

„Identifizierung von MAP-Kinase-Substraten in *Arabidopsis thaliana*“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom - Biologe

Martin Thomas

aus

Aachen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Uwe Conrath

Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Björn Usadel

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 02. 2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.

Publikationen

Teile der mit dieser Dissertation vorgelegten Arbeiten wurden bereits veröffentlicht:

Beckers, G.J.M., Thomas, M., Zhang, S. & Conrath, U. (2011). Phosphoproteomic approach to identify *Arabidopsis in vivo* MAPK-substrates. Posterpräsentation bei der gemeinsamen Jahrestagung der Arbeitskreise "Mykologie" und "Wirt-Parasit-Beziehungen" der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, München, 24.-25. März 2011

Thomas, M., Hoehenwarter, W., Nukarinen, E., Weckwerth, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M. (2012). *In vivo* MAP kinase substrates in *Arabidopsis*. Vortrag bei der gemeinsamen Jahrestagung der Arbeitskreise „Mykologie“ und „Wirt-Parasit-Beziehungen“ der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Hohenheim, 22.-23. März 2012

Hoehenwarter, W., Thomas, M., Nukarinen, E., Egelhofer, V., Röhrig, H., Weckwerth, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M. (2013). Identification of Novel *in vivo* MAP Kinase Substrates in *Arabidopsis thaliana* Through Use of Tandem Metal Oxide Affinity Chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**, 369-380

Leissing, F., Thomas, M., Hoehenwarter, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M. (2014) Tandem MOAC identifies novel *in vivo* substrates of MPK3/6 in *Arabidopsis*. Posterpräsentation bei der Conference Current Findings in Plant Pathology in Aachen, 04.-05. Juni 2014

Thomas, M., Huck, N., Hoehenwarter, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M (2015) Combining Metabolic ¹⁵N Labeling with Improved Tandem MOAC for Enhanced Probing of the Phosphoproteome. *Methods in Molecular Biology* Volume 1306, 2015, pp81-96

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	I
Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	V
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Einleitung	1
Pflanzen verfügen über verschiedene Arten der Interaktion mit Krankheitserregern	1
MAP-Kinase-Kaskaden sind konservierte Signaltransduktionswege.	4
MAP-Kinasen spielen bei der Pathogenabwehr und beim „Priming“ von Abwehrreaktionen eine Rolle	5
Die Substrate der MAP-Kinasen waren weitgehend unbekannt	9
„Shotgun“-Proteomik erleichtert die Suche nach möglichen MAP- Kinase-Substraten	10
Die metabolische Markierung mit ^{15}N erhöht die Genauigkeit der relativen Quantifizierung von Proteinen	13
Transgene Pflanzen ermöglichen die Aktivierung der MAP-Kinasen <i>in planta</i>	14
Ergebnisse	17
Quantitative Unterschiede nach Dexamethason-Behandlung lassen sich ohne Anreicherung nicht durch Immunodetektion feststellen.	17
Tandem-MOAC ermöglicht die Identifizierung be-kannter MAP- Kinase-Substrate mittels Massenspek-trometrie	19
141 putative MAP-Kinase-Substrate identifiziert, darunter 32 putative Substrate der MAP-Kinasen MPK3 und/oder MPK6	20
Metabolische ^{15}N -Markierung in Verbindung mit Graphit-basierter Entsalzung identifiziert weitere putative MAP-Kinase-Substrate ...	28

36 putative Substrate der MPK3 und/oder MPK6 identifiziert	29
Eine Mutante ermöglicht die Identifizierung von Proteinen, die spezifisch von MPK3 phosphoryliert werden	38
Behandlung mit Salicylsäure führt zu erhöhter Abundanz einiger Phosphopeptide	38
Bestimmte putative Substrate von MPK3 und/oder MPK6 werden nur nach vorherigem Priming detektiert.....	49
Diskussion	55
Tandem-MOAC ermöglicht die Identifizierung putativer MAP-Kinase-Substrate	55
Bekannte MAP-Kinase-Substrate	56
Putative neue MPK3 / MPK6-Substrate.....	57
Genaue Quantifizierung von MAP-Kinase-Substraten mittels metabolischer Markierung.....	58
Putative geprimte MPK3/MPK6-Substrate	60
Putative geprimte Substrate, die mindestens von MPK3 phosphoryliert werden.....	62
Material und Methoden	63
Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen.....	63
Wachstumsmedien.....	63
Oberflächensterilisierung von Samen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
Behandlung mit Salicylsäure	64
Induktion der Expression der <i>NtMEK2^{DD}</i>	64
Gesamtproteinextraktion	65
Kolorimetrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	66
Anreicherung von Zellkernen	66
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran („Western Blotting“).....	68

Immunodetektion.....	69
Al(OH) ₃ -Metalloxid/-hydroxid-Affinitätschromatographie (Al(OH) ₃ -MOAC) zur Phosphoproteinanreicherung	69
Verdau mit Trypsin	71
Entsalzung.....	71
mit C18 Chromatographie	71
mit Graphit	71
Phosphopeptidanreicherung durch TiO ₂ -MOAC	72
Nano-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)	72
markierungsfrei.....	72
metabolisch ¹⁵ N-markiert	73
Peptididentifizierung	75
markierungsfrei.....	75
metabolisch ¹⁵ N-markiert	76
Bestimmung der Markierungseffizienz	77
RNA-Extraktion	78
cDNA-Synthese.....	78
Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	79
Referenzen	81
Anhang	92
Danksagung	145
Curriculum Vitae	147
Veröffentlichungen	149

Zusammenfassung

Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) sind Signaltransduktionskomponenten, die in Eukaryoten konserviert sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Wachstum und Entwicklung, aber auch bei der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress. Sie sind Bestandteil eines molekularen Mechanismus des salicylsäureabhängigen „Primings“ von Abwehrreaktionen und sind an der Umsetzung extrazellulärer Signale in zelluläre Reaktionen beteiligt. Der entscheidende Schritt dieser Umsetzung, nämlich von der Signalweiterleitung hin zur Reaktion, wird jedoch von den Substraten der MAP-Kinasen ausgeführt. Im Gegensatz zum Wissensstand in tierischen Systemen sind nur wenige MAP-Kinase-Substrate in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden solche Substrate phosphospezifisch angereichert und durch Massenspektrometrie identifiziert, sowie die phosphorylierte(n) Aminosäure(n) bestimmt. Durch quantitative Analysen konnten bislang unbekannte putative MAP-Kinase-Substrate der durch Stress aktivierbaren MAP-Kinasen MPK3 und/oder MPK6 bestimmt werden. Experimente mit Induktion des „Primings“ der Abwehrreaktionen durch Salicylsäure und Mutantenanalysen ermöglichten die Bestimmung putativer MAP-Kinase-Substrate, die in den „Priming“-Prozess involviert sein könnten und zur Identifikation von putativen MAP-Kinase-Substraten, die spezifisch, aber nicht zwingend ausschließlich von MPK3 phosphoryliert werden.

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAP-kinases) are signal transduction components that are conserved in eukaryotes. They play important roles in growth and development as well as in defense against biotic and abiotic stress. They are part of a molecular mechanism of salicylic acid-dependent priming of defense responses. MAP-kinases transduce extracellular signals into cellular responses. The key step which actually turns the signal transduction into a response is performed by the substrates of the MAP-kinases. In contrast to the animal field only few MAP-Kinase substrates are known in the model plant *Arabidopsis thaliana*. In this work substrates of MAP-kinases were phosphor-specifically enriched by Tandem metal oxide / hydroxide affinity chromatography (Tandem-MOAC) and identified by mass spectrometry. The phosphorylated amino acids were determined in Tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments. Quantitative analysis enabled the identification of novel putative substrates of the stress-responsive MAP-kinases MPK3 and/or MPK6. Induction of defense priming by treatment with salicylic acid allowed for the identification of putative MAP-kinase substrates involved in the priming process. Analysis of a loss-of-function mutant facilitated recording of putative substrates that are phosphorylated specifically but not necessarily exclusively by MPK3.

Abkürzungsverzeichnis

ACS	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure-Synthase
ADP	Adenosindiphosphat
AGC	Automatic gain control
APS	Ammoniumpersulfat
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
C18	Alkan mit 18 Kohlenstoffatomen
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CDC48	Cell division cycle 48
cDNA	komplementäre DNA
CERK1	Chitin elicitor receptor kinase 1
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat
CID	Collision induced dissociation
CMT3	Chromomethylase 3
Col-0	Akzession Columbia-0
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA verdauendes Enzym
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DRM	Dormancy-associated protein
DTT	Dithiothreitol
E _{595nm}	Extinktion bei 595 nm Wellenlänge
EDS1	Enhanced disease susceptibility 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFR	EF-Tu Receptor
EIN3	Ethylene insensitive 3
elf18	konserviertes 18-Aminosäuren-Peptid aus dem bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu
ERF	Ethylene response factor

Abkürzungsverzeichnis

ERK	Extracellular regulated kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETI	Effector-triggered immunity
ETS	Effector-triggered susceptibility
FDR	False discovery rate
FLAG	zur Markierung an ein Protein klonierte Sequenz DYKDDDK
flg22	konserviertes 22-Aminosäuren-Peptid aus bakteriellem Flagellin
FLS2	Flagellin-sensitive 2
GVG	chimärischer Transkriptionsfaktor bestehend aus der DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4, der <i>trans</i> -aktivierenden Domäne aus dem Herpesvirusprotein VP16 und der Rezeptordomäne des Glucocorticoidrezeptors GR aus der Ratte
HD2B	Histone deacetylase 2B
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ISR	Induced systemic resistance
JA	Jasmonsäure
LC	Flüssigchromatographie
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LRR	Leucine-rich repeat
LTQ	linearer Triple-Quadrupol
m	Masse
MAMP	microbe-associated molecular pattern
MAP65-1	Microtubule-associated protein 65-1
MAPK	MAP-Kinase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MKK	MAPK Kinase
MKP1	MAP-Kinase phosphatase 1
MKS1	MAP-Kinase 4 substrate 1

Abkürzungsverzeichnis

MMLV-RT	Reverse Transkriptase des Moloney Murinen Leukämievirus'
MOAC	Metalloxid/-hydroxid Affinitätschromatographie
MPK	MAP-Kinase
MQ	Max-Quant Version 1.2.2.5.
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS-Medium	Pflanzenanzuchtsmedium nach Murashige und Skoog
NDR1	Non-race specific disease resistance 1
NIA2	Nitrate reductase 2
NOT2/3/5	Familie von Transkriptionsfaktoren
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
N-terminal	aminoterminal
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PD	Proteome Discoverer Version 1.3
PDF1.2	Plant defensin 1.2
PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria
PIRL9	Plant intracellular Ras group-related LRR 9
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPE	phenolischer Proteinextrakt
pPSM	Phosphopeptide spectrum match
PR1	Pathogenesis-related 1
PSM	Peptide spectrum match
PTEN2	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten 2
PTI	PAMP-triggered immunity
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
R-Gen	Resistenz-Gen
RIN4	RPM1-interacting protein 4
RNA	Ribonukleinsäure
RPM1	Resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Maculicola</i> 1
R-Protein	Resistenz-Protein
RPS2	Resistant to <i>Pseudomonas syringae</i> 2
SA	Salicylsäure

Abkürzungsverzeichnis

SAR	Systemic acquired resistance
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPCH	Speechless
SR1 / CAMTA3	Signal-responsive 1 / Calmodulin-binding transcription activator 3
TBS	Tris buffered saline
TBST	TBS + 0.1 % (v/v) Tween-20
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFIIB	Transcription factor IIB
TMV	Tobacco mosaic virus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV-B	ultraviolette Strahlung mit Wellenlängen zwischen 315 und 280 nm
VQ/MVQ	VQ motif-containing protein / MPK3/6-targeted VQP
WRKY	namengebende Aminosäuresequenz einer Familie von Transkriptionsfaktoren
z	Ladung
Zk	Zellkerne

Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren:

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin

Abkürzungsverzeichnis

M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin

Einleitung

Pflanzen verfügen über verschiedene Arten der Interaktion mit Krankheitserregern

Pflanzen können von verschiedenen Krankheitserregern befallen werden. Zu ihnen gehören Bakterien, Viren, Pilze und Oomyceten. Im Laufe der Evolution haben die Pflanzen Abwehrmechanismen entwickelt, die ihre Resistenz gegen die Erreger erhöhen. Man unterscheidet zwei Formen der Resistenz: Resistenz, die durch sogenannte *Pathogen/Microbe associated molecular patterns* (PAMPs/MAMPs) ausgelöst wird und Resistenz, die durch Effektorproteine ausgelöst wird. Die erste Form wird aus dem Englischen *PAMP-triggered immunity* auch PTI abgekürzt, die zweite Form, abgeleitet vom Englischen *Effector-triggered immunity*, mit ETI. Bei der PTI nimmt die Pflanze die Anwesenheit potenzieller Krankheitserreger durch die Erkennung allgemeiner Merkmale dieser Mikroorganismen (MAMPs) wahr. Bei diesen MAMPs handelt es sich um für die Mikroben essentielle Moleküle bzw. Teile davon, die unter den verschiedenen Mikroben entsprechend stark konserviert sind. Zu den am besten erforschten MAMPs gehören flg22, elf18 und Chitin. Flg22 ist ein 22 Aminosäuren langes Polypeptid aus bakteriellem Flagellin. Dieses bioaktive Peptid wird von der *Leucine rich repeat*-(LRR)-Rezeptorkinase „Flagellin-sensitive“ 2 (FLS2) gebunden (Gómez-Gómez and Boller, 2000) und startet eine Signalkaskade, die die Aktivierung des MAP-Kinase-Moduls MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 einschließt (Gao et al., 2008). Elf18 ist ein Peptid aus dem bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu. Es wird von der LRR-Rezeptorkinase „EF-Tu Receptor“ (EFR) erkannt und löst die Aktivierung der gleichen MAP-Kinasen aus wie flg22 (Zipfel et al., 2006). Chitin wird von dem Rezeptor „Chitin Elicitor Receptor Kinase“ 1 (CERK1) erkannt und triggert ebenfalls eine Abwehrreaktion, an deren Signalweiterleitung die MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 beteiligt sind (Miya et al., 2007). Die Wahrnehmung dieser MAMPs löst eine Abwehrreaktion aus, die häufig ausreicht, um potentielle Krankheitserreger abzuwehren. Um

die PTI zu überwinden, haben einige Mikroorganismen sogenannte Effektorproteine entwickelt. Diese tragen als Virulenzfaktoren dazu bei, die PTI zu unterdrücken. Gelingt dies, so spricht man von *Effector-triggered susceptibility* (ETS). In diesem Fall kommt es zu einer kompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Krankheitserreger, zur Ausbreitung des Erregers, zur Ausbildung von Krankheitssymptomen und zur Vermehrung des Pathogens. Als Reaktion auf die ETS hat die Pflanze im Laufe der Evolution Resistenz-(R)-Gene entwickelt, deren Genprodukte als R-Proteine die Anwesenheit oder die Wirkung von Effektorproteinen wahrnehmen. „RPM1-interacting Protein“ 4 (RIN4) ist ein Protein, das sogar von zwei R-Proteinen, nämlich „Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*“ 1 (RPM1) und „Resistant to *Pseudomonas syringae*“ 2 (RPS2) kontrolliert wird. Wird RIN4 durch einen Effektor manipuliert, so wird diese Veränderung von RPM1 oder RPS2 wahrgenommen und die Abwehrreaktion eingeleitet. Die Typ-drei-Effektoren AvrRpm1, AvrB und AvrRpt2 aus *Pseudomonas syringae* haben das RIN4-Protein zum Ziel, ohne dass diese Effektorproteine Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Die von AvrB und AvrRpm1 bewirkte Phosphorylierung von RIN4 wird durch RPM1 wahrgenommen, was eine Abwehrreaktion auslöst (Mackey et al., 2002). RPS2 überwacht hingegen die Anwesenheit von RIN4. Wird RIN4 von der Cysteinprotease AvrRpt2 gespalten, so aktiviert RPS2 die Abwehrreaktion. Fehlt RIN4 durch T-DNA-Insertion in das entsprechende Gen, so ist dies für die Pflanzen schon als Keimling letal. In der Doppelmutante *rin4/rps2* ist dieser Phänotyp aufgehoben und die Pflanzen sind lebensfähig (Axtell and Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2003). Dies weist darauf hin, dass die Abwesenheit von RIN4 zu einer Abwehrreaktion durch RPS2 führt. Die Spaltungsprodukte der Reaktion von AvrRpt2 mit RIN4 unterdrücken offenbar sowohl die PTI, als auch die RPM1-gesteuerte ETI in Zusammenarbeit mit „Non-race specific Disease Resistance“ 1 (NDR1) (Kim et al., 2005; Afzal et al., 2011). Die Expression des Gens für *NDR1* wird – zusammen mit der des Abwehrgens „*Enhanced Disease Susceptibility*“ 1 (*EDS1*) und der des Gens für das MAP-Kinase-Substrat „Ethylene insensitive“ 3 (*EIN3*) – durch den Calmodulin-bindenden Transkriptionsfaktor „Signal-responsive“ 1 (*SR1*, synonym *CAMTA3*) reguliert (Du et al., 2009; Nie et al., 2012).

Nachdem der Erreger die ersten Abwehrreaktionen unterdrückt oder überstanden hat, erfolgt auf eine solche Wahrnehmung eines Effektorproteins oder seiner Wirkung durch ein R-Protein eine erneute Auslösung von Abwehrreaktionen, möglicherweise stärker als bei der PTI (Tao et al., 2003). Die Pflanzen bilden in diesem Fall eine ETI aus und sind resistent gegen die entsprechenden Krankheitserreger. Diese Form der Gen-für-Gen-Resistenz ist sehr spezifisch, da sie nur dann zur Resistenz führt, wenn das Effektorprotein des Erregers und ein entsprechendes Resistenzprotein der Pflanze zusammenkommen (Jones and Dangl, 2006). PTI und ETI sind Abwehrmechanismen, die lokal an der Stelle des Befalls in den entsprechenden betroffenen Zellen der Pflanze auftreten. Zusätzlich haben Pflanzen auch Abwehrmechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, die gesamte Pflanze gewissermaßen in „Alarmbereitschaft“ zu versetzen. Diese „Alarmbereitschaft“ führt zu einer langanhaltenden Breitspektrum-Resistenz. Wird diese „Alarmbereitschaft“ nach einem Erstbefall mit einem Krankheitserreger etabliert, wird dieses Phänomen *Systemic acquired resistance* (SAR) genannt. Zusätzlich können Pflanzen auch durch die Kolonisierung der Wurzeloberflächen mit sogenannten *Plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR) resistenter gegen Krankheitserreger werden. Bei den PGPR handelt es sich um Bakterien, die die Rhizosphäre der Pflanzen besiedeln und das Pflanzenwachstum fördern. Sie verringern das Wachstum anderer (potentiell pathogener) Mikroorganismen in der Rhizosphäre und tragen so auch zu einem verminderten Befallsdruck durch Krankheitserreger auf die Pflanze bei. Im Gegenzug erhalten sie in einer symbiotischen Beziehung Nährstoffe aus Wurzelexsudaten der Pflanze. Werden Pflanzen durch PGPRs resistenter gegen Krankheitserreger, so spricht man von Induzierter Systemischer Resistenz (ISR). Die SAR benötigt eine Akkumulation von Salicylsäure (SA von engl. *salicylic acid*), die ISR wird meist durch einen SA-unabhängigen Signalweg etabliert (van Loon et al., 1998; Wildermuth et al., 2001). Die SAR kann auch durch die Behandlung von Pflanzen mit Salicylsäure induziert werden, ohne dass die Pflanzen mit Pathogenen in Kontakt kommen (White, 1979). Wenn eine Pflanze ein Pathogen durch die Bindung eines MAMPs an ein Rezeptorprotein oder durch die Erkennung eines Effektorproteins

durch ein R-Protein wahrnimmt, wird eine Signaltransduktion gestartet, welche die Auslösung einer Abwehrreaktion bewirkt. Einen möglichen Signaltransduktionsweg stellen sogenannte Mitogen-aktivierte Protein-Kinase- (MAP-Kinase)-Kaskaden dar.

MAP-Kinase-Kaskaden sind konservierte Signaltransduktionswege

MAP-Kinase-Kaskaden sind Signaltransduktionswege, die in allen darauf hin untersuchten Eukaryoten vorhanden sind (Herskowitz, 1995). Durch die Wahrnehmung eines extrazellulären Stimulus werden MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MEKKs) aktiviert. Die aktiven MEKKs phosphorylieren MAP-Kinase-Kinasen (MKKs) in der Aktivierungsschleife an zwei Serin- (S) oder Threoninresten (T), die durch fünf beliebige Aminosäuren (X) getrennt sind (S/T-X₅-S/T) (Ichimura et al., 2002). Die durch diese Phosphorylierung aktivierten MKKs phosphorylieren MAP-Kinasen (MPKs) in der Aktivierungsschleife an einem Threonin- und einem Tyrosinrest (Y), die durch eine beliebige Aminosäure getrennt sind (TXY) (Ichimura et al., 2002). Als Prolin-gerichtete Serin-/Threonin-Kinasen phosphorylieren die aktivierten MAP-Kinasen weitere Proteine an Serin- oder Threoninresten, auf die C-terminal ein Prolinrest (P) folgt (S/T-P). Dieses Dipeptid stellt die minimale Konsensus-Sequenz (*low-stringency motif*) für die Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase dar. Geht der phosphorylierten Aminosäure ein weiterer Prolinrest im Abstand von zwei Aminosäureresten N-terminal voraus (PX-S/T-P), so wird dies als erweiterte Konsensus-Sequenz (*high-stringency motif*) bezeichnet (Alvarez et al., 1991) (Abbildung 1 A). Versuche mit der humanen, sogenannten „Extracellular regulated kinase“ (ERK) 1 bzw. ERK2 haben gezeigt, dass der Austausch des N-terminalen Prolins durch Alanin die Höchstgeschwindigkeit der Phosphorylierung eines synthetischen Substratpeptids stark senkt; noch stärker ist dieser Effekt jedoch beim Austausch des C-terminalen Prolins durch Alanin (Gonzalez et al., 1991). Die Phosphorylierung des Substrats vermittelt dann die entsprechende zelluläre Reaktion, z.B. eine Veränderung bei der Genexpression. Dabei kann die Phosphorylierung verschiedene

Auswirkungen auf das Substrat haben; zum Beispiel kann sie eine Stabilisierung des Proteins (Joo et al., 2008) oder eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation bewirken, z.B. den Transport von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern (Djamei et al., 2007).

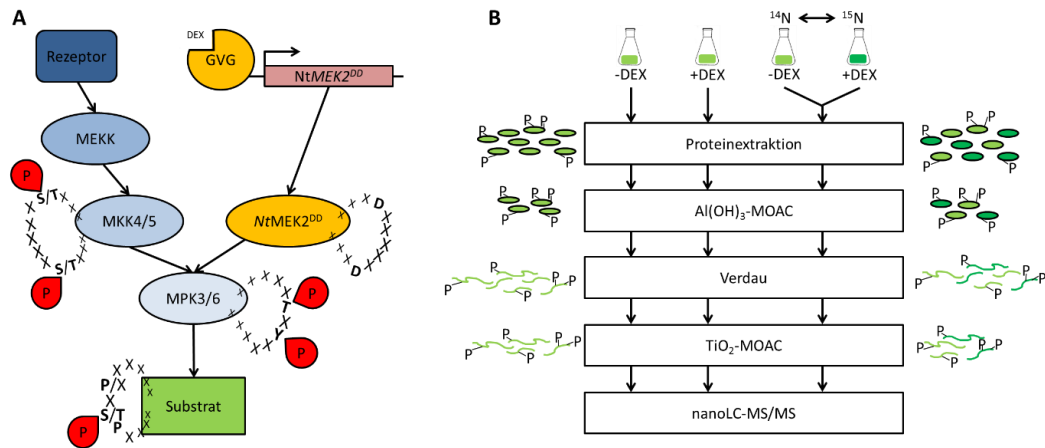


Abbildung 1: **A** Schematische Darstellung einer MAP-Kinase-Kaskade, die zur Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3 und/oder MPK6 in *Arabidopsis thaliana* führt. Modell der Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 in transgenen Pflanzen durch NtMEK2^{DD} nach Zugabe von Dexamethason (DEX). **B** Schematische Darstellung des Prinzips der Tandem-MOAC-Methode. Pflanzen werden entweder markierungsfrei oder mit metabolischer ¹⁵N-Markierung in flüssigem Murashige&Skoog (MS)-Medium angezogen. Nach der Behandlung werden die ganzen Pflanzen geerntet. In markierungsfreien Experimenten werden die unterschiedlich behandelten Pflanzen getrennt der Tandem-MOAC zugeführt. Bei metabolischer Markierung mit ¹⁵N wird das pflanzliche Material vor der Proteinextraktion gemischt.

MAP-Kinasen spielen bei der Pathogenabwehr und beim „Priming“ von Abwehrreaktionen eine Rolle

In *Arabidopsis thaliana* (im Folgenden *Arabidopsis* genannt) sind MAP-Kinasen für Wachstum und Entwicklung (Bergmann et al., 2004; Wang et al., 2007; Cho et al., 2008; Lampard et al., 2008), Pathogenabwehr (Asai et al., 2002; Andreasson et al., 2005; Mészáros et al., 2006; Qiu et al., 2008; Xu et al., 2008; Beckers et al., 2009) und Toleranz gegenüber abiotischem Stress (Mizoguchi et al., 1996; Ichimura et al., 2000; Yuasa et al., 2001; Droillard et al., 2002, 2004; Teige et al., 2004; Ahlfors et al., 2004) wichtig. Drei MAP-Kinasen sind besonders gut erforscht: die MPK4, die MPK3 und die MPK6. Die

MPK4 scheint in einer Signaltransduktionskaskade mit MKK1/MKK2 und MEKK1 organisiert zu sein (Gao et al., 2008). Sie ist sowohl an der Regulation der R-Protein-vermittelten Pathogenabwehr (Zhang et al., 2012), als auch an der Regulation des Jasmonsäure- (JA)-Signalweges beteiligt (Petersen et al., 2000). MPK3 und MPK6 werden von MKK4/MKK5 phosphoryliert (Asai et al., 2002; Wang et al., 2007). Diese zwei MAP-Kinasen wurden im Zusammenhang mit vielen Abwehrprozessen beschrieben (Ren et al., 2008; Han et al., 2010; González Besteiro et al., 2011; Mao et al., 2011). MPK4 gilt als negativer Regulator der SAR (Petersen et al., 2000), wogegen MPK3 und MPK6 zur SAR beitragen (Beckers et al., 2009).

Ein molekularer Mechanismus der SAR ist das sogenannte „Priming“ der pflanzlichen Abwehrreaktionen (Jung et al., 2009; Beckers et al., 2009; Kohler et al., 2002). Beim „Priming“ werden Zellen durch einen primären Stimulus (z.B. eine lokale Infektion mit einem Pathogen) in einen physiologischen Zustand versetzt, der es ihnen ermöglicht, auf einen Folgestimulus (z.B. einen nachfolgenden Befall) schneller und stärker zu reagieren. Dies führt oft zur Resistenz gegen den Stress (z.B. Pathogen). Das „Priming“ tritt nicht nur bei den Zellen in der Nähe des Erstbefalls auf, sondern auch in den systemischen Geweben. Der molekulare Mechanismus, der dem „Priming“ zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach einer Erstinfektion kommt es unter anderem zu einer Akkumulation von Salicylsäure. Die Salicylsäure-Akkumulation induziert die Expression von antimikrobiellen Abwehrgenen, z.B. dem *Pathogenesis-related (PR)* Protein 1, primt die Pflanze aber auch für eine verstärkte Aktivierung von Abwehrreaktionen bei einem Folgereiz. Durch eine Behandlung der Pflanze mit Salicylsäure können diese Effekte auch künstlich hervorgerufen werden. Im Verlauf des „Primings“ akkumulieren u.a. die MPK3 und die MPK6 in den Pflanzenzellen, jedoch in nicht phosphoryliertem, d.h. inaktivem Zustand (Abbildung 2). Bei einem Folgestimulus werden diese MAP-Kinasen schneller und stärker aktiviert, was zu einer verstärkten Abwehrreaktion führt (Beckers et al., 2009).

Zusätzlich zur Akkumulation von Signaltransduktionskomponenten spielen auch epigenetische Aspekte beim „Priming“ vermutlich eine

Rolle. Der Zustand des Chromatins hat auf die Genexpression und auf deren Vorbereitung einen entscheidenden Einfluss. Kovalente Modifikationen der Histone wie z.B. die Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung und die Poly-ADP-Ribosylierung spielen wichtige Rollen bei der Regulation der Genexpression. Die Acetylierung der N-terminalen Domänen von Histon H3 und Histon H4 beispielsweise wird mit einem Zustand des Chromatins in Verbindung gebracht, der Genexpression zulässt (Eberhardter and Becker, 2002). Im Verlauf des „Primings“ von Abwehrgenen kommt es an den Promotoren der Gene für die WRKY-Transkriptionsfaktoren *WRKY6*, *WRKY29* und *WRKY53* zu Acetylierungen und Methylierungen, ohne dass diese Gene transkribiert werden (Abbildung 2). Erst nach einem Folgestimulus kommt es zu einer Aktivierung der Gen-Expression, die in „geprimten“ und danach stimulierten Pflanzen schneller und/oder stärker erfolgt, als dies in „ungeprimten“ Pflanzen der Fall ist (Jaskiewicz et al., 2011). *Arabidopsis*-Pflanzen, die erfolgreich einen Befall durch Krankheitserreger abwehren konnten, bringen Nachkommen hervor, die für SA-abhängige Genexpression „geprimt“ sind, wogegen die JA-abhängige Genexpression weniger leicht zu induzieren ist (Luna et al., 2012). Dieser vererbte geprimte Zustand wurde „*Next Generation SAR*“ genannt und geht einher mit verstärkter Acetylierung von Lysin 9 in Histon H3 (H3K9Ac) in den Promotoren der auf SA reagierenden Abwehrgene *PR1*, *WRKY6* und *WRKY53* (Luna et al., 2012). Andererseits wurde im Promotor des auf JA reagierenden Gens *PDF1.2* eine verstärkte Trimethylierung von Lysin 27 in Histon H3 (H3K27me3) festgestellt. Diese Histon-Modifikation wird mit Genen in Verbindung gebracht, die nicht transkribiert werden (Zhang et al., 2007). Die *drm1drm2cmt3*-Dreifachmutante, bei der die Methylierung von nicht-CpG-Motiven in der DNA beeinträchtigt ist, zeigt einen Phänotyp, der dem der „*Next Generation SAR*“ gleicht. Da bei einem Befall mit *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* eine Hypomethylierung solcher DNA-Motive auftritt (Pavet et al., 2006), stellten die Autoren die Hypothese auf, dass die epigenetische Vererbung der SAR durch hypomethylierte Gene vermittelt wird, die in der nächsten Generation ein „Priming“ von SA-abhängigen Genen bewirkt (Luna et al., 2012).

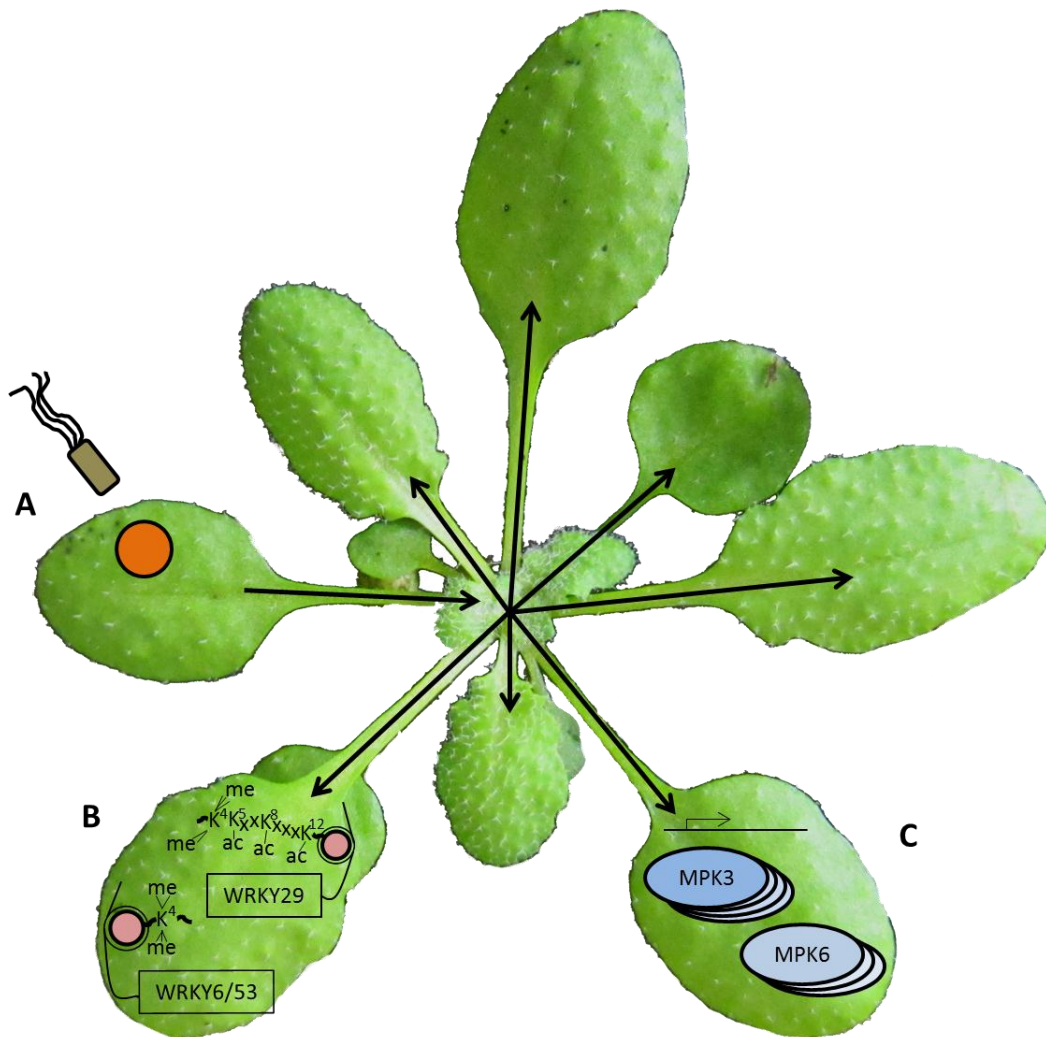


Abbildung 2: Schematische Darstellung von molekularen Mechanismen des „Primings“ bei der SAR. Das mit **A** bezeichnete Blatt wurde mit einem nekrotisierenden Pathogen inokuliert. Daraufhin werden vermutlich ein oder mehrere Signale erzeugt, die sich systemisch durch die Pflanze verteilen. In den systemischen Geweben kommt es zu posttranslationalen Modifikationen der Histone an den Promotoren von Abwergenen (z.B. an *WRKY6*, *WRKY29* und *WRKY53*). Die Di- und Trimethylierung von Lysin K4 an Histon H3 nimmt zu, bei *WRKY29* zusätzlich die Acetylierung der Lysinreste K5, K8 und K12 (hier beispielhaft in Blatt **B** dargestellt). Dennoch werden diese Gene ohne einen weiteren Reiz nicht aktiviert. Die MPK3 und die MPK6 akkumulieren im systemischen Gewebe (schematisch dargestellt in Blatt **C**), jedoch zunächst in inaktivem Zustand. Die Pflanzenzellen sind in diesem „geprimten“ Zustand aufgrund dieser und vermutlich weiterer, derzeit noch unbekannter Ereignisse, in der Lage, ihre Abwehrreaktionen bei einem Folgebefall schneller und stärker zu aktivieren und eine Resistenz gegen Schadorganismen aufzubauen.

Die Substrate der MAP-Kinasen waren weitgehend unbekannt

Trotz der wichtigen Rolle von MPKs bei der zellulären Signalumsetzung sind ihre Substrate weitgehend unbekannt. Zwar haben einige Studien zur Bestimmung von MPK-Interaktionspartnern im Mittel- bis Hochdurchsatzverfahren Protein-Microarrays verwendet (Feilner et al., 2005; Popescu et al., 2009), bei solchen Experimenten *in vitro* stellt sich jedoch immer die Frage der biologischen Relevanz. Nur wenige Substrate sind durch Daten bestätigt, die *in vivo* gewonnen wurden. Diese *bona fide* MAP-Kinase-Substrate sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der bekannten MAP-Kinase-Substrate in *Arabidopsis*. Aufgeführt sind die MAP-Kinase-Substrate, die durch *in vivo*-Daten identifiziert wurden.

Name	Referenz
1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid Synthase 2 bzw. 6 (ACS2/6)	(Liu and Zhang, 2004; Han et al., 2010)
Speechless (SPCH)	(Lampard et al., 2008)
PHOS32	(Merkouropoulos et al., 2008)
Ethylene-insensitive 3 (EIN3)	(Yoo et al., 2008)
Ethylene Response Factor 104 (ERF104)	(Bethke et al., 2009)
Nitrate reductase 2 (NIA2)	(Wang et al., 2010)
MAP-Kinase Phosphatase 1 (MKP1)	(Park et al., 2011)
WRKY33	(Mao et al., 2011)
Ethylene Response Factor 6 (ERF6)	(Meng et al., 2013)

Überwiegend zählen Transkriptionsfaktoren und Enzyme zu den bekannten MPK-Substraten. Da sowohl das *low-stringency motif* als auch das *high-stringency motif* für eine Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase sehr kurz ist, identifiziert eine *in silico*-Sequenzsuche im Proteom von *Arabidopsis* sehr viele potenzielle Kandidaten für MAP-Kinase-Substrate. So gibt es im Proteom von *Arabidopsis* 28867 Sequenzen, die das *low-stringency motif* von MPK-Substraten enthalten (das entspricht ca. 81,6 % aller durchsuchten Sequenzen). Von diesen beinhalten wiederum 6135 Sequenzen das *high stringency motif*, was ca. 17,3 % aller durchsuchten Sequenzen entspricht (Suche mit Patmatch auf <http://www.arabidopsis.org>). Da ein *low-stringency*

motif für eine Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase ausreichen kann, umfasst die Zahl der theoretisch möglichen MAP-Kinase-Substrate in *Arabidopsis* 28867 theoretische Genprodukte. Diese Zahl ist zu groß, um eine Liste von möglichen MPK-Substraten weit genug einzugrenzen. Hinzu kommt, dass es aus solchen *in silico*-Analysen keine Hinweise darauf gibt, ob diese Proteine tatsächlich *in vivo* vorkommen. Ebenso geben diese Daten keinen Aufschluss darüber, ob die Proteine *in vivo* phosphoryliert werden.

„Shotgun“-Proteomik erleichtert die Suche nach möglichen MAP-Kinase-Substraten

Das Forschungsgebiet der Proteomik beschäftigt sich mit der Erforschung möglichst aller Proteine auf allen Ebenen der Organisation, von der Zelle bis zum Organismus. Mit einem Massenspektrometer ist es möglich, Informationen über viele Proteine einer Zelle oder eines Organismus in einem einzigen Messvorgang zu erhalten. Massenspektrometer manipulieren elektrisch geladene Teilchen in einem Vakuum durch elektrische Felder derart, dass Informationen über das Verhältnis von Masse (m) zu Ladung (z) (der sog. m/z -Wert) dieser Teilchen erhalten werden. Da intakte Proteine nur sehr schwer in die Gasphase gebracht werden können, ist es üblich, sie vorher zu Peptiden zu verdauen. Dazu werden Rohextrakte der Proteine mit Sequenz-spezifischen Proteasen (meist Trypsin) behandelt. Die erhaltenen Peptide können danach durch verschiedene Verfahren ionisiert und in die Gasphase überführt werden, z.B. durch Elektrospray-Ionisation (ESI) (Fenn et al., 1989). Bei dieser Ionisierungsmethode wird die Peptidlösung bei hoher Temperatur durch eine sehr feine Kapillare in die Vakuumkammer eines Massenspektrometers injiziert. Die dabei entstehenden sehr feinen Tröpfchen zerfallen aufgrund elektrostatischer Effekte in noch kleinere Tröpfchen, bis schließlich einzelne Pseudo-Molekülonen vorliegen, die in elektrischen Feldern beschleunigt und selektiert werden. Die selektierten Ionen werden schließlich in einer Orbitrap-Ionenfalle gesammelt. Aufgrund ihrer Wechselwirkung mit den komplexen elektrischen Feldern können ihre m/z -Werte berechnet werden (Hu et al., 2005). Weitere Informationen über die selektierten

Ionen lassen sich durch sogenannte MS/MS-Experimente gewinnen. Dabei werden ausgesuchte Ionen (jetzt Vorläuferionen, engl. *precursor ions* genannt) zu einem weiteren Zerfall angeregt, z.B. durch kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. *collision induced dissociation*, CID). Bei diesem Verfahren werden die Vorläuferionen mit einem Inertgas zur Kollision gebracht. Dies hat ein Brechen von Peptidbindungen zur Folge. Es entstehen die Ionen der a-, b-, c-Reihe und der x-, y-, z-Reihe. Dabei entsprechen a und z, b und y, c und x, usw. jeweils Ionenpaaren, die entstehen, wenn die erste, zweite, dritte, usw. Peptidbindung bricht. Aus diesen Fraktionierungsmustern können Rückschlüsse auf die genaue Position einer post-translationalen Modifikation (z.B. einer Phosphorylierung) gezogen werden (Hunt et al., 1986). Um möglichst viele Peptide mit dem Massenspektrometer zu erfassen, ist es möglich, der eigentlichen Messung eine Auftrennung durch eine Flüssigchromatographie (engl. *liquid chromatography*, LC) voranzustellen. Heute werden dazu Systeme verwendet, bei denen die Flussgeschwindigkeit der Chromatographie im Bereich von Nanolitern pro Minute liegt (nanoLC) und bei denen die chromatographisch getrennten Proben direkt in die Ionenquelle eingespeist werden (Oosterkamp et al., 1998). Solche Systeme der nanoLC-MS/MS wurden auch in dieser Arbeit in einer Kooperation mit Dr. Wolfgang Hoehenwarter (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle / Saale) verwendet. Die Informationen aus den Spektren - insbesondere die m/z-Werte - werden verwendet, um die Peptide zu identifizieren. Dazu werden sie mit Datenbanken abgeglichen, in denen sich die theoretischen m/z-Werte aller durch Trypsin-Verdau erhältlichen Peptide des Proteoms eines Organismus befinden (Pappin et al., 1993; Gras et al., 1999). Für *Arabidopsis* wird eine solche Datenbank erstellt, indem alle Gene des Genoms *in silico* translatiert und die Produkte virtuell mit Trypsin verdaut werden. Ein solcher virtueller Verdau wird dadurch vereinfacht, dass Trypsin die Peptidbindungen sequenzspezifisch nach einem Lysin (K) oder Arginin (R) spaltet. Dem Programm zur Auswertung wird erlaubt, verschiedene Modifikationen von Peptiden, wie z.B. die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin, oder die Oxidation von Methionin (M) einzubeziehen. Wenn man zusätzlich davon ausgeht, dass bei der Spaltung der Proteine in Peptide

möglicherweise eine oder mehrere der Spaltungsstellen nicht gespalten wurden, so wird die Identifizierung der analysierten Peptide beliebig komplex und - damit verbunden - weniger eindeutig. Es ist daher wichtig, die Anzahl der Modifikationen und der nicht erfolgten Spaltungen auf einem geringen Ausmaß zu halten.

Um unvoreingenommen Daten über möglichst viele Proteine einer Probe zu erhalten, wird sogenannte „Shotgun“-Proteomik angewendet. Mit ihr werden Peptide ohne besondere Voreinstellungen untersucht, deren Zugehörigkeit zu bestimmten Proteinen erst nach der Messung ermittelt wird. Im Gegensatz dazu stehen Methoden, bei denen mit dem Massenspektrometer gezielt bestimmte Peptide aus einer Probe zur Analyse ausgewählt werden und Methoden, bei denen intakte Proteine massenspektrometrisch erfasst werden. Eine große Schwierigkeit bei Proteomik-Experimenten ist der gewaltige dynamische Bereich der Proteinabundanz. Für die Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden absolute Zahlen für viele cytosolische Proteine ermittelt; sie reichen von weniger als 50 bis zu mehr als 10^6 pro Zelle (Ghaemmaghami et al., 2003). Dieser dynamische Bereich überschreitet den Messbereich eines Massenspektrometers, der bei ≥ 5000 liegt (Makarov et al., 2006). Um die Komplexität der Probe zu verringern ist es daher üblich, Vorfraktionierungen durchzuführen. Mit einer spezifischen Affinitätschromatographie, die auf der Affinität zur Phosphorylgruppe von Phosphoproteinen bzw. Phosphopeptiden beruht, ist es möglich, den Anteil phosphorylierter Proteine bzw. Peptide in der Probe zu erhöhen. Proteine mit einer sehr hohen Anreicherung werden dadurch teilweise aus der Probe entfernt und der dynamische Bereich wird verkleinert. Durch die Etablierung einer doppelten Anreicherung von Phosphoproteinen bzw. Phosphopeptiden durch Metalloxid / Metallhydroxid-Affinitätschromatographie (Tandem-MOAC, Abbildung 1) (Hoehenwarter et al., 2013) konnte in dieser Studie die Phosphorylierung vieler Proteine mit niedriger Abundanz nachgewiesen werden.

Die metabolische Markierung mit ^{15}N erhöht die Genauigkeit der relativen Quantifizierung von Proteinen

Die markierungsfreie „Shotgun“-Proteomik ist eine kostengünstige und schnelle Methode, um mit einem Massenspektrometer Einblicke in die Phosphorylierungsvorgänge in Zellen zu erhalten. Der Nachteil dieser Methode ist ihre ungenaue Quantifizierung. Eine höhere Verlässlichkeit der quantitativen Werte wird durch eine erhöhte Probenzahl erreicht, wobei reproduzierbare Werte belastbarer sind, als kaum oder gar nicht reproduzierbare Werte. Solche quantitativen Unterschiede aufgrund der Aufarbeitung und Handhabung der Proben können vermieden werden, indem die Proteine mit stabilen Isotopen markiert werden. Pflanzen als meist autotrophe Organismen bieten die Möglichkeit, das gesamte Proteom nicht-selektiv mit ^{15}N , einem stabilen schweren Isotop des Stickstoffs zu markieren. Dazu werden die Stickstoffquellen im Nährmedium der Pflanzen, die üblicherweise die natürliche Isotopenverteilung des Stickstoffs aufweisen (^{14}N : 99,634 %, ^{15}N : 0,366 %), durch solche Stickstoffquellen ersetzt, bei denen der Anteil an ^{15}N möglichst hoch (≥ 98 %) ist. Die möglichst vollständige Markierung des Proteoms und der Ersatz möglichst aller ^{14}N -Atome durch ^{15}N -Atome sind dabei wichtig, um eine zuverlässige Identifizierung der Peptide zu gewährleisten. Die so markierten Pflanzenproben können dadurch vor einem frühen Schritt der Probenaufarbeitung gemischt werden, da mit dem Massenspektrometer später zwischen „leichten“ und „schweren“ Peptiden unterschieden werden kann und die Herkunftsproben dieser Peptide nachträglich wieder bestimmt werden können. Über das Verhältnis der Ionenintensitäten solcher Peptidpaare aus „leichten“ und „schweren“ Peptiden erfolgt dann innerhalb einer einzigen Messung eine relative Quantifizierung. Wegen der gemeinsamen Proben-Aufarbeitung entfällt auch die Notwendigkeit eines internen Standards, da die Werte immer auf andere Werte derselben Probe bezogen werden. Bei der Markierung mit ^{15}N zeigt sich ein weiterer Vorteil des Systems, die Pflanzen in Flüssigmedium anzuziehen, da hier eine entsprechende Manipulation des Mediums einfach zu erreichen ist.

In dieser Studie wurde die Methode der „Shotgun“-Proteomik zur Identifizierung möglicher, bislang unbekannter MAP-Kinase-Substrate angewendet. Bei den bekannten MAP-Kinase-Substraten in Säugern handelt es sich überwiegend um Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine (z.B. Proteinkinasen und -phosphatasen) (Yoon and Seger, 2006). Es ist daher naheliegend, dass es sich bei den Substraten der MAP-Kinasen in *Arabidopsis* ebenfalls um solche regulatorischen Proteine handeln könnte. Solche Proteine liegen in nur geringen Mengen in der Zelle vor. Dies erschwert ihre Identifizierung mit einem Massenspektrometer. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der wenig vorliegende Phosphopeptide stark genug angereichert werden, dass sie massenspektrometrisch erfasst werden können. Vor dem Verdau der Proteine wurde ein Schritt nach der MOAC-Methode eingefügt, der Phosphoproteine anreichert. Dieser weitere Schritt beruht auf der Nutzung von Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC) (Wolschin et al., 2005; Röhrig et al., 2008). Mit diesem Verfahren, das Tandem-MOAC genannt wurde, konnten bekannte MAP-Kinase-Substrate nachgewiesen werden (Hoeftenwarter et al., 2013).

Transgene Pflanzen ermöglichen die Aktivierung der MAP-Kinasen in *planta*

Um die Messung quantitativer Unterschiede im Vorhandensein der Phosphopeptide von MAP-Kinase-Substraten zu erleichtern, wurde ein System gewählt, das zu einer starken und dauerhaften Aktivierung von MAP-Kinasen in *Arabidopsis* führt. Es wurden transgene Pflanzen verwendet, die mit einem Gen transformiert worden waren, das für eine konstitutiv aktive MAP-Kinase-Kinase (MEK) kodiert. Das zugrunde liegende DNA-Konstrukt besteht aus dem Gen für die MEK2 aus *Nicotiana tabacum*, bei dem die Codons für die Threonin- bzw. Serinreste im Aktivierungsmotiv T-X₅-S (Yang et al., 2001) so verändert sind, dass sie für Asparaginsäurereste codieren (D-X₅-D). Zusätzlich ist das Protein am N-Terminus mit einem FLAG-tag (Hopp et al., 1988) markiert. Das modifizierte MEK2-Protein wird im Folgenden als *NtMEK2^{DD}* bezeichnet. Die Asparaginsäurereste in der Aktivierungsschleife ahmen mit ihrer negativen Ladung eine

Phosphorylierung an diesen beiden Positionen nach. Dies führt dazu, dass das Enzym konstitutiv aktiv und nicht mehr über eine Dephosphorylierung zu inaktivieren ist. *NtMEK2^{DD}* wird von der Pflanze nicht exprimiert, da es über ein Promotorsystem verfügt, das die Transkription dieses Transgens spezifisch aktiviert, wenn das Steroidhormon Dexamethason in ausreichender Konzentration vorhanden ist. Dexamethason ist ein künstliches Glucocorticoid, das natürlicherweise nicht in *Arabidopsis* vorkommt. Zusätzlich zum Gen für *NtMEK2^{DD}* wurden die Pflanzen mit einem Gen transformiert, das für das chimärische GVG-Protein kodiert und das durch den 35S-Promotor aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) konstitutiv exprimiert wird. Dieses GVG-Protein fungiert als Transkriptionsfaktor, der die Dexamethason-abhängige Expression des *NtMEK2^{DD}*-Proteins reguliert. Die Abkürzung GVG wurde gewählt, weil das Protein aus der DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors **GAL4**, der *trans*-aktivierenden Domäne des Herpesvirusproteins **VP16** und der Rezeptordomäne des Glucocorticoidrezeptors **GR** der Ratte besteht (Aoyama and Chua, 1997). Nach Bindung von Dexamethason an die Glucocorticoidrezeptor-Domäne bindet GVG mit der GAL4-DNA-Bindedomäne den Promotor von *NtMEK2^{DD}*. Von der VP16 *trans*-aktivierenden Domäne wird die Transkription der MEK initiiert. Man geht davon aus, dass die Glucocorticoidrezeptordomäne die DNA-bindenden und die Transkription aktivierenden Eigenschaften der übrigen Domänen bei Abwesenheit von Dexamethason hemmt (Picard, 1993; Aoyama and Chua, 1997). Die *NtMEK2^{DD}* akzeptiert – trotz ihrer Herkunft aus dem Tabak – die endogenen MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 aus *Arabidopsis* als Substrate, die in der Folge aktiviert werden (Ren et al., 2008). Die MPK3 und MPK6 phosphorylieren daraufhin ihre natürlichen Substrate (Abbildung 1 A). Nach der Behandlung der transgenen Pflanzen mit Dexamethason akkumuliert das *NtMEK2^{DD}*-Protein in den Pflanzenzellen. Weil seine Aktivität aufgrund der Sequenzänderung nicht durch Dephosphorylierung revidiert werden kann, aktiviert es MPK3 und MPK6 fortwährend. Trotz dieses Systems zur Aktivierung der MAP-Kinasen ist nur mit moderaten quantitativen Unterschieden zwischen Dexamethason-behandelten Pflanzen und Kontrollpflanzen zu rechnen, weil die Phosphorylierung eine transiente und reversible posttranslationale Modifikation ist. Viele der

phosphorylierten Substrate werden schnell durch die Aktivität entsprechender Phosphatasen dephosphoryliert, um der unnatürlich starken Aktivierung der MAP-Kinasen entgegenzuwirken. Ebenso kommt es bei Substraten durch die Phosphorylierung zum Abbau der Proteine (Yoo et al., 2008). Es wurden auch negative Effekte des GVG-Expressionssystems bei *Arabidopsis* (Kang et al., 1999), Reis (Ouwerkerk et al., 2001), *Lotus japonicus* (Andersen et al., 2003) und Tabak (Amirsadeghi et al., 2007) beobachtet. In allen Fällen wurde eine Missbildung der Sprossachse beobachtet. In Tabak war der Effekt von der Stärke der Expression des Gens für das GVG-Protein und von den Wachstumsbedingungen abhängig (Amirsadeghi et al., 2007). In Reis wurde eine Abhängigkeit von der Konzentration des Dexamethasons und der Dauer der Behandlung beobachtet (Ouwerkerk et al., 2001). Bei den Experimenten, die dieser Dissertation zugrunde liegen, lag sowohl die Behandlungsdauer, als auch die Konzentration des Dexamethasons unter den Werten, bei denen die Nebeneffekte des GVG-Expressionssystems beobachtet worden waren. Da für jede einzelne Messung sehr viele Individuen (> 1000) desselben Genpools verwendet wurden und stets ein Vergleich zwischen Pflanzen durchgeführt wurde, die mit Dexamethason bzw. identisch ohne Dexamethason behandelt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die gemachten Befunde auf die durch Dexamethason induzierte Expression der *NtMEK2^{DD}* zurückzuführen sind. Dennoch kann ich Nebeneffekte aufgrund des Expressionssystems selbst nicht vollkommen ausschließen.

Ergebnisse

Quantitative Unterschiede nach Dexamethason-Behandlung lassen sich ohne Anreicherung nicht durch Immunodetektion feststellen.

Um bislang unbekannte putative MAP-Kinase-Substrate *ex vivo* mit hohem Durchsatz zu identifizieren, wurden GVG::*NtMEK2^{DD}*-Pflanzen genutzt, bei denen eine Zugabe von Dexamethason zu einer kontinuierlichen und starken Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 führt (Ren et al., 2002). Die Pflanzen wurden in flüssigem MS-Medium angezogen, um eine gleichmäßige Behandlung der Keimlinge mit Dexamethason zu gewährleisten. Die ganzen Pflanzen wurden sechs Stunden nach Behandlung geerntet, da zu diesem Zeitpunkt die MAP-Kinase-Aktivität ein Maximum erreicht hat (Ren et al., 2002). Sowohl aus *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen als auch aus Col-0 Wildtyppflanzen wurden phenolische Proteinextrakte (PPE) angefertigt. Aus einem Teil dieser Extrakte wurden wiederum Phosphoproteine durch $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC angereichert. Diese Proteine wurden durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte durch einen Antikörper, der spezifisch an das phosphorylierte MAP-Kinase-Substratmotiv PX-pS/pT-P bindet (Edbauer et al., 2009). Bei den Col-0 Wildtyppflanzen konnte weder im phenolischen Proteinextrakt (PPE) noch bei den mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC angereicherten Proteinen ein Unterschied zwischen Dexamethason-behandelten Pflanzen und Kontrollpflanzen festgestellt werden. Die PPE der *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen ließen ebenfalls keine Unterschiede erkennen. Bei den mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC angereicherten Proteinen sind jedoch bei den Dexamethason-behandelten Pflanzen zusätzliche Proteinbanden zu sehen, die in keiner der übrigen Proben sichtbar sind (Abbildung 3 A). Als alternative Anreicherungs-methode für putative MAP-Kinase-Substrate wurde die Anreicherung von Zellkernen erprobt. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass fünf der neun eingangs erwähnten bekannten *in vivo* MAP-Kinase-Substrate Transkriptionsfaktoren sind (SPCH, EIN3, WRKY33, ERF6,

Ergebnisse - Quantitative Unterschiede nach Dexamethason-Behandlung lassen sich ohne Anreicherung nicht durch Immunodetektion feststellen.

ERF104), die zur Kontrolle der Genexpression an DNA im Zellkern binden. Daher wurden Zellkerne aus *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen angereichert, die zuvor mit Dexamethason bzw. zur Kontrolle mit Ethanol behandelt worden waren. Die Pellets der Anreicherung, die überwiegend aus Zellkernen bestanden, wurden in Ladepuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Proteine mit dem gleichen Antikörper wie oben beschrieben detektiert. Hier sind in den Proben aus den Dexamethason-behandelten Pflanzen einige Banden stärker als in den Proben aus den Kontrollpflanzen, zusätzlich können in den Proben der Dexamethason-behandelten Pflanzen Proteinbanden detektiert werden, die in den Proben der Kontrollpflanzen nicht zu sehen sind (Abbildung 3 B).

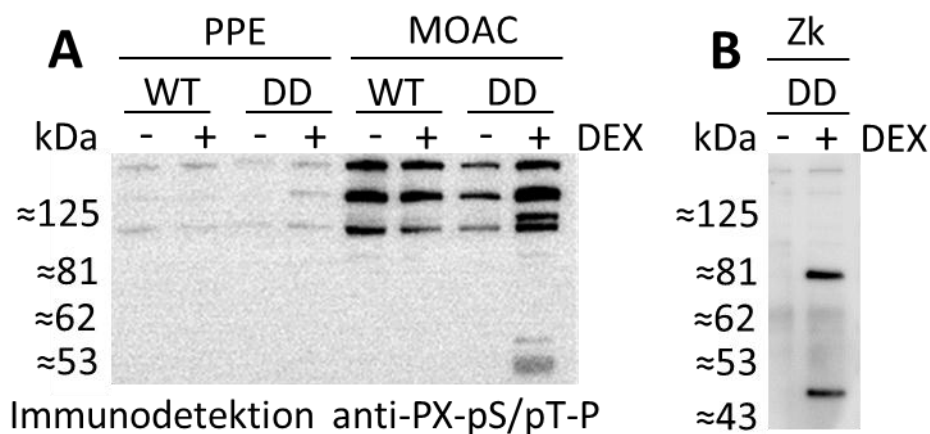


Abbildung 3: Immunodetektion von Phosphoproteinen mit einem oder mehreren phosphorylierten *high-stringency* MAP-Kinase-Substratmotiven. Col-0 Wildtyppflanzen (WT) und *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen (DD) wurden mit 1 μ M Dexamethason (+ DEX) bzw. zur Kontrolle mit Ethanol (- DEX) behandelt und sechs Stunden nach der Behandlung geerntet. Nach SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden Proteine mit einem Antikörper detektiert, der spezifisch das phosphorylierte *high-stringency* MAP-Kinase-Substratmotiv PX-pS/pT-P detektiert. Die Belichtungszeit betrug in beiden Fällen eine Minute. **A:** Aus den Pflanzen wurde ein phenolischer Proteinextrakt (PPE) angefertigt und aus dem PPE mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC Phosphoproteine angereichert. Nach der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC sind alle detektierbaren Proteinbanden deutlich stärker als im PPE. In *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen sind nach Dexamethason-Behandlung zusätzliche Banden zu erkennen, die in keiner der anderen Proben sichtbar sind. **B:** Anreicherung von Zellkernen aus *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen. Angereicherte Zellkerne aus dem Pellet wurden in Ladepuffer aufgekocht und der Überstand aufgetragen (Zk). Nach der Dexamethason-Behandlung sind im Pellet Banden stärker oder überhaupt erst sichtbar.

Tandem-MOAC ermöglicht die Identifizierung bekannter MAP-Kinase-Substrate mittels Massenspektrometrie

Um auch Phosphopeptide von putativen MAP-Kinase-Substraten mit niedriger Abundanz massenspektrometrisch messen zu können, wurde vor dem tryptischen Verdau der Proteine ein zusätzlicher phosphospezifischer Anreicherungsschritt eingeführt: Phosphoproteinanreicherung durch $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC. Die so erhaltenen Phosphoproteine wurden mit Trypsin verdaut und aus den resultierenden Peptiden mit TiO_2 -MOAC Phosphopeptide angereichert. Diese Methode wurde Tandem-MOAC genannt und führte dazu, dass bekannte MAP-Kinase-Substrate identifiziert werden konnten, so PHOS32 (Merkouropoulos et al., 2008) (und das sehr ähnliche PHOS34, das bislang noch nicht als MAP-Kinase-Substrat belegt ist), NIA2 (Wang et al., 2010), MAP-Kinase Phosphatase (MKP) 1 (Park et al., 2011) und "Microtubule-associated Protein" (MAP) 65-1 (Sasabe et al., 2011). Diese und weitere Proteine wurden replizierbar in drei unabhängigen Experimenten gefunden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte dazu mit zwei verschiedenen Softwares, nämlich ProteomeDiscoverer 1.3 (im folgenden PD genannt) und MaxQuant 1.2.2.5 (fortan MQ). In den drei Experimenten zusammengekommen konnten mit PD 1905 Spektren als Phosphopeptide (*Phosphopeptide Spectrum Match*, pPSM) annotiert werden, mit MQ 1505. Insgesamt 2201 pPSMs wurden mit mindestens einer der beiden Softwares erzielt. Diese pPSMs konnten 1012 verschiedenen Phosphopeptiden zugeordnet werden. Diese Phosphopeptide wurden wiederum 382 Phosphoproteinen zugeordnet. Alle pPSMs und die zugehörigen MS/MS-Spektren können in den Datenbanken PRIDE (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>) (Vizcaíno et al., 2013) und ProMEX (<http://promex.pph.univie.ac.at/promex/>) (Wienkoop et al., 2012) eingesehen werden. Mit den beiden Softwares PD und MQ wurden auch die Phosphorylierungen der jeweiligen Primärstruktur der identifizierten Peptide zugewiesen. Insgesamt wurden 733 Phosphorylierungsstellen identifiziert, von denen 362 bislang weder in der Pflanzenproteinphosphorylierungs-Datenbank P3DB (Gao et al.,

2009), noch in der *Arabidopsis*-spezifischen Proteinphosphorylierungs-Datenbank PhosPhAt (Durek et al., 2010) gespeichert waren.

141 putative MAP-Kinase-Substrate identifiziert, darunter 32 putative Substrate der MAP-Kinasen MPK3 und/oder MPK6

Mit PD und MQ zusammen konnten 141 Proteine identifiziert werden, bei denen eine Phosphorylierung an einem *high-* oder *low stringency motif* vorlag (siehe Tabelle A6 im Anhang). Dabei wurden 100 dieser Proteine von beiden Softwares als solche erkannt. Diese Proteine werden aufgrund der Phosphorylierung an den entsprechenden Motiven als putative MAP-Kinase-Substrate betrachtet. Um unter diesen putativen MAP-Kinase-Substraten solche zu finden, die von MPK3 und/oder MPK6 phosphoryliert werden, wurde das Verhältnis der Peptide im Vergleich zwischen Dexamethason-behandelten Pflanzen und kontrollbehandelten Pflanzen semiquantitativ bestimmt. Dazu wurde die Software ProtMAX 2012 Version 2.0.1.1 (im Folgenden ProtMAX (Egelhofer et al., 2013)) verwendet. Mit ProtMAX wurden die Peptidionenzahlen der Dexamethason-behandelten wie auch der Kontrollpflanzen bestimmt. Durch einen zweiseitigen Student-t-Test mit $\alpha = 0,05$ wurden 36 der 141 putativen MAP-Kinase-Substrate als signifikant reguliert gefunden. Diese Proteine werden als putative Substrate der MAP-Kinasen MPK3 und/oder MPK6 betrachtet. 32 dieser 36 Proteine waren sowohl durch PD als auch durch MQ als putative MAP-Kinase-Substrate erkannt worden. Die relative Quantifizierung dieser 32 Proteine wurde zusätzlich durch die Integration der Peptidionen-Signalpeaks von Hand bestätigt. Diese Proteine und die zugehörigen modifizierten Peptidsequenzen sowie die Peptidmassen sind in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Liste aller MAP-Kinase-Substrate, die mit der markierungsfreien Methode identifiziert wurden. Die modifizierte Peptidsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben, ein kleines „p“ kennzeichnet die nachfolgende Aminosäure als phosphoryliert. Die als phosphoryliert identifizierten MAP-Kinase-Substrat-Motive sind fett gedruckt.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT5G18230	transcription regulator NOT2/NOT3/NOT5 family protein	
NIMGVESNVQPLT p SPLSK		1994.96
AT1G60200	splicing factor PWI domain- / RNA recognition motif (RRM)-containing protein	
MKPLVPIDYSTEEQEAVAHGGSGN p TPPHLALAAEFAK		3958.88
AT5G09620	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	
VAPI PPp SPVKVPQVPPEPVVLEPPQMFVDQR		3468.81
AT4G12780	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	
SHLRPPGNISGSQSPPVE p SPGSYHSK		2784.30
AT2G41630	TFIIB	
IAPSWYAKEEDLKNLS p SP		2129.00

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT3G12140	EML1	
HATIQPFDVLP pSPT SAAR		2137.02
AT5G23680	Sterile alpha motif (SAM) domain-containing protein	
LGDIGGDQYHQHVVAAYD pSP QVR		2607.18
AT1G20670	DNA-binding bromodomain-containing protein	
ATDILQG pSP VESGPTTPLPDKK		2333.13
AT3G26910	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	
AK pSP GLVGHSAPLTAWNQER		2201.07
AT2G26530	AR781	
NFSDRLTVPFDWEET PGpTPR		2446.08
SL pSP FRVSAYPWEEQEQQEQEQR		3062.34
AT5G61960	ML1	
SSWTSESYQLKPQSSFSGSHPSG pSP NAR		3078.33

Ergebnisse - Tabelle 2: Liste aller markierungsfrei identifizierten putativen MAP-Kinase-Substrate

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT1G28280	VQ4/MVQ1	
LLPLFPVT pSPR		1320.70
YREATNLIP pSPR		1497.72
AT5G64330	NPH3	
LLEHFLVQEQTEGS pSPSR		2138.00
AT4G38470	STY46	
LLHSAYDPQNRPAIEVHLVQVQPAGISADLDSTSNDAGHS pSPTRK		4875.36
AT4G12770	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	
SHLRPPGNISGSQ pSP VESSGLYHSK		2703.27
AT3G26560	ATP-dependent RNA helicase, putative	
YSVDM pSP VKIFK		1494.70
AT3G49590	ATG13	
IITDYVG pSP ATDPMR		1716.76

Ergebnisse - Tabelle 2: Liste aller markierungsfrei identifizierten putativen MAP-Kinase-Substrate

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT4G38710	glycine-rich protein	
TLPVAVVEVVK pSP VLVIVEKPK		2651.52
AT3G13060	ECT5	
VAPLTGPYGLAGDFAGHLPSSIL pSP QAQGFYYR		3532.71
AT5G21160	LA RNA-binding protein	
NVEDLSNDFSNTFLLDEELDLEHR pSP R		3286.47
AT3G11330	PIRL9	
TYVADVSEYLGSN pSP RDPYLER		2613.18
AT1G64370	unknown protein	
EGYSQSQSRPVYGL pSP TLNHR		2458.14
AT1G74690	IQD31	
VHNPVVESSIQPQR pSP R		2011.98
AT5G13590	unknown protein	

Ergebnisse - Tabelle 2: Liste aller markierungsfrei identifizierten putativen MAP-Kinase-Substrate

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
IINLTQVK p SPVK		1420.80
AT4G38550	pEARLI4-like	
NSS PPp SPFHPAAYK		1580.68
AT1G43690	ubiquitin interaction motif-containing protein	
MVLF PKp SPSPVNK		1524.76
AT1G21380	Target of Myb protein 1	
p SPEHALFTKPVYDQTEQLPPAPWETQEPR		3473.61
AT4G27320	PHOS34	
IHH PSp SPR		1011.46
AT5G54430	PHOS32	
IHH PPp SPR		1021.48
AT1G50570	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	
MKLPLDIDSPTQSENSSSSQ p TPKSASSR		3188.46

Ergebnisse - Tabelle 2: Liste aller markierungsfrei identifizierten putativen MAP-Kinase-Substrate

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT1G78150	unknown protein	
STPVRKPHTSTADLLTWSEVPP PDp SPSSASR		3385.62
AT3G55270	MKP1	
FSSLSSLPSQT p SPKESR		1944.94

Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung der relativen Abundanz eines Proteins auf eine Akkumulation des Proteins in der Probe zurückzuführen ist, wurden die Spektrenzahlen der quantifizierbaren Proteine sowohl für die Dexamethason-behandelten Proben als auch für die Kontrollproben bestimmt. Unter der Annahme, dass die Spektrenzahl mit der Proteinabundanz korreliert (Gao et al., 2003; Liu et al., 2004), waren keine signifikanten Unterschiede in der Proteinabundanz zwischen den beiden Proben festzustellen (Abbildung 4 A). Unterstützt wurde dieser Befund durch qRT-PCR-Untersuchung der mRNA-Abundanz von 138 der 141 Gene, die für putative MAP-Kinase-Substrate kodieren. 85 dieser Gene (entspricht 61,6 %) wurden als nicht signifikant reguliert gefunden, 30 als herunterreguliert (entspricht 21,7 %) und 23 als heraufreguliert (entspricht 16,7 %; Abbildung A5 im Anhang). Dass sich die Proben dennoch statistisch unterscheiden, zeigt eine Hauptkomponentenanalyse, in der die Dexamethason-behandelten Proben in allen drei Replikaten eindeutig von den Kontrollproben unterschieden werden konnten (Abbildung 4 B). Die identifizierten Phosphorylierungsstellen befinden sich in unterschiedlichen unmittelbaren Zusammenhängen innerhalb der Aminosäuresequenzen. Um herauszufinden, welche Phosphorylierungsmotive überwiegen, wurde der Motif-X-Algorithmus (Schwartz and Gygi, 2005) verwendet. Vorherrschendes Motiv ist demnach das *high stringency motif* gefolgt vom *low stringency motif* für MAP-Kinase-Substrate (Abbildung 4 C).

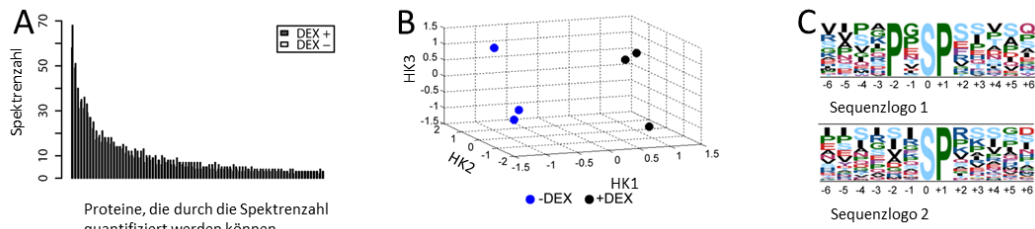


Abbildung 4: Analyse der markierungsfrei erhaltenen Daten. **A:** Die Spektrenzahlen der quantifizierbaren Proteine unterscheiden sich zwischen den zwei Behandlungszuständen nur wenig. **B:** Die Proben der zwei Behandlungszustände können in einer Hauptkomponentenanalyse klar voneinander getrennt werden. **C:** Eine Analyse mit dem Motif-X-Algorithmus ergab, dass die zwei MAP-Kinase-Substratmotive in der serinhaltigen Form die höchstrangigen Sequenzmotive sind. Aus Hoehenwarter et al., 2013

Metabolische ^{15}N -Markierung in Verbindung mit Graphit-basierter Entsalzung identifiziert weitere putative MAP-Kinase-Substrate

Um eine akkuratere Quantifizierung der Phosphopeptide zu ermöglichen, wurden ähnliche Experimente mit metabolischer ^{15}N -Markierung der Proteine und Peptide durchgeführt. Diese Markierungsmethode ermöglicht die Aufarbeitung und Messung zweier Behandlungszustände in derselben Probe durch das Mischen von ^{14}N - und ^{15}N -markiertem Probenmaterial. Die Effizienz des Einbaus von schwerem Stickstoff wurde mit einem Wert von 98 % bestimmt. Es wurde ebenfalls eine Liste putativer MAP-Kinase-Substrate erstellt, indem eine relative Quantifizierung von Phosphopeptiden aus *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen mit Col-0-Hintergrund nach Dexamethason-Behandlung im Vergleich mit den korrelierenden Peptiden aus solchen Pflanzen, die zur Kontrolle mit Ethanol behandelt worden waren, durchgeführt wurde. Diese Liste umfasst 143 Proteine (Tabelle A7 im Anhang), von denen 50 bereits mit der markierungsfreien Methode identifiziert worden waren. Die übrigen 93 Proteine waren mit der markierungsfreien Methode nicht erfasst worden. Im Umkehrschluss wurden mit der metabolischen Markierungsmethode 91 der zuvor identifizierten Proteine nicht erfasst.

36 putative Substrate der MPK3 und/oder MPK6 identifiziert

Die Liste mit 143 putativen MAP-Kinase-Substraten (Tabelle A7 im Anhang) umfasst auch solche Proteine, deren Phosphopeptide nach der Aktivierung der MPK3 und MPK6 durch Behandlung mit Dexamethason eine erhöhte Abundanz zeigen. Dabei handelt es sich um 36 Proteine, die nach Dexamethason-Behandlung mindestens 1,5-fach häufiger vorkommen, als ohne Dexamethason-Zugabe (Tabelle 3). Im Vergleich mit den 32 Proteinen, die markierungsfrei als MPK3/6-Substrate identifiziert wurden, zeigt sich, dass lediglich sieben Proteine in beiden Listen vorhanden sind, und zwar der Transkriptionsfaktor NOT2/3/5 (AT5G18230), die „Chaperone DnaJ-domain superfamily“-Proteine AT4G12770 und AT4G12780, das „LA RNA-binding“-Protein AT5G21160, das „Ubiquitin interaction motif-containing“ Protein AT1G43690, das „pEARLI4-like“ Protein AT4G38550 und VQ4/MVQ1 (AT1G28280).

Tabelle 3: Liste aller putativen Substrate der MPK3 und/oder MPK6. Die modifizierte Peptidsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Ein kleines „p“ markiert die nachfolgende Aminosäure als phosphoryliert, ein „ox“ bezeichnet den nachfolgenden Methioninrest als oxidiert. Die Werte der Spalte „Wildtyp-Hintergrund DEX“ geben die relative Quantifizierung des jeweiligen Peptids als Quotient aus Dexamethason-behandelter Probe und Kontrollprobe an. Peptide, deren Häufigkeit auch in Pflanzen mit *mpk6*-Hintergrund nach Dexamethason-Behandlung ansteigt haben zusätzlich die relativen quantitativen Werte in der Spalte „*mpk6*-Hintergrund DEX“ angegeben.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund	<i>mpk6</i> -Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da] DEX	DEX
AT1G07110	F2KP		
SVETL p SPFQQK		1358.59 12.44	6.47
AT1G13020	EIF4B2		
KADTEVSE p TPTAVK		1556.73 1.67	
AT1G27100	Actin cross-linking protein		
RPTSSPLSAE p SPR		1465.69 4.33	

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp- Hintergrund	mpk6- Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz	Peptidmasse [Da]	DEX	DEX
AT1G28280	VQ4/MVQ1		
SGSSNQ p SPNELAAEEK	1728.72	108.15	
LLPLFPVT p SPR	1334.68	12.84	4.68
AT1G43690	ubiquitin interaction motif- containing protein		
RSKPIEEEETGSGSQSGGE p SPEAK	2558.12	1.70	
AT1G59710	Protein of unknown function (DUF569)		
FFRQESTDSLAVG p SPPKSEGR	2377.11	1.64	
AT1G62300	WRKY6		
LGREE p SPETESNK	1556.67	21.71	6.69
LGREE p SPETESNKIQK	1926.91	20.64	6.43

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp- Hintergrund	mpk6- Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da]	DEX
			DEX
AT1G62390	PHOX2		
VVLKPVSH pSPK		1272.70	8.73
			4.01
AT1G76070	unknown protein		
SIFS FpSP ASGR		1250.51	3.87
			4.20
AT2G16900	pEARLI4-like		
KTESQ PPpSPL STR		1508.72	23.40
AT2G20950	pEARLI4-like		
SN PSpSP PHLAEGR		1429.63	5.12
			4.29
AT2G26570	WEB1		
ALEESESTLKANDTD pSPR		2043.90	1.82
			1.51
AT2G34310	unknown protein		
QVESSTDSDSLQQKSDEKEEIL pSPR		2917.33	1.97
			7.81

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp- Hintergrund	mpk6- Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da] DEX	DEX
AT2G45140	PVA12		
VVYVAPPRPPSPVREGSEEGpSpSPR		2711.25	2.15
AT2G45820	Remorin family protein		
ALAVVEKPIEEHpTPKK		1871.00	1.81
AT3G08710	TH9		
VTSHDSVPEpSPQRP		1705.82	1.91
KVTSIHDSVPEpSPQRP		1833.92	1.82
AT3G10380	SEC8		
ASQHDINpTPR		1219.53	2.16
AT3G18230	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein		1.59
SVAVQQPIDGpSPR		1434.68	1.67

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund	mpk6-Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz	Peptidmasse [Da]	DEX	DEX
AT3G19420	PTEN 2		
FTSGLGIRL pSPK		1356.71	8.88
AT3G23540	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein		1.81
ANQSETDSAS pSPVTR		1630.68	4.56
AT4G05150	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein		
EVSTLSD PGpSPR		1325.58	1.60
AT4G12770	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein		
ASVN pSPTASQMDELDDFSIGR		2320.97	2.99
AT4G12780	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein		
FENVFSSISS pSPTK		1610.72	1.55

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund	mpk6-Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da] DEX	DEX
AT4G15545	unknown protein		
HSSIQSQQASEAIEPAATDNENDAPKPSLSASLPLVSQTT pTPR		4557.18 2.62	
AT4G27430	CIP7		
HYSEDVGEVQASQEK PVpSPK		2296.04 1.88	
AT4G28610	PHR1		
YRPEPSETG pSPERK		1714.78 3.23	
YRPEPSETG pSPER		1585.67 1.71	
AT4G29810	MKK2		
IISQLEPEVL pSPIK PADDQLSLSDLDMVK		3275.67 2.59	1.57
AT4G32330	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family		
TASGADSEETQ pTPR		1548.57 1.58	

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund	mpk6-Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz	Peptidmasse [Da]	DEX	DEX
AT4G38550	pEARLI4-like		
NSS PPpSP FHPAAYK		1580.70	4.50
STPGSPAHPGAR pSP PPSYLSNK		2384.14	3.90
AT4G39680	SAP domain-containing protein		
VV PPpSP KEPTNSLR		1601.81	700.32
AT5G10470	KAC1		
SDAALLNLEEG pSP IPNPSTAAEDSR		2723.24	1.55
AT5G13260	unknown protein		
LSDIELK pSP GGPK		1436.67	5.74

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund	mpk6-Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz	Peptidmasse [Da]	DEX	DEX
AT5G18230	transcription regulator NOT2/NOT3/NOT5 family protein		
NIMGVESNVQPLT p SPLSK		1994.97	65.24
AT5G21160	LA RNA-binding protein		18.58
STSAETIGDGDKD p SPK		1688.71	1.67
AT5G46070	Guanylate-binding family protein		
GGKDSPADSASP p SPR		1509.64	12.37
AT5G53830	VQ33/MVQ3		3.74
DSQPLLLPLFPV a SPAR		1902.00	28.63

Eine Mutante ermöglicht die Identifizierung von Proteinen, die spezifisch von MPK3 phosphoryliert werden

Durch die Verwendung von *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen mit *mpk6*-Hintergrund nach Dexamethason-Behandlung wurde eine Liste von putativen MAP-Kinase-Substraten erstellt, die spezifisch, aber nicht zwingend ausschließlich, von MPK3 phosphoryliert werden. Diese Liste enthält 14 Proteine, deren Phosphopeptide in der Abundanz nach Dexamethason-Behandlung sowohl im Wildtyp-Hintergrund, als auch im *mpk6*-Hintergrund erhöht waren (Tabelle 3). Da MPK6 für ihre Phosphorylierung nicht in Betracht kommt, werden sie höchstwahrscheinlich mindestens von MPK3 phosphoryliert.

Behandlung mit Salicylsäure führt zu erhöhter Abundanz einiger Phosphopeptide

Um putative MAP-Kinase-Substrate zu identifizieren, die am Priming von Abwehrreaktionen beteiligt sein könnten, wurden *NtMEK2^{DD}*-Pflanzen zur Induktion des geprimten Zustandes mit Salicylsäure behandelt, bevor zwei Tage später die Dexamethason-Behandlung zur Aktivierung der MPK3 und der MPK6 erfolgte. Die Salicylsäurebehandlung kann jedoch auch unabhängig von der Aktivierung dieser MAP-Kinasen zu einer Regulation von Phosphoproteinen führen. Um solche Proteine, die keine putativen Substrate der MPK3 und/oder der MPK6 darstellen zu erkennen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Pflanzen nur der Salicylsäure- bzw. der entsprechenden Kontrollbehandlung unterzogen. Nach zwei Tagen erfolgte die Ernte, ohne dass eine Behandlung mit Dexamethason erfolgt wäre. Aus dem Vergleich dieser Proben geht hervor, dass nach der Behandlung mit Salicylsäure die Abundanz von Phosphopeptiden aus einigen Proteinen und putativen MAP-Kinase-Substraten steigt. Es handelt sich um 50 Phosphopeptide aus 40 Proteinen. Von diesen 50 Phosphopeptiden zeigen neun nach zusätzlicher Dexamethason-Behandlung eine Erhöhung der Abundanz. Sechs dieser Phosphorylierungsstellen steigen in ihrer Abundanz auch ohne Salicylsäure nach

Dexamethason-Behandlung. Auffällig ist, dass diese 50 Phosphopeptide die Salicylsäure-abhängige Erhöhung der Abundanz ausschließlich im Wildtyp-Hintergrund zeigen, nicht jedoch im *mpk6*-Hintergrund.

Einen Anstieg der Abundanz durch Salicylsäure-Behandlung im *mpk6*-Hintergrund zeigen vier Phosphopeptide, die zu den Proteinen MKK2, AT1G59710, AT5G45510 und „pearli4-like“ AT4G38550 gehören. Die Phosphorylierungsstelle des Peptids von „pearli4-like“ AT4G38550 ist auch im Wildtyp-Hintergrund nach Salicylsäure-Behandlung hochreguliert, jedoch weist das Peptid im *mpk6*-Hintergrund eine zweite Phosphorylierungsstelle auf, die nicht dem MAP-Kinase-Substratmotiv entspricht. Die Behandlung mit Salicylsäure führt bei diesen Peptiden zu einem Anstieg der Abundanz unabhängig von der Anwesenheit von MPK6.

Tabelle 4: Auszug aus Tabelle A7 im Anhang: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch Salicylsäure reguliert werden. Die modifizierte Peptidsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben, ein kleines „p“ kennzeichnet die nachfolgende Aminosäure als phosphoryliert, ein „ox“ kennzeichnet den nachfolgenden Methioninrest als oxidiert. Die als phosphoryliert identifizierten MAP-Kinase-Substrat-Motive sind fett gedruckt. Es sind die relativen Peptidabundanzen angegeben als Quotienten aus behandelten und kontrollbehandelten Proben. Dabei bedeutet DEX: Dexamethason-behandelte Probe geteilt durch Kontrolle; SA: Salicylsäure-behandelte Probe geteilt durch Kontrolle; SA + DEX: beide Proben wurden mit Salicylsäure vorbehandelt und der Wert ermittelt aus Dexamethason-behandelter Probe geteilt durch Kontrolle. Proben, in denen ein bestimmtes Peptid nicht detektiert wurde sind mit n.d. gekennzeichnet.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz								
AT1G04080	PRP39							
SQVDGSTEQ p SPKLESASSTEPEELKK		2873,32	1,0910	2,7532	1,2493	0,8189	0,7200	1,6445
AT1G11360	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein							
SPTVVTVQ PSp SPR		1452,66	1,3025	2,6868	1,3844	1,2324	0,6075	2,4465
KSPTVVTVQ PSp SPR		1563,80	0,9744	2,2588	1,4730	1,4647	n.d.	n.d.

Ergebnisse - Tabelle 4: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch SA reguliert werden

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT1G20760	Calcium-binding EF hand family protein							
FGN pSPPR		855,36	1,1934	1,6688	1,3468	1,2346	0,6916	1,7469
NATEVP pSPDYSQ GK		1573,66	n.d.	1,6071	1,3526	1,0266	0,6550	1,7294
AT1G23860	RSZ21							
pSPDYGYAR		1020,36	1,0444	2,0044	1,0920	0,9749	0,7652	n.d.
AT1G27650	ATU2AF35A							
RGG pSPGGGREGpSEER		1648,63	1,0679	2,1704	1,1518	n.d.	0,7720	n.d.
AT1G44910	PRP40A							
HAN pSPESESEN R		1437,55	0,9499	1,6259	1,1029	1,1022	0,7376	n.d.
KHAN pSPEpSESEN R		1645,61	n.d.	5,0441	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ANL pSPAGDKANVEEPoxMVYATK		2302,06	0,9572	2,9421	1,5041	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G52200	PLAC8 family protein							
GRVTTPSEEDSNNGLPVQQ PGpTPNQ R		2860,32	n.d.	1,5206	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Ergebnisse - Tabelle 4: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch SA reguliert werden

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT1G52380	NUP50 protein							
SALPLKpTPENpSPTATDT		1903,82	n.d.	3,4629	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G59710	Protein of unknown function (DUF569)							
QESTDSLAVGpSPPKSEGR		1925,87	n.d.	n.d.	1,2437	n.d.	2,1263	1,3102
FFRQESpTDSLAVGpSPPKSEGR		2457,08	n.d.	31,8289	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G61730	DNA-binding protein-related storekeeper transcriptional regulator							
IKpSPSATTAAAPPAK		1491,77	1,0725	1,5493	1,1505	0,9674	0,6511	1,5083
AT1G62390	PHOX2							
VVLKPVSHpSPK		1272,7	8,7283	11923,6673	3,6335	4,0119	0,7278	3,6402
AT2G24590	RSZ22a							
YRKpSPTYGGR		1266,60	n.d.	1,6737	1,1722	n.d.	n.d.	n.d.

Ergebnisse - Tabelle 4: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch SA reguliert werden

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz	Peptidmasse [Da]	DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT2G26460	SMU2						
EGGDVASLDAAEAQ p TPKR	1895,86	1,3454	2,2711	2,5216	1,1853	0,7112	2,1035
AT2G27660	Cys/His-rich C1 domain family protein						
GGLQGSN p SPIQSPR	1498,63	n.d.	1,5742	0,6916	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G37340	RS2Z33						
IIDG p SPPP p SPK	1280,51	n.d.	1,5523	1,2239	n.d.	n.d.	n.d.
RoxMDDpSL p SPR	1268,41	n.d.	2,3673	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G08710	TH9						
KVTSIIDS V PE p SPQRP	1833,92	1,8203	1,5378	2,4642	1,4683	0,4920	2,1906
AT3G22380	TIC						
AGSFRD p SPEEEGPVELPEAAR	2324,03	1,1850	1,7392	1,1239	2,3183	0,7274	2,5434
AT3G25070	RIN4						
ADE p SPEKVTVVPK	1479,72	1,1128	4,3189	1,2896	0,9582	0,9688	1,6937

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT3G28920	HB34							
SMDMT PKpS PEPESETPTR		2100,87	0,7172	9,9584	1,0452	0,6196	n.d.	n.d.
AT3G44750	HDA3							
pTP NIEPQGYSEEEEEEEVPAGNAAK		3056,27	n.d.	3,0310	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G50350	Protein of unknown function (DUF1685)							
STTSSSSLSDGDT pSP HHTVYQTSDDPQTVK		3247,38	n.d.	1,5055	n.d.	n.d.	n.d.	1,1818
AT3G57150	NAP57							
HDDSSD pSP APVTTK		1554,58	1,0008	3,0228	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G61860	RS31							
RP pSP DYGR		1028,44	n.d.	2,1879	1,2482	1,0140	n.d.	1,7269

Ergebnisse - Tabelle 4: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch SA reguliert werden

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT4G05150	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein							
EVSTLSD PGpSPR		1325,58	1,5980	4,0562	1,5430	1,3225	0,8879	1,5518
EVpSTLSD PGpSPRR		1580,60	n.d.	1,5145	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ISTPELPPPVFIKPESPEPVp SpTPK		2748,35	n.d.	1,6608	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G11740	SAY1							
SGp SP EEEEHASINPAER		1790,75	1,3982	1,9728	1,6201	1,2720	0,8841	1,9491
AT4G12780	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein							
FENVFSSISSp SPTK		1610,72	1,5527	3,2417	1,7501	1,3958	0,5761	2,0270
AT4G15545	unknown protein							
LTP PGpSP PILSASGTPK		1700,87	1,3578	3,7643	1,3077	1,2289	0,6840	1,6824
AT4G22285	Ubiquitin C-terminal hydrolases superfamily protein							
SDp SP PPPLGFNNPLLPLANTYDDDDDEEEENEQKK		3909,71	1,1207	3,1659	1,3660	n.d.	n.d.	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung		Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da]						
AT4G23040	Ubiquitin-like protein	superfamily						
TQR PPp SPSLTAQR		1520,75	1,3296	1,6356	1,4217	1,2071	0,8332	1,9340
AT4G25500	RS40							
ERT p SPDYGR		1161,48	1,0382	1,5311	1,1699	1,0706	0,6901	1,6506
AT4G27430	CIP7							
HYSEDVGEVQASQEK PVp SPK		2296,04	1,8788	1,9754	0,9836	0,9696	0,2633	2,1901
AT4G29810	MKK2							
IISQLEPEVL p SPIKPADDQLSLSDLDMVK		3275,67	2,5886	0,5826	1,9756	1,5656	2,3714	1,9583
AT4G35980	unknown protein							
A p SPDPLGESSSSGTAR		1670,71	1,0212	3,5097	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Ergebnisse - Tabelle 4: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch SA reguliert werden

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT4G38550	pEARLI4-like							
NSS PpSP FHPAAYK		1580,70	4,5045	1,9474	2,0201	2,9203	n.d.	2,4443
NpSS PpSP FHPAAYK		1660,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,8132	n.d.
ST PpSP AHPPGAR pSP PPSYLSNK		2464,10	n.d.	1,9380	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G39680	SAP domain-containing protein							
ADMDAGKGK pSP ENK		1529,67	0,9658	2,1288	0,9238	1,0303	0,6177	n.d.
AT5G09850	Transcription elongation factor (TFIIS) family protein							
FNQPGDLEPPSLIADED pSP VQK		2477,13	0,9920	6,1538	1,1118	1,0666	0,9077	1,5158
AT5G15270	RNA-binding KH domain-containing protein							
SED pSP EGEKQVTAK		1585,68	1,1566	16,7520	0,9879	1,3524	0,7692	1,9379
AT5G45510	Leucine-rich repeat (LRR) family protein							
GNPSDQESSSE pSP KK		1657,68	n.d.	n.d.	1,3111	n.d.	1,7134	1,4185

Ergebnisse - Tabelle 4: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch SA reguliert werden

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT5G52040	RS41							
VApSPENGAVR		1094,45	n.d.	2,6404	1,2674	n.d.	n.d.	n.d.
ERVApSPENGAVR		1365,64	n.d.	1,9303	0,9194	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G52200	I-2							
TPYHPoxMMDDDGSLpSPR		1915,74	1,3561	9,6443	1,5880	1,2051	0,9858	1,6757
AT5G54430	PHOS32							
IHHPPpSPR		1021,48	1,3380	1,5019	n.d.	0,9438	0,8318	n.d.
AT5G55230	MAP65-1							
ETLNRPAAPTNYVAISKEEAASSPVSGAADHQVPApSP		3814,82	0,9941	1,5663	1,2519	0,9872	0,5472	1,6208
EEAASSPVSGAADHQVPApSP		1987,85	0,9034	1,9985	1,1126	0,7881	0,5549	n.d.

Bestimmte putative Substrate von MPK3 und/oder MPK6 werden nur nach vorherigem Priming detektiert

Aus dem Vergleich der Dexamethason-Behandlung ungeprimter Pflanzen mit der Dexamethason-Behandlung geprimter Pflanzen ergeben sich putative MAP-Kinase-Substrate, die erst nach dem Priming-Stimulus messbar werden. Es handelt sich um Phosphopeptide von 25 Proteinen, die ohne Salicylsäure-Vorbehandlung nicht gemessen wurden, die nach Salicylsäure-Vorbehandlung jedoch Dexamethason-abhängig einen Anstieg der Abundanz zeigen (Tabelle 5). Die beiden „pearli4-like“-Proteine AT2G16900 und AT4G38550 sowie das „SAP domain-containing protein“ AT4G39680 und das „Guanylate-binding family protein“ AT5G46070 wurden auch ohne vorhergehendes Priming als putative Substrate der MPK3 und/oder MPK6 identifiziert (Tabelle 3), hier jedoch durch andere Phosphopeptide.

Aus dem Vergleich der Dexamethason-Behandlung geprimter *mpk6^{DD}*-Pflanzen mit ungeprimten *mpk6^{DD}*-Pflanzen lässt sich eine Liste der putativen MAP-Kinase-Substrate erstellen, die erst nach dem Priming-Stimulus spezifisch, aber nicht zwingend ausschließlich, von MPK3 phosphoryliert werden. Diese Liste umfasst neun Proteine, deren Phosphopeptidabundanz Dexamethason-abhängig nach Salicylsäure-Vorbehandlung sowohl im Wildtyp-Hintergrund als auch im *mpk6*-Hintergrund steigt. Diese Peptide sind in Tabelle 5 durch die Angabe des relativen quantitativen Wertes in der Spalte „*mpk6*-Hintergrund“ kenntlich gemacht.

Tabelle 5: Liste aller Phosphopeptide, deren Abundanz nach Dexamethason-Behandlung nur dann steigt, wenn die Pflanzen zuvor mit Salicylsäure geprimt wurden. In den beiden letzten Spalten sind die relativen quantitativen Werte für die Dexamethason-Behandlung nach Priming im Wildtyp-Hintergrund sowie im *mpk6*-Hintergrund angegeben. Peptide, bei denen im *mpk6*-Hintergrund keine Werte angegeben sind, wurden in diesen Proben nicht detektiert. Die modifizierte Peptidsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Ein kleines „p“ kennzeichnet die nachfolgende Aminosäure als phosphoryliert, ein „ox“ markiert den nachfolgenden Methioninrest als oxidiert.

ATG Code	Proteinbeschreibung		Wildtyp-Hintergrund	<i>mpk6</i> -Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da]	SA+DEX	SA+DEX
AT1G10290	ADL6			
AAAASSYSDNSGTES p SPR		1838.73	5.22	
AT1G14740	TTA1			
SNNLDGGFSSKS p SPR		1633.71	10.22	
AT1G52320	unknown protein			
VS p SPPRVPNPAlQK		1591.77	1.64	1.66
AT1G67325	Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein			
SNG p SPSRAPEENDQ		1588.55	2.18	

Ergebnisse - Tabelle 5: Liste aller Phosphopeptide, deren Abundanz nach „Priming“ und DEX steigt.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund	mpk6-Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz	Peptidmasse [Da]	SA+DEX	SA+DEX
AT1G79280	NUA		
RAP p SPGGGSSTIVTLADR	1823.90	1.60	
AT2G10950	BSD domain-containing protein		
STTGHE p TPEEGSSR	1555.62	25.10	
AT2G16900	pEARLI4-like		
TVPL p SPNSMADR	1368.61	20.38	
AT2G20960	pEARLI4		
SK p TPEPQPTYFEPSSR	1931.86	1.66	1.64
AT2G22300	SR1		
RF p SPVHELDVGQILSEAR	2135.06	2.19	2.09
AT2G38410	ENTH/VHS/GAT family protein		
DSSSIAGSS p SPIPATVSTGKSPIDEEYEEEEDEFAQLAR	4210.88	1.87	

Ergebnisse - Tabelle 5: Liste aller Phosphopeptide, deren Abundanz nach „Priming“ und DEX steigt.

ATG Code	Proteinbeschreibung		Wildtyp- Hintergrund	<i>mpk6</i> - Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da]	SA+DEX	SA+DEX
AT3G25070	RIN4			
SSGANVSGSSR p TPTHQSSR		2013.79	1.78	1.75
AT3G46640	PCL1			
GGSSGPNTSSSNNNVEEEDRVGSS p SPGSDSKK		3235.35	2.09	
AT3G48860	unknown protein			
RAG p SPVYGR		1058.45	1.50	1.84
AG p SPVYGR		887.39	1.69	
AT3G50370	unknown protein			
N P L p SPNSGQANLKR		1576.77	9.62	
AT3G53230	ATPase, AAA-type, CDC48 protein			
KRAE p SPEAoxMEEDEEEEIAEIK		2431.06	1.61	
RAE p SPEAoxMEEDEEEEIAEIK		2301.95	11.25	

ATG Code	Proteinbeschreibung		Wildtyp- Hintergrund	<i>mpk6</i> - Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz		Peptidmasse [Da]	SA+DEX	SA+DEX
AT4G11740	SAY1			
EAPVNDDDEMDIDDVIPAP QpSP LSMFNAAR		3354.46	2.14	
AT4G28080	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein			
ESGSTDGDSPTTEKDAGDSNSGL pSP KPK		2745.17	2.58	
AT4G29440	Regulator of Vps4 activity in the MVB pathway protein			
FGPLASGLENETTLPSYGS pSP PRDK		2702.27	1.73	1.85
AT4G38550	pEARLI4-like			
pSP PPSYLSNKR		1326.63	1.87	1.98
pSP PPSYLSNK		1170.53	1.93	1.73
AT4G38710	glycine-rich protein			
TLPVAVVEVVK PEpSP VLVIVEKPK		2651.54	7.59	11.89

ATG Code	Proteinbeschreibung	Wildtyp-Hintergrund	<i>mpk6</i> -Hintergrund
Modifizierte Peptidsequenz	Peptidmasse [Da]	SA+DEX	SA+DEX
AT4G39680	SAP domain-containing protein		
VPEAQITNSATPTT p TPR		1864.89	4.41
AT5G22650	HD2B		
SPVNANQ p SPK		1122.50	1.82
AT5G41950	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein		
ELLSELKSEEGDG p TPHSSASPF SR		2642.18	1.91
AT5G45510	Leucine-rich repeat (LRR) family protein		
GNPSDQESSSE p SPK		1529.58	1.94
AT5G46070	Guanylate-binding family protein		
DSPADSAS p SPR		1267.51	30.74

Diskussion

Tandem-MOAC ermöglicht die Identifizierung putativer MAP-Kinase-Substrate

MAP-Kinase-Substrate agieren als Transkriptionsfaktoren oder Enzyme häufig an zentralen Schaltstellen der Regulation von Genexpression und Biosynthesen und sind nicht einfach massenspektrometrisch nachzuweisen. Die Identifizierung bislang unbekannter putativer MAP-Kinase-Substrate durch „Shotgun“-Proteomik erfordert daher eine starke und spezifische Aktivierung der MAP-Kinasen, um nach den notwendigen Anreicherungs-schritten genügend viele Peptide der massenspektrometrischen Analyse zuführen zu können. Um eine starke und spezifische Aktivierung endogener MAP-Kinasen zu erreichen, wurden transgene Pflanzen genutzt. Diese Pflanzen exprimieren nach Zugabe von Dexamethason eine konstitutiv aktive MAP-Kinase-Kinase, die endogene MAP-Kinasen aktiviert. Obwohl diese MAP-Kinase-Kinase aus Tabak und nicht aus *Arabidopsis* stammt, akzeptiert sie mindestens die MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 als Substrate, denn sie ist den *Arabidopsis* MAP-Kinase-Kinasen MKK4 und MKK5 ortholog (Tena et al., 2001; Yang et al., 2001). Sie aktiviert MPK3 und MPK6, wie durch Aktivitätstests nachgewiesen werden kann (Ren et al., 2008). Zur Erzeugung von viel Biomasse und zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Behandlung der vollständigen Pflanzen mit Dexamethason wurde ein System mit *Arabidopsis*-Keimlingen in steriler Flüssigkultur bei Dauerlicht gewählt. Durch die Implementation eines phosphospezifischen Anreicherungs-schrittes auf Proteinebene ($\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC) in das weit verbreitete Verfahren einer einfachen Anreicherung auf Peptidebene (TiO_2 -MOAC) konnte die Sensitivität so weit erhöht werden, dass die Messung von Phosphopeptiden bekannter Substrate der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 im „Shotgun“-Proteomik-Verfahren möglich wurde. Die Anreicherung von Zellkernen aus den Versuchspflanzen ist ebenfalls geeignet, putative MAP-Kinase-Substrate anzureichern (Abbildung 3).

Die Methode der Tandem-MOAC erwies sich dabei als so erfolgreich, dass der Ansatz der Zellkernanreicherung nicht weiter verfolgt wurde.

Bekannte MAP-Kinase-Substrate

Zu den Substraten der MAP-Kinasen gehören auch Phosphatasen wie MKP1, die antagonistisch zur MAP-Kinase-Signaltransduktion wirken, was zur zellulären Kontrolle über Stärke und Dauer der Signalübertragung beiträgt. Phosphopeptide bekannter Substrate von MPK3 und MPK6 konnten durch einen einfachen TiO_2 -MOAC-Anreicherungsschritt nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wurde erst durch einen weiteren MOAC-Schritt möglich, bei dem Phosphoproteine durch die Affinität der Phosphorylgruppe zu $\text{Al}(\text{OH})_3$ angereichert werden. Durch diese Tandem-MOAC konnten Phosphopeptide bekannter Substrate von MPK3 und/oder MPK6 nachgewiesen werden, und zwar MKP1 (Park et al., 2011), PHOS32 (Merkouropoulos et al., 2008) und NIA2 (Wang et al., 2010). Die Phosphorylierungsstellen dieser Substrate wurden als spezifische Serinreste identifiziert, die sich in MAP-Kinase-Phosphorylierungsmotiven befinden und bereits zuvor von anderen Arbeitsgruppen als von MAP-Kinasen phosphorylierte Serine beschrieben wurden (Merkouropoulos et al., 2008; Wang et al., 2010; Park et al., 2011). Zudem verhindert eine Mutation des jeweiligen spezifischen Serinrestes die Phosphorylierung der betreffenden Proteine durch MPK3 bzw. MPK6 (Merkouropoulos et al., 2008; Wang et al., 2010; Park et al., 2011). In diesem Experiment wurde gezeigt, dass die MAP-Kinase-inaktivierende Phosphatase MKP1 nach Dexamethason-Induktion der *NtMEK2^{DD}* an Serin 558 im MAP-Kinase-Phosphorylierungsmotiv pSP phosphoryliert wird. Park et al. (2011) haben gezeigt, dass MKP1 durch ihr Substrat MPK6 phosphoryliert wird, was zu einer erhöhten Phosphataseaktivität führt. Ortsspezifische Mutation von Serin 558 zu Alanin verringerte die Phosphorylierung durch MPK6 und verringerte auch die Phosphataseaktivität von MKP1 *in vitro* (Park et al., 2011). *In vivo* konnte bislang allerdings keine entscheidende Rolle für Serin 558 festgestellt werden. Eine verkürzte Version von MKP1, der die letzten 243 Aminosäuren (und damit auch Serin 558) fehlen, kann den UV-B-Phänotypen der *mkp1*-Mutation komplementieren und zeigt auch die

durch UV-B hervorgerufene Mobilitätsverschiebung (González Besteiro and Ulm, 2013). Die Bedeutung der Phosphorylierung von MKP1 an Serin 558 ist demnach noch offen.

Ein weiteres publiziertes MAP-Kinase-Substrat, das in dieser Studie gefunden wurde, ist „Microtubule-associated Protein“ 65-1 (MAP65-1). Sein Phosphorylierungsstatus ändert sich nicht nach Induktion der Aktivität von MPK3 und MPK6 durch Behandlung mit Dexamethason. Da MAP65-1 als Substrat der MPK4 beschrieben ist (Sasabe et al., 2011), deckt sich dieser Befund mit der Hypothese, dass zwar MPK3 und MPK6, nicht jedoch MPK4 von *NtMEK2^{DD}* aktiviert werden.

Putative neue MPK3 / MPK6-Substrate

Zusätzlich zu bekannten MAP-Kinase-Substraten konnten putative neue Substrate von MPK3 und/oder MPK6 identifiziert werden. Darunter befinden sich Mitglieder der Phospholipase-ähnlichen Proteine der pEARLI4-Familie, ein für Pflanzen spezifisches LRR-Rezeptorprotein („Plant Intracellular Ras group-related LRR“ 9, PIRL9), zudem der generelle Transkriptionsfaktor TFIIB, NOT2/3/5 und weitere Transkriptionsfaktoren. Ebenfalls konnte „VQ motif-containing protein“ 4 / „MPK3/6-targeted VQP“ 1 (VQ4/MVQ1) identifiziert werden. Dieses Protein ist an mehreren Aminosäuren stark phosphoryliert gefunden worden, nachdem die MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 aktiviert worden waren. Kürzlich wurde VQ4 unter dem Namen MVQ1 als Substrat der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 beschrieben (Pecher et al., 2014). In dieser Studie wurde die Interaktion von VQ-Proteinen mit MPK3 und MPK6 sowie mit WRKY-Transkriptionsfaktoren untersucht. Zehn VQ-Proteine der Untergruppen I und II wurden als Interaktionspartner von MPK3 und MPK6 sowohl in Yeast-Two-Hybrid-Screens als auch bei *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten identifiziert. Ein weiteres Mitglied der VQ-Familie wurde unter dem Namen MKS1 als Substrat der MAP-Kinase MPK4 beschrieben (Andreasson et al., 2005). VQ-Proteine interagieren über das VQ-Motiv mit WRKY-Transkriptionsfaktoren der Gruppen I und IIc (Cheng et al., 2012; Pecher et al., 2014). Zu diesen Gruppen der WRKY-Proteine gehört auch WRKY33, das selbst

ebenfalls als Substrat von MPK3/6 beschrieben ist (Mao et al., 2011). Es liegt nahe zu vermuten, dass MAP-Kinase-Kaskaden direkt oder über interagierende VQ-Proteine die Expression WRKY-regulierter Gene steuern können, indem durch die Phosphorylierung von WRKY- und/oder VQ-Proteinen deren Interaktion und daraus resultierend die transkriptionsfördernden oder -hemmenden Eigenschaften der WRKY-Proteine moduliert werden.

Genaue Quantifizierung von MAP-Kinase-Substraten mittels metabolischer Markierung

Auch mit der Methode des metabolischen Markierens und der Entsalzung mit Graphit konnten bekannte MAP-Kinase-Substrate identifiziert werden, nämlich wie im markierungsfreien Ansatz PHOS32 und das homologe PHOS34, MAP65-1 sowie VQ4/MVQ1 und VQ33/MVQ3 (Pecher et al., 2014).

Die Analyse der metabolisch markierten Proteine ergab auch Kandidaten für bislang unbekannte Substrate von MPK3 und/oder MPK6: WRKY6- und NOT2/3/5-Transkriptionsfaktoren, drei Mitglieder der pEARLI4-Genfamilie, die Phosphatase „Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten“ 2 (PTEN2) und die MAP-Kinase-Kinase MKK2. WRKY6 wurde bereits mit Stressabwehr und Reaktionen auf Pathogene assoziiert (Robatzek and Somssich, 2001, 2002; Jaskiewicz et al., 2011). WRKY6 gehört zur Gruppe IIb der WRKY-Transkriptionsfaktoren, für die bisher keine Interaktion mit MPK3/6 gezeigt wurde. Die sehr stark erhöhte relative Abundanz des entsprechenden Phosphoproteins in Proben mit aktivierten MPK3 und MPK6 im Vergleich zu nicht aktivierten Proben (> 20-fach) spricht jedoch sehr für eine direkte Phosphorylierung von WRKY6 durch diese MAP-Kinasen. Der NOT2/3/5-Transkriptionsfaktor wurde ebenfalls bereits mit dem markierungsfreien Ansatz als putatives Substrat von MPK3/6 gefunden, genauso wie ein Mitglied der pEARLI4-Genfamilie. Die putativen Phospholipasen der pEARLI4-Genfamilie wurden bisher durch das namensgebende pEARLI4-Protein (AT2G20960) mit der Pathogenabwehr assoziiert (Humphry et al., 2010, hier earli4 genannt). Die Funktionsverlustmutante zeigt eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Golovinomyces orontii*, dem Erreger des Echten Mehltaus

bei *Arabidopsis*, und gegenüber *Erysiphe pisi*, dem Erreger des Echten Mehltaus bei der Erbse (*Pisum sativum*). Auch einige Mitglieder der pEARLI4-Familie wurden durch eine bioinformatische Studie zur Koregulation mit Pathogenabwehr in Verbindung gebracht, nämlich AT2G16900, AT4G38550 und AT4G38560 (Heyndrickx and Vandepoele, 2012), jedoch liegen dazu noch keine experimentellen Befunde vor. Die drei hier gefundenen pEARLI4-ähnlichen Proteine weisen durch eine starke Phosphorylierung nach Behandlung mit Dexamethason darauf hin, dass diese Proteinfamilie über MPK3/6 an der Pathogenabwehr beteiligt sein könnte. PTEN2 ist eine Phosphatase mit zweifacher Spezifität, d.h. sie kann sowohl phosphorylierte Serin- und Threoninreste als auch Tyrosinreste dephosphorylieren und kommt somit theoretisch in Frage, MAP-Kinasen zu inaktivieren. Eine Phosphataseaktivität wurde experimentell bislang nicht für MAP-Kinasen, sondern für Phosphatidylinositolphosphate und für Phosphotyrosin in Peptiden belegt (Pribat et al., 2012). Mit dieser Phosphatase als MAP-Kinase-Substrat ergibt sich eine Möglichkeit zur Kommunikation zwischen MAP-Kinase-Signalwegen und Phosphatidylinositolphosphat-Signalwegen. Solche Kommunikationsmöglichkeiten sind essentiell zur Aufrechterhaltung der Spezifität der Signaltransduktion, weil sie dazu beitragen können, dass andere Kaskaden, die mit-induziert wurden, wieder abgeschaltet werden. Eine solche Möglichkeit innerhalb der MAP-Kinase-Kaskaden bietet die Tatsache, dass in dieser Studie auch die MKK2 als Substrat der MPK3 und/oder MPK6 identifiziert wurde. Die MKK2 ist zusammen mit MKK1 die Kinase, die MPK4 aktiviert (Gao et al., 2008). Da MPK4 ebenfalls in der Stressantwort der Pflanze involviert ist, jedoch einen hemmenden Einfluss auf den Salicylsäure-Signalweg hat (Gao et al., 2008), kann man spekulieren, dass eine Phosphorylierung der MKK2 durch die auf Salicylsäure ansprechenden MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 eine Ko-aktivierung der MPK4 verhindern soll. Ein ähnliches System ist vor kurzem bei Mäusen beschrieben worden (Catalanotti et al., 2009). Allerdings hemmt hier die Phosphorylierung durch die MAP-Kinase ihre eigene aktivierende MAP-Kinase-Kinase, es handelt sich also um eine klassische Rückkopplungshemmung. Eine direkte Kommunikation zwischen den Komponenten zweier MAP-Kinase-Kaskaden ist eine

sehr direkte und einfache Methode, unerwünschte Nebenaktivierungen zu unterbinden und die Spezifität der zellulären Reaktion zu gewährleisten.

Putative geprimte MPK3/MPK6-Substrate

Einige Phosphopeptide konnten erst erfasst werden, wenn der Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 eine Behandlung mit Salicylsäure vorausgeht. Darunter befinden sich Peptide von pEARLI4 und seinem Homolog AT2G16900, von „Cell Division Cycle“ 48 (CDC48), RIN4, SR1, dem LRR-Protein AT5G45510 und der „Histone Deacetylase“ 2B (HD2B). Die Mitglieder der pEARLI4-Genfamilie wurden bereits ohne Salicylsäure-Vorbehandlung als mögliche Substrate von MPK3 und/oder MPK6 identifiziert. Das Protein CDC48, das einen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung der Pflanze, insbesondere auf Zellteilung und Differenzierung, hat (Park et al., 2008), wird auch mit dem Abbau des Movement-Proteins des Tabak-Mosaikvirus TMV in Verbindung gebracht (Niehl et al., 2012), was wiederum im Zusammenhang mit Pathogenabwehr zu sehen ist. Das in dieser Dissertation identifizierte CDC48B ist die transkriptionell am stärksten auf Stressstimuli reagierende Isoform (Niehl et al., 2012). Um die PTI zu unterdrücken, geben Pathogene Effektoren an die Pflanzenzelle ab, welche die Signalkaskaden unterbrechen. HopAI1 aus dem Bakterium *Pseudomonas syringae* dephosphoryliert MPK3 am Threoninrest des Aktivierungsmotivs irreversibel, wodurch die Kinase dauerhaft inaktiviert wird (Li et al., 2007). Solche Effektoren können entweder direkt durch R-Proteine erkannt werden (Gen-für-Gen-Resistenz), oder die Folgen ihrer Aktivität werden wahrgenommen (Guard-Hypothese). In beiden Fällen werden die Abwehrreaktionen trotz Unterdrückung der PTI wieder eingeschaltet und es kommt zur Ausbildung der ETI. RIN4 ist ein klassisches Beispiel für die Guard-Hypothese bei der pflanzlichen Pathogenabwehr. Wird RIN4 von AvrRpt2 gespalten, so unterdrücken die Spaltungsprodukte offenbar neben der PTI auch die RPM1-gesteuerte ETI im Zusammenspiel mit NDR1 (Kim et al., 2005; Afzal et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor, der die Expression von NDR1 reguliert, bestimmt auch die Expression des Abwehrgens *EDS1* und des MAP-Kinase-Substrats EIN3. Es handelt sich um SR1 [synonym

CAMTA3 (Du et al., 2009; Nie et al., 2012)], der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als putatives MAP-Kinase-Substrat identifiziert wurde. Zusätzlich zu seiner Rolle in der Pathogenabwehr reagiert SR1 auch auf abiotischen Stress, nämlich Kälte (Kim et al., 2013). Außerdem reprimiert SR1 bei warmen Temperaturen die Biosynthese von Salicylsäure (Kim et al., 2013). Kälte aktiviert neben MPK4 auch MPK6 und höchst wahrscheinlich MPK3 (Ichimura et al., 2000). Diese MAP-Kinasen könnten die Transkription von Kälte-induzierten Genen über SR1 regulieren. Bei warmen Temperaturen wiederum könnten die am Priming beteiligten MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 die Repression der Salicylsäure-Biosynthese durch SR1 unterbinden. Das LRR-Protein AT5G45510 könnte als putatives Rezeptorprotein eine Rolle in der Erkennung von Pathogenen und/oder ihren Auswirkungen auf pflanzeigene Strukturen spielen. HD2B schließlich ist eine Histon-Deacetylase, die eine Rolle in der Modifikation von Chromatin spielt. Chromatinmodifikationen sind wichtig zur epigenetischen Kontrolle der Genregulation und spielen auch eine Rolle im Zusammenhang mit dem Priming der Abwehrreaktionen (Jaskiewicz et al., 2011). Dabei werden Acetylierungen von Histonen mit exprimierbaren Genen in Verbindung gebracht, und die Aktivität von Histon-Deacetylasen wird mit der Repression der Gentranskription assoziiert (Eberharter and Becker, 2002; Wu et al., 2000, 2003). Die für Pflanzen spezifischen Histon-Deacetylasen der HD2-Unterfamilie wurden bereits als Phosphoproteine beschrieben (Lusser et al., 1997; Reiland et al., 2009; Mayank et al., 2012; Meyer et al., 2012; Bi et al., 2011), und die Phosphorylierung von Histon-Deacetylasen wurde mit ihrer Aktivität in Verbindung gebracht (Grozingler and Schreiber, 2000; Pflum et al., 2001). Die bei Grozingler und Pflum behandelten Histon-Deacetylasen sind zwar humanen Ursprungs und auf Sequenzebene nicht mit den pflanzenspezifischen HD2-Histon-Deacetylasen verwandt; dennoch wäre ein Mechanismus, der von MAP-Kinase-Signaltransduktion über Chromatinmodifikation zu veränderter Genexpression führt, denkbar. Dabei könnte die Phosphorylierung von Histon-Deacetylase HD2B ihre intrazelluläre Lokalisation und damit ihren Einfluss auf die Genexpression verändern oder die Aktivität der Deacetylase direkt beeinflussen. Diese Mechanismen könnten dann zur Aktivierung von Abwehrgenen

beitragen oder zur Repression von Genen, die bei der Aktivierung von MPK3 und/oder MPK6 herunterreguliert werden.

Putative geprimte Substrate, die mindestens von MPK3 phosphoryliert werden

Von den geprimten Phosphopeptiden werden einige auch im *mpk6^{DD}*-Hintergrund reguliert. Die zugehörigen Proteine stellen putative geprimte Substrate dar, die spezifisch, aber nicht unbedingt ausschließlich, von MPK3 phosphoryliert werden. Es sind dies unter anderem pEARLI4 und das verwandte AT4G38550, RIN4, SR1 und das LRR-Protein AT5G45510.

Die vorliegende Arbeit hat viele Proteine aufgrund der verstärkten Phosphorylierung an einem S/T-P-Motiv nach Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 als putative Substrate dieser Kinasen identifiziert. Zukünftige Arbeiten werden zeigen müssen, ob sich diese Vermutung halten lässt. Dazu muss die identifizierte Phosphorylierungsstelle bestätigt werden, etwa durch Aminosäureaustausch und *in-vitro*-Kinase-Assays. Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung liegt ebenfalls noch im Dunkeln. Hier werden Analysen von Funktionsverlustmutanten, Komplementationstudien und Lokalisationsstudien zeigen, welche Rolle die Phosphorylierung des jeweiligen Kandidatenproteins bei Prozessen wie Pathogenabwehr, Stressreaktion, Wachstum und Entwicklung spielen. Auch die direkte Interaktion der putativen Substrate mit den MAP-Kinasen MPK3 und/oder MPK6 sowie eventuell weiteren Kinasen muss noch gezeigt werden, z.B. durch *Yeast Two Hybrid*-Versuche, Co-Immunopräzipitation oder bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC). Die Methode der Tandem-MOAC reichert Phosphoproteine mit geringer Abundanz stark genug an für ihre Identifizierung durch Massenspektrometrie und ist damit auch zur Entdeckung von Kandidaten für Substrate anderer Kinasen geeignet.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

Als Versuchspflanzen wurden transgene *Arabidopsis thaliana* Col-0 verwendet, die mit der codierenden Sequenz für die MEK2 aus *Nicotiana tabacum* transformiert wurden. Die Sequenz ist so verändert, dass im translatierten Protein die Aminosäurereste T-227 und S-233 durch Asparaginsäure ersetzt sind. Die Expression dieses Proteins wird durch den Promotor GVG gesteuert und kann durch die Zugabe von DEX induziert werden (WT^{DD}). Es wurden auch Pflanzen verwendet, bei denen zusätzlich das Gen für MPK6 durch T-DNA-Insertionen ausgeschaltet wurden (*mpk6*^{DD}). Zur Anzucht in Flüssigkultur wurden Samen oberflächensterilisiert. 50 ml 1/4 MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962) in 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit je ca. 250 Samen inokuliert. Die Kolben wurden für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert, um eine gleichzeitige Keimung zu gewährleisten. Danach wurden sie in einen Lichtschrank überführt, wo sie bei 22°C und Dauerlicht mit einer Intensität von ca. 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ohne Schütteln inkubiert wurden. Alle Salicylsäure-Vorbehandlungen erfolgten am zehnten Tag im Licht. Die Induktion der Expression des Transgens erfolgte am zwölften Tag im Licht.

Wachstumsmedien

Alle *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in steriler Flüssigkultur angezogen. Im Falle der Experimente ohne ¹⁵N-Markierung wurde ein Murashige und Skoog-Medium inkl. modifizierter Vitamine von Duchefa (M0245) verwendet. Dieses Medium wurde in 1/4 der Konzentration der Publikation von Murashige und Skoog verwendet, nämlich mit 1,1 g/l. Es wurde zusätzlich mit 2,5 g/l Saccharose versetzt und der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 5,7 eingestellt. Im Falle der Experimente mit ¹⁵N-Markierung wurde das Medium in der gleichen Zusammensetzung aus den Einzelkomponenten angesetzt, für die Mikronährstoffe wurde eine Fertigmischung der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Die Vitaminmischung wurde aus den Einzelvitaminen angesetzt, wobei auf Glycin, wie es in dem Produkt von Duchefa vorkommt, verzichtet

wurde, um die Effizienz der Markierung mit ^{15}N zu erhöhen. Als ^{15}N -enthaltende Stickstoffquellen wurden K^{15}NO_3 und $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ der Firma eurisotop verwendet, für die ^{15}N -Gehalte von 99% bzw. 98%+ angegeben werden. Auch bei diesen Medien wurde der pH-Wert auf 5,7 eingestellt. Jeweils 50 ml wurden in 250 ml-Erlenmeyerkolben gegeben, diese mit Aluminiumfolie verschlossen und autoklaviert.

Oberflächensterilisierung von Samen von *Arabidopsis thaliana*

Um *Arabidopsis*-Pflanzen unter sterilen Bedingungen anziehen zu können, wurden die Samen oberflächensterilisiert. Dazu wurden die Samen mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol versetzt und für 15 Minuten über Kopf drehend inkubiert. Anschließend wurden die Samen dreimal mit je 1 ml reinem Ethanol gewaschen und in der Sterilbank auf Filterpapier luftgetrocknet. Die trockenen Samen wurden dann in 0,15 % (w/v) Select Agar suspendiert zu ca. einem Samen pro Mikroliter.

Behandlung mit Salicylsäure

Als Priming-Stimulus wurde der Flüssigkultur von *Arabidopsis* Salicylsäure mit einer Endkonzentration von 200 μM zugesetzt, indem 50 μl einer 200 mM Stammlösung von Salicylsäure mit einem pH-Wert von 5,7 zugefügt wurden. Als Kontrollbehandlung wurden 50 μl ddH₂O zugesetzt. Zwei Tage später wurden die Pflanzen entweder mit DEX bzw. Kontroll-behandelt oder sofort geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Induktion der Expression der *NtMEK2*^{DD}

Zur Induktion der Expression von *NtMEK2*^{DD} wurde dem Medium mit den Keimlingen Dexamethason (DEX) mit einer Endkonzentration von 1 μM zugesetzt, indem 5 μl einer 10 mM Stammlösung von DEX in Ethanol zugefügt wurden. Als Kontrollbehandlung wurden 5 μl reines Ethanol zugesetzt. Sechs Stunden nach dieser Behandlung wurden die Pflanzen geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Gesamtproteinextraktion

Das Pflanzengewebe wurde in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. 15 ml Pflanzenpulver wurden in einem 50 ml Falcongefäß zweimal mit 30 ml 100 % Aceton gewaschen und in einer Zentrifuge mit Ausschwenkrotor für 5 Minuten bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml 10 % (w/v) TCA in Aceton resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C in einem Eiswasser-Ultraschallbad behandelt. Nach einer Zentrifugation wie oben beschrieben wurde das Pellet zweimal mit 30 ml 10 % (w/v) TCA in Aceton gewaschen, einmal mit 30 ml 10 % (w/v) TCA in Wasser und zweimal mit 10 ml eiskaltem 80 % (v/v) Aceton. Der Überstand wurde vollständig verworfen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur in 24 ml frisch angesetztem dichtem SDS-Puffer resuspendiert (100 mM TRIS-HCl pH 8,0; 30 % (w/v) Saccharose; 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol). Ein Volumen (24 ml) TRIS-gepuffertes Phenol (pH 8,0) wurde zugefügt. Die Proben wurden gründlich gemischt und für 15 Minuten bei 4000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere phenolische Phase wurde in ein 175 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Die Proteine wurden durch Zugabe von fünf Volumen (ca. 100 ml) eiskaltem 100 mM Ammoniumacetat in Methanol und Inkubation für eine Stunde bei -20 °C gefällt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 7500 Upm und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 10 ml 100 mM Ammoniumacetat in Methanol und zweimal mit 10 ml 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das trockene Proteinpellet wurde bei -20° C gelagert.

Kolorimetrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976)

Es wurde eine Kalibration mit Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt. Die lineare Regression für den Standard in IB/A ergab folgende Gleichung:

$$E_{595\text{nm}} = 0,0406 \cdot c_{\text{Protein}}$$

Für den Standard in 8 M Harnstoff, 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat wurde folgende Gleichung ermittelt:

$$E_{595\text{nm}} = 0,0446 \cdot c_{\text{Protein}}$$

Der Standard in 20 mM TRIS-HCl pH 8,0 ergab die Gleichung:

$$E_{595\text{nm}} = 0,1128 \cdot c_{\text{Protein}}$$

Dabei steht $E_{595\text{nm}}$ für die Extinktion bei 595 nm Wellenlänge und c_{Protein} für die Konzentration des Proteins in der Probe.

Im Fall der Proteinkonzentrationsbestimmung in IB/A wurde 1 µl der Probe mit 1 ml Bio-Rad® Quick Start™ Bradford-Reagenz gemischt. Im Fall der Proteinkonzentrationsbestimmung in 8 M Harnstoff, 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat wurde 1 µl der Probe mit 8 M Harnstoff, 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat auf 100 µl gebracht und mit 1 ml Bio-Rad® Quick Start™ Bradford-Reagenz gemischt. Für die Konzentrationsbestimmung in 20 mM TRIS-HCl pH 8,0 wurden 2 µl der Probe mit 1 ml Bio-Rad® Quick Start™ Bradford-Reagenz gemischt. In allen Fällen wurden diese Lösungen mit einem Vortexmischer durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Probe bei 595 nm wurde mit einem Spektrophotometer bestimmt. Dieser Wert wurde zur Berechnung der Proteinkonzentration durch Einsetzen in die entsprechende Gleichung verwendet.

Anreicherung von Zellkernen

Die Methode zur Anreicherung von Zellkernen wurde nach dem Protokoll von Busk und Pagès angewendet (Busk and Pagès, 1997). Zwölf Tage alte Keimlinge aus der Flüssigkultur wurden in flüssigem

Stickstoff zu einem feinen, weißen Pulver zerrieben. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. 500 mg Pflanzenpulver wurden in ein 15 ml Falcongefäß überführt und mit 5 ml Puffer A (10 mM HEPES pH 7,8; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 250 mM Saccharose; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 10 mM Na₃VO₄; 10 mM NaF; 50 mM β-Glycerolphosphat; 5 µg ml⁻¹ Antipain; 5 µg ml⁻¹ Aprotinin; 5 µg ml⁻¹ Leupeptin) gemischt. Das Homogenisat wurde in eine Filtereinheit übertragen. Die Filtereinheit bestand aus einem Rundbodengefäß (Sarstedt), dessen Boden entfernt worden war und das in ein gekürztes 15 ml Falcongefäß gesteckt worden war. Zwischen den beiden Gefäßen befanden sich drei Lagen Miracloth (Calbiochem®). Diese Filtereinheit wurde 15 Minuten lang mit 3000 g zentrifugiert, um die Probe zu filtern und die Zellkerne zu pelletieren. Das Pellet wurde in 2 ml Puffer A resuspendiert und erneut zehn Minuten lang mit 2000 g zentrifugiert.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung eines Mini-Gels (12 % Acrylamid, 1 mm Dicke):

Trenngel:

1,685 ml	ddH ₂ O	
1,6215 ml	1,25 M	Bis(2-hydroxyethyl)amino-
		tris(hydroxymethyl)methan (BisTris) pH 6,5-6,8 mit HCl
2,3435 ml	30 % Acrylamid	
22,5 µl	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	
2,25 µl	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	

Sammelgel:

1,421 ml	ddH ₂ O
700 µl	1,25 M BisTris pH 6,5-6,8 mit HCl
329 µl	30 % Acrylamid
10,5 µl	10 % (w/v) APS
4,9 µl	TEMED

Die Komponenten wurden gemischt und das Trenngel wurde zwischen die beiden Glasplatten einer Bio-Rad® Gelgießstation gegossen. Das Gel wurde mit BisTris-gesättigtem Butanol beschichtet, um eine gerade Oberkante zu gewährleisten. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Butanol abgegossen und die Geloberkante dreimal mit ddH₂O gewaschen. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Kamm sofort eingesetzt. Proteinproben wurden in einem angemessenen Volumen LDS-Ladepuffer (25 Volumen-% 4x Probenpuffer, 10 Volumen-% 10x Reduktionmittel, bis zu 65 Volumen-% ddH₂O – Invitrogen NuPAGE® „LDS sample preparation buffer“) aufgenommen. Das Gel wurde mit 15 µl Proteinprobe pro Spur und 5 µl Proteinmarker-Lösung (Pink Prestained Protein Marker – NIPPON Genetics EUROPE GmbH) beladen.

Die Elektrophorese fand in einer Bio-Rad® Elektrophorese-Kammer bei 200 V für eine Stunde bei Raumtemperatur in MES Laufpuffer (250 mM MES; 250 mM Tris; 5 mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS) statt.

Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran („Western Blotting“)

Unter Transfer-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) wurden zwei Schichten Whatman-Papier, das Gel, eine Nitrocellulosemembran und zwei weitere Schichten Whatman-Papier gestapelt. Dieser Stapel wurde in eine Bio-Rad® Blot-Kammer überführt. Die Blot-Kammer wurde mit Transfer-Puffer gefüllt, ein magnetischer Rührfisch und ein Kühlelement zugefügt. Die Proteine

wurden für eine Stunde bei 250 mA unter Rühren des Puffers auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

Immunodetektion

Nitrocellulosemembranen wurden durch Inkubation in Block-Lösung (3 % (w/v) fettfreies Milchpulver in TBST [20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20]) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde dreimal für je fünf Minuten mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Membran befand sich dazu in einer Lösung aus 5 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in TBST und Antikörperlösung 1:3800. Nachdem die Antikörperlösung abgeschüttet worden war, wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Zur Detektion des ersten Antikörpers wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Lösung mit dem zweiten Antikörper inkubiert (anti-rabbit 1:2000 in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST). Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Membran zweimal mit TBST und einmal mit TBS (20 mM Tris, 140 mM NaCl) gewaschen. Für den dritten Waschschrift wurde immer TBS verwendet, um verbliebenes Tween-20 zu entfernen. Der zweite Antikörper, der an eine Rettich-Peroxidase gekoppelt ist, wird durch Chemilumineszenz von Luminol in der Anwesenheit von H₂O₂ mit einem Chemilumineszenz-Detektor (Fujifilm LAS-1000) sichtbar gemacht.

Al(OH)₃-Metalloxid/-hydroxid-Affinitätschromatographie (Al(OH)₃-MOAC) zur Phosphoproteinanreicherung (Röhrig et al., 2008)

Proteine aus der Gesamtproteinextraktion wurden über Nacht in 3 ml Incubation Buffer Part A (IB/A: 30 mM MES-HCl pH 6,1; 0,25 % (w/v) CHAPS; 7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff) gelöst, indem sie über Kopf drehend bei 10 °C inkubiert wurden. 1 µl wurde für eine Konzentrationsbestimmung verwendet. 36 mg Protein wurden mit IB/A auf eine Konzentration von 3 mg ml⁻¹ eingestellt. Zwei Volumen Incubation Buffer Part B (IB/B: 30 mM MES-HCl pH 6,1; 0,25 % (w/v)

CHAPS; 8 M Harnstoff; 0,2 M Natriumglutamat; 0,2 M Kaliumaspartat; 30 mM Imidazol) wurden zugefügt, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 1 mg ml^{-1} vorlag. 2,88 g Al(OH)_3 wurden in einem Rundbodengefäß zweimal mit 36 ml Incubation Buffer 150 (ein Volumen IB/A mit zwei Volumina IB/B gemischt) nach folgendem Schema gewaschen: Das Al(OH)_3 wurde suspendiert, für 3 Minuten bei 4000 Upm bei 10°C mit einem Ausschwenkrotor zentrifugiert, und der Überstand wurde abgenommen. Die Proteinlösung wurde für 10 Minuten bei 7500 *g* bei 10°C in einem 50 ml Falcon-Gefäß zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in das Rundbodengefäß mit dem gewaschenen Al(OH)_3 überführt. Diese Suspension wurde eine Stunde bei 10°C über Kopf drehend inkubiert, um die Phosphoproteine an das Al(OH)_3 zu binden. Das Al(OH)_3 wurde sechsmal wie oben beschrieben mit je 36 ml Incubation Buffer 200 (IB200: 30 mM MES-HCl pH 6,1; 0,25 % (w/v) CHAPS; 8 M Harnstoff; 0,2 M Natriumglutamat; 0,2 M Kaliumaspartat; 20 mM Imidazol) gewaschen. Der Überstand des letzten Waschschriffs wurde komplett abgenommen. Das Pellet wurde mit 24 ml Elution Buffer (200 mM Kaliumpyrophosphat pH 9,0; 8 M Harnstoff) versetzt, resuspendiert und 30 Minuten über Kopf drehend bei Raumtemperatur inkubiert, um die Phosphoproteine zu eluieren. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten mit 4000 Upm bei Raumtemperatur wurde das Eluat in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und erneut für 10 Minuten mit 4000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Amicon® (Millipore) Filtereinheit (10 kDa Ausschlussgröße) überführt und so lange mit 4000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert, bis das Volumen ca. 250 μl betrug. Dieses Volumen wurde in ein 1,5 ml Protein LoBind-Gefäß überführt, 1 ml ddH₂O und 12,5 μl 2 % (w/v) DOC-Lösung zugefügt, gründlich gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden 125 μl 100 % (w/v) TCA-Lösung zugegeben, gründlich gemischt und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten mit 14000 *g* bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml eiskalter 25 % (w/v) TCA-Lösung und einmal mit 1 ml eiskaltem 80 % (v/v) Aceton, 20 % (v/v) TRIS-HCl (50 mM, pH 7,5) gewaschen. Nach Zentrifugation wie

oben beschrieben wurde der Überstand komplett abgenommen und das trockene Pellet bei -20 °C gelagert.

Verdau mit Trypsin

Die durch die $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC angereicherten Phosphoproteine wurden in 400 μl 8 M Harnstoff, 100 mM NH_4HCO_3 gelöst. 1 μl wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung (s. Abschnitt 0) verwendet. 500 μg Protein wurden 1:1 mit 20 % (v/v) Acetonitril, 100 mM NH_4HCO_3 verdünnt. Diese Lösung wurde erneut 1:1 verdünnt mit 10 % (v/v) Acetonitril, 25 mM NH_4HCO_3 . Es wurden 15 μl immobilisiertes Trypsin zugefügt und die Probe über Nacht bei 37 °C mit 1500 Upm im Dunkeln inkubiert.

Entsalzung

mit C18 Chromatographie

Die 96 well-Festphasenextraktionsplatte wurde zweimal mit 400 μl Methanol und viermal mit 400 μl ddH₂O gewaschen. Die verdaute Proteinprobe wurde in 500 μl -Schritten aufgeladen, die je 1 Minute inkubiert wurden. Die Probe wurde viermal mit 400 μl ddH₂O gewaschen. Die entsalzten Peptide wurden mit zweimal 200 μl Methanol nach je fünfminütiger Inkubation in eine Protein LoBind 96 well-Platte eluiert, mit einer Glas-Pasteurpipette in 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäße überführt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

mit Graphit

50 mg Graphit wurden in Mobicol Zentrifugensäulen gefüllt. Die Peptide aus dem Verdau wurden mit TFA in einer Endkonzentration von 1,25 % (v/v) versetzt. Das Graphit wurde zweimal mit 500 μl 1 M Ammoniaklösung gewaschen und jeweils für 1 Minute mit 2000 *g* zentrifugiert. Die Aktivierung des Graphits erfolgte mit 500 μl Acetonitril, gefolgt von zwei Waschschritten mit je 500 μl 1 % (v/v) TFA. Die Peptide wurden zum Graphit gegeben und 10 Minuten unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Nach Zentrifugation für 3 Minuten mit 1000 *g* wurde das Graphit zweimal mit 500 μl 1 % (v/v) TFA gewaschen. Zur Elution der Peptide wurde das Graphit viermal mit 200 μl 0,1 % (v/v) Ameisensäure in 50 % (v/v) Acetonitril gewaschen

und der Durchfluss in einem 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäß vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Phosphopeptidanreicherung durch TiO₂-MOAC

Die entsalzten Peptide wurden in 100 µl einer mit Phthalsäure gesättigten Lösung von 50 % (v/v) Acetonitril, 2,5 % (v/v) TFA in ddH₂O gelöst. 12,5 mg TiO₂ wurden in Mobicol Zentrifugensäulen (MoBiTec) gefüllt. Das TiO₂ wurde mit 250 µl der mit Phthalsäure gesättigten Lösung von 50 % (v/v) Acetonitril, 2,5 % (v/v) TFA für 5 Minuten äquilibriert und mit 700 g für 2 Minuten abzentrifugiert. Die gelösten Peptide wurden mit 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde in die Zentrifugensäule mit dem äquilibrierten TiO₂ überführt und 15 Minuten über Kopf drehend inkubiert. Nach Zentrifugation wie oben beschrieben wurde das TiO₂ zweimal mit 250 µl der mit Phthalsäure gesättigten Lösung von 50 % (v/v) Acetonitril, 2,5 % (v/v) TFA gewaschen sowie zweimal mit 250 µl 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA und zweimal mit 250 µl 0,1 % (v/v) TFA. Zur Elution der Phosphopeptide wurden 100 µl 5 % Ammoniaklösung zum TiO₂ gegeben und 5 Minuten über Kopf drehend inkubiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation wie oben beschrieben in einem 1,5 ml Protein LoBind Reaktionsgefäß gesammelt. Die eluierten Peptide wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die trockenen Peptide wurden auf Trockeneis an den Kooperationspartner zur massenspektrometrischen Analyse verschickt.

Nano-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

markierungsfrei

Peptide wurden in 8 µl 5 % (v/v) Acetonitril, 0,5 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O gelöst und 10 Minuten mit 21400 g bei 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren. 5 µl hiervon wurden in ein Eksigent nano LC Flüssigchromatographiesystem (Thermo Scientific) injiziert. Für die Chromatographie wurde eine Chromolith CapRod-Säule mit einer Länge von 150 mm und einem Innendurchmesser von 0,1 mm und C18 als stationärer Phase verwendet. Die mobilen Phasen

bestanden aus 0,1 % (v/v) Ameisensäure und 90 % (v/v) Acetonitril in ddH₂O; 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O. Die Peptide wurden durch einen Gradienten von 10 % auf 35 % organischer Phase in 120 Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 500 nl Minute⁻¹ aufgetrennt und von der Säule direkt in eine Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI-Quelle) eluiert und per Elektrospray in ein LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (ThermoElectron) eingebracht. Die Spannung an der Ionenquelle wurde so gewählt, dass die Stromstärke unter 0,5 µA lag (1,5 bis 2 kV). Die Kapillartemperatur betrug 170 °C. Eine datenabhängige Analyse wurde durchgeführt, bei der im OrbiTrap Massenanalysator Massenspektren der gesamten Ionenpopulation in vollständigen Scans mit hoher Präzision aufgenommen wurden. Tandem-Massenspektren der fünf Ionen mit der höchsten Intensität wurden nach kollisionsinduzierter Dissoziation (CID, engl.: *collision-induced dissociation*) mit dem linearen Triple-Quadrupol (LTQ) Massenanalysator aufgenommen. Die automatische Anstiegskontrolle (AGC, engl.: *automatic gain control*) für die Aufnahme vollständiger Scans in der OrbiTrap wurde auf 5e+05 eingestellt. Die maximale Injektionszeit wurde auf 500 ms gesetzt und die Injektionskurvenform wurde freigegeben. Die Massenspektren aus den vollständigen Scans wurden in Echtzeit intern mit Referenzverbindungen kalibriert, um einen durchschnittlichen Massenfehler von weniger als 1 ppm zu erreichen. Die Ausschlussdauer für die datenabhängige Auswahl von MS/MS Vorläuferionen wurde auf 30 s festgelegt und die Ausschlussbreite auf ± 10 ppm. Das Screening nach dem Ladungszustand der Ionen wurde freigegeben und einfach geladene Ionen von der Aufnahme von MS/MS-Spektren ausgeschlossen. PseudoMS3 wurde mit einer Neutralfragment-Massenliste von 293,91; 195,94; 97,97; 48,999; 32,66 und 24,49 Da freigegeben. Die AGC für die Aufnahme der MS/MS-Spektren im LTQ wurde auf 3e+04 eingestellt, die maximale Injektionszeit auf 100 ms. Pro MS/MS-Spektrum wurden drei Mikroskans aufgenommen.

metabolisch ¹⁵N-markiert

Ein EASY-nLCII Flüssigchromatographiesystem gekoppelt an ein Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer, beide Systeme von Thermo

Fisher Scientific, wurde verwendet. Die Peptide wurden in 8 μ l 5 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation mit 14000 *g* für 10 Minuten pelletiert. Der klare Überstand wurde möglichst vollständig in einen LC-Autosampler-Probenbehälter überführt. Die Chromatographiesäule wurde mit zwei Volumenäquivalenten der wässrigen mobilen Phase äquilibriert. 6 μ l Peptidlösung wurden injiziert. Es wurde C18 als stationäre und 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O und 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril als mobile Phase zur Trennung von Phosphopeptiden durch Gradientenelution verwendet. Der lineare Gradient reichte von 5 % bis 35 % organischem Lösemittelgehalt in der mobilen Phase innerhalb von 180 Minuten und einer Flussrate von 300 nl Minute⁻¹. In datenabhängiger Analyse wurden die 20 intensivsten Ionen der gesamten Ionenpopulation eines hoch-aufgelösten Scans mit genauer Massenbestimmung im Orbitrap Massenanalysator mit 2 Th Abweichung im LTQ isoliert und einer kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) zugeführt. Die Fragmentationen wurden dann in MS/MS-Spektren mit geringer Auflösung aufgenommen. Die automatische Anstiegskontrolle (AGC) war auf 1e+06 eingestellt. Die maximale Injektionszeit (max IT) war auf 500 ms eingestellt und Injektionskurvenformen wurden freigegeben. Die Massenspektren aus den vollständigen Scans wurden in Echtzeit intern mit Referenzverbindungen kalibriert, um einen durchschnittlichen Massenfehler von weniger als 1 ppm zu erreichen. Die Anzahl der Wiederholungen wurde auf 1 eingestellt, die Dauer der Wiederholung auf 30 s und die Ausschlussdauer für die datenabhängige Auswahl von MS/MS Vorläuferionen wurde auf 30 s eingestellt. Die Ausschlussbreite betrug $\pm$ 10 ppm. Die Überprüfung des Ladungszustandes war aktiviert und einfach geladene Ionen wurden von der CID Fragmentierung ausgeschlossen. PseudoMS3 wurde mit einer Neutralfragment-Massenliste von 293,91; 195,94; 97,97; 48,999; 32,66 und 24,49 Da freigegeben, um verknüpfte MS/MS-Spektren zu erstellen, die Fragmente des Peptidrückgrats enthalten, wenn die ursprüngliche CID zur Abspaltung der Phosphorylgruppe geführt hatte. Die AGC für die Aufnahme der MS/MS-Spektren im LTQ wurde auf 1e+04 eingestellt, die maximale

Injektionszeit auf 200 ms. Pro MS/MS-Spektrum wurde ein Mikroscan aufgenommen.

Peptididentifizierung

markierungsfrei

Zur datenbankabhängigen Peptid- und Proteinidentifizierung und zur Bestimmung der Phosphorylierungsstelle wurden folgende Softwares verwendet: Proteome Discoverer Version 1.3 in Kombination mit Windows 7 verwendet den SEQUEST Algorithmus (im Folgenden abgekürzt als PD) und Max-Quant Version 1.2.2.5. in Kombination mit Windows Vista (fortan MQ). Bei PD wurde der Grenzwert für die Intensität auf 0 gesetzt und die Minimalzahl der registrierten Ionen auf 1. Für die Erstellung der Peak-Listen aus den MS/MS-Spektren wurde der Grenzwert für das Verhältnis von Signal zu Hintergrund auf 2 eingestellt. Die Toleranz für die Massenabweichung bei den MS/MS-Vorläuferionen wurde auf 7 ppm, bei den MS/MS-Fragmenten auf 0,4 Da gesetzt. Den b- und y-Ionen wurde das höchste Gewicht zugeteilt und die a-, c-, x- und z-Ionenreihen wurden für die Berechnung der Peptidsequenzen abgelehnt. Als variable Modifikationen wurden die Oxidation von Methionin und die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin zugelassen. Die Peak-Listen wurden verwendet, um sie mit der TAIR10 Datenbank abzugleichen, zu der die Sequenzen für modifiziertes Trypsin aus Schwein und für häufige kontaminierende Substanzen wie verschiedene Keratine hinzugefügt worden waren (35394 Sequenzen, 13419867 Aminosäuren). Als Enzym wurde Trypsin gewählt mit Toleranz zweier ausgelassener Spaltungen. Eine Rate für die Falschidentifizierung wurde errechnet, indem die Listen gegen eine Datenbank abgeglichen wurden, die alle Sequenzen in umgekehrter Reihenfolge enthielt. Übereinstimmungen im Peptidspektrum (fortan PSM von engl.: peptide spectrum match) mit einem q-Wert $<0,05$ wurden nicht verworfen. Ein q-Wert $<0,05$ entspricht einem korrigierten Signifikanz-Grenzwert von 0,05 bei Verwendung der Benjamini-Hochberg-FDR-Methode zur Kontrolle der Fehlerrate bei multiplem Testen. Nur die Peptidannotation mit dem höchsten Rang wurde nicht verworfen und zur Proteinidentifikation verwendet. Die

Gruppierung von Proteinen wurde zugelassen und PSMs wurden nur bei den Proteinen mit dem höchsten Wert gezählt. Das PhosphoRS-Modul ist in PD v. 1.3 integriert und wurde zur Bestimmung der Phosphorylierungsstelle mit Wahrscheinlichkeitsverfahren verwendet.

Bei MQ wurde die TAIR10-Datenbank mit der Andromeda-Suchmaschine durchsucht, die in die MQ-Software eingebettet ist. Die Oxidation von Methionin sowie die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin wurden als variable Modifikationen angegeben. Als Enzym wurde Trypsin eingestellt unter Ausschluss von Spaltung vor Prolin. Zwei unterbliebene Spaltungen, maximal vier Modifikationen und eine maximale Ladung von vier pro Peptid wurden zugelassen. Ein Massenfehler von 7 ppm bei den Vorläuferionen und von 0,4 Da bei den MS/MS-Fragmenten wurde bei der Hauptsuche toleriert. Der Grenzwert der FDR bei den Peptiden und den Proteinen wurde auf 0,05 eingestellt. Der FDR-Grenzwert, der getrennt angewendet wurde, wurde zur Erhöhung der Stringenz und Bestimmung der Phosphorylierungsstelle mit höchster Zuverlässigkeit auf 0,01 eingestellt.

Die Proteinmenge wurde durch die Spektrenzahl bestimmt, das heißt durch die Anzahl aller PSMs, die einer Proteingruppe von PD zugeordnet worden waren. Die Peptid- und Phosphopeptidmenge wurde mit der ProtMAX 2012 Software Version 2.0.1.1 (Egelhofer et al., 2013) durch die Ionenzahl bestimmt. Analog zur Spektrenzahl entspricht die Ionenzahl der Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Peptidionensignal, definiert durch sein Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und seine Retentionszeit, auf MS-Ebene während der LC-MS-Analyse registriert wird. Die Peptidmenge wurde zusätzlich durch Integration der Peakfläche des Peptidionenpeaks mit der Xcalibur Software Version 2.0.7 SP1 bestimmt.

metabolisch ^{15}N -markiert

Zur Identifizierung und Quantifizierung der $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Peptidionenpaare wurde die Software Mascot Distiller von Matrix Science verwendet. Die MS-Daten aus der Orbitrap Velos Pro von Thermo Fisher Scientific wurden importiert. Es wurde die „Orbitrap low res MS2

4.opt Processing Options“-Datei verwendet. Dabei wurden die folgenden Veränderungen vorgenommen. Unter dem „MS Processing“ Tab wurde die halbe Peakbreite auf 0,05 Da und die maximale Vorläuferladung auf 6 geändert; unter dem „MS/MS Processing“ Tab wurde das bevorzugte Multiformat-Spektrum zu „centroid“ geändert; unter dem „Time Domain“ Tab wurde die Zwischenzeit auf 0 gesetzt und das Häkchen bei „use intermediate scan count“ wurde entfernt; unter dem Tab „MS Peak Picking“ wurde die minimale Peakbreite auf 0,025 Da geändert, die erwartete Peakbreite auf 0,05 Da und die maximale Peakbreite auf 0,1 Da. Die von Mascot Distiller generierten Peaklisten wurden gegen die Datenbank TAIR10 abgeglichen, Trypsin als verdauendes Enzym und die Tolerierung von 2 nicht gespaltenen Spaltungsstellen eingestellt. Die Quantifizierungsoption wurde auf „¹⁵N Metabolic [MD]“ gesetzt. Phospho (ST) und (Y) wurden als variable Modifikationen angegeben und die Toleranzen der MS Vorläuferionen und MS/MS Fragmentionen auf 7 ppm bzw. 0.8 Da eingestellt. Nachdem diese Vorgänge abgeschlossen waren, wurden im Tab „Tools“ unter „format options“ die „quantitation options“ ausgewählt und der Grenzwert für den Standardfehler auf 0,3 umgestellt. Die Ergebnisse all dieser Untersuchungen wurden dann in MS-Excel kopiert zur weiteren Aufarbeitung.

Bestimmung der Markierungseffizienz

Bei der metabolischen Markierung mit ¹⁵N hängt die Anzahl stabiler Stickstoffisotope, die in ein bestimmtes Peptid eingebaut werden, von der Primärstruktur des Peptids ab. Dieser Umstand führt zu einem großen und sehr diversen Satz von ¹⁴N/¹⁵N Peptidpaaren mit vielen unterschiedlichen Massenverschiebungen zwischen dem leichten und dem schweren Peptid. Die Situation wird dadurch weiter verkompliziert, dass bei unvollständiger Markierung komplexe Isotopenmuster entstehen. Für eine zuverlässige Quantifizierung ist daher eine hohe Markierungseffizienz von 98 % oder mehr erforderlich. Daher muss die Effizienz mit den experimentellen Daten bestimmt werden. Dies wird allgemein dadurch erreicht, dass die gemessenen Isotopenmuster mit den theoretischen Mustern verschiedener Effizienzen wie 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 % und 99 % abgeglichen werden. Die beste Übereinstimmung mit der höchsten

Pearson Korrelation wird als Näherungswert für die Markierungseffizienz verwendet. Dies wurde ebenfalls mit der Mascot Distiller-Software für alle identifizierten Phosphopeptide durchgeführt.

RNA-Extraktion

Zur Extraktion der RNA aus Pflanzenmaterial wurde eine Spatelspitze Gewebepulver in 1 ml Trizol (380 mM Ammoniumthiocyanat, 780 mM Guanidinthiocyanat, 59 mM Natriumacetat, 5 % (v/v) Glycerin, 47,5 % (v/v) Phenol, pH 5,0) suspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl Bromchlorpropan wurden zugefügt, alles für zehn Sekunden auf einem Vortexmischer durchmischt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zehn Minuten mit 14000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. 200 µl der oberen, wässrigen Phase wurden zur Fällung der RNA in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Isopropanol vermischt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zehn Minuten mit 14000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit 300 µl 70 % (v/v) Ethanol durch Invertieren gewaschen. Nach Zentrifugation für zehn Minuten mit 14000 Upm bei 4 °C wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet für 10 – 15 Minuten im Abzug getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30 µl ddH₂O gelöst und zur cDNA-Synthese verwendet.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus RNA besteht aus drei Schritten: einem DNase-Verdau, um Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen, einer Primerhybridisierung und der reversen Transkription.

Benötigte Lösungen:

DNase-Verdau-Mix:	
DNase-Puffer 10-fach konzentriert	1 µl
ddH ₂ O	6,5 µl
DNase	0,5 µl

Primer-Mix	
Random Primer 50 pmol μl^{-1}	1 μl
ddH ₂ O	1 μl
Reverse-Transkriptase-Mix	
MMLV-RT-Puffer 5-fach konzentriert	4 μl
dNTPs	2 μl
ddH ₂ O	1,5 μl
MMLV-RT	0,5 μl

Für den DNase-Verdau wurden 2 μl der RNA-Lösung mit 8 μl DNase-Verdau-Mix vermengt, 30 Minuten bei 37 °C und 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Für die Primerhybridisierung wurden 2 μl Primer-Mix zugefügt und die Mischung fünf Minuten bei 70 °C inkubiert. Die reverse Transkription fand nach Zugabe von 8 μl Reverse-Transkriptase-Mix für 60 Minuten bei 37 °C statt und wurde durch Inkubation bei 70 °C für zehn Minuten beendet.

Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet den Fluoreszenzfarbstoff Sybr® green zur Messung der vorliegenden DNA-Menge, da der Farbstoff in DNA-Stränge interkaliert. Die Methode misst den Anstieg der DNA-Menge nach jedem Polymerisationszyklus. Als Vorlage wurde cDNA verwendet. Die Reaktionen fanden in einer 96-well Mikrotiterplatte statt. 2,7 μl ddH₂O, 0,3 μl 10 μM Primer-Lösung und 5 μl 2x Sybr® green master mix wurden gemischt und in eine Öffnung der Mikrotiterplatte gegeben. 2 μl cDNA-Lösung wurden hinzugefügt. Die Platte wurde dann in ein Applied Biosystems 7300 Real-time PCR-Gerät überführt und das PCR-Programm (50 °C zwei Minuten, 95 °C zehn Minuten, (95

°C 15 Sekunden, 60 °C eine Minute) 40x) gestartet. Die Daten wurden mit der 7300 System SDS Software ausgewertet. Zur Analyse der Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet (Livak and Schmittgen, 2001). Als interner Standard diente *ACTIN2*.

Referenzen

- Afzal, A.J., da Cunha, L., and Mackey, D.** (2011). Separable fragments and membrane tethering of Arabidopsis RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. *Plant Cell* **23**: 3798–3811.
- Ahlfors, R., Macioszek, V., Rudd, J., Brosché, M., Schlichting, R., Scheel, D., and Kangasjärvi, J.** (2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis thaliana during ozone exposure. *Plant J.* **40**: 512–522.
- Alvarez, E., Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Latour, D.A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., and Davis, R.J.** (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro Is a Consensus Primary Sequence for Substrate Protein Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**: 15277–15285.
- Amirsadeghi, S., McDonald, A.E., and Vanlerberghe, G.C.** (2007). A glucocorticoid-inducible gene expression system can cause growth defects in tobacco. *Planta* **226**: 453–463.
- Andersen, S.U., Cvitanich, C., Hougaard, B.K., Roussis, A., Grønlund, M., Jensen, D.B., Frøkjaer, L.A., and Jensen, E.Ø.** (2003). The glucocorticoid-inducible GVG system causes severe growth defects in both root and shoot of the model legume Lotus japonicus. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **16**: 1069–1076.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H.T., Zhu, S., Qiu, J.-L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.-A., Bjørn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., and Mundy, J.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* **24**: 2579–89.
- Aoyama, T. and Chua, N.-H.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11**: 605–612.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977–983.
- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**: 369–377.
- Beckers, G.J.M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., and Conrath, U.** (2009). Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **21**: 944–53.

- Bergmann, D.C., Lukowitz, W., and Somerville, C.R.** (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**: 1494-7.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Pöschl, Y., Gust, A. a, Scheel, D., and Lee, J.** (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 8067-72.
- Bi, Y.-D., Wang, H.-X., Lu, T.-C., Li, X.-H., Shen, Z., Chen, Y.-B., and Wang, B.-C.** (2011). Large-scale analysis of phosphorylated proteins in maize leaf. *Planta* **233**: 383-92.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Busk, P.K. and Pagès, M.** (1997). Microextraction of Nuclear Proteins from Single Maize Embryos. *Plant Mol. Biol. Report.* **15**: 371-376.
- Catalanotti, F., Reyes, G., Jesenberger, V., Galabova-Kovacs, G., de Matos Simoes, R., Carugo, O., and Baccarini, M.** (2009). A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 294-303.
- Cheng, Y., Zhou, Y.-H.Y., Yang, Y., Chi, Y.-J., Zhou, J., Chen, J.-Y., Wang, F., Fan, B., Shi, K., Yu, J.-Q., and Chen, Z.** (2012). Structural and functional analysis of VQ motif-containing proteins in *Arabidopsis* as interacting proteins of WRKY transcription factors. *Plant Physiol.* **159**: 810-25.
- Cho, S.K., Larue, C.T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T.-L., Zhang, S., and Walker, J.C.** (2008). Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 15629-15634.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I., and Hirt, H.** (2007). Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**: 453-6.
- Droillard, M., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C.** (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett.* **527**: 43-50.
- Droillard, M.-J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C.** (2004). Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Lett.* **574**: 42-48.

- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S.N., and Poovaiah, B.W.** (2009). Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* **457**: 1154–1158.
- Durek, P., Schmidt, R., Heazlewood, J.L., Jones, A., MacLean, D., Nagel, A., Kersten, B., and Schulze, W.X.** (2010). PhosPhAt: the Arabidopsis thaliana phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res.* **38**: D828–34.
- Eberharter, A. and Becker, P.B.** (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**: 224–9.
- Edbauer, D., Cheng, D., Batterton, M.N., Wang, C.-F., Duong, D.M., Yaffe, M.B., Peng, J., and Sheng, M.** (2009). Identification and characterization of neuronal mitogen-activated protein kinase substrates using a specific phosphomotif antibody. *Mol. Cell. Proteomics* **8**: 681–695.
- Egelhofer, V., Hoehenwarter, W., Lyon, D., Weckwerth, W., and Wienkoop, S.** (2013). Using ProtMAX to create high-mass-accuracy precursor alignments from label-free quantitative mass spectrometry data generated in shotgun proteomics experiments. *Nat. Protoc.* **8**: 595–601.
- Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., Meyer, S., Immink, R.G.H., Koenig, A., Possling, A., Seitz, H., Beveridge, A., Scheel, D., Cahill, D.J., Lehrach, H., Kreutzberger, J., and Kersten, B.** (2005). High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol. Cell. Proteomics* **4**: 1558–68.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M.** (1989). Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* (80-.). **246**: 64–71.
- Gao, J., Agrawal, G.K., Thelen, J.J., and Xu, D.** (2009). P3DB: a plant protein phosphorylation database. *Nucleic Acids Res.* **37**: D960–2.
- Gao, J., Opiteck, G.J., Friedrichs, M.S., Dongre, A.R., and Hefta, S.A.** (2003). Changes in the Protein Expression of Yeast as a Function of Carbon Source. *J. Proteome Res.* **2**: 643–649.
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., and Zhang, Y.** (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res.* **18**: 1190–1198.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., and Weissman, J.S.** (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–741.

- Gómez-Gómez, L. and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **5**: 1003–1011.
- González Besteiro, M.A., Bartels, S., Albert, A., and Ulm, R.** (2011). *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *Plant J.* **68**: 727–737.
- González Besteiro, M.A. and Ulm, R.** (2013). Phosphorylation and stabilization of *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1 in response to UV-B stress. *J. Biol. Chem.* **288**: 480–486.
- Gonzalez, F.A., Raden, D.L., and Davis, R.J.** (1991). Identification of Substrate Recognition Determinants for Human ERK1 and ERK2 Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **266**: 22159–22163.
- Gras, R., Müller, M., Gasteiger, E., Gay, S., Binz, P.-A., Bienvenut, W., Hoogland, C., Sanchez, J.-C., Bairoch, A., Hochstrasser, D.F., and Appel, R.D.** (1999). Improving protein identification from peptide mass fingerprinting through a parameterized multi-level scoring algorithm and an optimized peak detection. *Electrophoresis* **20**: 3535–3550.
- Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L.** (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 7835–7840.
- Han, L., Li, G.-J., Yang, K.-Y., Mao, G., Wang, R., Liu, Y., and Zhang, S.** (2010). Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate *Botrytis cinerea*-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant J.* **64**: 114–127.
- Herskowitz, I.** (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**: 187–197.
- Heyndrickx, K.S. and Vandepoele, K.** (2012). Systematic identification of functional plant modules through the integration of complementary data sources. *Plant Physiol.* **159**: 884–901.
- Hoehenwarter, W., Thomas, M., Nukarinen, E., Egelhofer, V., Röhrig, H., Weckwerth, W., Conrath, U., and Beckers, G.J.M.** (2013). Identification of Novel in vivo MAP Kinase Substrates in *Arabidopsis thaliana* Through Use of Tandem Metal Oxide Affinity Chromatography. *Mol. Cell. Proteomics* **12**: 369–380.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Ceretti, D.P., Urdal, D.L., and Conlon, P.J.** (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Biotechnology* **6**: 1204–1210.

- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., and Cooks, R.G.** (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **40**: 430–443.
- Humphry, M., Bednarek, P.P., Kemmerling, B., Koh, S., Stein, M., Göbel, U., Stüber, K., Piślewska-Bednarek, M., Loraine, A., Schulze-Lefert, P., Somerville, S., Panstruga, R., and Piślewska-Bednarek, M.** (2010). A regulon conserved in monocot and dicot plants defines a functional module in antifungal plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 21896–21901.
- Hunt, D.F., Yates III, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., and Hauer, C.R.** (1986). Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *PNAS* **83**: 6233–6237.
- Ichimura, K. et al.** (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants : a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**: 301–308.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., and Shinozaki, K.** (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* **24**: 655–665.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U., and Peterhänsel, C.** (2011). Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* **12**: 50–56.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A., and Zhang, S.** (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J.* **54**: 129–40.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science* (80-.). **324**: 89–91.
- Kang, H.-G., Fang, Y., and Singh, K.B.** (1999). A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in Arabidopsis and induces defense-related genes. *Plant J.* **20**: 127–133.
- Kim, H.-S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., and Dangl, J.L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 6496–6501.

- Kim, Y., Park, S., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F.** (2013). Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. *Plant J.* **75**: 364–376.
- Kohler, A., Schwindling, S., and Conrath, U.** (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **128**: 1046–1056.
- Lampard, G.R., MacAlister, C.A., and Bergmann, D.C.** (2008). Arabidopsis Stomatal Initiation Is Controlled by MAPK-Mediated Regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* (80-). **322**: 1113–1116.
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J.-M., and Shao, F.** (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* **315**: 1000–1003.
- Liu, H., Sadygov, R.G., and Yates 3rd, J.R.** (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* **76**: 4193–4201.
- Liu, Y. and Zhang, S.** (2004). Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6 , a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase , Induces Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3386–3399.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse, C.M.J.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453–483.
- Luna, E., Bruce, T.J.A., Roberts, M.R., Flors, V., and Ton, J.** (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* **158**: 844–853.
- Lusser, A., Brosch, G., Loidl, A., Haas, H., and Loidl, P.** (1997). Identification of Maize Histone Deacetylase HD2 as an Acidic Nucleolar Phosphoprotein. *Science* (80-). **277**: 88–91.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379–389.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**: 743–754.

- Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., and Horning, S.** (2006). Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**: 977–982.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., and Zhang, S.** (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1639–1653.
- Mayank, P., Grossman, J., Wuest, S., Boisson-Dernier, A., Roschitzki, B., Nanni, P., Nühse, T., and Grossniklaus, U.** (2012). Characterization of the phosphoproteome of mature *Arabidopsis* pollen. *Plant J.* **72**: 89–101.
- Meng, X., Xu, J., He, Y., Yang, K.-Y., Mordorski, B., Liu, Y., and Zhang, S.** (2013). Phosphorylation of an ERF Transcription Factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 Regulates Plant Defense Gene Induction and Fungal Resistance. *Plant Cell* **25**: 1126–42.
- Merkouropoulos, G., Andreasson, E., Hess, D., Boller, T., and Peck, S.C.** (2008). An *Arabidopsis* protein phosphorylated in response to microbial elicitation, AtPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **283**: 10493–9.
- Mészáros, T., Helfer, A., Hatzimasoura, E., Magyar, Z., Serazetdinova, L., Rios, G., Bardóczy, V., Teige, M., Koncz, C., Peck, S., and Bögre, L.** (2006). The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J.* **48**: 485–98.
- Meyer, L.J., Gao, J., Xu, D., and Thelen, J.J.** (2012). Phosphoproteomic analysis of seed maturation in *Arabidopsis*, rapeseed, and soybean. *Plant Physiol.* **159**: 517–528.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19613–19618.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki, K.** (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase 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**: 765–769.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.

- Nie, H., Zhao, C., Wu, G., Wu, Y., Chen, Y., and Tang, D.** (2012). SR1, a calmodulin-binding transcription factor, modulates plant defense and ethylene-induced senescence by directly regulating NDR1 and EIN3. *Plant Physiol.* **158**: 1847-59.
- Niehl, A., Amari, K., Gereige, D., Brandner, K., Mély, Y., and Heinlein, M.** (2012). Control of Tobacco mosaic virus movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48. *Plant Physiol.* **160**: 2093-2108.
- Oosterkamp, A.J., Gelpí, E., and Abian, J.** (1998). Quantitative Peptide Bioanalysis Using Column-switching Nano Liquid Chromatography / Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33**: 976-983.
- Ouwerkerk, P.B.F., de Kam, R.J., Hoge, J.H.C., and Meijer, A.H.** (2001). Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. *Planta* **213**: 370-378.
- Pappin, D.J.C., Hojrup, P., and Bleasby, A.J.** (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**: 327-332.
- Park, H.C., Song, E.H., Nguyen, X.C., Lee, K., Kim, K.E., Kim, H.S., Lee, S.M., Kim, S.H., Bae, D.W., Yun, D.-J., and Chung, W.S.** (2011). Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 is phosphorylated and activated by its substrate AtMPK6. *Plant Cell Rep.* **30**: 1523-31.
- Park, S., Rancour, D.M., and Bednarek, S.Y.** (2008). In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiol.* **148**: 246-258.
- Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L., and Alvarez, M.E.** (2006). Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**: 577-587.
- Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke, G., Uhrig, J., Weyhe, M., Scheel, D., and Lee, J.** (2014). The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of "VQ-motif"-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytol.* **203**: 592-606.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., and Mundy, J.** (2000). Arabidopsis MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell* **103**: 1111-1120.

- Pflum, M.K.H., Tong, J.K., Lane, W.S., and Schreiber, S.L.** (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J. Biol. Chem.* **276**: 47733-47741.
- Picard, D.** (1993). Steroid-binding domains for regulating the functions of heterologous proteins in cis. *Trends Cell Biol.* **3**: 278-280.
- Popescu, S.C., Popescu, G. V, Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2009). MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* **23**: 80-92.
- Pribat, A., Sormani, R., Rousseau-Gueutin, M., Julkowska, M.M., Testerink, C., Joubès, J., Castroviejo, M., Laguerre, M., Meyer, C., Germain, V., and Rothan, C.** (2012). A novel class of PTEN protein in *Arabidopsis* displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid. *Biochem. J.* **441**: 161-171.
- Qiu, J.-L., Zhou, L., Yun, B.-W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., MacKinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J., and Morris, P.C.** (2008). *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol.* **148**: 212-222.
- Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W., and Baginsky, S.** (2009). Large-scale *Arabidopsis* phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiol.* **150**: 889-903.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K.-Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., and Zhang, S.** (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 5638-5643.
- Ren, D., Yang, H., and Zhang, S.** (2002). Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**: 559-565.
- Robatzek, S. and Somssich, I.E.** (2001). A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* **28**: 123-133.
- Robatzek, S. and Somssich, I.E.** (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* **16**: 1139-1149.

- Röhrig, H., Colby, T., Schmidt, J., Harzen, A., Facchinelli, F., and Bartels, D.** (2008). Analysis of desiccation-induced candidate phosphoproteins from *Craterostigma plantagineum* isolated with a modified metal oxide affinity chromatography procedure. *Proteomics* **8**: 3548–60.
- Sasabe, M., Kosetsu, K., Hidaka, M., Murase, A., and Machida, Y.** (2011). *Arabidopsis thaliana* MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant Signal. Behav.* **6**: 1–5.
- Schwartz, D. and Gygi, S.P.** (2005). An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1391–8.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317–330.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangel, J.L., and Hirt, H.** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **15**: 141–152.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L., and Sheen, J.** (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 392–400.
- Vizcaíno, J.A., Côté, R.G., Csordas, A., Dianes, J. a, Fabregat, A., Foster, J.M., Griss, J., Alpi, E., Birim, M., Contell, J., O’Kelly, G., Schoenegger, A., Ovelheiro, D., Pérez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ríos, D., Wang, R., and Hermjakob, H.** (2013). The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**: D1063–9.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C., and Zhang, S.** (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 63–73.
- Wang, P., Du, Y., Li, Y., Ren, D., and Song, C.-P.** (2010). Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 2981–98.
- White, R.F.** (1979). Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco. *Virology* **99**: 410–412.
- Wienkoop, S., Staudinger, C., Hoehenwarter, W., Weckwerth, W., and Egelhofer, V.** (2012). ProMEX - a mass spectral reference database for plant proteomics. *Front. Plant Sci.* **3**: 125.

- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562–565.
- Wolschin, F., Wienkoop, S., and Weckwerth, W.** (2005). Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* **5**: 4389–4397.
- Wu, K., Tian, L., Malik, K., Brown, D., and Miki, B.** (2000). Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **22**: 19–27.
- Wu, K., Tian, L., Zhou, C., Brown, D., and Miki, B.** (2003). Repression of gene expression by *Arabidopsis* HD2 histone deacetylases. *Plant J.* **34**: 241–247.
- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., and Ren, D.** (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **283**: 26996–7006.
- Yang, K.-Y., Liu, Y., and Zhang, S.** (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 741–746.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Tena, G., Xiong, Y., and Sheen, J.** (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**: 789–95.
- Yoon, S. and Seger, R.** (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**: 21–44.
- Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., and Shinozaki, K.** (2001). Oxidative stress activates ATMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1012–1016.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V., Pellegrini, M., Goodrich, J., and Jacobsen, S.E.** (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* **5**: 1026–1035.
- Zhang, Z., Wu, Y., Gao, M., Zhang, J., Kong, Q., Liu, Y., Ba, H., Zhou, J., and Zhang, Y.** (2012). Disruption of PAMP-Induced MAP Kinase Cascade by a *Pseudomonas syringae* Effector Activates Plant Immunity Mediated by the NB-LRR Protein SUMM2. *Cell Host Microbe* **11**: 253–263.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G.** (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell* **125**: 749–760.

Anhang

Tabelle A6: Liste aller MAP-Kinase-Substrate, die mit der markierungsfreien Methode identifiziert wurden. Die modifizierte Peptidsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben, ein kleines „p“ kennzeichnet die nachfolgende Aminosäure als phosphoryliert, ein „ox“ kennzeichnet den nachfolgenden Methioninrest als oxidiert. Die als phosphoryliert identifizierten MAP-Kinase-Substrat-Motive sind fett gedruckt.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT1G01320	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	
pSPSYKEVALAPPGSI AK		1795,90
AT1G11360	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	
SPTVVTVQ PSpSP RFPISTPTAGAQR		2663,34
AT1G18500	MAML-4	
pSQTLRLSCpSISDP pSPLPPH TPR		2631,12
AT1G20670	DNA-binding bromodomain-containing protein	
ATDILQG pSP VESGPTTPLPDKK		2332,14
IL pSPT ASVSSAFIGNR		1700,84
LVSP NpSP GSNQQTGSSSSQHPLALQL		2830,30
AT1G20760	Calcium-binding EF hand family protein	
FGN pSP PRFSDASAR		1589,68
DFSGSHGYSFDDADPFGSTGPFKVSSDE pSPT KR		3607,52

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT1G21380	Target of Myb protein 1	
pS PEHALFTKPVYDQTEQLPPAPWETQEPR		3473,61
AT1G27100	Actin cross-linking protein	
FASLGLST pSPR		1216,58
AT1G28280	VQ4/MVQ1	
LLPLFPVT pSPR		1320,70
LLPLFPVT pSPR VSGSSSASTS		2171,08
YREATNLIP pSPR		1497,72
INPLNPVFNPVNSAF pSPR		2064,00
AT1G29350	Kinase-related protein of unknown function (DUF1296)	
ELDFQY pSP FSAQQSMQSR		2229,92
AT1G29530	unknown protein	
KSEVPV pSP EKKPLLLPGPPVVR		2449,32
AT1G31440	SH3 domain-containing protein	
NALDILDKLHSEMIAEEEEAIG pSPK		2792,31
AT1G31870	unknown protein	
RAHNAIAEDGSGWVTLPLNREDTQSNIP SPPR		3484,68
AT1G34220	Regulator of Vps4 activity in the MVB pathway protein	
NY pSP PSIDAVGPIPTKESGASR		2325,09
KTSDQY PEpSP SENPFHAPSMGNLQFDHQNSSASSSGDLTELQR		4804,08
AT1G35560	TCP family transcription factor	
VGLGMSLEQKPQHQVSDHATRDQNPTIDG pSP		3424,59

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT1G36310	SAM-dependent methyltransferases superfamily protein	
YVEEWVGPSPMN pSPR		1885,80
AT1G37130	NIA2	
IGELITTYGYSSDSS pSP NNSVHGSSAVFSLLAPIGEATPVR		4099,98
AT1G43690	ubiquitin interaction motif-containing protein	
MVLFPK pSP SPV NK		1524,76
AT1G50570	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	
MKLPLDIDSPTQSENSSSSQQ pTPK		2700,24
MKLPLDIDSPTQSENSSSSQQ pTPK SASSR		3188,46
oxMKLPLDIDSPTQSENSSSSQQ pTPK		2716,23
AT1G51140	FBH3	
AM pSP ISEVDVKPGFSSR		1887,86
AT1G54170	CID3	
NSENSAASSASNLPI pSP SSGSLSEKSTLNPNAK		3615,69
AT1G56080	unknown protein	
LFSGAA pSP TSSHYDIR		1789,80
AT1G59710	Protein of unknown function (DUF569)	
FFRQUESTDSLAVG pSP PKSEGR		2377,08

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT1G60200	splicing factor PWI domain- / RNA recognition motif (RRM)-containing protein	
MKPLVPIDYSTEEQEAVAHGGSGN pTP PHLALAAEFAK		3958,88
KMKPLVPIDYSTEEQEAVAHGGSGN pTP PHLALAAEFAK		4087,00
oxMKPLVPIDYSTEEQEAVAHGGSGN pTP PHLALAAEFAK		3974,88
ILSGQAAIGSETVQT pSPI ENDHK		2477,19
AT1G64370	unknown protein	
EGYSQSQRVPVYGL pSPTL NHR		2458,14
AT1G64500	Glutaredoxin family protein	
LKPAAVKPPEVDSVKPP ApTP PR		2376,27
AT1G64580	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	
VFNRMVDCGV pSP DIVTYNILLDCLCNNGKIEK		3668,76
AT1G70180	Sterile alpha motif (SAM) domain-containing protein	
NMGSYMSSSQGF pSP PRNPR		2180,90
NoxMGSYMSSSQGF pSP PRNPR		2197,89
NoxMGSYoxMSSSQGF pSP PRNPR		2213,88
SYMGSSRG pSP PRSNIEDFHGR		2420,04
NAGSFIGIPREP pSP PR		1775,86
AT1G73350	unknown protein	
ISTPSSPSL pSP PVR		1505,74
AT1G74690	IQD31	
VHNPVVESSIQPQR pSP R		2011,98

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT1G75100	JAC1	
IL p SPAHKPESSSGT p SPSQFSLPAK		2702,22
ILSPAHKPESSSGT p SPSQFSLPAK		2622,27
IL p SPAHKPE p SpSSGTSSPSQFSLPAK		2782,20
AT1G75230	DNA glycosylase superfamily protein	
KL p SPDDDDASDGFNPEHNLSQMTTTPATK		3227,46
AT1G77760	NIA1	
KSV p SPFMNTASK		1464,66
AT1G78150	unknown protein	
KPHTSTADLLTWSEVPP PDp SPSSASR		2845,32
AT1G79090	unknown protein	
SSFVSYPPPGSI p SPDQR		1901,84
AT1G80840	WRKY40	
KVT p SPTSRIIDFPQVQK		1911,98
AT2G05590	TLD-domain containing nucleolar protein	
LSNLFADSPSQSA p SPR		1757,78
AT2G20960	pEARLI4	
KIEPSSNVDSL PVp SPSLALYSGGDYFAR		3051,45
SAIPDTR PRp TPIHESAATGR		2215,08
SAHQEDAFSLETR PRp TPERR		2465,16
AT2G22300	SR1	
RF p SPVHELDVGQILSEAR		2135,04

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT2G24590	RSZ22a	
AR p SPPPPR		958,46
AT2G26530	AR781	
SL p SPFRVSAYPWEEQEQEQEQEQR		3062,34
LTVPFDWEET PGp TPR		1825,82
NFSDRLTVPFDWEET PGp TPR		2445,08
AT2G27100	SE	
GGPAPFLL p SPAFR		1410,70
AT2G36480	ENTH/VHS family protein	
VASSGILPSSGSGSDRQ p SPLHDSTSKQNVTK		3209,52
AT2G36881	unknown protein	
SGSGIVGYYS p SL p SPTTPIPTTTGLVR		2773,29
AT2G38280	FAC1	
KVNDQYGR p SPASLPDATPFTDGGGGGGGGDTGR		3189,42
AT2G38410	ENTH/VHS/GAT family protein	
DSSSIAGSS p SPIPATVSTGK		1929,88
HDAIASGSPLPVQASG p SPLSVQASKPADSSPK		3169,56
GLDLNDSLQILLAKHDAIASGSPLPVQASG p SPLSVQASKPADSSPK		4663,40
HDAIASG p SPLPVQASGSPLSVQASKPADSSPK		3168,54
HDAIASGSPLPVQASG p SPLSVQASKPADS p SPK		3248,52
AT2G40070	unknown protein	
HGT p SPVFNISSGAPPSR		1791,82

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT2G41410	Calcium-binding EF-hand family protein	
LAASLNRL pSPK		1250,66
AT2G41630	TFIIB	
IAPSWYAKEEDLKNLS pSP		2129,00
AT2G41900	OXS2	
FTDSALASAVF pSP THK		1759,80
SVDHSLFSGGGRM pSPR		1770,78
SVDHSLFSGGGRoxM pSPR		1786,78
AT2G43680	IQD14	
ILGEAERDHNLVFR PPpTP DRPNPYpSASPPPRPASPR		4167,00
AT2G44440	EML4	
NAAQVVHDTLP pSP SVSASMK		2120,00
AT2G45140	PVA12	
VVYVAPPR PPpSP VREGSEEGSp SPR		2711,25
AT2G46770	NST1	
pSP YPSLNR		1014,44
AT3G05420	ACBP4	
RQSGSGVWGWLAGSPQEKDDD pSP		2511,09
AT3G07580	unknown protein	
LPHQILAAANKTL PPpSP TDYmTEVRR		3114,57
AT3G08710	TH9	
VTSIIDSV PEpSP QRP		1705,82
KVTSIIDSV PEpSP QRP		1833,90

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT3G09750	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	
ESGpYALARVPI PHp SPNVRFSpSLVR		2895,32
AT3G11330	PIRL9	
TYVADVSEYLGSN p SPRDPYLER		2613,18
AT3G12140	EML1	
HATIQPFDVLP p SPTFSAAR		2136,02
AT3G12640	RNA binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	
SVFDRISHSTGSETLDQNMVLGEV p SPKDEESR		3632,64
AT3G13060	ECT5	
VAPLTGPYGLAGDFAGHLPSSIL p SPQAQGFYYR		3532,71
AT3G13300	VCS	
TLSYPTPPLNLQ p SPR		1764,88
AT3G19420	PTEN2	
FTSGLGIRL p SPK		1356,70
AT3G22380	TIC	
SS p SPEKEKFEIDLMAPPPVR		2339,13
AT3G22520	unknown protein	
DSSVLVSVSp SP MREYEWAEAR		2479,10
AT3G26560	ATP-dependent RNA helicase, putative	
YSVDM p SPVKIFK		1494,70
YSVDM p SPVKIFKNPEGSLSR		2336,10

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT3G26910	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	
pSP GLVGHSAPLTAWNQER		2000,94
AK pSP GLVGHSAPLTAWNQER		2201,07
DDIV pSP PLTPMSLSRPLPQATGVAQTSQIR		3328,68
DDIV pSPPLpTP MMSLSRPLPQATGVAQTSQIR		3408,66
AT3G29360	UGD2	
DLSMNKFDWDHPLHLQ PMpSP TTVK		2919,33
AT3G45260	C2H2-like zinc finger protein	
NLPGNPDPAEVIAl pSP NSLMTTNR		2718,27
AT3G48860	unknown protein	
ST pTP PIPNLMPPSR		1689,80
AT3G49010	BBC1	
AGDS pTP EELANATQVQGDYLPVR		2626,23
AT3G49590	ATG13	
IITDYVG pSP ATDPMR		1716,76
AT3G55270	MKP1	
FSSLSLLPSQT pSPK		1572,76
FSSLSLLPSQT pSPK ESR		2917,41
AT3G56460	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	
KLGDPTAp TNPGpSP ESPVEVSKTHPIPSLNSDTSVR		3777,76

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT3G57410	VLN3	
AEALAALTSAFNSSPSSK pSPRR		2427,18
QRAEALAALTSAFNSSPSSK pSPRR		2555,25
AT3G58600	NECAP-1	
SIETTIPSII LPPPPPG PLpSPVTTA QK		2832,52
AT3G59090	CAND3	
mLLAS pSPp SISVWLLSMPLLL pSSHSFR		3130,44
AT3G60966	RING/U-box superfamily protein	
VCEYITVSILITSVAVFSERFATLIVT pSPWR		3585,84
AT3G63460	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	
SVQ PAPpSPPT QAAAAQAAPAPATPPPTVQTADTSNVPAHQKPVIATLTR		4862,46
AT4G00752	UBX domain-containing protein	
YSLDNNPSSVL pSPR		1629,74
AT4G04885	PCFS4	
VYGQNSLGGYND FEDQLE pSPSSLSSTPDGFTRR		3705,63
AT4G05150	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	
DVP pSPY GSTSSAPVMR		1731,74
ISTPELPPP VFIKPESPEPV pTPK		2668,38
EVSTLSD PGpSPRR DVPSYGSTSSAPVMR		3114,45
IS pTPEL PPP VFIK PEpSPEPVSTPK		2748,33
AT4G09830	Uncharacterised conserved protein UCP009193	
NSVFSNAL pSPIRR		1628,78

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT4G11740	SAY1	
AQPR PPp SPSLTAQR		1586,78
AT4G12770	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	
SHLRPPGNISGSQ p SPVESSGLYHSK		2703,27
AT4G12780	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	
SHLRPPGNISGSQSPPVE p SPGSYHSK		2784,30
SHLRPPGNISGSQ p SPPVE p SPGSYHSK		2864,25
FENVFSSISS p SPTK		1610,70
FENVFSSISS p SPTKHR		1903,88
AT4G15545	unknown protein	
LTP PGp SPPILSASGTPK		1700,86
LTP PGp SPPILSApSGTPK		1780,84
AT4G17950	AT hook motif DNA-binding family protein	
AQNTPEPASAPANMLSFGGVGG PGp SPR		2648,18
AQNTPEPASAPANoxMLSFGGVGG PGp SPR		2665,20
TLESLGFDG p SPSSVAATQQHSMR		2487,10
TLESLGFDG p SPSSVAATQQHSoxMR		2504,10
LPFGGSM p SPHQPPQHQYHHPQPQQQIDQK		3486,60
AT4G18120	ML3	
SPIFGNL p SPTK		1241,60
AT4G22770	AT hook motif DNA-binding family protein	
YGHDDAAVTL p SPNPISAAPTTSHVIDFSpTTSEKR		3777,72

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT4G25180	RNA polymerase III RPC4	
SFGVPKEDDKPNSDVN PSpSP SILPAVSSVTAAQEDGEVHNFVTR		4907,28
AT4G25880	PUM6	
HSLNRIP pSP PIIYPTEYQFIDNR		2902,38
AT4G27320	PHOS34	
IHH PSpSPR		1011,46
HSHHHSSSTPSAATP pTP TAGAR		2277,00
HSHHHSSSTPSAATP pTP TAGARR		2433,09
AT4G28080	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	
MFVK pSPLNK		1144,56
AT4G28990	RNA-binding protein-related	
YAPAN pSP PLPR		1263,58
HRYAPAN pSP PLPR		1556,74
LLPPPMNH pSPR		1339,64
AT4G29810	MKK2	
IISQLEPEVL pSPIK PADDQLSLSDLDMVK		3275,67
AT4G30160	VLN4	
GR pSP AFNALAATFESQNR		2089,95
AT4G33050	EDA39	
LAYMGIP pSPR		1184,55
LAYoxMGIP pSPR		1201,54
AT4G35785	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	
pTP TPGHYLGLK		1264,60

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT4G36870	BLH2	
NIYYGANSSN pSP HHQYNQFK		2522,07
AT4G38470	STY46	
LLHSAYDPQNRPAIEVHLVQVQPAGISADLDSTSNDAGHS pSP TR		4747,28
LLHSAYDPQNRPAIEVHLVQVQPAGISADLDSTSNDAGHS pSP TRK		4875,36
AT4G38550	pEARL14-like	
NSS PPpSP FHPAAYK		1580,68
NSS PPpSP LHPAASHSPPPPQPYR		2500,17
RDHYDMEPEANTMLQNSAPGSPFHPAGSR pSP PPYpR		4235,80
MEAMSYEPETNAP SpSP YHPAGNRTPERPR		3354,45
MEAMSYEPETNAP SpSP YHPAGNR		2618,04
STPGSPAHPPGAR pSP PPSYLSNK		2384,13
SN pSP FHPFR		1240,52
AT4G38710	glycine-rich protein	
TLPVAVVEVVK PEpSP VLVIVEKPK		2651,52
AT4G39680	SAP domain-containing protein	
WNSNSIKVPEAQITNSATPTT pTP R		2695,29
WNSNSIKVPEAQIpTNSATPTT pTP R		2774,26
WNSNSIKVPEAQITNSApTPTT pTP R		2775,27
AT5G03040	IQD2	
NSFF pSP PTPSR		1317,56
LSY PTpSP ALPKPR		1507,76
NRDL pSP PSTADAVNVTATDVPVVPSSSAPGVVR		3357,66

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT5G06780	EML2	
HQSLDVHP pS PTFSASR		1846,82
AT5G07120	SNX2b	
SAMSTLFDSRHPSIVVTPADSDPLFAPPSYYSES RpSPR		4250,96
AT5G09620	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	
VAPI PPpSP VKVPQPVPEPVVLEPPQMFVDQR		3468,81
AT5G13020	EML3	
ANSLQSSVPQLVHDAP pSP AVSGSR		2486,19
KANSLQSSVPQLVHDAP pSP AVSGSR		2614,29
TSQSIASLAMG PPpSP SLHPSMQPSSSALR		3004,41
AT5G13560	unknown protein	
QQFESIARPTLEIEIP pSPR		2292,14
AT5G13590	unknown protein	
IINLTQVK pSP VK		1420,80
AT5G14720	Protein kinase superfamily protein	
FKVTSADL pSPK		1273,62
YLEQTSAKQ PGpSP ETNVDDLQTPPATSR		3225,51
YLSGSIIP ESTFpSPK		1706,80
AT5G16780	DOT2	
TPYLVLSGHVKPGQTSDPQSGFATVEKDVP GS L pTP MLGDR		4265,08
AT5G16880	Target of Myb protein 1	
TLSKYEEMNKPSAPLTSHEPAMIPVAEEPDD pSPI HGREESLVR		4870,28

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT5G18230	transcription regulator NOT2/NOT3/NOT5 family protein	
NIMGVESNVQPLT pSP LSK		1994,96
NIoxMGVESNVQPLT pSP LSK		2010,96
AFSPSIVSGSQWR PGpSP FQSQNETVR		2931,36
VGIPNQPPSQ PPpSP IPANGSR		2319,12
AT5G20190	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	
SAS pTP LLNSLVHVSSPR		1846,92
AT5G21160	LA RNA-binding protein	
NVEDLSNDFSNTFLLDEELDLEHR pSP R		3286,47
AT5G23680	Sterile alpha motif (SAM) domain-containing protein	
LGDIGGDQYHQHVVAAYD pSP QVR		2607,18
AT5G28300	Duplicated homeodomain-like superfamily protein	
FTDHDLDVVQN PTpSP SQDSSSLALR		2811,27
FISKFTDHDLDVVQN PTpSP SQDSSSLALR		3286,56
AT5G41100	unknown protein	
SK pSP GLVGHSAPLTAWNQER		2217,06
AT5G42950	GYF domain-containing protein	
SVSMGSADRVLS pSP VVTQASHK		2325,12
AT5G43310	COP1-interacting protein-related	
ASKFSDSEPGSL pSP LQRLPR		2254,11
AT5G43560	TRAF-like superfamily protein	
VGEADIVISHIQ KEpSP KER		2314,17
RVGEADIVISHIQ KEpSP KER		2470,26

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT5G45190	Cyclin family protein	
NVDVGDALISQ pSP KDLK		1879,92
AT5G46070	Guanylate-binding family protein	
SFFGRGGKDSPADSAS pSPR		2103,92
AT5G47430	DWNN domain, a CCHC-type zinc finger	
YAR pSP PVVVSDVSEDKLR		2099,04
AT5G47790	SMAD/FHA domain-containing protein	
SQTSEPFVSANPPPVVQHL pS PEALSGQK		3228,54
AT5G51300	splicing factor-related	
MLQSGMPLDDRPEGQR pSPpS PEPVYDNMGIR		3534,51
AT5G52310	LTI78	
IKGWFGGGATDEVK PEpSP HSVEEAPK		2834,31
AT5G54430	PHOS32	
IHH PPpSPR		1021,48
HSHHHHSSSTPSSAAT pT PTAGAR		2501,10
AT5G55210	unknown protein	
WTPLTSATVTASDANGSGETEE pSP KRR		2930,34
AT5G55230	MAP65-1	
RETLNRPAAPTNYVAISKEEAASSPVSGAADHQV PApSP		3971,92
ETLNRPAAPTNYVAISKEEAASSPVSGAADHQV PApSP		3814,80
ETLNRPAAPTNYVAISKEEAAS pSP VS GAADHQV PApSP		3894,78
KVQEQPHVEQESAFSTR pSP ARPVSAK		3072,51

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]
Modifizierte Peptidsequenz		
AT5G55300	TOP1ALPHA	
IIKDESDDE p TPISSMFRK		2192,00
AT5G58950	Protein kinase superfamily protein	
SV p SPSPQMAVPDVFK		1669,76
AT5G61960	ML1	
SSWTSESYQLKPQSSFSGSHPSG p SPNAR		3078,33
MDVNSQNAVLR p SPQQLSHLFPGR		2676,30
VIHNSIG p SPVNSFIER		1849,90
GVEGFSGGGIG p SPMHQSSR		1927,80
AT5G62390	BAG7	
VSDLESKFDRLV p SPK		1801,89
AT5G63490	CBS / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (PB1) domains- containing protein	
SLTVSR p SPLGLTGGER		1710,86
AT5G64330	NPH3	
LLEHFLVQEQTGEG p SPSR		2138,00
AT5G64430	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	
VASDTYREPHQ p SPYNVAQPLQAPIGTK		3050,48
AT5G65410	HB25	
SP p SPLHHHQAPPPPPQSSFHHEQDQP		3096,36
AT5G66730	IDD1	
NLPGMPDPDAEVIAL p SPK		1944,92

Tabelle A7: Liste aller MAP-Kinase-Substrate, die mit der Methode der metabolischen ¹⁵N-Markierung identifiziert wurden. Die modifizierte Peptidsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben, ein kleines „p“ kennzeichnet die nachfolgende Aminosäure als phosphoryliert, ein „ox“ kennzeichnet den nachfolgenden Methioninrest als oxidiert. Die als phosphoryliert identifizierten MAP-Kinase-Substrat-Motive sind fett gedruckt. Es sind die relativen Peptidabundanzen angegeben als Quotienten aus behandelten und kontrollbehandelten Proben. Dabei bedeutet DEX: Dexamethason-behandelte Probe geteilt durch Kontrolle; SA: Salicylsäure-behandelte Probe geteilt durch Kontrolle; SA + DEX: beide Proben wurden mit Salicylsäure vorbehandelt und der Wert ermittelt aus Dexamethason-behandelter Probe geteilt durch Kontrolle. Proben, in denen ein bestimmtes Peptid nicht detektiert wurde sind mit n.d. gekennzeichnet. Werte ≥1,5 sind rot hinterlegt, sie werden als heraufreguliert betrachtet. Werte ≤0,6666 sind grün hinterlegt, sie werden als herunterreguliert angesehen.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz								
AT1G01320	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein							
pSPSYKEVALAPPGSIAK		1795,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4372	n.d.
AT1G04080	PRP39							
SQVDGSTEQpSPKLESASSTEPEELKK		2873,32	1,0910	2,7532	1,2493	0,8189	0,7200	1,6445
AT1G07110	F2KP							
SVETLpSPFQQK		1358,59	12,4360	n.d.	14,9842	6,4746	n.d.	n.d.
AT1G10290	ADL6							
AAAASSYSDNSGTESpSPR		1838,73	n.d.	n.d.	5,2222	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G11310	MLO2							
SVENYpSpSPSPR		1416,55	n.d.	1,3257	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G11360	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein							
SPTVVTVQpSpSPR		1452,66	1,3025	2,6868	1,3844	1,2324	0,6075	2,4465
KSPTVVTVQpSpSPR		1563,80	0,9744	2,2588	1,4730	1,4647	n.d.	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz								
AT1G11700	Protein of unknown function, DUF584							
VGGGLSLAFEDASS pSPR		1730,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,1108
AT1G13020	EIF4B2							
KADTEVSE pTP AVK		1556,73	1,6650	n.d.	1,6463	1,1815	0,4734	2,8390
AT1G14740	TTA1							
SNNLDGGFSSKS pSPR		1633,71	n.d.	n.d.	10,2249	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G15750	TPL							
AP pSP VNNPLLGGIPK		1554,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,7061
AT1G17130	Family of unknown function (DUF572)							
KATEV pSP SNPTDILTSSSAENPKPK		2809,35	0,8342	n.d.	n.d.	1,1590	n.d.	n.d.
AT1G20670	DNA-binding bromodomain-containing protein							
ATDILQG pSP VESGPTTLPDKK		2333,16	1,1202	n.d.	1,6750	1,1593	0,5238	2,0186
AT1G20760	Calcium-binding EF hand family protein							
FGN pSP PR		855,36	1,1934	1,6688	1,3468	1,2346	0,6916	1,7469
FGN pSP PRFSDASAR		1590,70	n.d.	1,3415	n.d.	n.d.	0,7069	n.d.
NATEVP pSP DYSQ GK		1573,66	n.d.	1,6071	1,3526	1,0266	0,6550	1,7294
AT1G21630	Calcium-binding EF hand family protein							
GIEAD pSP PR		1012,42	1,3086	0,6749	1,4856	1,2668	0,5122	1,9600
KGIEAD pSP PR		1140,52	n.d.	0,9557	n.d.	1,1822	n.d.	n.d.
AT1G22310	MBD8							
HPQPPEE PPpSP QR		1596,64	n.d.	1,1981	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G23860	RSZ21							
pSP DYGYAR		1020,36	1,0444	2,0044	1,0920	0,9749	0,7652	n.d.
AT1G27100	Actin cross-linking protein							
RPTSSPLSAE pSP PR		1465,69	4,3283	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Anhang - Tabelle A7: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch metabolische ¹⁵N-Markierung identifiziert wurden.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz	DEX		SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX	
AT1G27650	ATU2AF35A							
RGGpSPGGGREGpSEER		1648,63	1,0679	2,1704	1,1518	n.d.	0,7720	n.d.
AT1G28280	VQ4/MVQ1							
SGSSNQpSPNELAAEEK		1728,72	108,1549	n.d.	810,6131	n.d.	n.d.	13,2310
LLPLFPVTpSPR		1334,68	12,8423	n.d.	7,9826	4,6848	1,3098	3,1923
AT1G29530	unknown protein							
KSEVPVpSPEEKPLLLPGPPVVR		2449,34	1,4567	n.d.	n.d.	1,4178	n.d.	n.d.
AT1G31440	SH3 domain-containing protein							
NALDILDKLHSEoxMIAEEEAIGSpSPK		2808,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3878	n.d.
NALDILDKLHSEMIAEEEAIGSpSPK		2792,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,6126
AT1G31870	unknown protein							
YLSEDLpSPPR		1257,56	1,2442	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SFGSNADLpSPPGR		1385,60	1,2086	1,4022	1,2624	n.d.	0,6950	7,2784
TRNDpSPpSPEPGPR		1590,56	1,2048	1,0921	1,2182	1,1952	0,7461	n.d.
DLHGpSPVSDVK		1248,52	1,1124	1,4317	1,2546	2,2525	0,7334	1,6584
NINMKDSQSDSLpSPQRK		2057,93	0,9535	n.d.	n.d.	1,1474	0,7510	n.d.
NINoxMKDSQSDSLpSPQRK		2073,92	n.d.	1,1608	1,2259	n.d.	n.d.	7,7369
HTKPVSLDSDoxMpSPPR		1785,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8055	n.d.
SSNFDSpSPRRPR		1584,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,7503	n.d.
ARNDpSPpSPEPEAK		1576,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,8771
AT1G35580	CINV1							
SVLDpTPLSSAR		1240,55	n.d.	1,2197	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G42550	PMI1							
TSFSVPpSPK		1040,44	n.d.	1,2828	1,2278	1,2143	0,3925	2,2264

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT1G43690	ubiquitin interaction motif-containing protein							
RSKPIEEEEETGSGSQSGGE pS PEAK		2558,12	1,6963	n.d.	n.d.	1,3769	n.d.	n.d.
SKPIEEEEETGSGSQSGGE pS PEAK		2402,02	n.d.	n.d.	1,4928	n.d.	n.d.	2,1502
AT1G44910	PRP40A							
KHAN pS PESESENR		1565,64	1,1530	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HAN pS PESESENR		1437,55	0,9499	1,6259	1,1029	1,1022	0,7376	n.d.
KHAN pS P E pSESENR		1645,61	n.d.	5,0441	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ANL pS PAGDKANVEEPMVYATK Q EAK		2743,30	1,0895	n.d.	n.d.	0,9329	0,6798	1,9042
ANL pS PAGDKANVEEPMVYATK		2287,06	n.d.	n.d.	n.d.	1,0111	n.d.	1,3239
ANL pS PAGDKANVEEPoxMVYATK		2302,06	0,9572	2,9421	1,5041	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G50570	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein							
oxMKLPLDIDSPTQSENSSSSQ p TPK		2716,24	n.d.	1,4034	1,4979	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G52200	PLAC8 family protein							
GRVTTPSEEDSNNGLPVQQ PG pTPNQ R		2860,32	n.d.	1,5206	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VVTPSEEDSNNGLPVQQ PG pTPNQ R		2647,19	n.d.	0,9554	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G52320	unknown protein							
VS pS PPRPVPNP AIQ K		1591,77	n.d.	0,8806	1,6413	n.d.	0,7607	1,6592
AT1G52380	NUP50 protein							
SALPLK p TPEN pS PTATDT		1903,82	n.d.	3,4629	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SALPLKTPEN pS PTATDT		1823,85	n.d.	n.d.	n.d.	1,4393	n.d.	n.d.
AT1G53165	ATMAP4K ALPHA1							
GQNDDSGS PR pTP R		1488,54	n.d.	1,2337	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz	DEX		SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX	
AT1G59710	Protein of unknown function (DUF569)							
FFRQESTDSLAVG pSPPK SEGR		2377,11	1,6360	n.d.	1,2563	n.d.	1,4264	1,3760
QESTDSLAVG pSPPK SEGR		1925,87	n.d.	n.d.	1,2437	n.d.	2,1263	1,3102
FFRQESpTDSLAVG pSPPK SEGR		2457,08	n.d.	31,8289	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G60200	splicing factor PWI domain- / RRM-containing protein							
ILSGQAAIGSETVQT pSPI ENDHK		2477,19	n.d.	n.d.	1,2123	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G61730	DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator							
IK pSP SATTAAAPPAK		1491,77	1,0725	1,5493	1,1505	0,9674	0,6511	1,5083
AT1G62300	WRKY6							
LGREE pSP ETESNK		1556,67	21,7071	0,9099	5,7157	6,6926	1,0670	5,1967
LGREE pSP ETESNKIQK		1926,91	20,6382	n.d.	5,6851	6,4263	1,1031	5,4242
AT1G62390	PHOX2							
VVLKPVSH pSPK		1272,70	8,7283	11923,6673	3,6335	4,0119	0,7278	3,6402
AT1G67325	Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein							
SNG pSP SRAPEENDQ		1588,55	n.d.	1,4943	2,1828	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G73350	unknown protein							
IST pSpSP pSLSPVVR		1585,71	n.d.	1,1090	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT1G75190	unknown protein							
AKETSSVAEAS pSP TESQATR		2118,95	n.d.	n.d.	n.d.	1,0450	0,1864	n.d.
AT1G76070	unknown protein							
SIFS FpSP ASGR		1250,51	3,8696	n.d.	n.d.	4,1971	n.d.	4,6409
AT1G79280	NUA							
RAP pSP GGGSSTIVTLADR		1823,90	n.d.	n.d.	1,5974	n.d.	n.d.	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz								
AT2G02070	IDD5							
TPNSDAEVIAL pSPK		1538,68	0,9190	n.d.	n.d.	0,8981	0,4367	4,2812
AT2G03150	emb1579							
TVDVKQETG pSPD TK		1585,72	n.d.	1,0329	1,1799	1,1435	n.d.	1,8116
DAEKK pSPG DTSGTPTTGTK		1959,88	n.d.	n.d.	0,7127	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G10950	BSD domain-containing protein							
STTGHE pTPEE GSSR		1555,62	n.d.	n.d.	25,1029	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G15860	unknown protein							
GGTSLVQKLENSVQQGS pSPR		2181,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,6980
AT2G16900	pEARLI4-like							
KTESQ PPpSPL STR		1508,72	23,4025	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TV PLpSPN SoxMADR		1384,60	n.d.	1,1511	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TV PLpSPN SMADR		1368,61	n.d.	n.d.	20,3752	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G20950	pEARLI4-like							
SN PSpSPPH LAEGR		1429,63	5,1216	1,4007	1,6928	4,2891	n.d.	2,3936
pSASKSN PSpSPPH LAEGR		1907,73	n.d.	1,0664	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G20960	pEARLI4							
GR pSPE FoxMER		1205,49	n.d.	1,4432	n.d.	n.d.	1,3670	1,8090
SK pTPEP QPTYFEPSSR		1931,86	n.d.	0,3355	1,6564	n.d.	n.d.	1,6450
SK pTPE SPR		1079,50	n.d.	n.d.	n.d.	1,4917	n.d.	n.d.
NEESVLLFPELIL pSPQ ERPPSR		2632,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,6253
AT2G22300	SR1							
RF pSPV HELDVGQILSEAR		2135,06	n.d.	n.d.	2,1942	n.d.	1,0070	2,0890
AT2G24590	RSZ22a							
YRK pSP TYGGR		1266,60	n.d.	1,6737	1,1722	n.d.	n.d.	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz								
AT2G26460	SMU2							
EGGDVASLDAAEAQ pTPKR		1895,86	1,3454	2,2711	2,5216	1,1853	0,7112	2,1035
AT2G26570	WEB1							
ALEESESTLKANDTD pSPR		2043,90	1,8217	n.d.	2,7546	1,5063	0,8569	2,6176
FSGSPVSTG pTPK		1245,56	1,3804	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G27100	SE							
DR pSPLPPRR		1291,60	n.d.	n.d.	n.d.	1,1564	n.d.	1,6682
AT2G27660	Cys/His-rich C1 domain family protein							
GGLQGSN pSPIQSPR		1498,63	n.d.	1,5742	0,6916	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G34310	unknown protein							
QVESSTDSDSLQKKSDEKEEIL pSPR		2917,33	1,9680	n.d.	n.d.	7,8130	n.d.	n.d.
SDEKEEIL pSPR		1383,63	n.d.	1,2943	1,1194	1,5462	0,3761	2,0087
AT2G37340	RS2Z33							
DR pSPVLDDEGpSPK		1592,57	1,1907	1,3410	1,2086	1,1001	0,6023	n.d.
IIDG pSPPPpSPK		1280,51	n.d.	1,5523	1,2239	n.d.	n.d.	n.d.
RoxMDDpSL pSPR		1268,41	n.d.	2,3673	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RMDDpSL pSPR		1252,41	n.d.	n.d.	1,3006	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G38280	FAC1							
EVISD pSpTPKPNTEPFAHYPQGK		2621,23	n.d.	1,2633	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G38410	ENTH/VHS/GAT family protein							
DSSSIAGSS pSPIPATVSTGK		1929,89	1,1631	n.d.	n.d.	n.d.	0,5648	n.d.
DSSSIAGSS pSPIPATVSTGKSPIDEEYEEEEDEFAQLAR		4210,88	n.d.	n.d.	1,8711	n.d.	n.d.	n.d.
HDAIASGSPLPVQASG pSPLSVQASKPADSSPK		3168,54	1,0029	n.d.	2,3750	1,0286	0,7479	1,7953
HDAIASGSPLPVQASGSPLSVQASKPADS pSPK		3168,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,7456	n.d.
AT2G41410	Calcium-binding EF- hand family protein							
LAASLNRL pSPK		1250,67	n.d.	n.d.	1,1942	n.d.	n.d.	1,5085

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT2G41900	OXS2							
NVVEPIpSPoxMSAR		1412,60	n.d.	1,1630	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT2G45140	PVA12							
VVYVAPPRPPSPVREGSEEGpSPR		2711,25	2,1514	1,4374	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VVYVAPPRPPSPVREGpSEEGSpSPR		2711,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,0395	n.d.
AT2G45820	Remorin family protein							
ALAVVEKPIEEHpTPKK		1871,00	1,8099	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ALAVVEKPIEEHpTPK		1742,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4316	n.d.
AT2G46020	BRM							
LVNEPETEPSPSPQR		1663,74	n.d.	1,1715	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G02880	Leucine-rich repeat protein kinase family protein							
LIEEVSHSSGpSPNPVSD		1834,80	n.d.	1,2827	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G08710	TH9							
VTSHDSVPEpSPQRP		1705,82	1,9055	0,9376	n.d.	n.d.	0,5125	n.d.
KVTSIIDSVPepSPQRP		1833,92	1,8203	1,5378	2,4642	1,4683	0,4920	2,1906
AT3G10380	SEC8							
ASQHDINpTPR		1219,53	2,1607	1,3050	1,8888	1,5930	0,7210	2,2984
AT3G12480	NF-YC11							
GIDGTAASNEDTKQHLQpSPK		2179,00	n.d.	1,1611	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MHASESpSPQEDEKK		1683,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,0605
AT3G18230	Octicosapeptide/Phox/B em1p family protein							
SVAVQQPIDGpSPR		1434,68	1,6673	1,2253	n.d.	1,2318	0,8127	2,3967
AT3G19420	PTEN 2							
FTSGLGIRLpSPK		1356,71	8,8761	n.d.	3,1925	1,8111	n.d.	2,8246

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT3G22380	TIC							
AGSFRD pS PEEEGPVELPEAAR		2324,03	1,1850	1,7392	1,1239	2,3183	0,7274	2,5434
AT3G23540	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein							
ANQSETDSAS pS PVTR		1630,68	4,5618	n.d.	4,4336	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G25070	RIN4							
ADE pS PEKVTVPK		1479,72	1,1128	4,3189	1,2896	0,9582	0,9688	1,6937
ASQNNsYDNK pS PLHK		1783,78	n.d.	1,1474	n.d.	1,2156	n.d.	n.d.
SSGANVSGSSR pT PTHQSSR		2013,79	n.d.	n.d.	1,7815	n.d.	n.d.	1,7467
AT3G28920	HB34							
SMDMTPK pS PEPESETPTR		2100,87	0,7172	9,9584	1,0452	0,6196	n.d.	n.d.
SoxMDoxMTPK pS PEPESETPTR		2133,87	n.d.	1,4640	n.d.	0,7822	n.d.	n.d.
SMDoxMTPK pS PEPESETPTR		2116,87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8085	n.d.
AT3G43590	zinc knuckle (CCHC- type) family protein							
THKEEQPQT pS PR		1518,68	n.d.	n.d.	n.d.	1,6823	n.d.	n.d.
AT3G44750	HDA3							
pTPNIEPQGYSEEEEEEEVPAGNAAK		3056,27	n.d.	3,0310	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G46640	PCL1							
GGSSGPNTSSSNNNVEEEDRVGSSpSPGSDSKK		3235,35	n.d.	n.d.	2,0910	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G48860	unknown protein							
RAGpSPVYGR		1058,45	n.d.	n.d.	1,5009	1,2922	n.d.	1,8405
AGpSPVYGR		887,39	n.d.	n.d.	1,6858	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G50350	Protein of unknown function (DUF1685)							
STTSSSSLSDGDTpSPHHTVYQTSDDPQTVK		3247,38	n.d.	1,5055	n.d.	n.d.	n.d.	1,1818
AT3G50370	unknown protein							
NPLpSPNSGQANLKR		1576,77	n.d.	1,3324	9,6236	n.d.	n.d.	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz	DEX		SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX	
AT3G53230	ATPase, AAA-type, CDC48 protein							
KRAEpSPEAoxMEEDEEEIAEIK		2431,06	n.d.	n.d.	1,6051	n.d.	n.d.	n.d.
RAEpSPEAoxMEEDEEEIAEIK		2301,95	n.d.	n.d.	11,2487	n.d.	n.d.	n.d.
KRAEpSPEAMEEDEEEIAEIK		2415,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,8169
AT3G53500	RS2Z32							
GRDQpSLpSPDRK		1419,59	n.d.	n.d.	1,1254	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G57150	NAP57							
KHDDSSDpSPAPVTTK		1665,72	1,1706	n.d.	n.d.	1,1022	0,6071	1,9865
HDDSSDpSPAPVTTK		1554,58	1,0008	3,0228	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HDDSSDpSPAPVTTKK		1665,72	n.d.	n.d.	n.d.	0,8415	n.d.	n.d.
AT3G60600	VAP27-1							
VTYVAPPRPPpSPVHEGSEEGSpSPR		2694,20	n.d.	1,3153	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT3G61260	Remorin family protein							
IALESESPAKVTpTPAPADTPAPAPAEIPAPAPAPTPADVTKDVAEEK		4712,36	n.d.	n.d.	n.d.	1,2006	n.d.	n.d.
AT3G61860	RS31							
RPpSPDYGR		1028,44	n.d.	2,1879	1,2482	1,0140	n.d.	1,7269
AT3G62330	Zinc knuckle (CCHC- type) family protein							
GpSPQAYGSDR		1118,44	1,0142	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fortsetzung

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT4G05150	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein							
EVSTLSDPGpSPR		1325,58	1,5980	4,0562	1,5430	1,3225	0,8879	1,5518
EVpSTLSDPGpSPRR		1580,60	n.d.	1,5145	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DVPpSPYGSTSSAPVMR		1731,75	1,0053	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DVPpSPYGSTSSAPVoxMR		1747,74	n.d.	1,2406	1,2279	n.d.	n.d.	n.d.
ISTPELPPPVFIKPESPEVPpSpTPK		2748,35	n.d.	1,6608	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ISTPELPPPVFIKPEpSPEPVSTPK		2668,39	1,2528	n.d.	1,3780	n.d.	0,8972	1,6164
ISpTPELPPPVFIKPESPEPVSTPK		2668,39	n.d.	n.d.	n.d.	1,2876	n.d.	n.d.
AT4G11740	SAY1							
LAAPSpSPFDDDSDDVDEQPLVR		2469,06	1,0502	n.d.	n.d.	n.d.	0,8376	1,3158
SGpSPEEEHASINPAER		1790,75	1,3982	1,9728	1,6201	1,2720	0,8841	1,9491
AQPRPPpSPSLTAQR		1586,79	n.d.	1,2214	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EAPVNDDDEMDIDDVIPAPQpSPLSMFNAAR		3354,46	n.d.	n.d.	2,1442	n.d.	n.d.	n.d.
EAPVNDDDEoxMDIDDVIPAPQpSPLSoxMFNAAR		3386,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,3714
AT4G12770	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein							
ASVNpSPTASQMDELDDFSIGR		2320,97	2,9947	n.d.	4,5290	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G12780	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein							
FENVFSSISSpSPTK		1610,72	1,5527	3,2417	1,7501	1,3958	0,5761	2,0270
AT4G13350	NIG							
TSEEGSQpSPEQVKDLGSASPPVARPVR		2890,40	0,9029	n.d.	n.d.	1,2317	n.d.	n.d.
KTSEEGSQpSPEQVK		1632,66	n.d.	1,3802	1,2051	n.d.	0,6582	n.d.
TSEEGSQpSPEQVKDLGSAPpSPPVARPVR		2970,36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,5585	n.d.
SSPGGRpSPGFETGSR		1559,67	n.d.	1,2085	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SpSPGGRSPGFETGSR		1559,67	n.d.	n.d.	n.d.	0,9161	n.d.	n.d.

Anhang - Tabelle A7: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch metabolische ^{15}N -Markierung identifiziert wurden.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz	DEX		SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX	
AT4G13510	AMT1;1							
RVEPRpSPpSPSGANTTPTPV		2110,94	n.d.	1,3747	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G15545	unknown protein							
LTPPGpSPPILSASGTPK		1700,87	1,3578	3,7643	1,3077	1,2289	0,6840	1,6824
TTSRPpSPR		1095,54	1,2739	1,4983	1,2620	n.d.	n.d.	n.d.
TTpSRPpSPR		1175,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4715	1,6263
HSSIQQQASEAIEPAATDNENDAPKPSLSASLPLVSQTTpTPR		4557,18	2,6244	n.d.	3,3172	n.d.	0,3886	3,1893
AT4G17720	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein							
VHLSEpSPKAASSTQEAERESK		2353,10	n.d.	n.d.	n.d.	1,2380	n.d.	n.d.
AT4G17950	AT hook motif DNA- binding family protein							
AQNTPEPASAPANoxMLSFGGVGGPGpSPR		2665,20	n.d.	1,2262	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G22285	Ubiquitin C-terminal hydrolases superfamily protein							
SDpSPPPPLGFNNPLLPLANTYDDDDDEEEENEQKK		3909,71	1,1207	3,1659	1,3660	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G23040	Ubiquitin-like superfamily protein							
TQRPPpSPSLTAQR		1520,75	1,3296	1,6356	1,4217	1,2071	0,8332	1,9340
AT4G25070	unknown protein							
RPGTSASSpSPToxMSPSHR		1840,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,9619
AT4G25500	RS40							
ERTpSPDYGR		1161,48	1,0382	1,5311	1,1699	1,0706	0,6901	1,6506
pSRSPRpSPPADE		1376,46	n.d.	1,0684	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G27320	PHOS34							
IHHPSpSPR		1011,46	n.d.	1,4205	n.d.	1,1558	n.d.	n.d.
HSHHHSSSTPSAApTPpTPTAGAR		2356,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8688	2,3583
HSHHHSSSTPSAATpTPTAGAR		2277,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,7751	2,7083

Anhang - Tabelle A7: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch metabolische 15N-Markierung identifiziert wurden.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz	DEX		SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX	
AT4G27430	CIP7							
HYSEDVGEVQASQEKPvpSPK		2296,04	1,8788	1,9754	0,9836	0,9696	0,2633	2,1901
HYSEDVGEVQASQEKPvpSPKK		2424,14	n.d.	1,0237	n.d.	0,9379	n.d.	n.d.
AT4G28080	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein							
ESGSTDGDSPTEKDAGDSNSGLpSPKPK		2745,17	n.d.	n.d.	2,5801	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G28610	PHR1							
YRPEPSETGpSPERK		1714,78	3,2255	1,2945	n.d.	1,3894	n.d.	n.d.
YRPEPSETGpSPER		1585,67	1,7074	n.d.	n.d.	1,3264	n.d.	n.d.
AT4G29440	Regulator of Vps4 activity in the MVB pathway protein							
EKPSSPPTFDDGPTpSPPASLHEPEPSAK		2984,35	n.d.	1,2080	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FGPLASGLENETTLPSYGSpSPPRDK		2702,27	n.d.	n.d.	1,7298	n.d.	n.d.	1,8546
AT4G29810	MKK2							
IISQLEPEVLpSPIKPADDQLSLSDLDMVK		3275,67	2,5886	0,5826	1,9756	1,5656	2,3714	1,9583
IISQLEPEVLpSPIKPADDQLSLSDLDoxMVK		3291,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,1730
AT4G31580	RSZ22							
RRpSPpSPPPAR		1282,58	1,0641	1,3723	1,1852	1,0781	0,7158	1,6441
AT4G31880	unknown protein							
AAEISpTPERTDAPKDESGK		2083,95	n.d.	1,1929	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G32330	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family							
TASGADSEETQpTPR		1548,57	1,5815	n.d.	n.d.	1,1291	n.d.	20,2378
QAHETSEDDTQSSNpSPK		1941,76	1,1422	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d.
QAHETSEDDTQSSNpSPKADDGKPR		2683,13	n.d.	n.d.	1,3519	n.d.	0,4824	2,1142

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT4G33400	Vacuolar import/degradation, Vid27-related protein							
LRPKpSPSSSLDDVEAK		1831,83	n.d.	1,4189	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G35140	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein							
SSSpSPEREGESSSATGR		1791,72	n.d.	1,3009	1,4780	0,8930	0,6135	1,9726
AT4G35785	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein							
pTPTPGHYLGLK		1278,58	1,0415	n.d.	1,2508	0,9588	0,5927	1,6710
AT4G35980	unknown protein							
AApSPDPLGESSSSGTAR		1670,71	1,0212	3,5097	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT4G38550	pEARLI4-like							
NSSPPpSPFHAAAYK		1580,70	4,5045	1,9474	2,0201	2,9203	n.d.	2,4443
NpSSPPpSPFHAAAYK		1660,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,8132	n.d.
NSpSPPpSPFHAAAYK		1660,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,5422
NSSPPpSPLHPAASHpSPPPPQPYR		2580,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,8458
STPGSPAHPGARpSPPPSYLSNK		2384,14	3,8984	n.d.	1,8143	1,8162	n.d.	1,8151
STPGpSPAHPGARpSPPPSYLSNK		2464,10	n.d.	1,9380	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
STPGpSPAHPPGAR		1330,54	n.d.	1,3221	n.d.	n.d.	n.d.	2,4369
MEAMSYEPETNAPSpSPYHPAGNR		2618,06	n.d.	1,3545	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
oxMEAoxMSYEPETNAPSpSPYHPAGNR		2650,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,4578
pSPPPSYLSNKR		1326,63	n.d.	1,1977	1,8717	n.d.	n.d.	1,9802
pSPPPSYLSNK		1170,53	n.d.	n.d.	1,9338	n.d.	n.d.	1,7316
AT4G38710	glycine-rich protein							
TLPVAVVEVVKPEpSPVLVIVEKPK		2651,54	n.d.	1,2226	7,5886	n.d.	n.d.	11,8874

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz	DEX		SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX	
AT4G39680	SAP domain-containing protein							
VVPPpSPKEPTNSLR		1601,81	700,3232	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ADMDAGKGKpSPENK		1529,67	0,9658	2,1288	0,9238	1,0303	0,6177	n.d.
VPEAQITNSATPTTpTPR		1864,89	n.d.	1,0832	4,4090	2,2946	n.d.	n.d.
AT5G02850	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein							
LGLTGPGpSPSVQNPTPTR		1859,91	n.d.	n.d.	n.d.	1,6160	n.d.	n.d.
AT5G03040	IQD2							
LKPQpSPLGGTTQENEGFTDKASAK		2586,24	0,8560	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G03110	unkown protein							
SAAAVAQEPSPSPK		1338,56	n.d.	1,2298	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G09850	Transcription elongation factor (TFIIS) family protein							
FNQPGDLEPPSLIADEDpSPVQK		2477,13	0,9920	6,1538	1,1118	1,0666	0,9077	1,5158
AT5G10470	KAC1							
SDAALLNLEEGSpSPIPNPSTAAEDSR		2723,24	1,5533	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G13260	unknown protein							
LSDIELKpSPGGPK		1436,67	5,7376	n.d.	7,3000	n.d.	1,1074	3,6514
SSpSPANSPAVSVR		1339,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,6743	n.d.
AT5G14120	Major facilitator superfamily protein							
REDQEPGLQpTPDLILpSEVEDEKPK		2927,33	n.d.	1,4835	n.d.	n.d.	n.d.	1,5248
AT5G14720	Protein kinase superfamily protein							
FKVTSADLpSPK		1273,63	n.d.	1,3169	1,4314	1,1456	0,5853	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
Modifizierte Peptidsequenz			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
AT5G15030	Paired amphipathic helix (PAH2) superfamily protein							
RIGDKEIDGSGSQNQHPVGpSPR		2416,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8938	2,1602
IGDKEIDGSGSQNQHPVGpSPR		2260,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,6218
AT5G15270	RNA-binding KH domain-containing protein							
SEDpSPEGEKQVTAK		1585,68	1,1566	16,7520	0,9879	1,3524	0,7692	1,9379
AT5G18230	transcription regulator NOT2/NOT3/NOT5 family protein							
NIMGVESNVQPLTpSPLSK		1994,97	65,2441	n.d.	n.d.	18,5768	n.d.	n.d.
AT5G21160	LA RNA-binding protein							
STSAETIGDGDKDpSPK		1688,71	1,6688	n.d.	1,4333	1,3819	0,6010	2,4959
AT5G22650	HD2B							
SPVNANQpSPK		1122,50	n.d.	n.d.	1,8187	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G41950	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein							
ELLSELKSEEGDGpTPHSSASPF SR		2642,18	n.d.	n.d.	1,9052	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G45190	Cyclin family protein							
NVDVGDALISQpSPK		1540,67	0,9392	n.d.	n.d.	1,1052	0,6642	1,8116
AT5G45510	Leucine-rich repeat (LRR) family protein							
GNPSDQESSSEpSPKK		1657,68	n.d.	n.d.	1,3111	n.d.	1,7134	1,4185
GNPSDQESSSEpSPK		1529,58	n.d.	n.d.	1,9444	n.d.	n.d.	2,1758
AT5G46070	Guanylate-binding family protein							
GGKDSPADSASpSPR		1509,64	12,3710	n.d.	6,1173	3,7443	0,8412	4,4774
DSPADSASpSPR		1267,51	n.d.	n.d.	30,7388	n.d.	n.d.	n.d.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz								
AT5G46870	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein							
SS p SP T REDVSVFR		1547,70	n.d.	n.d.	n.d.	2,2484	n.d.	n.d.
AT5G52040	RS41							
VAp SP ENGAVR		1094,45	n.d.	2,6404	1,2674	n.d.	n.d.	n.d.
ERVAp SP ENGAVR		1365,64	n.d.	1,9303	0,9194	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G52200	I-2							
TPYHPoxMDDDGSL p SPR		1915,74	1,3561	9,6443	1,5880	1,2051	0,9858	1,6757
TPYHPMoxMDDDGSL p SPR		1916,76	n.d.	n.d.	n.d.	1,6009	n.d.	n.d.
AT5G53420	CCT motif family protein							
LGAGLVQ p SPLDR		1306,66	n.d.	1,3919	0,8976	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G53830	VQ33/MVQ3							
DSQPLLLPLFPVAp SP AR		1902,00	28,6261	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AT5G54430	PHOS32							
IHHPP p SPR		1021,48	1,3380	1,5019	n.d.	0,9438	0,8318	n.d.
AT5G55210	unknown protein							
VISKDSEIEETEEFDTE p SPLPK		2603,17	0,7838	0,8097	1,4299	0,9546	0,6117	2,1923
EKVISKDSEIEETEEFDTE p SPLPK		2861,32	0,7104	n.d.	n.d.	n.d.	0,5225	n.d.
AT5G55230	MAP65-1							
ETLNRPAAPTNYVAISKEEAASSPVGAADHQV P Ap SP		3814,82	0,9941	1,5663	1,2519	0,9872	0,5472	1,6208
EEAASSPVGAADHQV P Ap SP		1987,85	0,9034	1,9985	1,1126	0,7881	0,5549	n.d.
AT5G62865	unknown protein							
APAI p SP T SLSALTPR		1562,81	n.d.	n.d.	n.d.	1,4315	n.d.	n.d.
AT5G63480	unknown protein							
ASEMQNGLG p SP E SEDEIEKLEEQALSLR		3171,42	n.d.	1,2619	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ASEoxMQNGLG p SP E SEDEIEKLEEQALSLR		3187,43	n.d.	n.d.	1,4035	n.d.	0,5557	1,6331

Anhang - Tabelle A7: Liste aller putativen MAP-Kinase-Substrate, die durch metabolische 15N-Markierung identifiziert wurden.

ATG Code	Proteinbeschreibung	Peptidmasse [Da]	Wildtyp-Hintergrund			mpk6-Hintergrund		
			DEX	SA	SA + DEX	DEX	SA	SA + DEX
Modifizierte Peptidsequenz								
AT5G66730	IDD1							
NLPGoxMPDPDAEVIALpSPK		1960,92	0,8911	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

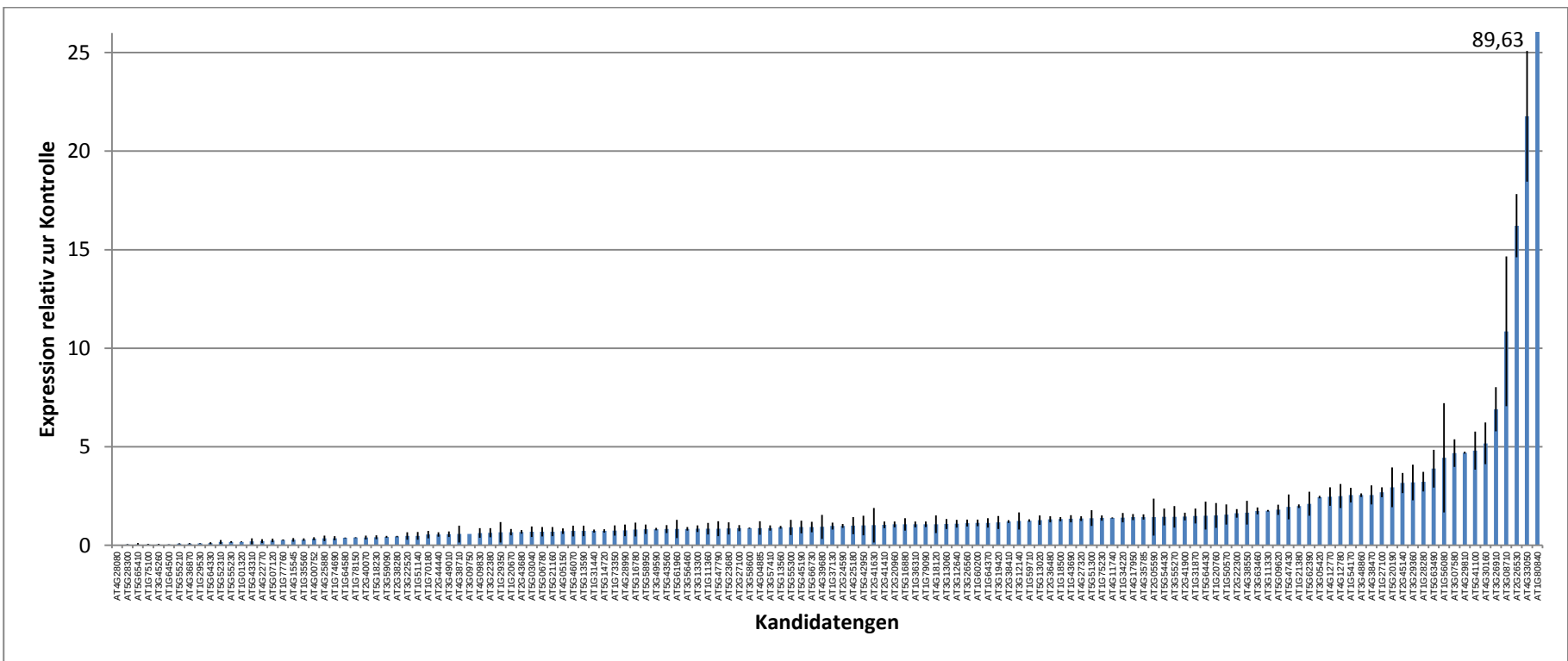


Abbildung A5: Relative Quantifizierung der Expression der Gene, die für Kandidaten putativer MAP-Kinase-Substrate kodieren. RNA wurde aus Dexamethason-behandelten Pflanzen und aus Kontrollpflanzen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde als Vorlage in quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) verwendet. Die gemessenen Werte wurden auf das Kontrollgen *ACTIN2* normalisiert und der Quotient aus DEX-behandelter Probe und Kontrollprobe gebildet, um die relative Expression der Gene nach DEX-Behandlung anzugeben. Etwa zwei Drittel der Gene sind durch die DEX-Behandlung in ihrer Expression nicht reguliert, je etwa ein Sechstel der Gene wird herauf- (≥ 2) bzw. herunterreguliert ($\leq 0,5$).

Tabelle A8: qRT-PCR-Werte der markierungsfrei identifizierten putativen MAP-Kinase-Substrate. Die verwendeten Primerpaare sind mit den jeweiligen 5' → 3'-Sequenzen angegeben. Zu jedem Gen ist der Median der relativen Genexpression mit dem Wert der Standardabweichung aus den Messungen zu jeweils drei unabhängigen Experimenten aufgeführt.

Primernamen	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT1G01320_qPCR_F	GCTGCGCGAAATGGTACTCCTAAG	0,18	0,02
AT1G01320_qPCR_R	CTTTGCCTTTTTCGTTATGACTTGG		
AT1G11360_qPCR_F	GGTTGAGGCGGATATTCCGT	0,85	0,30
AT1G11360_qPCR_R	CCCTAACCTCTCCACCTCCAAA		
AT1G18500_qPCR_F	CTCCGCCACAAAAATCCCTT	1,33	0,11
AT1G18500_qPCR_R	CTGACTTTTTTGGTATTTGCCGG		
AT1G20670_qPCR_F	TTGGTCCTGTTGCCTGGAAA	0,67	0,16
AT1G20670_qPCR_R	CCAACCCAACCTTGACCAAA		
AT1G20760_qPCR_F	TGCCACCTGGAAGTGCAGTT	1,52	0,63
AT1G20760_qPCR_R	ATGGTTTCATTTTGGCCACG		
AT1G21380_qPCR_F	ATCTGCAGCGCGTTCTTCAG	1,99	0,08
AT1G21380_qPCR_R	GCGGTATTGGAGTGGGAGCT		

Primernamen	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT1G27100_qPCR_F	CATCGGAGACCGACGAGTTC	2,70	0,25
AT1G27100_qPCR_R	GCAGAGAAGAAGAAGGCGGTG		
AT1G28280_qPCR_F	CCCCGTAAACCGGAGATCCT	3,23	0,50
AT1G28280_qPCR_R	CGGGTATAAGAGGCGTAACCG		
AT1G29350_qPCR_F	AGGGAACATGCAACTCTGATT	0,66	0,52
AT1G29350_qPCR_R	GCTTCAAAAATCACGTTGAGC		
AT1G29530_qPCR_F	AAGAAGCAACAGGAAGCGATTG	0,11	0,02
AT1G29530_qPCR_R	TGCTATCACTTCCCCTCCCAT		
AT1G31440_qPCR_F	AAGCTGGATGGTTTCCGTCTG	0,73	0,08
AT1G31440_qPCR_R	TGCTTGGAGTTTGATTCCACG		
AT1G31870_qPCR_F	GCTGCATCAAACCGGTATGGGATTA	1,49	0,37
AT1G31870_qPCR_R	TTCCGTTGCTTTCCTCTCATTGGTC		
AT1G34220_qPCR_F	AAATGCGTCGTGAAATTGCAAAGC	1,40	0,24
AT1G34220_qPCR_R	TGAGCAGCCATCATCTTCTCTTCC		
AT1G35560_qPCR_F	CCACAAACGGAGGTAGTGCTTT	0,29	0,06
AT1G35560_qPCR_R	ATGTGCTGTGATGGATCCTGAA		

Primernamen	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT1G36310_qPCR_F	GTTTACGATGCGATTGCTCCTC	1,07	0,14
AT1G36310_qPCR_R	GTAACGATTTCGAGAAAGGCAGC		
AT1G37130_qPCR_F	CGCAGCCCCGAGAAAATGATAT	0,98	0,18
AT1G37130_qPCR_R	GGCTTGCACACGTTAGTCTTCA		
AT1G43690_qPCR_F	ATGTGGGCTTCCTCACGTTG	1,35	0,18
AT1G43690_qPCR_R	CATATTGGCCATTTGGGACATT		
AT1G50570_qPCR_F	TGGCAGTGGTGAAACCAAAAC	1,56	0,51
AT1G50570_qPCR_R	AACCTCAAGCACACCGATGAAA		
AT1G51140_qPCR_F	TGCGGTTCAATACATCAAGGACCTG	0,48	0,19
AT1G51140_qPCR_R	CGCGCATACTCCCACTTCTAGTTTC		
AT1G54170_qPCR_F	GAACCAAATCCCGTACTGTCAGCAA	2,55	0,37
AT1G54170_qPCR_R	GAGACGCTATCGCTGGATAGAGGAA		
AT1G56080_qPCR_F	TGATTCCCACCGACCCTTATG	4,44	2,77
AT1G56080_qPCR_R	GATTCGAAACCCTTGAAGCGA		
AT1G59710_qPCR_F	TCTACGGAGCCATCACGACAA	1,26	0,06
AT1G59710_qPCR_R	CACCTGCTGAGCCGTTACGT		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT1G60200_qPCR_F	AATGGTTATCCCGGAATTCATGGTG	1,13	0,17
AT1G60200_qPCR_R	CAGGACGAACCATTGTTGGATATGG		
AT1G64370_qPCR_F	TTAGCCCCGACTTTGAACCACC	1,14	0,23
AT1G64370_qPCR_R	CCTAGCCCCACTCTGACCCTTTT		
AT1G64500_qPCR_F	CAAGCAAAAGCTAACGTCGTCG	0,06	0,01
AT1G64500_qPCR_R	CTTGGATGGCGTTGACATCA		
AT1G64580_qPCR_F	GTTTCTGCCGATGCTCACGA	0,38	0,02
AT1G64580_qPCR_R	AAGAGTGACAATGCTGGGACGA		
AT1G70180_qPCR_F	CAAATGTCGGAAGGTTTCGAGAC	0,54	0,19
AT1G70180_qPCR_R	CACTTGCAGCTCGATTACCA		
AT1G73350_qPCR_F	TTCATGGACGAGGCGCTTTAGATAG	0,75	0,26
AT1G73350_qPCR_R	AGATGCTGGAGATGAATCAGCTTGG		
AT1G74690_qPCR_F	GGGAACAAGCTTGCAAATCCTACAG	0,36	0,10
AT1G74690_qPCR_R	GCACTTTTGGTGATGAAGCGAGAA		
AT1G75100_qPCR_F	GAACATCGATGCTAAAATCCGCAAG	0,05	0,03
AT1G75100_qPCR_R	CACCCGCTCCCAGACCAAAGAA		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT1G75230_qPCR_F	AAAATGGAGCAGCTTTGCGAG	1,39	0,13
AT1G75230_qPCR_R	TTTAGATTCAATGAGCCGCCAC		
AT1G77760_qPCR_F	TGCTGAGCTGGCAAATTCCGAAG	0,27	0,03
AT1G77760_qPCR_R	CTCTGCGTGACCAGGTGTTGTAATC		
AT1G78150_qPCR_F	CTCCGGTGAGAAAGCCACAC	0,39	0,02
AT1G78150_qPCR_R	GAAGCGGAGGAAGGAGAATCC		
AT1G79090_qPCR_F	AACCGTTTTGGGACTTCGGATTTTC	1,07	0,14
AT1G79090_qPCR_R	CCAAAAGCGTCCATAACCGCTACC		
AT1G80840_qPCR_F	GGATCAAATCAGCCCTCCCA	89,64	11,60
AT1G80840_qPCR_R	CTCCGACACTCCGCCAATAAC		
AT2G05590_qPCR_F	TTAGACCTACCGGTGCCAACC	1,44	0,93
AT2G05590_qPCR_R	CCAAACGCCAAAAATTCATTC		
AT2G20960_qPCR_F	TTCAAGCAATGTCGATTGCT	1,06	0,15
AT2G20960_qPCR_R	TTGCAAAGTAGTCTCCCCCTGA		
AT2G24590_qPCR_F	TGAACTCGAGGATGAGTTTCGTTCC	0,98	0,10
AT2G24590_qPCR_R	CGTCACGGGCATCTCTTGAATC		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT2G26530_qPCR_F	TTGGGAAGAGACTCCAGGCAC	16,21	1,60
AT2G26530_qPCR_R	CCACCAATCTCGAAAGCGAA		
AT2G36480_qPCR_F	AGAGACCGCACCCAATTTGACTAGG	1,32	0,15
AT2G36480_qPCR_R	TGAGGTGCGCCGAATGTTTTTAGCTG		
AT2G38280_qPCR_F	CCTGGTCTCCCTAGGCTTCATACG	0,45	0,04
AT2G38280_qPCR_R	ACAGGGGATTTCTGGAGATATTGGTC		
AT2G38410_qPCR_F	CTCTTGGGCGACATGCTACAA	1,20	0,07
AT2G38410_qPCR_R	CAACGCTCAACCAAGTCAACAA		
AT2G40070_qPCR_F	TCGCCGGTGTTTAACATCTCAAGTG	0,40	0,10
AT2G40070_qPCR_R	TGGAGGGGTCAGAAGCCATTCA		
AT2G41410_qPCR_F	TCATGAACCACCGAGTCAAGAA	1,04	0,17
AT2G41410_qPCR_R	TCAAGGCTGATACAACCACCGT		
AT2G41630_qPCR_F	GCAACTATCAAGGATCGGGCTA	1,02	0,87
AT2G41630_qPCR_R	GTGCATCCTGATTTCTTCCCCT		
AT2G41900_qPCR_F	GCATCAACTGGTTCAGCGGT	1,46	0,20
AT2G41900_qPCR_R	TGATGGAGAACCAGGAAGGAGA		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT2G43680_qPCR_F	GTACATGCAGCAAGTGGTCCG	0,68	0,09
AT2G43680_qPCR_R	TCTACCTGGGCTTGGTTTTCC		
AT2G44440_qPCR_F	CGAGGACCTGTTCTATTGTCAAGG	0,55	0,11
AT2G44440_qPCR_R	CGTGGAGGTTGATCTGAAGGATGG		
AT2G45140_qPCR_F	TGCTCCAAGATTTAGCGCAGACA	3,16	0,50
AT2G45140_qPCR_R	CAGTTGAACCGCAGAGTTCTTTTCC		
AT3G05420_qPCR_F	AAGCGCCTTTGCCAGGTAGT	2,45	0,07
AT3G05420_qPCR_R	TCTTGGCTCACCTCAACCTCAG		
AT3G07580_qPCR_F	GGCAGCTGAAATGCATCAATACGAC	4,68	0,69
AT3G07580_qPCR_R	CTGCAGCCAGGATCTGATGAGG		
AT3G09750_qPCR_F	CCCTCTGCCGGAACTTGATA	0,58	0
AT3G09750_qPCR_R	GAGAATGCGGGATTGGGACT		
AT3G11330_qPCR_F	AGGATGAGGAGAATGTTGCGG	1,76	0,04
AT3G11330_qPCR_R	ATCCACCGGATTAGCAGAAGC		
AT3G12140_qPCR_F	GGGTCGGCATGCTTTGGTGTAT	1,24	0,43
AT3G12140_qPCR_R	CTCCTCCCCATCCCATCTTATGTCT		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT3G12640_qPCR_F	GACGACTCACGGAATGAACAGAGG	1,10	0,20
AT3G12640_qPCR_R	GCATCTCGCACAGCAAAGTGAAG		
AT3G13060_qPCR_F	GCAGCAAGTCCCTTGCCTTC	1,08	0,26
AT3G13060_qPCR_R	GCTGGTAATACGGTGATGCCC		
AT3G13300_qPCR_F	CCGAGCTGTAAATTGCCCAAG	0,84	0,16
AT3G13300_qPCR_R	CTGCGGCTGAATCTCACCTT		
AT3G19420_qPCR_F	ACTGTAAGGCTGGCATGGCA	1,17	0,33
AT3G19420_qPCR_R	CTTCGGCAGTGGGAAAGAACT		
AT3G22380_qPCR_F	AAGCTCGGTCAGCGTGTACG	0,64	0,24
AT3G22380_qPCR_R	CGATGGATTTGTTACCGGA		
AT3G22520_qPCR_F	GCAGAAGCGAGAGTGCAAAAAGG	0,48	0,19
AT3G22520_qPCR_R	ACTGGTTCCGTATCAAACCCAGGA		
AT3G26560_qPCR_F	CGTGCTCAAGATGTGAGGAAACAAC	1,13	0,17
AT3G26560_qPCR_R	GCCGTGATTGCTTTCCTTATCTTCG		
AT3G26910_qPCR_F	AGTCCCCTGGTCTGGTTGGT	6,91	1,12
AT3G26910_qPCR_R	GGACGGAACAGCAACAGTGAC		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT3G29360_qPCR_F	GACCGTTACTTGGGACGCATAC	3,19	0,90
AT3G29360_qPCR_R	GACCGTTACTTGGGACGCATAC		
AT3G45260_qPCR_F	ACCGCCGACATGAACCAGTAATC	0,05	0,03
AT3G45260_qPCR_R	ACCGCCGACATGAACCAGTAATC		
AT3G48860_qPCR_F	CGGTGAAAAC TCCGGTTTCTATTCC	2,55	0,09
AT3G48860_qPCR_R	TCCCGCTGATCACCTTTTCTT		
AT3G49010_qPCR_F	AGGCTGCTGGTATCCCAAAGA	0,56	0,14
AT3G49010_qPCR_R	GAAGACCCTCCAAAGATCGGTT		
AT3G49590_qPCR_F	TGCCTCCTGGTCGTCTTTGT	0,82	0,06
AT3G49590_qPCR_R	GGCAATGTGATATGAGCACCG		
AT3G55270_qPCR_F	AGAGGGAGGTTTTGTGCCAAC	1,45	0,54
AT3G55270_qPCR_R	CTCCAAC TGTTCCTTG CAG		
AT3G56460_qPCR_F	TGCTACGAGCTTGAATTACGCA	0,84	0,09
AT3G56460_qPCR_R	CCCGGAATGAAAGGTAACGG		
AT3G57410_qPCR_F	GGGTTTGCTCCAATAGCAAGGAAAG	0,88	0,13
AT3G57410_qPCR_R	TCGCCGTCTATAGATTCCACCTGA		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT3G59090_qPCR_F	AAGTTGGATGGACTCGGCAAAAAGT	0,43	0,05
AT3G59090_qPCR_R	CCACCTTGTGCAAGTCGCTATAACC		
AT3G63460_qPCR_F	AGCAGCTGGACCCATAGGATTT	1,75	0,17
AT3G63460_qPCR_R	TGTTGGAGGACTTGCTGGTTG		
AT4G00752_qPCR_F	GTGAGAACACCGTTGCTTCCA	0,34	0,08
AT4G00752_qPCR_R	TCTCTCGTCGGACTCACCATCT		
AT4G04885_qPCR_F	GGGCGGGATTATGGTCGCTATTTT	0,88	0,34
AT4G04885_qPCR_R	GGTGACGCATTGACGGATGTAAACG		
AT4G05150_qPCR_F	ATGGGATACCACCAACCTCAGA	0,72	0,14
AT4G05150_qPCR_R	CATCATAACCGGCCTAACCGTT		
AT4G09830_qPCR_F	ACCAGGCCAAGAACTCGGTTT	0,62	0,25
AT4G09830_qPCR_R	CCTGCGGAATTTGGTAGTTCTG		
AT4G11740_qPCR_F	TCTCTGGCTCCACCTAACGCT	1,39	0,03
AT4G11740_qPCR_R	CCACGCTCCGCTGGATTAATA		
AT4G12770_qPCR_F	ATTGGTGGGACCCTGGATGT	2,47	0,47
AT4G12770_qPCR_R	TAATGTTGAAAGCAGAGCACGC		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT4G12780_qPCR_F	CTCCTCCATCTAAGCGGACAA	2,50	0,61
AT4G12780_qPCR_R	GATGTCTCGGCAGTTCGATATG		
AT4G15545_qPCR_F	TTCTCGCCGAGAAAAGAAAAAGA	0,28	0,09
AT4G15545_qPCR_R	TGAAACGCATCGGAAAGAGAAG		
AT4G17950_qPCR_F	CCGCTGTTTTAATGGGTCACAA	1,43	0,15
AT4G17950_qPCR_R	GCGGTGACATAGAACCACCAA		
AT4G18120_qPCR_F	CAAGGCCAAGCTGCTTAAAAAGAGG	1,07	0,44
AT4G18120_qPCR_R	GGAGCCAAGTTGAAAACCACAAGAG		
AT4G22770_qPCR_F	ACGCCGCATATTATTACGGTGAATG	0,21	0,10
AT4G22770_qPCR_R	CGACACCGTTTGCGCATAAAAC		
AT4G25180_qPCR_F	TTCTTGACCAGGAGGAATTTGG	1,00	0,43
AT4G25180_qPCR_R	CGAGTTCTTCTGCGGAGTTGAT		
AT4G25880_qPCR_F	TCCCGGCAGACAAAGTTGGTTTC	0,36	0,14
AT4G25880_qPCR_R	CAACGCTCCAAAAGCCTCTGTATGA		
AT4G27320_qPCR_F	GCTGCTTCCGATCATCATGAACAC	1,36	0,12
AT4G27320_qPCR_R	TCCGTTTTGTTTCATCCATCGTTGT		

Primernamen	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT4G28080_qPCR_F	CCAGGTGCGTGGCACTAAACTC	0,02	0,01
AT4G28080_qPCR_R	GTGGCTTGCTCCTCCGTATAGTCC		
AT4G28990_qPCR_F	AACTTTGCGAGACGCGAGTC	0,77	0,29
AT4G28990_qPCR_R	AAGAAGGCGAGGCAGTGGAG		
AT4G29810_qPCR_F	CAGCTGGTTCAACACAAATGGA	4,70	0,05
AT4G29810_qPCR_R	TGCCTTGCGAATTGCTTCAT		
AT4G30160_qPCR_F	GGGTTGGCCAAGAAGTAGTCCCAAA	5,17	1,06
AT4G30160_qPCR_R	GGGCTTCAGGGGATAACTTCTCCAG		
AT4G33050_qPCR_F	GGAGCACAATGTTGATCTCACC	21,77	3,32
AT4G33050_qPCR_R	TGCAGTCGATTTGAATGACGAA		
AT4G35785_qPCR_F	CACATTTGCGCCAAGGAAGGAA	1,44	0,14
AT4G35785_qPCR_R	AAGGCAAAACCACGAGACACAC		
AT4G36870_qPCR_F	CGAATCAGCCGGTATGTTATCC	0,09	0,03
AT4G36870_qPCR_R	GATTGGCCGAGGTCGAGATC		
AT4G38470_qPCR_F	GTTTCGAAGACGACCTCTGGAA	2,55	0,48
AT4G38470_qPCR_R	TCTTCAGCCCTCTCCACATTCA		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT4G38550_qPCR_F	GAATGCAGAGAGAAGGTGACG	1,66	0,60
AT4G38550_qPCR_R	ACGGAGCTAAAGGTGGAGAAG		
AT4G38710_qPCR_F	AGAATCCAATCATGGCGGCT	0,58	0,43
AT4G38710_qPCR_R	CTTCATGTTCTCGGCTTCAAG		
AT4G39680_qPCR_F	CGGTTAGTGAAGATGGACCCAA	0,94	0,61
AT4G39680_qPCR_R	AACGGTCAATCCTGAGGGAATT		
AT5G03040_qPCR_F	TCGTCGCGCTACACCTACTCGAT	0,69	0,27
AT5G03040_qPCR_R	GCAACGCTCTCCTTGCCAAATAAC		
AT5G06780_qPCR_F	TGAACCTGCGGAAGCTCTTATTGG	0,69	0,24
AT5G06780_qPCR_R	CAACGCATGTCGACCCTCATTTG		
AT5G07120_qPCR_F	TGTTGCCATCAGGGAGTACGA	0,25	0,09
AT5G07120_qPCR_R	AAGAAGTCTGCACGCCTTTCC		
AT5G09620_qPCR_F	ATGCGTTTGTTTCTCTTCCCG	1,81	0,26
AT5G09620_qPCR_R	GCGTATCCCGATCCGATTTAGT		
AT5G13020_qPCR_F	GTTTCACGTCCGCGACTCATA	1,28	0,24
AT5G13020_qPCR_R	AAAGAACGCCGTGGAATTGA		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT5G13560_qPCR_F	CCCGAGGAGGTTTCTTCCCTA	0,91	0,07
AT5G13560_qPCR_R	TCCACAGCCTTATTCACGGC		
AT5G13590_qPCR_F	ATTTGTGCGATGACGGGAAG	0,73	0,27
AT5G13590_qPCR_R	ACCACCACACTCAGGATGTGC		
AT5G14720_qPCR_F	TGGAATTTCAATCTCGAGGACC	0,74	0,09
AT5G14720_qPCR_R	AAATCGGGCTCTTCAGCATGT		
AT5G16780_qPCR_F	ATCTGCGTTGGACCTTCAGAATCG	0,80	0,35
AT5G16780_qPCR_R	GGCTCCTTGCAACCCATGATAGAG		
AT5G16880_qPCR_F	TCCTCGCCTCAACATGATGCTTTAC	1,06	0,31
AT5G16880_qPCR_R	GCTTCGTTTTTCACCTGCTGTTTCAA		
AT5G18230_qPCR_F	CATCGTCTTCTTCCTCTCGCTC	0,42	0,10
AT5G18230_qPCR_R	GTCGGGATTTGGTTACGGAAAG		
AT5G20190_qPCR_F	TGCGTCTTCTTCCTCTTGCTGT	2,94	1,01
AT5G20190_qPCR_R	TGACGCCGTTCTTTTCATCCT		
AT5G21160_qPCR_F	CTGCTCCGCCGTCTAAAAACATTC	0,70	0,24
AT5G21160_qPCR_R	CTTGTGTCCAGGATTAGCCTTTCCA		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT5G23680_qPCR_F	CTCGTTTTCCATGGCCGAGT	0,86	0,31
AT5G23680_qPCR_R	TGAGTTTATTATCGCCGGCG		
AT5G28300_qPCR_F	CAGCCAGAGATCTAGACACCCG	0,04	0,02
AT5G28300_qPCR_R	TTGCTTTTATCGCCAGCACC		
AT5G41100_qPCR_F	AGCTAGAGACTGCTCGCGATGA	4,80	0,96
AT5G41100_qPCR_R	AGCTTGCCCTTCCTTGAGAGA		
AT5G42950_qPCR_F	AGGCGTCTCTTGATGCGCTTA	1,01	0,50
AT5G42950_qPCR_R	ACCTGCACCTGCTGATTGACTT		
AT5G43310_qPCR_F	TGCCTGGGACACCTGAAAATAGTG	0,21	0,15
AT5G43310_qPCR_R	TGAACTGGCCAGGGTGCATACAT		
AT5G43560_qPCR_F	TTGCAGACGAACACGGTACAAT	0,83	0,21
AT5G43560_qPCR_R	CGCACCGCCATGATATGAGTA		
AT5G45190_qPCR_F	TGAGCAAAATCGTGTCCCTG	0,92	0,32
AT5G45190_qPCR_R	GCTGAGCTGACCCTCCACCTA		
AT5G46070_qPCR_F	CAAGGTTCTGGGAGGGGATATTGG	0,73	0,28
AT5G46070_qPCR_R	TGCAGGTCCTTCTCATTGTTTCAGAG		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT5G47430_qPCR_F	CCTGGAAGGATGAATGGACGTG	1,95	0,63
AT5G47430_qPCR_R	TTGTGGGGCAATGCTGAATAAAATG		
AT5G47790_qPCR_F	AATCAAACCTGGCATCCCCCT	0,85	0,38
AT5G47790_qPCR_R	TCTGGCCGTCTTTCACAACTTC		
AT5G51300_qPCR_F	TCAGGAAGCTCTTGAAGCTGCT	1,38	0,40
AT5G51300_qPCR_R	TTGCCTCTTGTGCTCGTTGAG		
AT5G52310_qPCR_F	CCGGTGGGAGATCAAACCTCAA	0,17	0,10
AT5G52310_qPCR_R	TCACGGCAGACTCTGTTTCTTG		
AT5G54430_qPCR_F	ATCATGAATCCAGCAGATTCCG	1,44	0,43
AT5G54430_qPCR_R	TGATGGTGAGAGTGACGTGGAG		
AT5G55210_qPCR_F	GTGGCCGTGTAAGGAAATGGA	0,08	0,02
AT5G55210_qPCR_R	CGACCGTTGGATTTAGATGCTC		
AT5G55230_qPCR_F	ATGCTGAACTTTCCAGCCTCAC	0,17	0,04
AT5G55230_qPCR_R	TCCGGAATGCCAACTAAGCTT		
AT5G55300_qPCR_F	GGTGCGCAAATTGAAAAATTGACTG	0,91	0,38
AT5G55300_qPCR_R	CAATGGTGGTTTTCCCTTTTATGCC		

Primername	Sequenz	Median der rel. Genexpression	Standardabw.
AT5G58950_qPCR_F	TCAAGCTGCTTTCGCAGTCGTACAT	0,82	0,24
AT5G58950_qPCR_R	GCAACCGACCAACACTGCTCTATCA		
AT5G61960_qPCR_F	AAGCTCTCGCCGCCCTATTA	0,83	0,46
AT5G61960_qPCR_R	AGATGGCGAGTTAGGCCACAT		
AT5G62390_qPCR_F	ACTGTTGACGCCATAGAGGGAGTTG	2,11	0,61
AT5G62390_qPCR_R	CGGTTGCGGGTCTACCACATCTAAC		
AT5G63490_qPCR_F	CAATCCCAGAATCCATTTGTTGACC	3,89	0,96
AT5G63490_qPCR_R	GCAATGACGCAGTCGTAACGGATA		
AT5G64330_qPCR_F	TGGGTTTGAGCTTAGAGGCCAATCT	0,11	0,05
AT5G64330_qPCR_R	CAGCAACGGATACTTGTGAAGGTGA		
AT5G64430_qPCR_F	GGTGAAATTACCGGTTCTCTGTG	1,51	0,70
AT5G64430_qPCR_R	TTTACGACGTGATCCGGTTGA		
AT5G65410_qPCR_F	AGAAGACGACGACGCCGTTTA	0,05	0,08
AT5G65410_qPCR_R	TTCCGGTGGTTTCATGACTTTC		
AT5G66730_qPCR_F	CAGCTACTGCATTGCTCCAAAA	0,93	0,27
AT5G66730_qPCR_R	AACTATGCCTAACCCGCGAAG		

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank zum Ausdruck bringen für die große Unterstützung, die mir von allen Seiten zugekommen ist.

Danke an meinen Doktorvater Uwe Conrath. Dafür, dass ich diese Doktorarbeit unter seiner Führung anfertigen konnte, dafür, dass seine Tür immer für mich offen stand, für alle fachlichen Ratschläge, konstruktive Kritik und die Möglichkeiten, die er mir eröffnet hat.

Ich danke ebenfalls Björn Usadel für die Zweitbegutachtung dieser Dissertation, Alan Slusarenko für den Vorsitz bei der Doktorprüfung und Jan Schirawski für die Vervollständigung der Prüfungskommission.

Besonderer Dank gilt Gerold Beckers, der mich schon während meiner Diplomarbeit eingearbeitet hat und der mich auch fördernd und fordernd durch diese Doktorarbeit geleitet hat. Für viele gute Gespräche, gemeinsame Dienstreisen, Rat und auch manche tatkräftige Hilfe: Danke!

Sehr dankbar bin ich auch meinem Kollaborationspartner Wolfgang Hoehenwarter und seinen Mitarbeiterinnen Petra Majovsky und Domenika Thieme für die Expertenarbeit am Massenspektrometer und der Auswertung der Rohdaten. Danke auch für die herzliche Aufnahme in Halle!

Weiterhin gilt mein Dank allen meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen im Institut für Biologie 3, vor allem in der Arbeitsgruppe von Uwe Conrath. Erwähnt seien hier Dennis Hopkins, Stephani Baum, Nicola Huck und Irina Jansen. Vielen Dank für eure Freundschaft, die großartige Arbeitsatmosphäre mit euch, viel Spaß in den Mittagspausen und auch hervorragenden fachlichen Austausch.

Ella Nukarinen und Wolfram Weckwerth danke ich für manchen wichtigen Hinweis und gute Inspiration.

Shuqun Zhang danke ich für die Bereitstellung der Samen der transgenen Pflanzen. Danke an Horst Röhrig für Tipps zur $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC. Dank auch an Dieter Edbauer dafür, dass er mir seinen MAP-Kinase-Substrat-Antikörper zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin danke ich allen meinen Freunden dafür, dass ihr mein Leben zusätzlich zur Familie so bereichert.

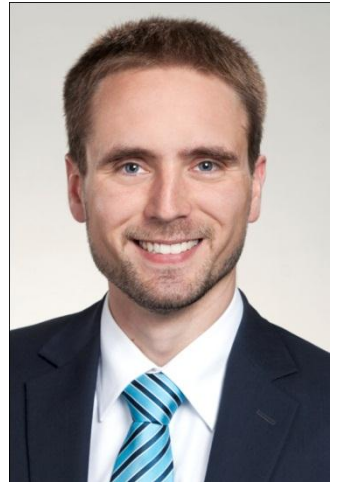
Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken:

Meinen Eltern danke ich für die Rückendeckung, die sie mir gegeben haben, die Ermutigungen, den Antrieb und alle guten Ratschläge!

Sarah und Jonathan: Ihr seid die Sonne in meinem Leben. Bei euch tanke ich auf und bekomme ich immer neue Energie. Sarah, danke dass du mir den Rücken freigehalten hast, wann immer es nötig war. Jonathan, danke für deine Fröhlichkeit, dein sonniges Gemüt und deinen Gesang!

Danke!

Curriculum Vitae



Persönliche Daten

Name: Martin Thomas

Geburtsdatum und -ort: 20. Oktober 1984 in Aachen

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1990 – 1994 Domsingschule Aachen, Grundschule in der Trägerschaft des Domkapitels Aachen

1994 – 2003 Besuch des städtischen Kaiser-Karls-Gymnasiums in Aachen, Abitur mit Abschlussnote 2,0

Studium

WS 04/05 - Biologiestudium an der RWTH Aachen

WS 10/11

SS 06 Vordiplom Note: 2,1

Diplomhauptprüfung im nichtbiologischen
Nebenfach

Makromolekulare Chemie Note: 1,0

Diplomhauptprüfung im biologischen Nebenfach

Biochemie Note: 1,3

Diplomhauptprüfung im biologischen Nebenfach

Botanik Note: 1,0

Diplomhauptprüfung im biologischen Hauptfach

Pflanzenphysiologie / Phytopathologie Note: 1,3

Studienschwerpunkte: Biochemie, Interaktionen
zwischen Pflanzen und Phytopathogenen,
Proteinchemie, Physiologie der Pflanzen

Experimentelle Diplomarbeit im Bereich Biochemie
der Pflanzen. Thema der Arbeit: „Characterization
of MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis*“

07. Februar 11 Diplom im Fach Biologie Note: sehr gut

seit WS10/11 Doktorandenstudium an der RWTH Aachen zur
Erlangung des Dr. rer. nat. zum Thema
„Identifizierung von MAP-Kinase-Substraten in
Arabidopsis“.

Veröffentlichungen

Beckers, G.J.M., Thomas, M., Zhang, S. & Conrath, U. (2011). Phosphoproteomic approach to identify *Arabidopsis in vivo* MAPK-substrates. Posterpräsentation bei der gemeinsamen Jahrestagung der Arbeitskreise "Mykologie" und "Wirt-Parasit-Beziehungen" der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, München, 24.-25. März 2011

Thomas, M., Hoehenwarter, W., Nukarinen, E., Weckwerth, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M (2012). *In vivo* MAP kinase substrates in *Arabidopsis*. Vortrag bei der gemeinsamen Jahrestagung der Arbeitskreise „Mykologie“ und „Wirt-Parasit-Beziehungen“ der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Hohenheim, 22.-23. März 2012

Hoehenwarter, W., Thomas, M., Nukarinen, E., Egelhofer, V., Röhrig, H., Weckwerth, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M. (2013). Identification of Novel *in vivo* MAP Kinase Substrates in *Arabidopsis thaliana* Through Use of Tandem Metal Oxide Affinity Chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**, 369-380

Leissing, F., Thomas, M., Hoehenwarter, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M. (2014) Tandem MOAC identifies novel *in vivo* substrates of MPK3/6 in *Arabidopsis*. Posterpräsentation bei der Conference Current Findings in Plant Pathology in Aachen, 04.-05. Juni 2014

Thomas, M., Huck, N., Hoehenwarter, W., Conrath, U. & Beckers, G.J.M (2015) Combining Metabolic ¹⁵N Labeling with Improved Tandem MOAC for Enhanced Probing of the Phosphoproteome. *Methods in Molecular Biology* Volume 1306, 2015, pp81-96