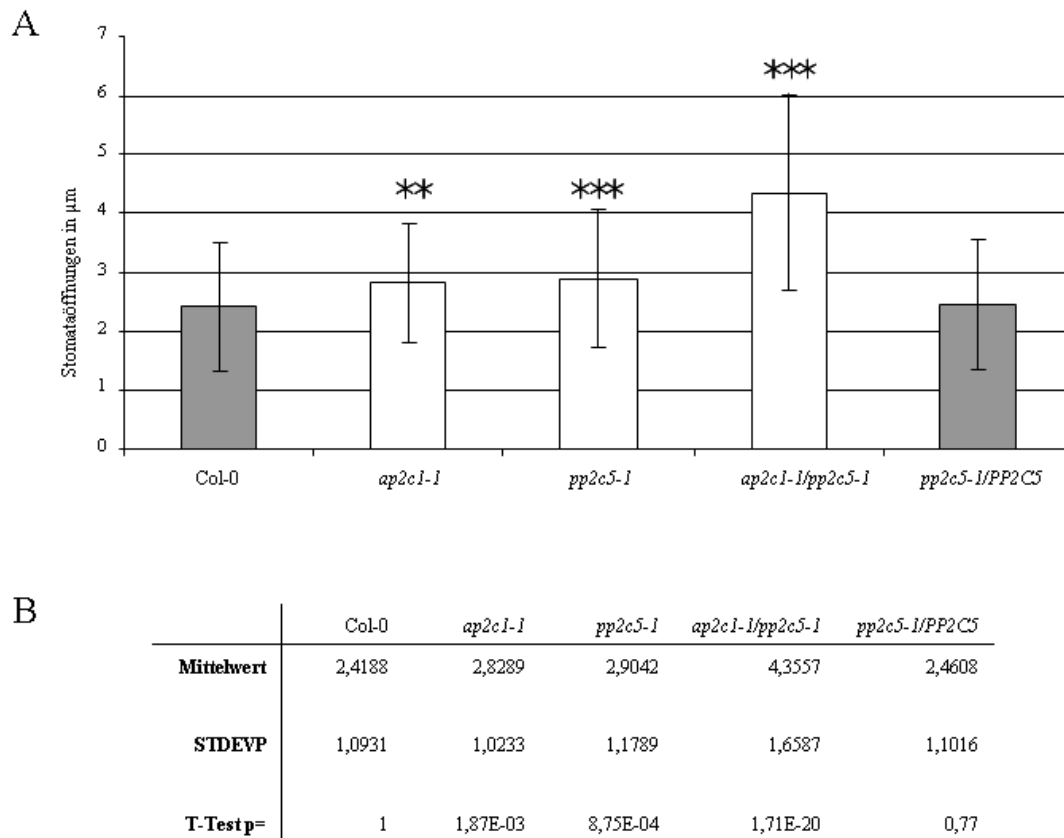


Abbildung 3-27: Messung der Stomataöffnungen.

Klebstoffabdrücke der Blattunterseite von fünf Wochen alten Wildtyppflanzen, den Knockoutlinien *ap2c1-1* und *pp2c5-1*, der Doppelknockoutline *ap2c1-1/pp2c5-1* sowie der komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5* wurden mikroskopiert. Mithilfe eines digitalen Lineals (Scion Image Software) wurden anschließend pro Linie 100 bis 150 Stomataöffnungen gemessen. A: Darstellung der Stomataöffnung mit Standardabweichung. Die Sterne symbolisieren die Signifikanz im T-Test (2 Sterne stehen für $0,01 > p > 0,001$, 3 Sterne stehen für $0,001 > p$). B: Darstellung der in A zugrunde gelegten Mittelwerte, Standardabweichungen (STDEVP) und p (T-Test).

Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit Klebstoff eingestrichen und die entstandenen Abdrücke mikroskopiert (Vorschlag von Prof. R. Hampp, Universität Tübingen). So wurde der „Ist“-Zustand der Blätter unmittelbar nach dem Abschneiden von der Pflanze konserviert. Mithilfe eines digitalen Lineals wurden die Öffnungen der Stomata ausgemessen und anschließend ausgewertet. In Abbildung 3-27 ist deutlich zu erkennen, dass die Stomataöffnungen bei Blättern der Doppelmutante *ap2c1-1/pp2c5-1* wesentlich größer sind als die der Einzelmutanten *ap2c1-1* und *pp2c5-1*, welche aber immer noch größer sind als die von Col-0-Blättern und *pp2c5-1/PP2C5*-Blättern. Abbildung 3-27 B enthält die exakten Mittelwerte, Standardabweichungen und die Signifikanztests. Letztere ergeben, dass trotz großer Standardabweichung die Stomataöffnungen in unbehandelten Blättern der *ap2c1-1*-, *pp2c5-1*- und *ap2c1-1/pp2c5-1*-Mutanten signifikant weiter geöffnet sind als in Blättern des Col-0-Wildtyps und der *pp2c5-1/PP2C5*-Linie.

4 DISKUSSION

4.1 Die Rolle der PP2C5 in der Regulation von stressinduzierten MAPKs

MAP-Kinasen sind wichtige Komponenten von stressinduzierten Signaltransduktionswegen. Wenn sie durch verschiedene Stimuli wie Phytohormone oder PAMPs aktiviert werden, lösen MAP-Kinasen zum Beispiel die Induktion von bestimmten für die entsprechende zelluläre Antwort wichtigen Genen aus. Um die Intensität und Dauer dieser Reaktionen zu kontrollieren, ist eine Regulation der MAPK-Kaskaden erforderlich. Die Möglichkeit von reversiblen Protein-Phosphorylierungen ist dabei wie bei vielen zellulären Prozessen enorm wichtig. In dieser Arbeit wurde die *Arabidopsis* PP2C5 der B-Gruppe der PP2C-Phosphatasen als negativer Regulator der stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 identifiziert. Zum einen co-lokalisiert die PP2C5 mit MPK3, MPK4 und MPK6 im Zellkern sowie im Zytoplasma (Abbildung 3-3), was eine wichtige Voraussetzung für eine funktionelle Interaktion ist, wobei die physische Interaktion mit zwei unabhängigen Methoden nachgewiesen worden (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-6) ist. Hier wurde außerdem durch Mutation des hochkonservierten Kinase-Interaktions-Motivs (KIM) der Beweis erbracht, dass die Aminosäuren Lysin (K) an Position 90 und Arginin (R) an Position 91 im selbigen essentiell für diese Interaktion sind (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-6) und die Interaktion somit über dieses KIM erfolgt. Dies ist vergleichbar mit AP2C1 bei der der Austausch der entsprechenden Aminosäuren ebenfalls zum Verlust der Interaktion mit den MAPKs MPK4 und MPK6 führte (Schweighofer *et al.* 2007). Zum anderen konnte durch einen Vergleich der MAPK-Aktivierung zwischen *Arabidopsis*-Wildtyp- und *pp2c5*-Knockoutpflanzen (Abbildung 3-16) die Regulation der vorher durch zugefügten Stress aktivierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 durch die PP2C5 festgestellt werden. In Abbildung 3-16 ist deutlich zu erkennen, dass besonders bei sehr frühen Zeitpunkten, wie 2,5 min nach Infiltration von Wasser zum Herbeiführen von hypoosmotischem Stress sowie Verwundungsstress, die MPK3 und MPK6 in *pp2c5-1*-Knockoutpflanzen deutlich stärker aktiviert sind als in vergleichbaren Wildtyppflanzen. Die MPK4 ist unter diesen Bedingungen sogar ausschließlich im *pp2c5-1*-Knockout aktiviert. Außerdem konnte festgestellt werden, dass wie bereits veröffentlicht, MPK4 und MPK6 (Schweighofer *et al.* 2007) und zusätzlich auch MPK3 im *ap2c1-1*-Knockout ebenfalls durch diese Behandlung stärker aktiviert sind. Anders als in dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung auf Deaktivierung von aktivierten MAPKs in Schweighofer *et al.* (2007) durch Co-Transformation von Plasmiden, die die

MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 zusammen mit AP2C1 exprimieren, in *Arabidopsis* Protoplasten mit anschließendem MBP-basierenden MAPK-Assay. Durch die Benutzung unterschiedlicher Methoden ist eine Differenz bezüglich der Deaktivierung der MPK3 durch AP2C1 möglicherweise zustande gekommen.

Beim Vergleich von Wildtyp und *PP2C5*-Überexpressionspflanzen war ein komplementäres Ergebnis zu den Untersuchungen mit *pp2c5-1*-Knockoutpflanzen zu erwarten. Nachdem eine Überexpression der *PP2C5* in *Arabidopsis* nicht erfolgreich war, konnte beim Vergleich von transient *PP2C5*-überexprimierenden Tabakpflanzen mit einer entsprechenden Kontrolle diese Hypothese bestätigt werden. In *PP2C5*-überexprimierenden Tabakblättern wurde nach Infiltration von 1 μ M Flg22 eine deutlich geringere Aktivierung der Tabak-MAPKs SIPK (homolog zur *Arabidopsis* MPK6) und WIPK (homolog zur *Arabidopsis* MPK3) als in den Kontrollblättern festgestellt. Bei Verwundung durch Infiltration von Wasser wurden die genannten Tabak-MAPKs nur sehr schwach aktiviert. In diesem Fall wurde auch kein Unterschied zwischen *PP2C5*-überexprimierenden Blättern und Kontrollblättern beobachtet. Es bleibt die Frage offen, warum eine stabile Überexpression der *PP2C5* in *Arabidopsis* nicht erfolgreich war. In mehreren unabhängigen Experimenten wurden Col-0-Pflanzen mit einem 35S:*PP2C5*-GFP-Konstrukt mithilfe von Agrobakterien transformiert. Man kann davon ausgehen, dass die Transformation selbst erfolgreich war, denn es gab in der folgenden Generation Keimlinge, die auf dem Selektionsmedium überlebten. Bei diesen Pflanzen konnte dann allerdings keine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Möglicherweise fand ein „Silencing“ des überexprimierten *PP2C5*-Genproduktes statt. Weiterhin wäre denkbar, dass die GFP-Fluoreszenz so schwach ausfiel, dass ein Western-Blot mit einem GFP-Antikörper notwendig wäre, um 35S:*PP2C5*-GFP-exprimierende Pflanzen zu selektionieren. Möglich ist auch, dass die transformierten Pflanzen die Überexpression nicht tolerieren und verstärktes *PP2C5*-Genprodukt somit zur Letalität führt.

Zusätzlich zu den Einzelknockouts *pp2c5-1* und *ap2c1-1* wurde auch die Doppelknockoutlinie *pp2c5-1/ap2c1-1* bezüglich der Aktivierung der MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 getestet. Ebenso wie in den Einzelknockouts sind diese im Doppelknockout deutlich stärker aktiviert als im Wildtyp, doch konnte kein additiver Effekt beider Knockoutlinien beobachtet werden (Abbildung 3-17). Vermutlich ist bereits eine der beiden Phosphatasen ausreichend für die MAPK-Dephosphorylierung und jede kann im Falle des Verlustes einer Phosphatase die Dephosphorylierungsfunktion der anderen vollständig übernehmen.

Neben der hauptsächlich in dieser Arbeit untersuchten PP2C5 wurden bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mithilfe des Split-YFP-Systems außerdem die AP2C1 und die AP2C2 mit einbezogen, da diese ebenfalls ein KIM beinhalten und durch Stress transkriptionell induziert sind (Abbildung 1-3, Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Die Charakterisierung der AP2C1 war zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht (Schweighofer *et al.* 2007). Im Gegensatz zu der in dieser inzwischen erschienenen Veröffentlichung gezeigten Interaktion der AP2C1 mit den MAPKs MPK4 und MPK6 konnte diese in der vorliegenden Dissertation mittels des Split-YFP-Systems nicht reproduziert werden. Möglicherweise liegt die Ursache in der unterschiedlichen Herstellung der für das Split-YFP-System benutzten Protoplasten. Die Zellkulturen für die in der „Transformation Unit“ des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP) hergestellten Protoplasten werden im Dunkeln angezogen. Dies führt dazu, dass in den *Arabidopsis*-Zellen keine funktionsfähigen Chloroplasten ausgebildet werden können. Laut Vorhersage (<http://www.bar.utoronto.ca>) sowie durch mikroskopische Untersuchung von 35S:AP2C1-GFP-Überexpressionspflanzen (freundlicherweise von Irute Meskiene, Wien, zur Verfügung gestellt) konnte festgestellt werden, dass die AP2C1 jedoch hauptsächlich chloroplastenlokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Somit befindet sich die AP2C1 in den hier verwendeten *Arabidopsis*-Protoplasten nicht dort, wo sie natürlicherweise lokalisiert ist. Folglich sind zwei verschiedene Erklärungen denkbar: Die in Schweighofer *et al.* (2007) beobachtete Interaktion im Zellkern und Zellplasma ist ein Artefakt, weil sie in ihrem natürlich vorkommenden Organell nicht interagieren würden, da stressinduzierte MAPKs in den Zellkern wandern. Eine Migration der stressinduzierten MPK4 und MPK6 in Chloroplasten wurde bis jetzt noch nicht gezeigt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass diese Interaktion tatsächlich erfolgt und AP2C1 in geringen Mengen außer in den Chloroplasten auch z. B. im Zytoplasma und im Zellkern vorkommt und so tatsächlich eine Interaktion mit MPK6 und MPK4 möglich wäre. Dafür spricht auch die Existenz des KIM in der Proteinsequenz der AP2C1 sowie die in Schweighofer *et al.* (2007) gezeigte Dephosphorylierung der aktivierten MPK4 und MPK6 durch die AP2C1.

Als weitere PP2C mit KIM, die stark homolog zur PP2C5 und AP2C1 ist, wäre eine genaue Untersuchung der Funktionen der AP2C2 sinnvoll. Sowohl durch Mikroarray-Analysen als auch durch Real-Time-Experimente konnte festgestellt werden, dass diese durch PAMPs sowie durch biotischen und abiotischen Stress ebenfalls wie die PP2C5 stark transkriptionell induziert ist (Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). Außerdem konnte mithilfe des Split-YFP-Systems eine Interaktion der AP2C2 mit den MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 gezeigt

werden (Abbildung 3-4). Eine Knockoutlinie, die *ap2c2*, wurde in dieser Arbeit charakterisiert (Abbildung 3-10), sodass eine mögliche Rolle der AP2C2 in der Dephosphorylierung der MPK3, MPK4 und MPK6 demnächst untersucht werden kann. Es wäre dann ebenfalls interessant, die sich bereits in Vorbereitung befindende Doppelknockoutlinie *pp2c5-1/ap2c2* bezüglich ihrer Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress zu testen.

Neben der bereits beschriebenen Regulation von MAPKs durch *Arabidopsis*-PP2C-Phosphatasen der B-Gruppe, wie der PP2C5 (diese Arbeit) und der AP2C1 (Schweighofer *et al.* 2007), sind außerdem dualspezifische Phosphatasen (DsPTPs) bekannt, welche MAPKs dephosphorylieren und somit negativ regulieren können (Martin *et al.* 2005). DsPTPs sind in Hefe und in Säugetieren in der Lage, beide Phosphatreste im TXY-Motiv der MAPKs abzuspalten (Keyse 1998, Camps *et al.* 2000) und wurden deshalb ursprünglich als klassische MAPK-Phosphatasen angesehen. In *Arabidopsis* sind fünf potentielle DsPTPs bekannt: *MKP1*, *MKP2*, *DsPTP1*, *PHS1* und *IBR5* (Kerk *et al.* 2002). Für die *DsPTP1* wurde gezeigt, dass sie die MPK4 *in vitro* dephosphorylieren kann. Allerdings wurde nur MPK4 getestet, weshalb unklar ist, ob auch weitere MPKs Substrat für *DsPTP1* sein können. Die Aktivität der *DsPTP1* kann dabei in Abhängigkeit vom Substrat durch Calmodulin reguliert werden (Yoo *et al.* 2004). Weiterhin wurde die *MKP1* bereits näher charakterisiert. Neben der Dephosphorylierung der MPK3, MPK4 und MPK6 durch *MKP1* sind *mkp1*-Mutanten anfälliger für genotoxischen Stress (Ulm *et al.* 2001) und resistenter gegenüber Salzstress (Ulm *et al.* 2002). Die *MKP1*-Homologe in Tabak und Reis regulieren außerdem Wundantworten (Yamakawa *et al.* 2004, Katou *et al.* 2005, Katou *et al.* 2007). Die *Arabidopsis* *MKP1*, ebenso wie ihre Homologe in Tabak und Reis, fungiert außerdem als Calmodulin-Bindeprotein (Lee *et al.* 2008). Zwei Ca^{2+} -abhängige Calmodulin-Bindedomänen (CaMBDs) wurden innerhalb von *MKP1* identifiziert, wobei vier Aminosäuren identifiziert wurden, die bei der Calcium-Bindung eine essentielle Rolle spielen. Somit wurde ein Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Signalwegen und MAPK-Kaskaden hergestellt (Lee *et al.* 2008). Weiterhin wurde die *MKP2* als negativer Regulator der MPK3 und MPK6 identifiziert. *MKP2* ist dabei in zellulären Antworten auf oxidativen Stress in *Arabidopsis* beteiligt und reguliert diese positiv (Lee und Ellis 2007). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass neben der in dieser Arbeit identifizierten PP2C5 als negativem Regulator der MPK3, MPK4 und MPK6, auch noch weitere PP2Cs sowie DsPTPs diese Funktion ausführen können.

4.2 Die Rolle der PP2C5 und der AP2C1 in der Pathogenabwehr von *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund der bereits zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Mikroarraydaten, aus denen hervorgeht, dass insbesondere die *PP2C5* durch PAMPs und Pathogeninfektionen transkriptionell induziert ist (Abbildung 3-1) und da eine Interaktion und Regulation der in Pathogenantworten involvierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 erfolgt, wurde eine Rolle der *PP2C5* in der pflanzlichen Immunabwehr untersucht. Die transkriptionelle Aktivierung konnte im Rahmen einer semiquantitativen RT-PCR (Daten nicht gezeigt) sowie einer Real-Time-PCR-Analyse bestätigt werden (Abbildung 3-2). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *PP2C5* die stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 negativ reguliert, lag die Vermutung nahe, dass in *pp2c5*-Knockoutpflanzen diese MPK-Inaktivierung nicht, bzw. im Falle von Redundanz mit anderen Protein-Phosphatasen, schwächer ausfällt. Demzufolge würden sich die stressinduzierten MPK3, MPK4 und MPK6 in ihrer aktivierten Form anreichern. Da Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich die größte Substratgruppe der MAPKs sind (Feilner *et al.* 2005), könnten Abwehrgene stärker aktiviert werden und die *pp2c5*-Knockoutpflanze wäre resistenter gegenüber Pathogenbefall. Wie in Abbildung 3-19 zu sehen ist, konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Im Falle von *Pto* DC3000-Infektionen konnte in manchen Experimenten eine geringfügige Resistenz der Knockoutlinien im Gegensatz zum Wildtyp und der komplementierten Linie festgestellt werden, doch war dieser Unterschied nicht signifikant. Umgekehrt wurde in einigen Infektionsexperimenten mit *Pto* DC3661 beobachtet, dass die Knockoutlinien anfälliger gegenüber diesem Bakterienstamm waren. Auch wenn der Unterschied ebenfalls nicht immer auftrat, wäre diese Beobachtung folgendermaßen erklärbar: Coronatin ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *Pseudomonas syringae* (Rangaswamy *et al.* 1998). Das Pathogen benutzt Coronatin um die Stomata der Wirtspflanze wieder zu öffnen, nachdem die Pflanze nach der Pathogenerkennung über PAMPs diese geschlossen hat (Melotto *et al.* 2006). Dem Stamm *Pto* DC3661 fehlt Coronatin, er kann somit Wildtyppflanzen nur schlecht besiedeln (Mittal und Davis 1995). Im Falle der Einzelknockouts *pp2c5-1* und *ap2c1-1* und besonders der Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* sind die Stomata von unbehandelten Pflanzen jedoch weiter geöffnet als die von Wildtyppflanzen. Somit wäre denkbar, dass selbst der Coronatin-defiziente Stamm durch die Stomata der Knockouts deutlich leichter eindringen kann im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Ein solcher Phänotyp wurde beispielsweise bei der *aba3*-Mutante beobachtet, welche ihre Stomata aufgrund einer Störung des ABA-induzierten Schließmechanismus nicht schließen kann (Leon-Kloosterziel *et al.* 1996, Melotto *et al.* 2006).

Pflanzen der Linie *aba3* sind wesentlich anfälliger gegenüber Coronatin-defizienten *Pto*-Stämmen (Melotto *et al.* 2006). Eine mögliche Erklärung ist, dass der Schließmechanismus nach der PAMP-Erkennung in PP2C-Knockouts nicht beeinflusst ist. Es konnte weiterhin kein Unterschied bezüglich Anfälligkeit oder Resistenz der *pp2c5-1* Knockoutlinie gegenüber nekrotrophen Pilzen festgestellt werden, obwohl diese ebenfalls durch Stomata eindringen können. Die Penetration von *Alternaria brassicicola* in das pflanzliche Gewebe erfolgt in der Regel über Stomata und Verletzungen, aber auch direkt durch die Kutikula (Van Den Berg *et al.* 2003).

Wie bereits erwähnt fielen die Phänotypen bezüglich Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber verschiedenen *Pseudomonas*-stämmen so gering aus, dass kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Ein möglicher Grund dafür könnte die Redundanz zu den anderen PP2Cs der B-Gruppe sein. Aus diesem Grund wurden die Knockoutlinien *ap2c1-1* und *pp2c5-1* miteinander gekreuzt. Da auch die Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* gegenüber verschiedenen *Pseudomonas*-stämmen sowie den nekrotrophen Pilzen *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* sowie dem biotrophen Pilz *Erysiphe pisi*, keinen signifikanten Unterschied zeigten, wurden weitere multiple Knockouts vorbereitet (Tabelle 3-1). Möglicherweise können nicht nur die stark homologen PP2Cs der B-Gruppe die Funktionen übernehmen, sondern auch andere Protein-Phosphatasen wie die bereits erwähnten dualspezifischen Phosphatasen. In Schweighofer *et al.* (2007) wurde berichtet, dass AP2C1-Überexpressionspflanzen deutlich anfälliger als Wildtyppflanzen gegenüber *Botrytis cinerea* sind, und zwar bezüglich Penetration als auch Kolonisation des nekrotrophen Pilzes. Eine signifikant erhöhte Resistenz der *ap2c1*-Knockoutlinie gegenüber dem Wildtyp konnte bei Schweighofer *et al.* (2007) ebenfalls nicht festgestellt werden. Möglicherweise würden PP2C5-Überexpressionspflanzen einen ähnlichen Phänotyp wie die AP2C1-Überexpressionspflanzen zeigen, jedoch konnten, wie bereits erwähnt, in dieser Arbeit keine PP2C5-Überexpressionspflanzen generiert werden.

4.3 Die Rolle der PP2C5 und AP2C1 in ABA-Signalwegen

Abszisinäure (ABA) wird von Pflanzen produziert, um die Keimung von Samen und andere Entwicklungsprozesse sowie zelluläre Antworten auf abiotischen Stress wie Salz, Kälte, Trockenheit und Verwundung zu regulieren (Zhu 2002, Finkelstein *et al.* 2002). ABA spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulation des Wasserstatus in Pflanzen (Zeevaart und Creelman 1988). Das ABA-induzierte Schließen der Stomata ist auf einen sinkenden

Tugor in den Schließzellen zurückzuführen (Hetherington und Woodward 2003, Fan *et al.* 2004, Roelfsema und Hedrich 2005). Es sind bereits einige calciumabhängige Proteinkinasen (CDPKs) sowie PP2Cs bekannt, die in die ABA-induzierte Schließung der Stomata involviert sind (Fedoroff 2002). So führt ABA zur transkriptionellen Induktion von PP2Cs der „A“-Gruppe in *Arabidopsis*, die als negative Regulatoren von ABA-induzierten Signalwegen fungieren. AtPP2CA und AtP2C-HAB1 spielen dabei vor allem in Samen eine Rolle (Kuhn *et al.* 2006, Yoshida *et al.* 2006b), können aber das Schließen der Stomata und Wurzelwachstum beeinflussen (Leonhardt *et al.* 2004, Saez *et al.* 2004, Kuhn *et al.* 2006). Die Proteinphosphatase ABI1 und die stark homologe ABI2 sind außerdem Regulatoren der ABA-ausgelösten Samenruhe, Stomataschließung und Wachstumshemmung (Merlot *et al.* 2001).

In dieser Arbeit wurden zwei weitere PP2Cs identifiziert, die eine Rolle in ABA-vermittelten Signalwegen spielen, die PP2C5 und die AP2C1 als Mitglieder der „B“-Gruppe der *Arabidopsis* PP2Cs. Bisher waren schon MAPKs bekannt, die von Protein Phosphatasen dephosphoryliert werden und auch MAPKs, die in ABA Signalwegen eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde jedoch zum ersten Mal eine PP2C charakterisiert, die sowohl stressinduzierte MAPKs dephosphorylieren kann als auch ABA-induzierte Signalwege reguliert. Dafür wurde die Expression der ABA-induzierten Gene *RD29A* und *Erd10* untersucht. Das Gen *RD29A* wird innerhalb von 20 min durch Trockenstress sowie nach 3 h durch Applikation von ABA exprimiert (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993b, Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993a) und gilt daher als Markergen für ABA-Antworten. *Erd10* wird ebenfalls durch ABA-Applikation und durch Trockenstress induziert (Kiyosue *et al.* 1994) und wurde daher als zweites Markergen für ABA-Antworten verwendet. Hier konnte gezeigt werden, dass die Doppelknockoutlinie *pp2c5-1/ap2c1-1* anders als der Wildtyp und die entsprechenden Einzelknockouts auch ohne äußere Zugabe von ABA *RD29A* und *Erd10* stärker exprimiert (Abbildung 3-25). Das lässt darauf schließen, dass ein oder mehrere Signalwege, die zur *RD29A*- und *Erd10*-Expression führen, in der Doppelmutante dereguliert sind. Da die Anzucht der Keimlinge auf verschlossenen ½-MS-Agar-Platten erfolgte und die Keimlinge später in Wasser weiter inkubiert wurden, scheint eine Induktion beider Gene aufgrund von Trockenstress eher unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Expression beider Gene in *pp2c5-1/ap2c1-1*-Keimlingen durch einen erhöhten endogenen ABA-Spiegel konstitutiv angeregt ist. Nimmt man an, dass PP2C5 und AP2C1 als negative Regulatoren dieses ABA-Signalweges fungieren, könnte ein Verlust dieser beiden Phosphatasen eine erhöhte Akkumulation von ABA zur Folge haben, was wiederum zur

transkriptionellen Induktion von *RD29A* ohne erkennbare Stresssituation führt. Allerdings gibt es bisher keinen Hinweis darauf, dass PP2Cs die ABA-Biosynthese beeinflussen. Es wäre also interessant, den endogenen ABA-Spiegel in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu bestimmen. Die Expression von *RD29A* wurde auch in der *abi3-1*-Mutante unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen untersucht. Das *ABI3*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor und kontrolliert embryogene Genexpression sowie Sensitivität gegenüber ABA in *Arabidopsis* (Giraudat *et al.* 1992, Nambara *et al.* 1994). Obwohl die *abi3-1*-Mutante generell als ABA-insensitive Mutante beschrieben wurde (Koornneef *et al.* 1982, Koornneef *et al.* 1984), konnte *RD29A* in *abi3-1*-Keimlingen nach Zugabe von 50 μ M ABA nach 24-stündiger Inkubation transkribiert werden, nicht aber in der Kontrollgruppe, welche nur in Wasser inkubiert wurde (Nakashima *et al.* 2006). Dies deutet darauf hin, dass die *RD29A*-Expression über verschiedene Signalwege induziert werden kann. Um eine bessere Übersicht über die ABA-stimulierte Genexpression in allen Mutanten zu bekommen, muss die Expression weiterer Gene, welche durch ABA induziert werden, betrachtet werden oder auch Mikroarrays durchgeführt werden.

Ein weiterer Phänotyp, der durch ABA reguliert wird, ist die Samenkeimung (Merlot *et al.* 2001). *pp2c5-1* und *ap2c1-1* Pflanzen keimen unter ABA-Zugabe besser als Wildtypsamen (Abbildung 3-26). Bei der *pp2c5-1/ap2c1-1* Linie ist dieser Effekt sogar noch deutlich verstärkt. Diese beiden in ihrer Proteinsequenz stark homologen PP2Cs sind also funktionell redundant. Im Gegensatz dazu keimt die komplementierte Linie *pp2c5-1/PP2C5* sogar noch etwas schlechter als Col-0, obwohl es sich bei dieser Linie wahrscheinlich nicht um eine Überexpressionslinie handelt, da die *PP2C5*-Transkriptmenge zumindest nach Behandlung mit Flg22 mit der von Col-0 identisch ist (Abbildung 3-7). Beide Knockout-Linien der Proteinphosphatasen PP2C5 und AP2C1 scheinen daher teilweise ABA-insensitiv zu sein, während *pp2c5-1/PP2C5*-Pflanzen leicht hypersensitiv sind. Die *abi1*-Mutante wurde zunächst auch als ABA-insensitiv beschrieben (Koornneef *et al.* 1984), doch handelt es sich bei der dominanten *abi1-1*-Mutation wahrscheinlich eher um eine „gain-of-function“-Mutation (Gosti *et al.* 1999). ABI1 wurde mittlerweile zweifelsfrei als negativer Regulator von ABA-Signalwegen identifiziert (Gosti *et al.* 1999), denn ABA hemmt in „loss-of-function“-Mutanten von ABI1 die Samenkeimung schon bei viel geringeren Konzentrationen als im Wildtyp. Genauso verhält es sich bei zwei weiteren negativen Regulatoren von ABA-Antworten, AtPP2CA und HAB1. Es werden beide Gene durch ABA induziert und *atpp2ca*-als auch *hab-1*-Mutanten reagieren während der Samenkeimung ABA hypersensitiv, wohingegen entsprechende Überexpressionen beider Proteine in einer ABA-Insensitivität

resuliert (Kuhn *et al.* 2006, Saez *et al.* 2004). Als weiterer negativer Regulator von ABA-Signalwegen wurde die dualspezifische Phosphatase PHS1 beschrieben (Quettier *et al.* 2006). Weiterhin führt eine Mutation der dualspezifischen Phosphatase IBR5 zur Reduktion der Sensitivität gegenüber Auxin und ABA (Monroe-Augustus *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu scheint ein weites Mitglied der *Arabidopsis* DsPTP-Familie, IBR5, eher ein positiver Regulator der Samenkeimung zu sein, denn *ibr5*-Mutanten keimen auf ABA besser als auf dem Wildtyp (Monroe-Augustus *et al.* 2003). In dieser Arbeit konnten neben IBR5 als DsPTP erstmals PP2Cs, und zwar die PP2C5 und AP2C1, identifiziert werden, die als positive Regulatoren von ABA-Signalwegen fungieren, denn ohne funktionsfähige PP2C5 und AP2C1 kann ABA seine vollständige Funktion nicht entfalten.

Die PP2C5 und AP2C1 tragen nicht nur positiv zur Wirkung von ABA auf die Inhibierung der Keimung bei, sondern regulieren auch positiv das Schließen der Stomata, wofür ebenfalls ABA verantwortlich ist. Die Stomata sind in *pp2c5-1*- und in *ap2c1-1*-Knockoutpflanzen weiter geöffnet als im Wildtyp. In beiden Fällen wurde eine Verstärkung des Phänotyps in der Doppelknockoutlinie *pp2c5-1/ap2c1-1* im Vergleich zu den Einzelknockouts *pp2c5-1* und *ap2c1-1* festgestellt (Abbildung 3-27). Einen erhöhten Wasserverlust in den Knockoutlinien im Vergleich zum Wildtyp, der durch die größeren Stomataöffnungen erwartet wurde, konnte allerdings nicht bestätigt werden (Abbildung 3-22). ABA begünstigt normalerweise das Schließen der Stomata und unterdrückt den Öffnungsmechanismus (Koornneef *et al.* 1998). Die Stomataöffnungen wurden allerdings nur im ungestressten Zustand untersucht. Es kann daher nicht unterschieden werden, ob *PP2C5* und/oder *AP2C1*-Verlust zur Störung des ABA-vermittelten Schließmechanismus oder des Öffnungsmechanismus führt, oder ob sogar beides der Fall ist. Es scheint allerdings wahrscheinlich, dass der stressinduzierte Schließmechanismus der Stomata in den Knockoutlinien nicht gestört ist. Dies würde erklären, weshalb bei Trockenstress kein erhöhter Wasserverlust und bei *PtoDC3661*-Infektionen keine erhöhte Anfälligkeit der Knockoutlinien festgestellt wurde. Die *abi1* und *abi2* Mutanten, welche auch im Schließmechanismus der Stomata gestört sind, weisen beispielsweise diesen erwarteten Wasserverlust auf (Roelfsema und Prins 1995, Leung *et al.* 1997). Allerdings weist die *ibr5*-Mutante ebenso wie die *pp2c5-1*-Mutante keinen Unterschied bezüglich des Wasserverlusts gegenüber Wildtyppflanzen auf (Monroe-Augustus *et al.* 2003), jedoch wurde die Stomata-Öffnung bisher noch nicht analysiert. Die ABA-induzierte Stomataschließung ist in *pp2c5-1* bei Trockenstress offenbar nicht gestört. Anscheinend ist nur die durch ABA regulierte unterdrückte Stomata-Öffnung beeinflusst.

Wie schon erwähnt wurde auch für die stressinduzierten MAPKs MPK3, 4 und 6 eine Rolle in ABA-vermittelten Signalwegen beschrieben. Eine *mpk6*-Mutation blockt ABA-abhängige Prozesse wie H₂O₂-Produktion, wohingegen eine *MPK6*-Überexpression diese induziert (Xing *et al.* 2008). H₂O₂ induziert wiederum das Schließen der Stomata (McAinsh *et al.* 1996) und wird in den Schließzellen als Antwort auf verschiedene Stimuli wie Pathogenbefall (Lee *et al.* 1999), ABA (Pei *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2001), extrazelluläres Calmodulin (Chen *et al.* 2004), Methyljasmonat (Suhita *et al.* 2004), Dunkelheit (Desikan *et al.* 2004, She *et al.* 2004) und Ozon (Joo *et al.* 2005) produziert. Also ist die MPK6 ein positiver Regulator von ABA-induzierten Reaktionen. Weiterhin zeigen Pflanzen mit reduziertem *MPK3*-Transkript in den Schließzellen der Stomata eine teilweise Insensitivität gegenüber ABA beim Öffnungsmechanismus der Stomata, was darauf schließen lässt, dass MPK3 zur Perzeption von ABA in den Schließzellen beiträgt. Interessanterweise ist der Schließmechanismus dabei nicht beeinflusst (Gudesblat *et al.* 2007). Außerdem wird auch die MPK4 durch ABA aktiviert (Desikan *et al.* 2001, Xing *et al.* 2008). Es gibt allerdings bisher noch keine Daten darüber, ob es sich bei der MPK4 um einen positiven oder einen negativen Regulator von ABA-Signalwegen handelt. Beim Split-YFP-System wurde beobachtet, dass die MPK4 diejenige MAPK ist, die am stärksten mit der PP2C5 im Zellkern interagiert (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-6) und somit wahrscheinlich die bedeutendste Rolle als Substrat für die PP2C5 spielt. Interessanterweise fungiert die MPK4 im Gegensatz zu MPK3 und MPK6 zum Beispiel in der Pathogenabwehr als negativer Regulator, denn *mpk4*-Knockouts sind resistenter gegenüber *PtoDC3000* (Qiu *et al.* 2008, Brodersen *et al.* 2006, Petersen *et al.* 2000). Eine Reduktion der MPK3 und MPK6-Expression durch antisense-Konstrukte erhöht hingegen die Anfälligkeit der entsprechenden Mutanten gegenüber einer *Pseudomonas*-Infektion (Menke *et al.* 2004, Gudesblat *et al.* 2009). MPK3 und MPK6 fördern folglich das Schließen der Stomata nach der PAMP-Erkennung, wohingegen diese durch die MPK4 eher geöffnet zu werden scheinen, wenn man annimmt, dass eine erhöhte Resistenz von *mpk4*-Knockoutpflanzen gegenüber *PtoDC3000* mit kleineren Stomataöffnungen korreliert. Nimmt man weiter an, dass die MPK4 als stärkster Interaktionspartner von PP2C5 das Hauptsubstrat derer ist, unterstützen die weiter geöffneten Stomata in *pp2c5-1* und *ap2c1-1/pp2c5-1* die Theorie, dass die PP2C5 sowohl als negativer Regulator der MPK4 dienen kann und gleichzeitig positiv ABA-Signalwege reguliert.

Nicht untersucht wurde, in welchen Geweben die Dephosphorylierung der MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 durch die PP2C5 erfolgt. Möglicherweise erfolgt diese Deaktivierung in anderen Geweben als der positive Regulationsmechanismus von ABA erfolgt. Zumindest was das Öffnen und Schließen der Stomata betrifft, liegt eine Expression der PP2C5 und AP2C1 in den Schließzellen der Stomata nahe. Laut Vorhersage wird in *Arabidopsis*-Blättern die PP2C5 tatsächlich besonders stark in den Schließzellen exprimiert, die AP2C1 hingegen hauptsächlich im Mesophyll und etwas schwächer auch in den Schließzellen (Daten nicht gezeigt, <http://www.bar.utoronto.ca>). Betrachtet man den Einfluss der PP2C5 und AP2C1 bei der Keimung von *Arabidopsis*-Samen, wird deutlich, dass diese auch im Keimling exprimiert werden müssen. Besonders die AP2C1 ist im trockenen Samen und in Samen, die bis zu drei Stunden im Wasser inkubiert wurden, besonders stark exprimiert (Daten nicht gezeigt, <http://www.bar.utoronto.ca>). Möglicherweise variieren die Funktionen der PP2C5 und AP2C1 sogar je nach Entwicklungsstadium. In Keimlingen verstärken sie die Wirkung von ABA. Im Falle, dass die größeren Stomataöffnungen in den Knockouts tatsächlich auch auf die verminderte Wirkung von ABA zurückzuführen sind, trifft diese positive Regulation der PP2C5 und AP2C1 auf ABA-Signalwege auch für ältere Pflanzen zu. Zwar wurde für die MPK3 und MPK6, mit denen die PP2C5 interagiert, eine positive Regulation von ABA-Signalwegen nachgewiesen, doch ist natürlich nicht auszuschließen, dass die PP2C5 noch mit weiteren MAPKs wie zum Beispiel der MPK4 interagiert, die in anderen, möglicherweise komplementären, Signalwegen eine Rolle spielen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass andere Kinasen wie calciumabhängige Proteinkinasen (CDPKs, Mori *et al.* 2006, Zhu *et al.* 2007), die LRR-Kinase RPK1 (Osakabe *et al.* 2005) und SNF1-verwandte Proteinkinasen (SnRKs, Fujii *et al.* 2007), für die eine ABA-Abhängigkeit bereits gezeigt wurde, auch Substrate der PP2C5 oder AP2C1 sind. Wie bereits erwähnt werden die MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 auch durch weitere PP2Cs neben der PP2C5 und AP2C1 sowie durch dualspezifische Phosphatasen reguliert. Folglich handelt es sich bei der Regulation von ABA-abhängigen Prozessen um ein sehr komplexes Netzwerk mit teilweise redundant fungierenden Proteinen, was der Pflanze erlaubt, sehr genau auf einzelne Stimuli zu reagieren. Weitere Untersuchungen, insbesondere ein Screen auf weitere Protein-Protein-Interaktionen zwischen Kinasen und Phosphatasen, sind daher erforderlich, um dieses Netzwerk besser zu verstehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Proteinphosphatasen sind wichtige Regulatoren von stressinduzierten MAPK-Kaskaden und können hormonabhängige Signaltransduktionswege beeinflussen. In dieser Arbeit wurde eine PP2C-Phosphatase charakterisiert, PP2C5, welche zusammen mit ihrem nächsten Homolog AP2C1 sowohl aktivierte MAPKs negativ reguliert als auch in einen positiven Regulationsmechanismus von ABA-induzierten Signalwegen involviert ist. Für die PP2C5 wurde eine Interaktion mit den im Zellkern co-lokalisierenden stressinduzierten MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 nachgewiesen. Durch Mutation des KIM konnte festgestellt werden, dass die Aminosäuren Lysin an Position 90 und Arginin an Position 91 essentiell für diese Interaktion sind. Da in der *pp2c5-1*-Knockoutlinie die MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 deutlich stärker aktiviert sind als in Wildtyppflanzen und in PP2C5-überexprimierenden Tabakblättern die entsprechenden Tabak-MAPKs SIPK und WIPK schwächer aktiviert sind als in Kontrollblättern, konnte die PP2C5 als negativer Regulator der MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 beschrieben werden. Außerdem ist die PP2C5 durch PAMPs und Pathogene transkriptionell induziert. Die Annahme, dass die PP2C5 eine Rolle in der pflanzlichen Immunantwort spielt und *PP2C5*-Knockoutlinien möglicherweise resistenter gegenüber bakteriellen oder pilzlichen Pathogenen sind, konnte nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund dafür ist die funktionelle Redundanz der PP2C5 mit anderen PP2Cs der B-Gruppe und möglicherweise auch dualspezifischen Proteinphosphatasen. Deshalb wurden Doppelknockoutlinien für verschiedene Kombinationen von Gruppe B-PP2Cs untereinander bzw. mit DsPTPs für weitere Untersuchungen vorbereitet.

Die *PP2C5*-Genexpression erfolgt nicht nur durch PAMPs und Pathogene, sondern auch durch Hormonbehandlungen wie zum Beispiel ABA. Eine nähere Untersuchung der ABA-regulierten Samenkeimung ergab, dass die Keimungsrate der Knockouts *ap2c1-1* und *pp2c5-1* auf mit ABA-versetztem Medium deutlich höher war als die der Wildtypsamen. Die Keimungsrate der komplementierten Linie *pp2c5-1/PP2C5* lag sogar etwas unterhalb der des Wildtyps. ABA beeinflusst nicht nur die Keimung von Samen, sondern auch den Öffnungszustand der Stomata. So konnte auch beim Messen der Stomata von unbehandelten Blättern festgestellt werden, dass die Stomataöffnungen der *ap2c1-1* und *pp2c5-1* Knockoutlinien deutlich größer ausfielen als beim Wildtyp und der komplementierten Linie. In beiden Experimenten fiel der Phänotyp im Falle der Doppelknockoutlinie *ap2c1-1/pp2c5-1* noch deutlich stärker aus als bei den Einzelknockouts, was auf eine funktionelle Redundanz

der beiden PP2Cs hindeutet. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei der PP2C5 und der AP2C1 um positive Regulatoren von ABA-abhängigen Signalwegen handelt, da sie die keimungshemmende und stomataschließende Wirkung von ABA verstärken. Gleichzeitig wirken die PP2C5 und AP2C1 aber auch als negative Regulatoren von ABA-abhängigen Prozessen, denn es konnte in Abwesenheit von ABA eine konstitutive Expression der ABA-responsiven Gene *RD29A* und *Erd10* im Doppelknockout festgestellt werden.

Zusammenfassend ist die PP2C5 somit also eine MAPK-Phosphatase und fungiert sowohl als positiver als auch als negativer Regulator von ABA-induzierten Signalwegen.

6 LITERATUR

Aderem, A. und R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* **406**(6797): 782-7.

Ahlfors, R., V. Macioszek, J. Rudd, M. Brosche, R. Schlichting, D. Scheel und J. Kangasjarvi (2004). "Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure." *Plant J* **40**(4): 512-22.

Akira, S., S. Uematsu und O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.

Alessi, D. R., C. Smythe und S. M. Keyse (1993). "The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts." *Oncogene* **8**(7): 2015-20.

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): 1785-98.

Alonso, J. M., T. Hirayama, G. Roman, S. Nourizadeh und J. R. Ecker (1999). "EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*." *Science* **284**(5423): 2148-52.

Alonso, J. M. und A. N. Stepanova (2004). "The ethylene signaling pathway." *Science* **306**(5701): 1513-5.

Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C. C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D. E. Carter, T. Marchand, E. Risseeuw, D. Brogden, A. Zeko, W. L. Crosby, C. C. Berry und J. R. Ecker (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." *Science* **301**(5633): 653-7.

Anderson, J. P., E. Badruzsaufari, P. M. Schenk, J. M. Manners, O. J. Desmond, C. Ehlert, D. J. Maclean, P. R. Ebert und K. Kazan (2004). "Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **16**(12): 3460-79.

Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M. R. Willmann, W. L. Chiu, L. Gomez-Gomez, T. Boller, F. M. Ausubel und J. Sheen (2002). "MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity." *Nature* **415**(6875): 977-83.

Audenaert, K., G. B. De Meyer und M. M. Hofte (2002). "Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms." *Plant Physiol* **128**(2): 491-501.

- Ausubel, F. M.** (2005). "Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?" *Nat Immunol* **6**(10): 973-9.
- Bardwell, L. und J. Thorner** (1996). "A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs." *Trends Biochem Sci* **21**(10): 373-4.
- Bechtold, N., B. E. Ellis und G. Pelletier** (1993). "In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants." *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* **316**: 1194-1199.
- Belkhadir, Y., X. Wang und J. Chory** (2006). "Brassinosteroid signaling pathway." *Sci STKE* **2006**(364): cm4.
- Bergman, L. W.** (2001). "Growth and maintenance of yeast." *Methods Mol Biol* **177**: 9-14.
- Birnboim, H. C. und J. Doly** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bisgrove, S. R., M. T. Simonich, N. M. Smith, A. Sattler und R. W. Innes** (1994). "A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes." *Plant Cell* **6**(7): 927-33.
- Block, A., E. Schmelz, J. B. Jones und H. J. Klee** (2005). "Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control." *Mol Plant Pathol* **6**(1): 79-83.
- Blume, B., T. Nürnberger, N. Nass und D. Scheel** (2000). "Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley." *Plant Cell* **12**(8): 1425-40.
- Brodersen, P., M. Petersen, H. Bjorn Nielsen, S. Zhu, M. A. Newman, K. M. Shokat, S. Rietz, J. Parker und J. Mundy** (2006). "Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4." *Plant J* **47**(4): 532-46.
- Browse, J.** (2005). "Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants." *Vitam Horm* **72**: 431-56.
- Cabrillac, L.** (2005). Identifizierung und Charakterisierung von LPS-induzierbaren Genen in *Arabidopsis thaliana*. Institut für Pflanzenbiochemie. Tübingen, Universität Tübingen.
- Camps, M., A. Nichols und S. Arkininstall** (2000). "Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function." *Faseb J* **14**(1): 6-16.
- Chao, Q., M. Rothenberg, R. Solano, G. Roman, W. Terzaghi und J. R. Ecker** (1997). "Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins." *Cell* **89**(7): 1133-44.
- Chen, Y. F., N. Etheridge und G. E. Schaller** (2005). "Ethylene signal transduction." *Ann Bot (Lond)* **95**(6): 901-15.

- Chen, Y. F., S. N. Shakeel, J. Bowers, X. C. Zhao, N. Etheridge und G. E. Schaller** (2007). "Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in Arabidopsis." *J Biol Chem* **282**(34): 24752-8.
- Chen, Y. L., R. Huang, Y. M. Xiao, P. Lu, J. Chen und X. C. Wang** (2004). "Extracellular calmodulin-induced stomatal closure is mediated by heterotrimeric G protein and H₂O₂." *Plant Physiol* **136**(4): 4096-103.
- Cherel, I., E. Michard, N. Platet, K. Mouline, C. Alcon, H. Sentenac und J. B. Thibaud** (2002). "Physical and functional interaction of the Arabidopsis K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA." *Plant Cell* **14**(5): 1133-46.
- Chinchilla, D., Z. Bauer, M. Regenass, T. Boller und G. Felix** (2006). "The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception." *Plant Cell* **18**(2): 465-76.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Christians, M. J. und P. B. Larsen** (2007). "Mutational loss of the prohibitin AtPHB3 results in an extreme constitutive ethylene response phenotype coupled with partial loss of ethylene-inducible gene expression in Arabidopsis seedlings." *J Exp Bot* **58**(8): 2237-48.
- Christians, M. J., L. M. Robles, S. M. Zeller und P. B. Larsen** (2008). "The eer5 mutation, which affects a novel proteasome-related subunit, indicates a prominent role for the COP9 signalosome in resetting the ethylene-signaling pathway in Arabidopsis." *Plant J* **55**(3): 467-77.
- Clark, K. L., P. B. Larsen, X. Wang und C. Chang** (1998). "Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5401-6.
- 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.
- Dangl, J. L. und J. D. Jones** (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *Nature* **411**(6839): 826-33.
- Dempsey, D. A., J. Shah und D. F. Klessig** (1999). "Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants." *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 547-575.
- Desikan, R., M. Cheung, A. Clarke, S. Golding, M. Sagi, R. Fluhr, C. Rock, J. Hancock und S. Neill** (2004). "Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*." *Functional Plant Biology* **31**: 913-920.
- Desikan, R., J. T. Hancock, K. Ichimura, K. Shinozaki und S. J. Neill** (2001). "Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6." *Plant Physiol* **126**(4): 1579-87.
- Doi, K., A. Gartner, G. Ammerer, B. Errede, H. Shinkawa, K. Sugimoto und K. Matsumoto** (1994). "MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*." *Embo J* **13**(1): 61-70.

- Dow, M., M. A. Newman und E. von Roepenack** (2000). "The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides." *Annu Rev Phytopathol* **38**: 241-261.
- Edwards, K., C. Johnstone und C. Thompson** (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." *Nucleic Acids Res* **19**(6): 1349.
- Enyedi, A. J., N. Yalpani, P. Silverman und I. Raskin** (1992). "Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6): 2480-4.
- Eulgem, T., P. J. Rushton, S. Robatzek und I. E. Somssich** (2000). "The WRKY superfamily of plant transcription factors." *Trends Plant Sci* **5**(5): 199-206.
- Fan, L. M., Z. Zhao und S. M. Assmann** (2004). "Guard cells: a dynamic signaling model." *Curr Opin Plant Biol* **7**(5): 537-46.
- Fedoroff, N. V.** (2002). "Cross-talk in abscisic acid signaling." *Sci STKE* **2002**(140): RE10.
- Feilner, T., C. Hultschig, J. Lee, S. Meyer, R. G. Immink, A. Koenig, A. Possling, H. Seitz, A. Beveridge, D. Scheel, D. J. Cahill, H. Lehrach, J. Kreutzberger und B. Kersten** (2005). "High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates." *Mol Cell Proteomics* **4**(10): 1558-68.
- Felix, G., J. D. Duran, S. Volko und T. Boller** (1999). "Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin." *Plant J* **18**(3): 265-76.
- 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 C. R. Somerville** (1990). "Three Classes of Abscisic Acid (ABA)-Insensitive Mutations of Arabidopsis Define Genes that Control Overlapping Subsets of ABA Responses." *Plant Physiol* **94**(3): 1172-1179.
- Frye, C. A., D. Tang und R. W. Innes** (2001). "Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase." *Proc Natl Acad Sci* **98**(1): 373-8.
- 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.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki und K. Shinozaki** (2006). "Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks." *Curr Opin Plant Biol* **9**(4): 436-42.
- Gagne, J. M., J. Smalle, D. J. Gingerich, J. M. Walker, S. D. Yoo, S. Yanagisawa und R. D. Vierstra** (2004). "Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation." *Proc Natl Acad Sci* **101**(17): 6803-8.

- Gao, Z., C. K. Wen, B. M. Binder, Y. F. Chen, J. Chang, Y. H. Chiang, R. J. Kerris, 3rd, C. Chang und G. E. Schaller** (2008). "Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in Arabidopsis." *J Biol Chem* **283**(35): 23801-10.
- Gietz, R. D. und R. A. Woods** (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Giraudat, J., B. M. Hauge, C. Valon, J. Smalle, F. Parcy und H. M. Goodman** (1992). "Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning." *Plant Cell* **4**(10): 1251-61.
- Gomez-Gomez, L. und T. Boller** (2000). "FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis." *Mol Cell* **5**(6): 1003-11.
- Gomez-Gomez, L. und T. Boller** (2002). "Flagellin perception: a paradigm for innate immunity." *Trends Plant Sci* **7**(6): 251-6.
- Gomez-Gomez, L., G. Felix und T. Boller** (1999). "A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana." *Plant J* **18**(3): 277-84.
- 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.
- Gudesblat, G. E., N. D. Iusem und P. C. Morris** (2007). "Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide." *New Phytol* **173**(4): 713-21.
- Gudesblat, G. E., P. S. Torres und A. A. Vojnov** (2009). "Xanthomonas campestris overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor." *Plant Physiol* **149**(2): 1017-27.
- Guo, H. und J. R. Ecker** (2003). "Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor." *Cell* **115**(6): 667-77.
- Guo, H. und J. R. Ecker** (2004). "The ethylene signaling pathway: new insights." *Curr Opin Plant Biol* **7**(1): 40-9.
- Gust, A. A., R. Biswas, H. D. Lenz, T. Rauhut, S. Ranf, B. Kemmerling, F. Gotz, E. Glawischnig, J. Lee, G. Felix und T. Nurnberger** (2007). "Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis." *J Biol Chem* **282**(44): 32338-48.
- Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander und K. Davenport** (1998). "MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1264-300.
- Hall, A. E., Q. G. Chen, J. L. Findell, G. E. Schaller und A. B. Bleeker** (1999). "The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor." *Plant Physiol* **121**(1): 291-300.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill und A. Aderem** (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* **410**(6832): 1099-103.

- He, C., S. H. Fong, D. Yang und G. L. Wang** (1999). "BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice." *Mol Plant Microbe Interact* **12**(12): 1064-73.
- Heath, M. C.** (2000). "Nonhost resistance and nonspecific plant defenses." *Curr Opin Plant Biol* **3**(4): 315-9.
- Hetherington, A. M. und F. I. Woodward** (2003). "The role of stomata in sensing and driving environmental change." *Nature* **424**(6951): 901-8.
- 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.
- 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* **12**(8): 343-51.
- Ho, D. T., A. J. Bardwell, M. Abdollahi und L. Bardwell** (2003). "A docking site in MKK4 mediates high affinity binding to JNK MAPKs and competes with similar docking sites in JNK substrates." *J Biol Chem* **278**(35): 32662-72.
- Hua, J., C. Chang, Q. Sun und E. M. Meyerowitz** (1995). "Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene." *Science* **269**(5231): 1712-4.
- Hua, J. und E. M. Meyerowitz** (1998). "Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana." *Cell* **94**(2): 261-71.
- Huang, Y., H. Li, R. Gupta, P. C. Morris, S. Luan und J. J. Kieber** (2000). "ATMPK4, an Arabidopsis homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation." *Plant Physiol* **122**(4): 1301-10.
- Huang, Y., H. Li, C. E. Hutchison, J. Laskey und J. J. Kieber** (2003). "Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis." *Plant J* **33**(2): 221-33.
- Ichimura, K., T. Mizoguchi, K. Irie, P. Morris, J. Giraudat, K. Matsumoto und K. Shinozaki** (1998). "Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in Arabidopsis." *Biochem Biophys Res Commun* **253**(2): 532-43.
- Ichimura, K., T. Mizoguchi, R. Yoshida, T. Yuasa und K. Shinozaki** (2000). "Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6." *Plant J* **24**(5): 655-65.
- Ingle, R. A., M. Carstens und K. J. Denby** (2006). "PAMP recognition and the plant-pathogen arms race." *Bioessays* **28**(9): 880-9.
- Inohara, N. und G. Nunez** (2003). "NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis." *Nat Rev Immunol* **3**(5): 371-82.

- Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama** (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Joo, J. H., S. Wang, J. G. Chen, A. M. Jones und N. V. Fedoroff** (2005). "Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone." *Plant Cell* **17**(3): 957-70.
- Kaiser, C.** (1994). "Methods in Yeast Genetics." *Cold Spring Harbour, NY. Cold Spring Harbour Laboratories.*
- Katou, S., E. Karita, H. Yamakawa, S. Seo, I. Mitsuhashi, K. Kuchitsu und Y. Ohashi** (2005). "Catalytic activation of the plant MAPK phosphatase NtMKP1 by its physiological substrate salicylic acid-induced protein kinase but not by calmodulins." *J Biol Chem* **280**(47): 39569-81.
- Katou, S., K. Kuroda, S. Seo, Y. Yanagawa, T. Tsuge, M. Yamazaki, A. Miyao, H. Hirochika und Y. Ohashi** (2007). "A calmodulin-binding mitogen-activated protein kinase phosphatase is induced by wounding and regulates the activities of stress-related mitogen-activated protein kinases in rice." *Plant Cell Physiol* **48**(2): 332-44.
- Kende, H. und J. Zeevaart** (1997). "The Five "Classical" Plant Hormones." *Plant Cell* **9**(7): 1197-1210.
- Kendrick, M. D. und C. Chang** (2008). "Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation." *Curr Opin Plant Biol* **11**(5): 479-85.
- Kerk, D., J. Bulgrien, D. W. Smith, B. Barsam, S. Veretnik und M. Gribskov** (2002). "The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **129**(2): 908-25.
- Keyse, S. M.** (1998). "Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity." *Semin Cell Dev Biol* **9**(2): 143-52.
- Kieber, J. J., M. Rothenberg, G. Roman, K. A. Feldmann und J. R. Ecker** (1993). "CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases." *Cell* **72**(3): 427-41.
- Kiegerl, S., F. Cardinale, C. Siligan, A. Gross, E. Baudouin, A. Liwosz, S. Eklof, S. Till, L. Bogre, H. Hirt und I. Meskiene** (2000). "SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK." *Plant Cell* **12**(11): 2247-58.
- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki und K. Shinozaki** (1994). "Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* **35**(2): 225-31.
- Klee, H. J.** (2004). "Ethylene signal transduction. Moving beyond *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **135**(2): 660-7.
- Konishi, M. und S. Yanagisawa** (2008). "Ethylene signaling in *Arabidopsis* involves feedback regulation via the elaborate control of EBF2 expression by EIN3." *Plant J* **55**(5): 821-31.

- Koornneef, M., M. L. Jorna, D. L. C. Brinkhorst-van der Swan und C. M. Karszen** (1982). "The isolation of abscisic acid (ABA)-deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellinsensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." *Theor Appl Genet* **61**: 385-393.
- Koornneef, M., K. M. Léon-Kloosterziel, S. H. Schwartz und J. A. D. Zeevaart** (1998). "The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*." *Plant Physiol Biochem* **36**: 83-89.
- Koornneef, M., G. Reuling und C. M. Karszen** (1984). "The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*." *Physiol Plant* **61**: 377-383.
- Kovtun, Y., W. L. Chiu, G. Tena und J. Sheen** (2000). "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants." *Proc Natl Acad Sci* **97**(6): 2940-5.
- 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.
- Kunze, G., C. Zipfel, S. Robatzek, K. Niehaus, T. Boller und G. Felix** (2004). "The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants." *Plant Cell* **16**(12): 3496-507.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lee, J., J. J. Rudd, V. K. Macioszek und D. Scheel** (2004). "Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley." *J Biol Chem* **279**(21): 22440-8.
- Lee, J. S. und B. E. Ellis** (2007). "Arabidopsis MAPK phosphatase MKP2 positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem*.
- Lee, K., E. H. Song, H. S. Kim, J. H. Yoo, H. J. Han, M. S. Jung, S. M. Lee, K. E. Kim, M. C. Kim, M. J. Cho und W. S. Chung** (2008). "Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in *Arabidopsis*." *J Biol Chem* **283**(35): 23581-8.
- Lee, S., H. Choi, S. Suh, I. S. Doo, K. Y. Oh, E. J. Choi, A. T. Schroeder Taylor, P. S. Low und Y. Lee** (1999). "Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*." *Plant Physiol* **121**(1): 147-52.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart und J. A. Hoffmann** (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* **86**(6): 973-83.

- 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.
- Leon-Kloosterziel, K. M., M. A. Gil, G. J. Ruijs, S. E. Jacobsen, N. E. Olszewski, S. H. Schwartz, J. A. Zeevaart und M. Koornneef** (1996). "Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci." *Plant J* **10**(4): 655-61.
- Leung, J. und J. Giraudat** (1998). "Abscisic Acid Signal Transduction." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199-222.
- 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): 759-71.
- Li, B. und S. Fields** (1993). "Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system." *Faseb J* **7**(10): 957-63.
- Lin, N. C. und G. B. Martin** (2005). "An avrPto/avrPtoB mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 does not elicit Pto-mediated resistance and is less virulent on tomato." *Mol Plant Microbe Interact* **18**(1): 43-51.
- Lipka, V., J. Dittgen, P. Bednarek, R. Bhat, M. Wiermer, M. Stein, J. Landtag, W. Brandt, S. Rosahl, D. Scheel, F. Llorente, A. Molina, J. Parker, S. Somerville und P. Schulze-Lefert** (2005). "Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis." *Science* **310**(5751): 1180-3.
- 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.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lorenzo, O. und R. Solano** (2005). "Molecular players regulating the jasmonate signalling network." *Curr Opin Plant Biol* **8**(5): 532-40.
- Lu, C., M. H. Han, A. Guevara-Garcia und N. V. Fedoroff** (2002). "Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15812-7.
- 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.
- Martin, H., M. Flandez, C. Nombela und M. Molina** (2005). "Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast." *Mol Microbiol* **58**(1): 6-16.

- Matsuoka, D., T. Nanmori, K. Sato, Y. Fukami, U. Kikkawa und T. Yasuda** (2002). "Activation of AtMEK1, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings." *Plant J* **29**(5): 637-47.
- Mauch-Mani, B. und F. Mauch** (2005). "The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions." *Curr Opin Plant Biol* **8**(4): 409-14.
- 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.
- Medzhitov, R. und C. A. Janeway, Jr.** (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 4-9.
- Medzhitov, R. und C. A. Janeway, Jr.** (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." *Science* **296**(5566): 298-300.
- Melotto, M., W. Underwood, J. Koczan, K. Nomura und S. Y. He** (2006). "Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion." *Cell* **126**(5): 969-80.
- Menke, F. L., J. A. van Pelt, C. M. Pieterse und D. F. Klessig** (2004). "Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis." *Plant Cell* **16**(4): 897-907.
- Merlot, S., F. Gosti, D. Guerrier, A. Vavasseur und J. Giraudat** (2001). "The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway." *Plant J* **25**(3): 295-303.
- Meskiene, I., E. Baudouin, A. Schweighofer, A. Liwosz, C. Jonak, P. L. Rodriguez, H. Jelinek und H. Hirt** (2003). "Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* **278**(21): 18945-52.
- Mittal, S. und K. R. Davis** (1995). "Role of the phytotoxin coronatine in the infection of Arabidopsis thaliana by Pseudomonas syringae pv. tomato." *Mol Plant Microbe Interact* **8**(1): 165-71.
- Mizoguchi, T., K. Ichimura, K. Irie, P. Morris, J. Giraudat, K. Matsumoto und K. Shinozaki** (1998). "Identification of a possible MAP kinase cascade in Arabidopsis thaliana based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants." *FEBS Lett* **437**(1-2): 56-60.
- Mizoguchi, T., K. Irie, T. Hirayama, N. Hayashida, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Matsumoto und K. Shinozaki** (1996). "A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2): 765-9.
- Monroe-Augustus, M., B. K. Zolman und B. Bartel** (2003). "IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in Arabidopsis." *Plant Cell* **15**(12): 2979-91.

- 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 Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure." *PLoS Biol* **4**(10): e327.
- Nakashima, K., Y. Fujita, K. Katsura, K. Maruyama, Y. Narusaka, M. Seki, K. Shinozaki und K. Yamaguchi-Shinozaki** (2006). "Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis." *Plant Mol Biol* **60**(1): 51-68.
- Nambara, E., K. Keith, P. McCourt und S. Naito** (1994). "Isolation of an internal deletion mutant of the Arabidopsis thaliana ABI3 gene." *Plant Cell Physiol* **35**(3): 509-13.
- Narusaka, Y., M. Narusaka, M. Seki, T. Umezawa, J. Ishida, M. Nakajima, A. Enju und K. Shinozaki** (2004). "Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray." *Plant Mol Biol* **55**(3): 327-42.
- Negrutiu, I., R. D. Shillito, I. Potrykus, G. Biasini und F. Sala** (1987). "Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts." *Plant Mol Biol* **8**: 363-373.
- Nguyen, A. N. und K. Shiozaki** (1999). "Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases." *Genes Dev* **13**(13): 1653-63.
- Nühse, T. S., S. C. Peck, H. Hirt und T. Boller** (2000). "Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6." *J Biol Chem* **275**(11): 7521-6.
- Nürnberg, T. und F. Brunner** (2002). "Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns." *Curr Opin Plant Biol* **5**(4): 318-24.
- Nürnberg, T. und V. Lipka** (2005). "Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon." *Mol. Plant Pathol.* **6**: 335-345.
- Ofek, P., D. Ben-Meir, Z. Kariv-Inbal, M. Oren und S. Lavi** (2003). "Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C alpha." *J Biol Chem* **278**(16): 14299-305.
- 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* **100**(20): 11771-6.
- O'Malley, R. C., F. I. Rodriguez, J. J. Esch, B. M. Binder, P. O'Donnell, H. J. Klee und A. B. Bleeker** (2005). "Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato." *Plant J* **41**(5): 651-9.
- Osakabe, Y., K. Maruyama, M. Seki, M. Satou, K. Shinozaki und K. Yamaguchi-Shinozaki** (2005). "Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis." *Plant Cell* **17**(4): 1105-19.

- 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.
- Parker, J. E.** (2003). "Plant recognition of microbial patterns." *Trends Plant Sci* **8**(6): 245-7.
- 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.
- Petersen, M., P. Brodersen, H. Naested, E. Andreasson, U. Lindhart, B. Johansen, H. B. Nielsen, M. Lacy, M. J. Austin, J. E. Parker, S. B. Sharma, D. F. Klessig, R. Martienssen, O. Mattsson, A. B. Jensen und J. Mundy** (2000). "Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance." *Cell* **103**(7): 1111-20.
- Potuschak, T., E. Lechner, Y. Parmentier, S. Yanagisawa, S. Grava, C. Koncz und P. Genschik** (2003). "EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2." *Cell* **115**(6): 679-89.
- Qiu, J. L., B. K. Fiil, K. Petersen, H. B. Nielsen, C. J. Botanga, S. Thorgrimsen, K. Palma, M. C. Suarez-Rodriguez, S. Sandbeck-Clausen, J. Lichota, P. Brodersen, K. D. Grasser, O. Mattsson, J. Glazebrook, J. Mundy und M. Petersen** (2008). "Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus." *Embo J* **27**(16): 2214-21.
- Qu, X., B. P. Hall, Z. Gao und G. E. Schaller** (2007). "A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on Arabidopsis plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1." *BMC Plant Biol* **7**: 3.
- Quettier, A. L., C. Bertrand, Y. Habricot, E. Miginiac, C. Agnes, E. Jeannette und R. Maldiney** (2006). "The phs1-3 mutation in a putative dual-specificity protein tyrosine phosphatase gene provokes hypersensitive responses to abscisic acid in Arabidopsis thaliana." *Plant J* **47**(5): 711-9.
- Rangaswamy, V., S. Jiralerspong, R. Parry und C. L. Bender** (1998). "Biosynthesis of the Pseudomonas polyketide coronafacic acid requires monofunctional and multifunctional polyketide synthase proteins." *Proc Natl Acad Sci* **95**(26): 15469-74.
- Razem, F. A., A. El-Kereamy, S. R. Abrams und R. D. Hill** (2006). "The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor." *Nature* **439**(7074): 290-4.
- Robert, N., S. Merlot, V. N'Guyen, A. Boisson-Dernier und J. I. Schroeder** (2006). "A hypermorphic mutation in the protein phosphatase 2C HAB1 strongly affects ABA signaling in Arabidopsis." *FEBS Lett* **580**(19): 4691-6.
- Robles, L. M., J. S. Wampole, M. J. Christians und P. B. Larsen** (2007). "Arabidopsis enhanced ethylene response 4 encodes an EIN3-interacting TFIID transcription factor required for proper ethylene response, including ERF1 induction." *J Exp Bot* **58**(10): 2627-39.
- Rodriguez, P. L.** (1998). "Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants." *Plant Mol Biol* **38**(6): 919-27.

- Rodriguez, P. L., G. Benning und E. Grill** (1998a). "ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis." *FEBS Lett* **421**(3): 185-90.
- Rodriguez, P. L., M. P. Leube und E. Grill** (1998b). "Molecular cloning in Arabidopsis thaliana of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2." *Plant Mol Biol* **38**(5): 879-83.
- Roelfsema, M. R. und R. Hedrich** (2005). "In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'." *New Phytol* **167**(3): 665-91.
- Roelfsema, M. R. G. und H. B. A. Prins** (1995). "Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of abi mutants of Arabidopsis thaliana." *Physiol Plant* **95**: 373-378.
- Romeis, T.** (2001). "Protein kinases in the plant defence response." *Curr Opin Plant Biol* **4**(5): 407-14.
- Romeis, T., P. Piedras, S. Zhang, D. F. Klessig, H. Hirt und J. D. Jones** (1999). "Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses." *Plant Cell* **11**(2): 273-87.
- 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.
- Sakai, H., J. Hua, Q. G. Chen, C. Chang, L. J. Medrano, A. B. Bleeker und E. M. Meyerowitz** (1998). "ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5812-7.
- Schaffer, R., J. Landgraf, M. Accerbi, V. Simon, M. Larson und E. Wisman** (2001). "Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis." *Plant Cell* **13**(1): 113-23.
- Schoenbeck, M. A., D. A. Samac, M. Fedorova, R. G. Gregerson, J. S. Gantt und C. P. Vance** (1999). "The alfalfa (Medicago sativa) TDY1 gene encodes a mitogen-activated protein kinase homolog." *Mol Plant Microbe Interact* **12**(10): 882-93.
- Schweighofer, A., H. Hirt und I. Meskiene** (2004). "Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling." *Trends Plant Sci* **9**(5): 236-43.
- Schweighofer, A., V. Kazanaviciute, E. Scheikl, M. Teige, R. Doczi, H. Hirt, M. Schwanninger, M. Kant, R. Schuurink, F. Mauch, A. Buchala, F. Cardinale und I. Meskiene** (2007). "The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis." *Plant Cell* **19**(7): 2213-24.
- She, X., X. Song und J. He** (2004). "Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in Vicia faba." *Acta Botanica Sinica* **46**: 1292-1300.

- 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.
- Solano, R., A. Stepanova, Q. Chao und J. R. Ecker** (1998). "Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1." *Genes Dev* **12**(23): 3703-14.
- Suhita, D., A. S. Raghavendra, J. M. Kwak und A. Vavasseur** (2004). "Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure." *Plant Physiol* **134**(4): 1536-45.
- Tahtiharju, S. und T. Palva** (2001). "Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **26**(4): 461-70.
- Takekawa, M., T. Maeda und H. Saito** (1998). "Protein phosphatase 2C α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways." *Embo J* **17**(16): 4744-52.
- Tena, G., T. Asai, W. L. Chiu und J. Sheen** (2001). "Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades." *Curr Opin Plant Biol* **4**(5): 392-400.
- Thaler, J. S. und R. M. Bostock** (2004). "Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects." *Ecology* **85**: 48-58.
- TheMAPKgroup** (2002). "Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature." *Trends Plant Sci* **7**(7): 301-8.
- Ulm, R., K. Ichimura, T. Mizoguchi, S. C. Peck, T. Zhu, X. Wang, K. Shinozaki und J. Paszkowski** (2002). "Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1." *Embo J* **21**(23): 6483-93.
- Ulm, R., E. Revenkova, G. P. di Sansebastiano, N. Bechtold und J. Paszkowski** (2001). "Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*." *Genes Dev* **15**(6): 699-709.
- Van Den Berg, N., T. A. S. Aveling und S. L. Venter** (2003). "Infection studies of *Alternaria cassiae* on cowpea." *Australasian Plant Pathology* **32**(1): 33 - 38.
- Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre und D. Baulcombe** (2003). "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." *Plant J* **33**(5): 949-56.
- Vranova, E., S. Tahtiharju, R. Sriprang, H. Willekens, P. Heino, E. T. Palva, D. Inze und W. Van Camp** (2001). "The AKT3 potassium channel protein interacts with the AtPP2CA protein phosphatase 2C." *J Exp Bot* **52**(354): 181-2.
- 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.

- Wang, K. L., H. Li und J. R. Ecker** (2002). "Ethylene biosynthesis and signaling networks." *Plant Cell* **14 Suppl**: S131-51.
- Wang, W., J. J. Esch, S. H. Shiu, H. Agula, B. M. Binder, C. Chang, S. E. Patterson und A. B. Bleeker** (2006). "Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of Arabidopsis." *Plant Cell* **18**(12): 3429-42.
- Wang, W., A. E. Hall, R. O'Malley und A. B. Bleeker** (2003). "Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 352-7.
- Warmka, J., J. Hanneman, J. Lee, D. Amin und I. Ota** (2001). "Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1." *Mol Cell Biol* **21**(1): 51-60.
- Whenham, R. J., R. S. S. Fraser, L. P. Brown und J. A. Payne** (1986). "Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark green areas, and relationship to symptom development." *Planta* **168**: 592-598.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe und G. L. Johnson** (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* **79**(1): 143-80.
- Williams, R. W., J. M. Wilson und E. M. Meyerowitz** (1997). "A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the Arabidopsis CLAVATA1 signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10467-72.
- Xie, F., Q. Liu und C. K. Wen** (2006). "Receptor signal output mediated by the ETR1 N terminus is primarily subfamily I receptor dependent." *Plant Physiol* **142**(2): 492-508.
- Xing, Y., W. Jia und J. Zhang** (2008). "AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis." *Plant J* **54**(3): 440-51.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und K. Shinozaki** (1993a). "Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes." *Plant Physiol* **101**(3): 1119-20.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und K. Shinozaki** (1993b). "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.
- Yamakawa, H., S. Katou, S. Seo, I. Mitsuhashi, H. Kamada und Y. Ohashi** (2004). "Plant MAPK phosphatase interacts with calmodulins." *J Biol Chem* **279**(2): 928-36.
- Yanagisawa, S., S. D. Yoo und J. Sheen** (2003). "Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants." *Nature* **425**(6957): 521-5.
- Yoo, J. H., M. S. Cheong, C. Y. Park, B. C. Moon, M. C. Kim, Y. H. Kang, H. C. Park, M. S. Choi, J. H. Lee, W. Y. Jung, H. W. Yoon, W. S. Chung, C. O. Lim, S. Y. Lee und M. J. Cho** (2004). "Regulation of the dual specificity protein phosphatase, DsPTP1, through interactions with calmodulin." *J Biol Chem* **279**(2): 848-58.

- Yoo, S. D., Y. Cho und J. Sheen** (2009). "Emerging connections in the ethylene signaling network." *Trends Plant Sci* **14**(5): 270-9.
- Yoo, S. D., Y. H. Cho, G. Tena, Y. Xiong und J. Sheen** (2008). "Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling." *Nature* **451**(7180): 789-95.
- Yoshida, R., T. Umezawa, T. Mizoguchi, S. Takahashi, F. Takahashi und K. Shinozaki** (2006a). "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): 5310-8.
- Yoshida, T., N. Nishimura, N. Kitahata, T. Kuromori, T. Ito, T. Asami, K. Shinozaki und T. Hirayama** (2006b). "ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs." *Plant Physiol* **140**(1): 115-26.
- Yu, L. P., A. K. Miller und S. E. Clark** (2003). "POLTERGEIST encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identity at Arabidopsis shoot and flower meristems." *Curr Biol* **13**(3): 179-88.
- Zeevaart, J. A. D. und R. A. Creelman** (1988). "Metabolism and physiology of abscisic acid." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 439-473.
- Zhang, S. und D. F. Klessig** (2001). "MAPK cascades in plant defense signaling." *Trends Plant Sci* **6**(11): 520-7.
- Zhang, X., L. Zhang, F. Dong, J. Gao, D. W. Galbraith und C. P. Song** (2001). "Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*." *Plant Physiol* **126**(4): 1438-48.
- Zhou, B., Z. X. Wang, Y. Zhao, D. L. Brautigam und Z. Y. Zhang** (2002). "The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases." *J Biol Chem* **277**(35): 31818-25.
- 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.
- Zipfel, C., G. Kunze, D. Chinchilla, A. Caniard, J. D. Jones, T. Boller und G. Felix** (2006). "Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation." *Cell* **125**(4): 749-60.
- Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E. J. Oakeley, J. D. Jones, G. Felix und T. Boller** (2004). "Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception." *Nature* **428**(6984): 764-7.

7 ANHANG

Tabelle 7-1: Oligonukleotide

Primername	Gen	Sequenz (5'-3'-Richtung)	T _s in °C
Salk_Lba	T-DNA bei Salk-Linien	tggttcacgtagtgggccatcg	64
Flag_LB4	T-DNA bei Flag-Linien	gtgccacggaatagtttg	59,8
p745	T-DNA bei Wisc-Linien	tccgaatgtgttattaagttg	57,6
Exotic_LB_spm32	T-DNA bei Exotic-Linien	gaataagagcgtccatttagagt	59,7
eF1a-s	At1g07920/30/40	tcacatcaacattgtggcattgg	59,3
eF1a-as	At1g07920/30/40	ttgatctggtcaagagcctacag	60,6
SpyN/CE-for		atctccactgacgtaagg	53,7
SpyNe-rev		gggcaccaccccggtgaaca	65,5
SpyCe-rev		ggcggatcttgaagttcacct	59,8
Y2HT7Seq.for		taatacgactcactatagggc	55,9
pGADT73?ADSeq.rev		agatggtgcacgatgcacag	59,4
pGBKT73?DNA-BDSeq.re		taagagtcactttaaattgtat	50,8
609987LP	At2g40180	tgaattcgtggaaaaagcgac	55,9
609987RP	At2g40180	tcttacctataggacaaacc	55,9
N103698LP2	At2g40180	ctcaagcaaatgagctcaaagg	58,9
N103698RP	At2g40180	gcctacgcagtagcgtcgaacgaca	67,7
At2g40180fwd	At2g40180	atgcaactctcaaagaatccg	55,9
At2g40180R	At2g40180	agcctctcttaaccgatagc	58,4
At2g40180-XbaI-f	At2g40180	aatttctagaatgcaactctcaaagaat	57,8
At2g40180-XmaI-r	At2g40180	aattcccgggtggaagaaagttttag	63,7
At2g40180-NdeI-f	At2g40180	aattcatatgcaactctcaaagaat	54,8
At2g40180-XhoI-r	At2g40180	aattctcgagtcattggaagaaagttttag	62,9

40180-LDL-ADL-f	At2g40180-L95A	gaccaccgatggctgacttaacggcggctccgac ggt	>75
40180-LDL-ADL-r	At2g40180-L95A	acttttctttgctgggtgctaccgactgaattgccg	>75
40180-KRK-AAA-f	At2g40180-K88A- R89A-K90A	ctgattctgaaacgggtgtggcagcggcagcacc gatgcttgacttaacg	>75
40180-KRK-AAA-r	At2g40180-K88A- R89A-K90A	ccaagactaagactttgccacaaccgtcgccgt gctgggtggctacgaactga	>75
40180-K98A-fw	At2g40180-K98A	ctgattctgaaacgggtgtgaaaagggcagcacc accgatgcttgacttaacg	>75
40180-K98A-rev	At2g40180-K98A	cgtaagtcaagcatcggtggtcgtgccctttcaa caccgttcagaatcag	>75
40180-K98A-R99Q-fw	At2g40180-K98A- R99Q	ctgattctgaaacgggtgtgaaaagggcacaacc accgatgcttgacttaacg	>75
40180-K98A-R99Q-rev	At2g40180-K98A- R99Q	cgtaagtcaagcatcggtggtggtgccctttcaa caccgttcagaatcag	>75
At2g30020-BamHI-f	At2g30020	aattggatccatgtcttgcctcgcgcgt	69,5
At2g30020-XmaI-r	At2g30020	aattcccgggtatgaactggcgtaaaggg	68,1
565126LP	At2g30020	aagcggctgagttgcagc	59,5
565126RP2	At2g30020	aaacctccaaatttctaacg	51,2
565126LP3	At2g30020	caccaatctcatggagatcg	57,9
At2g30020-F	At2g30020	tttctgcatcctcctcctcg	59,4
565126RP3	At2g30020	gatatcatcagacgagcctcg	59,8
At1g07160-BamHI-f	At1g07160	aattccatccatgtcgtcttcagttgc	63,4
At1g07160-XmaI-r	At1g07160	aattcccggggaagaggtggcacaactga	69,5
At1g07160-NdeI-f	At1g07160	aattcatatgatgtcgtcttcagttgccg	63,9
At1g07160-BamHI-r	At1g07160	aattggatcctcagaagaggtggcacaac	66,7
At1g07160-F	At1g07160	ccgttgaacacttctccggccat	64,4
At1g07160-R	At1g07160	tccgatccaaaccctagtttagc	60,6
FLAG_023H08-LP	At1g07160	aaataaaacgacccgggtcggg	62,1
FLAG_023H08RP2	At1g07160	aactgaagacgacatcgtttcgtag	61,3
At1g67820-F	At1g67820	aaagaagtgggtggtgctg	57,3
At1g67820-R	At1g67820	agcctttgtaatggttgagatc	56,5
At1g67820-XbaI-f	At1g67820	aatttctagaatgactaataaactcgetc	59,9
At1g67820-XmaI-r	At1g67820	aattcccggggcctttgtaatggttgag	66,6
564063LP	At1g67820	aacggttacgaaatagtgtg	54,3

564063RP	At1g67820	taggaaatcacgatcagtc	56,4
N564063-LP3	At1g67820	tgactgcgcaaacacctag	59,4
564063RP2	At1g67820	ttgtatcacagcagtaacac	53,2
MPK3-XbaI-f	At3g45640	aatttctagaatgaacaccggcggtggcc	68,1
MPK3-XhoI-r	At3g45640	aattcccgggaccgtatgttgattgagtg	68,1
MPK3-EcoRI-f	At3g45640	aattgaattcatgaacaccggcggtggcc	68,1
MPK3-BamI-r	At3g45640	aattggatccctaaccgtatgttgattgagtg	67,0
MPK4-BamHI-f	At4g01370	aattggatccatgtcggcgagagttgttcg	69,5
MPK4-XmaI-r	At4g01370	aattcccgggactgagtcttgaggattgaac	69,5
MPK4-EcoRI-f	At4g01370	aattgaattcatgtcggcgagagttgttcg	66,9
MPK4-BamI-r	At4g01370	aattggatcctcacactgagtcttgaggattgaac	68,3
MPK6-XbaI-f	At2g43790	aatttctagaatggacgggtggtcaggta	65,4
MPK6-XmaI-r	At2g43790	aattcccgggtgctgatattctggatt	63,7
MPK6-NdeI-f	At2g43790	aattcatatggacgggtggtcaggta	63,4
MPK6-BamHI-r	At2g43790	aattggatccctattgctgatattctggatt	62,9
At1g51850-for	At1g51850	tgaattggggaactagactga	55,9
At1g51850R3	At1g51850	aaatccacgttacatatggcg	55,9
At2g14610Fwd	At2g14610	atgaattttactggctattc	49,1
At2g14610Rev	At2g14610	ttagtatggcttctcgttc	52,4
At3g55270-LP2	At3g55270	attttattgtaatttgttaataataaag	51,1
At3g55270-RP	At3g55270	aggagcagctggacatcttcg	61,8
At3g55270(mkp1)-fw	At3g55270	atgtggagagaagggcaaag	57,3
N613092RP	At3g55270	aagtgttacagactgcttca	56,5
N581540LP	At3g23610	gaggtgacgaagttacgtata	55,9
N581540RP	At3g23610	gtccatcgaagttcgatat	52,4
N592811LP	At3g23610	acttgcagtgtcactatagtgttgc	61,6
N592811RP	At3g23610	tcacgcctgacatttgcaatcg	62,4
N596835LP	At5g23720	atggcggaacctgagaagaagc	62,1
N596835RP	At5g23720	tacttgggtgacttttaggatcag	59,3
N653151LP	At2g04550	atgaggaagagagaaagaga	53,2
N653151RP	At2g04550	tcaactctgcagttgttggttaa	57,6
RD29A_f	At5g52310	gaggagccaaaacagagcac	59,4

RD29A_r	At5g52310	ccattcctcctcctccttc	59,4
Erd10_f	At1g20450	agagattaaggagcggggaa	57,3
Erd10_r	At1g20450	tacatcatcaccctcggtt	57,3

	cgcataatatagatcacttatttctaaggtaaaagatttcacgtgatcaccgagtgccaaccttctatttcaaatctctcgtt	80
Salk_015191	atggcaatttaataaaccactagaaaaaacaattatagagaaaggttaatttgggcaccgacgtgaatttgactaaattac	160
	gagagagaaagaaagagagacttggtcacgaaggtgttaattagcatgaaagagagagaaataatcgtcgttgaccattg	240
	accataacttagtcagtcatatatataaaaaatccaaccgcccactattgttcccctattcacaaggtccttgctttctca	320
	gacgtaaacacaagaatttatattaacacaacaacaacaacaaaaagaccaaccctatttattcatattttctcttatA	400
	<u>TGCAACTCTCAAAGAAATCCGATCAAACAAACGAGAAAATCGAGAGAAGAAATTACACCGACGATTTACCCATGAAGAGATCT</u>	480
	<u>GTAATCATGGCTCCTGAATCTCCGGTTTTTTTCCCACTCCGCTTGTTCCTCCGACGTCGGTCAAACGCCGTTGTC</u>	560
	<u>TTCTCCTCGTTCGTCGCCACCGAAGCTGACGATGGTTGCTTGTCTCCAAGAAAGCCAAAGGAGACGAAGACTACGGGTT</u>	640
	<u>CTGATTCGAAAACGGTGTGAAAAGGAAACGACCACCGATGCTTGACTTAACGGCGGCCTCCGACGGTTGCATCGTGGTGC</u>	720
	<u>AGTACGACGAGAGACGGCGGAGAAAAGGAGCGGAAGTTGTTGAAAGCAGAAGAAGATGGATACTACTCTGTTTATTGCAA</u>	800
	<u>GAGAGGAAAGACCGGACCAATGGAAGATAGGTATTTCCGGCCGTTGATCGTAACGACGACCGAGGTTACAAAATGCTT</u>	880
	<u>TCTTTGGGGTATTTGATGGTCACGGCGGATCCAAAGCGCGGAATTCGCTGCGATGAATCTAGGGAACAATATCGAGGCG</u>	960
	<u>GCAATGGCATCGGCGAGATCAGGAGAAGATGGTTGTTTCGATGGAGAGTCCGATAAAGAGAAGGTTATATCAAACGGATGA</u>	1040
	<u>GGATTTCTGAAAAGAGTTTCGAGAGGTGGCGCGTGTGTGTAACCGCTTTGATATCGAAAAGCGAGCTTGCGGTTTCGA</u>	1120
	<u>ATGCAGGCGACTGCCGGCTGTTATGAGTCGTTGGTAACCGCGGAAGCTCTCACCTCCGATCATAATCCTTCTCAAAGCA</u>	1200
SM_3_15467	<u>AATGAGCTCAAAGGATTGAAGCATTG</u> gtgagttttatccttgtgcattggattttgattagtaacatcacataaattgtg	1280
	gaattgcatttcaaaaaaaaaaattcatttgaattcgtggaaaaagcgactctagtataaaatgcggttgataaaaatttttg	1360
	caaatggagaatcattctaccattttgcgttcaaaaataatgttttagtgcggtttgggttaatttgggtttgggttact	1440
Salk_109987	<u>tatttttgaatgtgtgtag</u> GTTGGTTATGTTGACTGCTGC AACGGCGTTTGGAGAATTCAAGGGACATTAGCAGTCTCAC	1520
	GAGGAATTGGAGACCGGTACCTCAAAGGAGTGGGTGATAGCTGAACCGGAAACCAGAACATTACGGATTAACCGGAGTTT	1600
	GAATTCCTGATCTTAGCATCTGATGGCCTGTTGGACAAAGtaagcataacaagaatgcatgatttcaaaaatttgattt	1680
	tcatttttggctctttggatttaattgtgaagetgggtttgtcctatagGTAACGAACCAAAGAGGCGCTCGATGTCGTTTCGA	1760
	CCGTAAGCTAGGCGTAGAGAAATCCAATGACACTTTCTGCTTGCAAGAAACTGGCTGAGCTATCGGTTAAGAGAGGCTC	1840
	TTTGGATGATATAAGTCTAATTATAATTCAGCTACAAAACCTTTCTCCATGAatattaacacatagtagctaaa	1920
	cttaattaatttcattaggtcgtagttatataaaattttgttcggtatttacatgtaataacataaagggttgga	2000
	taataatattatgttatgttcttagagataagctccaaaatattttgggtttacgatataaacactacataatacatg	2080
	aaatgcactatctaaccatttatcatcctttttatcctcaactttttatctcatgcatttggaaaaccacattctaa	2160
	tcataattctgcttttatgtgtaaaaccaacaagatgtacatgggttgatatacacacgtagacataaaccttgacaagca	2240
	acatctctcgtcgttactcattttacagatttctaccatctgccttcaataaaacaaacatcaaccatattagtaactgc	2320
	atggtaaccaagcatacgtgagttttgttgtaaggaccggttaaacactttgaacctataaacacctccgcctcttccaa	2400
	caactcagaataatgaacaagatcacatgctaagggtttgttaatgcttcttcaaaaacaaagtttattttaaaggggaag	2480
	ggagagtttataaaatataa	2500

Abbildung 7-1: Genmodell der PP2C5.

Kleine schwarze Buchstaben geben die Basen der 5' und 3' untranslatierte Region an. Die großen grünen Buchstaben stellen die Exons der PP2C5 dar. Die Start- und Stopcodons sind unterstrichen. Kleine rote Buchstaben geben die Intronsequenzen an. Die Positionen der drei T-DNA-Insertionslinien sind gekennzeichnet.

	cgaaatcgaaatcaaaatatagaaacg <u>ATGTC</u> TTGCTCCGTCGCCGTATGTA <u>AA</u> TTCTCCGGTGTTCACCCGTCGTCTTC	80
	TCTATTCTGCAACAAATCTTCGATTCTCTCGTCAACGCAAGAAATCTTTCTCTAACGCTTTCTCATCGCAAACTCAGA	160
	CCTCTTCTCCTTCTCCTCCATCCACCACCGTTCTTCTCCTAAATCTCCATTTCGTCTCCGTTTCCAGAAACCTCCGTCC	240
	GGATTCCGCTCCTGGTCCATTATCTTTGGATCTGAAATCTGTTTCTGCATCCTCTCCTCCGGGAGGTGTTTAAAGAGGAA	320
	ACGACCTACAAGGCTTGATATACCGATTGGTGTGCTGGATTGTAGCTCCGATTCTTCATCGGCCGCTGTGGCTGCGA	400
	CGCCGAGAGAGGAGTGTAGAGAGGTTGAGAGAGAAAGGTGATGGTTATTCTGTTTATTGTAAGAGAGGAAGAAGAGAACT	480
	ATGGAGGATCGTTTCTCTGCTATCACCAATCTTCATGGAGATCGTAAACAG <u>gtaatttt</u> aaatttcaaattcatttttca	560
	<u>gttttgg</u> tttagaattgaattgaattgggtgattttgattcgattgattagcaattacagctcaaattagggtttatcatg	640
	tgagatctacattgattgggttaataagctatctaaaattagggttctttggggaaaaatgaaattctgaaatagaattag	720
	aagttttacagaatcatatgaacaattgtgtgcttattgatgaatcgtgtattctaaacgtgttttggctttgtgataa	800
	<u>tttctcag</u> CGGATTTTCGGAGTCTATGATGGTCAATGGAGGAGTTAAAGCGGCTGAGTTTGCAGCTAAAGAACTTAGATAAG	880
	AACATTGTAGAAGAAGTAGTTGGTAAGAGAGACGAGTCTGAGATAAGCTGAAGCGGTGAACATGGTTACTTGGCAACAGA	960
salk_065126	CGCGTCGTTTCTTAAGGAGGAAGACGTTAAGGGTGGTTCATGCTGTGTCACGGCTCTGGTTAACGAAAGGAACCTTGGTG	1040
	TGTCTAACGCCGGTGACTGTCGTGCTGTTATGAGTGTAGGAGGTGTAGCTAAGGCTTTATCTTCTGATCACCCCCGCTCT	1120
salk_104446	AGAGACGATGAACGGAAAAGAAATTGAAACCACGGGAGGATATGTTGATACGTTTACGGTGTGGAGAAATCCAGGGATC	1200
	TTTAGCTGTGTCAAAGAGGAATTGGAGATGCTCAACTTAAAGAAATGGGTTATAGCTGAACCAGAGACAAAGATTTCGAGAA	1280
	TCGAGCATGACCATGAGTTTTTATCTTGGCATCTGATGGTTTATGGGATAAAAGTGAAGTAACCAAGAAGCAGTAGACATT	1360
	GCTCGTCTCTCTGCTTAGGAACCGAGAAGCCATTGTTGTTAGCTGCCTGTAAGAAGCTTGTGCGATTATCTGCTTCCAG	1640
	AGGCTCGTCTGATGATATCAGTGTGATGTTGATCCCTTACGCCAGTTCATATAGaaaagagaggcatcttagaagattt	1720
	tagatatatgataaacgttagaaatttggagggtttatgatattagttcttttggtttaacttgatccattcatttattt	1800
	attctttctaacttagtgaacaaagctaaactcattgtggcttatgattacttgatgatcgagcattggccgaaatt	1879

Abbildung 7-2: Genmodell der AP2C1.

Kleine schwarze Buchstaben geben die Basen der 5' und 3' untranslatierte Region an. Die großen grünen Buchstaben stellen die Exons der AP2C1 dar. Die Start- und Stopcodons sind unterstrichen. Kleine rote Buchstaben geben die Intronsequenzen an. Die Positionen der drei T-DNA-Insertionslinien sind gekennzeichnet.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde vom November 2005 bis Juli 2009 am Institut für Pflanzenbiochemie des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Überlassung dieses interessanten Themas, die optimalen Arbeitsbedingungen sowie seine Unterstützung durch fachliche Beratung.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Harter für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Andrea Gust, die als meine direkte Betreuerin dieser Promotionsarbeit mich stets ermutigt hat, bei Fragen zur Verfügung stand und trotz Babypause diese Arbeit geduldig korrigiert hat.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 685 Infektionsbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Friedrich Götz für die Finanzierung des größten Teils meiner Doktorarbeit.

Für die Hilfsbereitschaft und eine tolle Arbeitsatmosphäre danke ich allen Mitarbeitern der Pflanzenbiochemie, besonders meinen Laborkollegen Dr. Stefan Engelhardt, Dr. Yvonne Gäbler, Dr. Karina Kober, Dagmar Kolb, Heini Lajunen, Heike Lenz und Roland Willmann.

Die Protoplastentransformationen wurden in der „Transformation Unit“ des ZMBPs von Caterina Brancato durchgeführt. Dafür danke ich ihr herzlich, ebenso unserem Systemadministrator Dieter Steinmetz und den Gärtnern des ZMBPs für ihre gute Arbeit.

Von Irute Meskiene (Universität Wien) und Roman Ulm (Universität Freiburg) wurden freundlicherweise Samen zur Verfügung gestellt. Ebenso danke ich Gerit Bethke (Leibniz-Institut Halle) für die Co-Lokalisationsanalysen.

Meinen Eltern, meiner Schwester und Bela danke ich besonders für den Rückhalt und die moralische Unterstützung während meiner Promotionszeit.