



# Charakterisierung des phloemspezifisch exprimierten Calcium-Sensors CBL5

Katrin Held, Rainer Waadt, Julia Knutova, Oliver Batistič, Jörg Kudla

Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Botanik, Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie der Pflanzen  
Schlossplatz 4, 48149 Münster

## Einleitung

Calciumsignale vermitteln eine Vielzahl spezifischer Antworten auf verschiedene Umweltreize in Pflanzen. Die kleine Proteinfamilie der Calcium-bindenden CBLs (Calcineurin B-Like Proteins), in Verbindung mit ihren interagierenden CIPKs (CBL-interacting Protein Kinases), bildet einen wichtigen Schalter in der Entschlüsselung und spezifischen Weiterleitung dieser Signale. Verschiedene CBLs und CIPKs können hierbei ein komplexes Netzwerk mit überlappenden Signalwegen bilden.

AtCBL5 ist eines von 10 CBLs aus *Arabidopsis thaliana* mit bisher unbekannter Funktion. Hier zeigen wir seine subzelluläre Lokalisierung im Tabak-Expressions-System und die gewebsspezifische Expression im Leitsystem oberirdischer Pflanzenteile (Phloem) in *Arabidopsis*. CIPK-Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid System und durch Bimolekulare Fluoreszenz Komplementation (BiFC) in transient transformierten Tabak Zellen geben Hinweise auf weitere Elemente der CBL5-Signalkette und den Ort ihrer Interaktion.

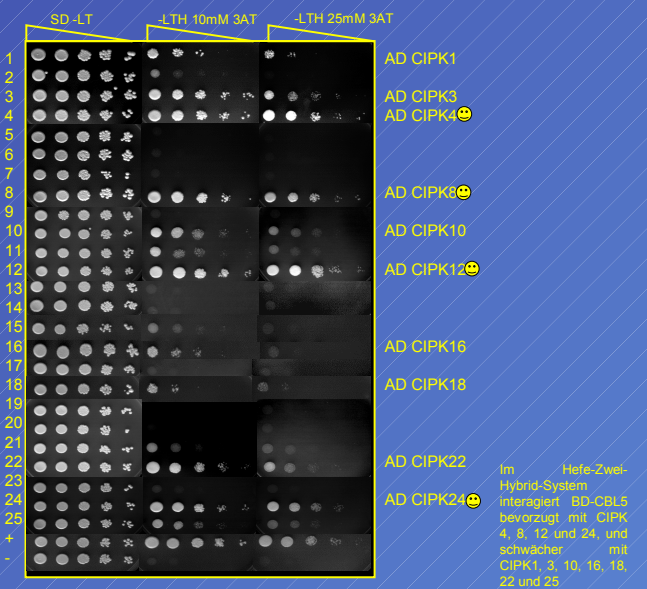
### Proteinstruktur von CBL5:

- 4 EF-Hände können als Calciumbindstellen dienen
- 1 putative Myristylierungsstelle (G2)
- und 2 putative Palmitylierungsstellen (C3, C5)



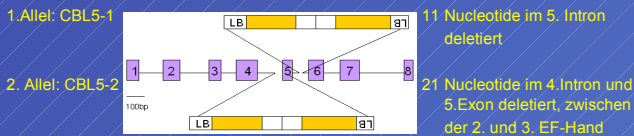
CIPK8 und CIPK24 wurden als mögliche Interaktionspartner von CBL5 an der Plasmamembran identifiziert. Die Interaktion ist abhängig vom Vorhandensein der NAF-Domäne, die als CBL-Interaktionsmotiv in den CIPKs beschrieben wurde.

## CBL5 interagiert mit verschiedenen CIPKs in Y2H

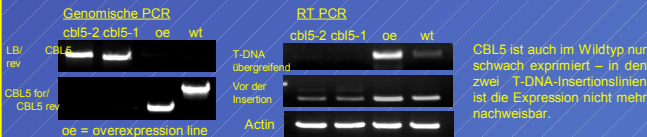


im Hefe-Zwei-Hybrid-System interagiert BD-CBL5 bevorzugt mit CIPK 4, 8, 12 und 24, und schwächer mit CIPK1, 3, 10, 16, 18, 22 und 25

## Zwei T-DNA-Allele wurden isoliert



## Nachweis der T-DNA Insertion

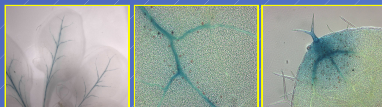


CBL5 ist auch im Wildtyp nur schwach exprimiert – in den zwei T-DNA-Insertionslinien ist die Expression nicht mehr nachweisbar.

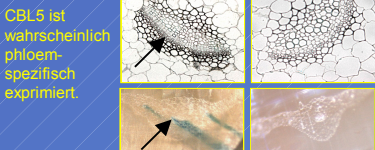
## CBL5 Expression in oberirdischen Leitgeweben

CBL5 wird vornehmlich in den Blättern (major veins) von Pflanzen ab ca. Tag 10 exprimiert.

Auch in Blütenblättern und Filamenten ist die Expression schwach, in reifenden Schoten dagegen deutlich nachweisbar.



CBL5 Expression in Blättern und Hydathoden



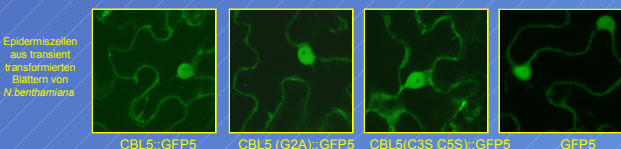
CBL5 ist wahrscheinlich phloem-spezifisch exprimiert.

CBL5-Expression im Leitgewebe (Phloem)

Links: CBL5-Promotor::GUS; Rechts: negativ Kontrolle

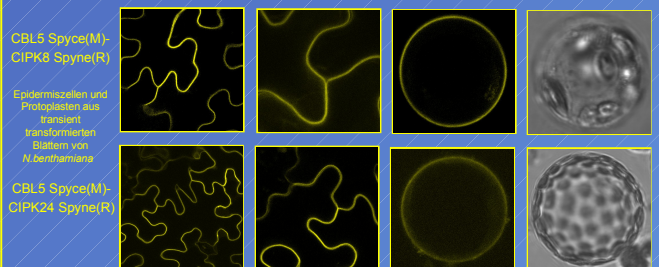
## CBL5::GFP5 Expression lokalisiert CBL5 in verschiedenen Zellkompartimenten

Nach transienter Transformation von Tabakblättern mit einem 35SPromotor::CBL5::GFP5 Konstrukt ist das Fusionsprotein im Cytosol und im Kern der Epidermiszellen nachweisbar. Die Bindung von CBL5 an die Plasmamembran und möglicherweise weiterer Membransysteme ist wahrscheinlich, durch die vorhandenen Myristylierungs- und Palmitylierungsstellen (siehe auch Ergebnisse der BiFC mit CIPK8 und CIPK24). Austausch der lipidmodifizierten Aminosäuren zeigt keinen gravierenden Einfluss auf die Lokalisierung des CBL5::GFP5-Fusionsproteins.



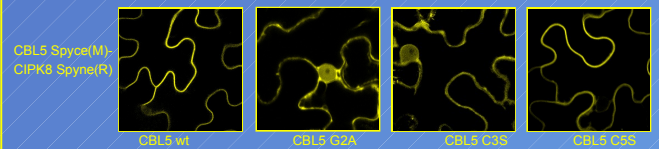
CBL5::GFP5 CBL5 (G2A)::GFP5 CBL5(C3S C5S)::GFP5 GFP5

## CBL5 interagiert mit CIPK8 und CIPK24 an der Plasmamembran



*In planta* Interaktionsstudien mit BiFC bestätigen CIPK8 und CIPK24 als mögliche Interaktionspartner von CBL5. Nach Deletion der NAF-Domäne zeigen beide keine oder nur eine schwache Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

## Lipidmodifikationen am N-Terminus von CBL5 bestimmen die Lokalisierung der CBL5/CIPK-Komplexe



Austausch der putativen Myristylierungsstelle (G2A) und der ersten Palmitylierungsstelle (C3S) verschieben den CBL5-CIPK8-Komplex zum Cytosol. Die dritte Mutation (C5S) hat keinen wesentlichen Effekt – sie wird möglicherweise auch im Wildtyp-Protein nicht palmityliert.

## Zusammenfassung / Ausblick

CBL5 ist ein Leitgewebe-spezifisch exprimiertes Calcium-bindendes Protein, welches ubiquitär in der Zelle vorliegt, aber anscheinend vornehmlich an der Plasmamembran funktionelle Komplexe mit seinen interagierenden Kinasen bildet.

CIPK8 und CIPK24 sind zwei mögliche Interaktionspartner von CBL5. Allerdings muss die Funktionalität der Komplexe durch Vergleich von Expressionsmustern und Phänotypenanalysen noch nachgewiesen werden.

Bisher wurden keine physiologischen Defekte der *cbi5*-Mutanten Linien identifiziert. Aufgrund des Expressionsmusters von CBL5, sowie bekannter Effekte in anderen *cbi/cipk*-Linien liegt das Hauptaugenmerk der Untersuchungen dabei zur Zeit auf Stressanalysen (Salz, ABA, Zucker), sowie Interaktionsstudien mit phloemspezifisch exprimierten Transportproteinen. Auch eine Funktion in Prozessen, die die Seneszenz der Blätter betreffen, kann zur Zeit nicht ausgeschlossen werden, da vor allem in seneszenten Blättern und Schoten die höchsten Transkriptkonzentrationen von CBL5 nachgewiesen wurden (AtGenExpress Data).