

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

Perzeption der Abscisinsäure und die Funktion des
Phytohormons bei abiotischem Stress

Simone Demmel

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 18.11.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.02.2011 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	10
Summary	12
1. Einleitung	14
1.1. Das Phytohormon Abscisinsäure	14
1.1.1. Biosynthese und Abbau von Abscisinsäure	16
1.1.2. Abscisinsäure-Signaltransduktion	18
1.1.2.1. Regulation der Stomataapertur	23
1.1.2.2. Genexpressionsregulation.....	26
1.2. Salzstress	29
1.2.1. NaCl-Aufnahme durch die Pflanze und Auswirkungen	29
1.2.2. Mechanismen der Salztoleranz in Arabidopsis	31
1.3. Suche nach Arabidopsis-Mutanten mit gestörter Reaktion auf Trockenheit	34
1.3.1. Infrarotthermographie	35
1.3.2. RNA-Interferenz.....	35
1.4. Abscisinsäure-Rezeptoren	39
1.4.1. Bis Ende 2008 beschriebene Abscisinsäure-Rezeptoren in <i>A. thaliana</i>	39
1.4.2. Der cytosolische Abscisinsäure-Rezeptorkomplex	41
1.4.2.1. RCAR-Proteine und die Bet v 1-Superfamilie in <i>A. thaliana</i>	41
1.4.2.2. RCAR-Proteine in der ABA-Perzeption als Interaktionspartner von PP2Cs ...	43
1.5. Zielsetzung der Arbeit	46
2. Ergebnisse	47
2.1. Salzstress	47
2.1.1. Reporteraktivierung durch ABA.....	47
2.1.2. Reporteraktivierung durch Salzstress	50
2.1.2.1. Zeitliches Muster der Reporteraktivierung.....	51
2.1.2.2. Räumliches Muster der Reporteraktivierung	52
2.1.3. Vergleich der Auswirkungen von NaCl- und Mannit-induziertem osmotischen Stress auf die ABA-Antwort.....	56
2.1.4. Einfluss von NaCl auf Genexpression und Signaltransduktionswege	57
2.1.5. ABA-Akkumulation während Salzstress	63
2.1.6. Einfluss von ABA auf die Salztoleranz	65
2.2. Etablierung eines Screens auf in der Perzeption von osmotischem Stress oder in der ABA-Signaltransduktion gestörte Arabidopsis-Mutanten	68
2.2.1. Verhalten von bekannten ABA-insensitiven und -hypersensitiven Mutanten.....	69
2.2.2. Isolierung und Verifizierung von Kandidaten.....	74
2.3. Charakterisierung des cytosolischen ABA-Rezeptorkomplexes	83
2.3.1. Optimierung der Expression von ABI2 und diversen RCARs in <i>E. coli</i>	83
2.3.1.1. Proteinexpression im pQE-System	83
2.3.1.2. Etablierung weiterer Expressionssysteme sowie Proteinverkürzung.....	85
2.3.1.3. Funktion der RCARs und Einfluss auf die Phosphataseaktivität	89
2.3.2. Regulation der Aktivität von Phosphatasen durch RCARs und Homologe	90
2.3.2.1. Regulation von ABI2 durch RCAR11	91
2.3.2.2. Differentielle Regulation unterschiedlicher Phosphatasen durch verschiedene RCARs	96
2.3.2.3. RCAR-Homologe aus Birke und Erdbeere.....	100

2.3.3.	Kristallisation des Abscisinsäure-Rezeptorkomplexes	108
2.3.3.1.	Optimierung der Kristallisationsbedingungen	109
2.3.3.2.	Auswertung der Kristallstruktur	115
2.3.4.	Charakterisierung der Superfamilie der Bet v 1-Proteine aus Arabidopsis	120
2.3.4.1.	Einfluss von Hormonen und Pflanzenzellextrakt auf die Interaktion von Bet v 1-Proteinen mit Phosphatasen	123
2.3.4.2.	Interaktion von Phosphatasen des Typs 2C mit RCAR-Proteinen	125
3.	Diskussion	130
3.1.	Funktionen der Abscisinsäure bei Salzstress	130
3.1.1.	Die ABA-Antwort auf osmotischen Stress	130
3.1.2.	Limitierte Aktivierung von ABA-Antworten durch Salzstress	132
3.1.3.	Anpassung von <i>Arabidopsis thaliana</i> an Salzstress	134
3.2.	Der ABA-Rezeptorkomplex	141
3.2.1.	Funktion der RCAR-Proteine in der ABA-Signaltransduktion	141
3.2.2.	Unterschiede in ABA-Selektivität und Sensitivität von Rezeptorkomplexen	146
3.2.3.	Mechanismus der ABA-Bindung durch die Rezeptorkomplexe	150
3.2.4.	Die Bet v 1-Superfamilie in Pflanzen	157
4.	Material und Methoden	165
4.1.	Physiologische Methoden	165
4.1.1.	Pflanzenmaterial und Anzucht	165
4.1.2.	Samensterilisation und Sterilkultur	165
4.1.3.	Salzstress und osmotischer Stress an Keimlingen	166
4.1.4.	Bestimmung der Reporteraktivität	167
4.1.4.1.	Luciferase-Aktivität (<i>In vivo imaging</i>)	167
4.1.4.2.	Enzymatische GUS-Bestimmung	167
4.1.5.	Klonierung der Reporterkonstrukte <i>pAtHB6::EGFP</i> und <i>pRD29B::EGFP</i>	169
4.1.6.	Transiente Expression in Protoplasten	169
4.1.7.	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	172
4.1.8.	Mikroskopische Verfahren	173
4.1.9.	Bestimmung der Spaltöffnungsweite	174
4.1.10.	Bestimmung von Chlorophyllgehalten	174
4.1.11.	ABA-Extraktion und Bestimmung der Gehalte über HPLC-MS/MS	174
4.1.12.	Aufreinigung eines Pflanzenextraktes aus Arabidopsis-Zellkultur	175
4.2.	Infrarotthermographie bei Pflanzen	176
4.2.1.	Bestehende RNAi-Bibliothek	176
4.2.2.	Infrarotthermographie	177
4.2.3.	Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	178
4.3.	Molekularbiologische Methoden	179
4.3.1.	<i>Escherichia coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung	179
4.3.2.	Herstellung chemisch und elektro-kompetenter Zellen	180
4.3.3.	Transformation kompetenter Mikroorganismen mit Plasmid-DNA	180
4.3.4.	Methoden der DNA-Isolation	181
4.3.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	182
4.3.6.	Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung	183
4.3.7.	Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen	184
4.3.8.	Ligation von DNA-Fragmenten	185
4.3.9.	DNA-Sequenzierung	185
4.3.10.	Klonierungsstrategien	185
4.4.	Proteinbiochemische Methoden	189
4.4.1.	Proteinexpression	189
4.4.2.	Aufreinigung und Dialyse	189

4.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	191
4.4.4.	Silber- und Coomassie-Färbung	192
4.4.5.	Western Blot	193
4.4.6.	Immunologischer Nachweis und Antikörper	194
4.4.7.	Phosphatase-Aktivitätsassay	195
4.4.8.	Massenspektrometrie: MALDI-TOF nach <i>In Gel-Digestion</i>	196
4.5.	Proteinkristallisation.....	199
4.5.1.	Kristallisationsbedingungen und Mikroskopie	199
4.5.2.	Röntgenstrukturanalyse.....	202
4.6.	<i>Yeast Two-Hybrid</i> Interaktionsscreen	203
4.6.1.	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	203
4.6.2.	Verwendete Plasmide und Klonierung von MLPs	204
4.6.3.	Transformation von DNA in Hefezellen	205
4.6.4.	Präparation von DNA aus Hefezellen.....	206
4.6.5.	Bestimmung positiver Interaktion	207
4.6.5.1.	Selektion und Test des Wachstumsphänotyps	207
4.6.5.2.	β -Galactosidase-Assay	208
4.7.	Chemikalien und Geräte.....	208
4.7.1.	Chemikalien / Reagenzien	208
4.7.2.	Vektoren, Plasmide, Oligonukleotide und Restriktionsenzyme.....	208
4.7.3.	Geräte.....	209
4.8.	<i>In silico</i> -Analyse.....	210
5.	Anhang	212
5.1.	Oligonukleotide und Ausgangsplasmide	212
5.2.	Konstrukte zur Proteinexpression.....	215
5.3.	Proteinsequenzen.....	220
6.	Literatur	222

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyssäure
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABI	Abscisinsäure-insensitiv
ABRE	<i>ABA-Response Element</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AHG	<i>ABA-Hypersensitive Germination</i>
Amp	Ampicillin
AREB	<i>ABA-Response Element Binding Protein</i>
AS	Aminosäure
AtHB	<i>A.t.</i> Homöobox Leucin-Zipper
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAP	6-Benzylamino-9-methylpurin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CaMV	Blumenkohl-Mosaikvirus (<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)
CBL	<i>Calcineurin B-like Protein</i>
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	<i>Coupling Element</i>
CIPK	<i>CBL-Interacting Kinase</i>
Col	Ökotyp Columbia
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
CSBP	<i>Cytokinin-specific Binding Protein</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DRE	<i>Drought-Response Element</i>
DREB	<i>Drought-Response Element Binding Protein</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	und andere (lateinisch)
FG	Frischgewicht
FtsH	<i>Filamentation temperature sensitive H</i>
g	Erdbeschleunigung 1g = 9,81 m/s ²
GCA	<i>Growth Control exerted by ABA</i>
GUS	β-D-Glucuronidase

h	Stunde
HAB	<i>Hypersensitive to ABA</i>
HAI	<i>Highly ABA-induced</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
IRT	Infrarotthermographie
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
Kan	Kanamycin
K_d	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Nährmedium
<i>Ler</i>	Ökotyp <i>Landsberg Erecta</i>
LUC	Luciferase
M	mol/l
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MLP	<i>Major Latex Protein</i>
MPa	Megapascal
mQ	milliQ-destilliertes Wasser
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie bzw. Murashige&Skoog-Nährmedium
MUG/MUP/MUS	Methylumbelliferylglucuronid/-phosphat/-sulfonat
OD	Optische Dichte
OST	<i>Open Stomata</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pl	Isoelektrischer Punkt
PP2C	Proteinphosphatase des Typs 2C
PR-10	<i>Pathogenesis-Related 10</i>
PYR1/PYL	<i>Pyrabactin-Resistant 1/Pyrabactin-Resistant Like</i>
RCAR	<i>Regulatory Component of ABA Receptor</i>
RD	<i>Responsive to Desiccation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SnRK	<i>Sucrose non-fermenting Related Kinase</i>
SOS	<i>Salt Overly Sensitive</i>
Tab.	Tabelle
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Struktur und Funktion von Phytohormonen nach Iten et al. (1999)
- Abb. 1.2 Strukturen der Abscisinsäure-Stereoisomeren
- Abb. 1.3 Biosynthese von Abscisinsäure in Pflanzen
- Abb. 1.4 Subgruppe A der PP2Cs in Arabidopsis nach Schweighofer et al. (2004)
- Abb. 1.5 Modell zur Regulation der am Stomataschluss beteiligten Komponenten
- Abb. 1.6 Allgemeines Modell der ABA-abhängigen Gentranskription
- Abb. 1.7 Modell der Signaltransduktion in der Pflanzenzelle bei Salzstress
- Abb. 1.8 Mechanismus der dsRNA-initiierten Genabschaltung
- Abb. 1.9 Phylogenetischer Baum der RCAR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*
- Abb. 2.1 *In vivo imaging* des ABA-Effekts auf *pAtHB6::LUC*-Pflanzen
- Abb. 2.2 Test der EGFP-Konstrukte im Protoplastensystem
- Abb. 2.3 ABA-abhängige Aktivierung des *pAtHB6::LUC*-Reporterkonstrukts, ausgelöst durch Salzstress
- Abb. 2.4 Zeitliches Muster der ABA-Aktivität bei Salzstress
- Abb. 2.5 Vergleich der Reporteraktivierung von *pAtHB6::LUC* und *pRD29B::LUC* in Spross und Wurzel
- Abb. 2.6 Räumliche Verteilung der Salzstress-induzierten *pAtHB6::LUC*-Aktivität
- Abb. 2.7 Räumliche Verteilung der Salzstress-induzierten *pRD29B::EGFP*-Aktivität
- Abb. 2.8 Vergleich der ABA-abhängigen Aktivierung der Genexpression bei NaCl und Mannit
- Abb. 2.9 Einfluss von NaCl auf die ABA-Signaltransduktion
- Abb. 2.10 Einfluss von NaCl auf die ABA-unabhängige Reporterexpression von *IDA::LUC*
- Abb. 2.11 Einfluss von NaCl auf die Auxin-Signaltransduktion
- Abb. 2.12 Einfluss von NaCl auf die Genexpression
- Abb. 2.13 Anstieg der ABA-Gehalte als Antwort auf NaCl- und Mannit-Stress
- Abb. 2.14 Vergleich der Reporterexpression von Wildtyp und ABA-Mutanten
- Abb. 2.15 Verhalten von in der ABA-Biosynthese und in der ABA-Signaltransduktion gestörten Mutanten bei Salzstress
- Abb. 2.16 Effekt von osmotischem Stress auf Mutanten im Vergleich zum Wildtyp
- Abb. 2.17 Stomataapertur und Temperatur der Blattoberflächen von *gca2*-Mutanten nach Behandlung mit (S)-ABA
- Abb. 2.18 IRT-Aufnahmen putativer Mutanten
- Abb. 2.19 Übersicht über die Anteile bestätigter bzw. nicht bestätigter Mutanten
- Abb. 2.20 IRT-Aufnahmen vom Rescreen der T₃-Generation im Vergleich zu *aba2-1*
- Abb. 2.21 Vektorkarte des gewünschten pBI Ascl-Plasmids
- Abb. 2.22 Phänotypen der SALK-Linien und Positionen der T-DNA-Insertionen
- Abb. 2.23 SDS-PAGE der Proteine ABI2 und RCAR1
- Abb. 2.24 SDS-PAGE von ABI2, coexprimiert mit RCAR11
- Abb. 2.25 Phosphataseaktivität von ABI2, inhibiert durch RCAR1 und (S)-ABA
- Abb. 2.26 Einfluss von RCAR11 auf die Aktivität von ABI2 in Abhängigkeit von ABA
- Abb. 2.27 Inhibierung von ABI2 in Abhängigkeit von der ABA-Konzentration
- Abb. 2.28 Abhängigkeit der ABA-vermittelten PP2C-Inhibition vom Verhältnis der Komplexkomponenten
- Abb. 2.29 Regulation der ABI2-Aktivität durch RCAR11 und ABA unter Zusatz von anderen Phytohormonen
- Abb. 2.30 Einfluss von RCAR11 auf verschiedene Phosphatasen

- Abb. 2.31 Einfluss unterschiedlicher RCARs der Subgruppen I und III auf die ABI2-Aktivität bei Zugabe von (S)-, (R)- und *trans*-ABA
- Abb. 2.32 Abhängigkeit der ABA-vermittelten Inhibition von Rezeptorkomplex-Zusammensetzung und Corezeptor-Konzentrationsverhältnis
- Abb. 2.33 Einfluss von Bet v 1 auf diverse Phosphatasen
- Abb. 2.34 Effekt unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse auf die Phosphataseaktivität von ABI2
- Abb. 2.35 Regulation der ABI2-Aktivität durch Bet v 1 bei Anwesenheit diverser Phytohormone
- Abb. 2.36 Einfluss der Fra-Proteine auf verschiedene Phosphatasen
- Abb. 2.37 Flavonoid-Biosynthese in der Erdbeerfrucht nach Hoffmann et al. (2006)
- Abb. 2.38 Regulation der ABI2-Aktivität durch Fra-Proteine bei Anwesenheit diverser Liganden aus der Flavonoid-Biosynthese
- Abb. 2.39 Vergleich der Bet v 1a-Struktur mit der von RCAR1 (Ma et al., 2009)
- Abb. 2.40 Vergleich von Primär- und Sekundärstruktur der Proteine RCAR11 und 8
- Abb. 2.41 Abbildungen verschiedener Kristalle von RCAR11 mit (S)-ABA sowie von RCAR11, (S)-ABA und ABI2
- Abb. 2.42 Optimierung der Bedingungen für Kristalle von RCAR11 mit (S)-ABA
- Abb. 2.43 Kristall, Raumgruppe und Parameter der Elementarzelle des Komplexes RCAR11 mit (S)-ABA
- Abb. 2.44 Struktur des Homodimers RCAR11 mit (S)-ABA sowie Bindung des ABA-Moleküls (Santiago et al., 2009)
- Abb. 2.45 Vergleich der im Rezeptorkomplex kristallisierten Phosphatasen HAB1 und ABI1 mit ABI2
- Abb. 2.46 Phylogenetischer Baum der Bet v 1-Superfamilie in *A. thaliana*
- Abb. 2.47 Einteilung der PP2Cs aus Arabidopsis und ihr Expressionsmuster nach ABA- bzw. Stressbehandlung nach Xue et al. (2008)
- Abb. 2.48 Test auf Interaktion zwischen MLP-Proteinen und Phosphatasen
- Abb. 2.49 Einfluss von RCARs und PP2Cs auf die ABA-Signaltransduktion in Arabidopsis-Protoplasten
- Abb. 3.1 An der Aufnahme, Verteilung und Abgabe von Natrium beteiligte Transporter, Kanäle und Pumpen (Plett et al., 2010)
- Abb. 3.2 Modell der ABA-Signaltransduktion (Raghavendra et al., 2010)
- Abb. 3.3 Modell der ABA-Bindung durch RCARs und Interaktion mit PP2Cs (Hubbard et al., 2010)
- Abb. 3.4 Perzeptionsmechanismen von Gibberellin und Auxin
- Abb. 3.5 Proteasomale Degradation als Strategie in der Phytohormon-Signaltransduktion (Chini et al., 2009)
- Abb. 3.6 Vergleich der Proteinstrukturen von RCAR11, Bet v 1 und At1g24000
- Abb. 4.1 Reaktionsschema der Luciferin-Umsetzung
- Abb. 4.2 GUS-Reaktionsschema mit Substrat MUG
- Abb. 4.3 Übersicht über das Prinzip der RNAi-Bibliothek in *Arabidopsis thaliana*
- Abb. 4.4 Die im *Yeast Two-Hybrid* verwendeten Plasmide pGAD424 und pBridge
- Tab. 1.1 Die RCAR/PYR1/PYL-Proteine
- Tab. 2.1 Übersicht über die Anteile bestätigter bzw. nicht bestätigter Mutanten
- Tab. 2.2 Ergebnisse der Sequenzierung
- Tab. 2.3 Übersicht über die Interaktion von RCAR-Proteinen mit Phosphatasen aus der Subgruppe A in Abhängigkeit von ABA
- Tab. 3.1 Auflistung verwendeter, zum Teil in der Literatur beschriebener Mutanten

Zusammenfassung

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) steuert zahlreiche Prozesse der pflanzlichen Entwicklung und dient als endogener Botenstoff in der Adaption an abiotische Stressbedingungen wie Trockenheit oder Salinität, welche den Wasserhaushalt der Pflanzen empfindlich stören. Die Funktion von ABA bei der Anpassung von *Arabidopsis thaliana* an Salzstress wurde im Vergleich zu osmotischem Stress untersucht. Das zeitliche und räumliche Muster der ABA-Wirkung wurde *in vivo* mit Hilfe vorhandener sowie neu generierter ABA-Reporterlinien visualisiert und war in beiden Fällen vergleichbar. Die ABA-Signaltransduktion bei Salzstress entspricht damit dessen osmotischer Komponente, eine geringere Aktivierung als bei Mannitstress vergleichbarer Intensität weist auf eine effektivere osmotische Adaption der Pflanze bei Natriumchlorid-Stress hin. Untersuchungen an Mutanten der ABA-Biosynthese sowie der ABA-Signaltransduktion ergaben keinen Hinweis auf einen direkten Beitrag von ABA zur Salztoleranz von Pflanzen. Das Hormon beeinflusst aber indirekt über die Steuerung der Transpiration das Ausmaß der Akkumulation von Natriumionen im Spross und bestimmt so, ob und wann Gehalte auftreten, die toxisch wirken.

Um die Signaltransduktion der Abscisinsäure besser verstehen zu können, ist die Identifizierung bisher unbekannter Signalelemente sehr wichtig. Um derartige Komponenten zu finden, wurde ein Hochdurchsatzsystem entwickelt, das es erlaubt unter Anwendung der Infrarotthermographie Mutanten der ABA-Signaltransduktion bzw. der Wahrnehmung von osmotischem Stress zu identifizieren. Dazu wurde eine Mutantenpopulation durch stabilen Transfer einer RNAi-Bibliothek des Arabidopsis-Genoms generiert. Die identifizierten Mutanten sind nur eingeschränkt in der Lage, auf eine Trockenstresssituation mit einem Schluss der Stomata zu reagieren und weisen daher unter Stress im Vergleich zum Wildtyp eine gleichbleibende Transpirationsrate und damit Blattoberflächenkühlung auf.

Nach der zwischenzeitlich erfolgten Entdeckung der cytosolischen ABA-Rezeptorkomplexe, bestehend aus RCAR-Proteinen (*Regulatory Component of ABA-Receptor*) und den Proteinphosphatasen 2C (PP2Cs) der Subgruppe A, wurden Interaktionen zwischen RCARs und PP2Cs näher charakterisiert. PP2Cs sind negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion, die Bindung von ABA an den Rezeptorkomplex führt zur Inaktivierung der PP2Cs, was eine Fülle physiologischer ABA-gesteuerter Prozesse ermöglicht. Die 14 RCAR-Proteine in Arabidopsis gehören der pflanzlichen Bet v 1-Superfamilie an. Die PP2C-Subgruppe A besteht aus neun Proteinen. Durch *in vitro*-Bestimmung der Phosphataseaktivität konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich Rezeptorkomplex-Kombinationen aus

RCAR1, 3, 11 und 12 und den Phosphatasen ABI1, ABI2, AHG3 und HAI2 hinsichtlich ihrer Sensitivität und Stereoselektivität für (S)-ABA unterscheiden. Ebenso zeigte ein *Yeast Two-Hybrid* (Y2H)-Screen Unterschiede in der ABA-Abhängigkeit der RCAR-PP2C-Interaktion auf. Dies deutet auf ein Modell hin, in dem die Intensität der ABA-Antwort durch das Zusammenwirken differentieller Expression und angepasster Kombination von Corezeptoren feinreguliert wird.

Versuche zur Kristallisation der ABA-Rezeptorkomponenten verliefen erfolgversprechend, wurden aber nach dem Erscheinen mehrerer diesbezüglicher Arbeiten nicht weiter fortgesetzt. Ein Einfluss weiterer Proteine der Bet v 1-Superfamilie aus *Arabidopsis*, Birke und Erdbeere in Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Phytohormone auf die PP2C-Aktivität konnte *in vitro* und über Y2H nicht nachgewiesen werden. Eine Beteiligung RCAR-verwandter MLP-Proteine an Bindung und Transport hydrophober Liganden mit regulatorischer Funktion ist wahrscheinlich.

Summary

The phytohormone abscisic acid (ABA) regulates a large number of physiological processes in plants and serves as an endogenous messenger in responses to abiotic stress such as drought or salinity which impair the plant's water balance. The role of ABA in adaptation of *Arabidopsis thaliana* to salt stress or mannitol (osmotic) stress was compared. New ABA reporter lines were generated and were used together with available reporter lines to visualize the temporal and spatial pattern of ABA action *in vivo*. Both salt and mannitol stress induced a similar pattern of ABA action indicating that ABA signaling in response to salt stress is triggered by the osmotic component of this type of stress. However, when comparable osmotic stress intensities were applied, ABA signaling was less intensively activated by the salt treatment which points to a more effective osmotic adaptation of salt-stressed plants. Salt tolerance of mutants impaired in ABA biosynthesis or ABA signal transduction did not differ from wild type tolerance suggesting that the hormone is not directly contributing to salt tolerance. However, ABA has an indirect effect on salt tolerance by affecting import of sodium ions into the shoot via its key role in regulation of stomatal aperture and by these means determines if and when toxic levels accumulate.

A better understanding of ABA signal transduction requires identification of additional signaling elements and therefore, a high-throughput system was developed which allows identification of mutants with lesions in ABA signal transduction or sensing of osmotic stress, respectively, using thermal imaging. The mutant population screened was generated by stable transfer of an RNAi library of the *Arabidopsis* genome. The selected mutants are impaired in their response to drought stress via stomatal closure and thus maintain high transpiration rates and cool leaf surfaces during stress treatments.

After the discovery of the cytosolic ABA receptor complex, which consists of RCAR (*Regulatory Component of ABA Receptor*) proteins and type 2C protein phosphatases (PP2Cs) of subgroup A, the interaction among RCARs and PP2Cs was studied in more detail. PP2Cs function as negative regulators of ABA signal transduction and are inactivated upon binding of ABA to the receptor complex, thereby allowing activation of a plethora of ABA-dependent processes. The 14 RCAR proteins of *Arabidopsis* belong to the plant Bet v 1-protein superfamily. The PP2C subgroup A comprises 9 proteins. *In vitro* assays of phosphatase activity unravelled differences in sensitivity and (S)-ABA stereoselectivity among receptor complexes between RCAR1, 3, 11 and 12 and the PP2Cs ABI1, ABI2, AHG3 and HAI2. In a yeast two-hybrid screen, too, differences were found in ABA-dependency of the RCAR-PP2C interaction. These findings are

compatible with a model where the intensity of ABA responses is fine-tuned by differential expression and combination of co-receptors.

Promising results were obtained during optimization of conditions for crystallization of ABA receptor components, but the crystallization studies were discontinued when receptor complex structural data were published by several groups. An influence of other proteins of the Bet v 1-protein superfamily from Arabidopsis, birch or strawberry in the presence or absence of different phytohormones on PP2C activity could not be demonstrated both *in vitro* and in yeast two-hybrid experiments. A participation of RCAR-related MLP proteins in binding and transport of hydrophobic ligands with regulatory function seems probable.

1. Einleitung

1.1. Das Phytohormon Abscisinsäure

Die Ortsgebundenheit von Pflanzen erfordert ein schnelles und flexibles Netzwerk von Adaptionsmechanismen an äußere Umwelteinflüsse. Phytohormone, endogene pflanzeigene niedermolekulare organische Verbindungen, bilden die Grundlage für dieses Netzwerk, sie nehmen wesentlichen Einfluss nicht nur auf Steuerung und Koordination von Wachstum und Entwicklung der Pflanze, sondern ebenso auf die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen wie Licht, Schwerkraft, Wasserverfügbarkeit, Nährstoffgehalte oder Pathogene. Phytohormone wirken in niedrigen physiologischen Konzentrationen und können durch Regulation der Genexpression extrazelluläre Signale in endogene physiologische Reaktionen der Pflanze integrieren. Die Pflanzenhormone gehen aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze hervor und lassen sich in zwei Wirkklassen unterteilen: Vorwiegend wachstumsfördernde Regulatoren wie Auxine, Cytokinine, Gibberelline und Brassinosteroide stehen eher wachstumshemmenden Substanzen wie Ethylen, Abscisinsäure, Jasmonsäure und Salicylsäure gegenüber (Iten et al., 1999).

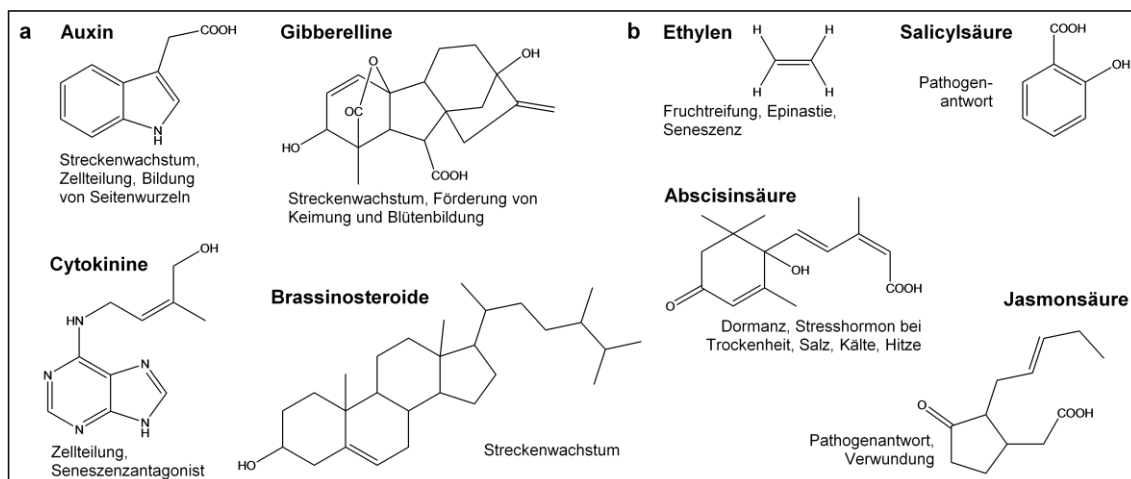


Abb. 1.1: Struktur und Funktion von Phytohormonen nach Iten et al. (1999).

Vorwiegend wachstumsfördernde Hormone (a) stehen eher wachstumshemmenden und in Stressantworten involvierten Hormonen (b) gegenüber.

Neben den oben aufgezählten Substanzen (siehe Abb. 1.1) werden von manchen Autoren auch Peptide zu den Phytohormonen gezählt. So spielen beispielsweise die aus 18 Aminosäuren bestehenden Systemine eine wichtige Rolle bei der Wundsignaltransduktion in Tomate und Tabak (Ryan & Pearce, 2003).

Von ihrem Entstehungsort werden die Phytohormone zu ihrem spezifischen Wirkort transportiert, was entweder von Zelle zu Zelle wie bei den Auxinen, über das Leitsystem wie bei den Cytokininen, oder über den Gasraum wie bei Ethylen erfolgt. Für die physiologische Wirksamkeit der Hormone ist nicht die absolute Konzentration allein entscheidend, sondern das Mengenverhältnis der Hormone zueinander, da sie im wechselseitigen dynamischen Zusammenspiel Wachstums- und Entwicklungsprozesse der Pflanze regulieren. So wirken Abscisinsäure und Ethylen zusammen bei der Regulation der Samendormanz (Beaudoin et al., 2000) oder der Wachstumssteuerung bei Wasserstress (Sharp & LeNoble, 2002). Bei der Regulation lateraler Wurzelbildung wirkt Abscisinsäure antagonistisch zu Auxin (De Smet et al., 2006; Wasilewska et al., 2008). Im Folgenden soll nun näher auf das Phytohormon Abscisinsäure und seine Wirkung in der Pflanzenentwicklung und an der Adaption der Pflanze unter Stressbedingungen eingegangen werden.

Abscisinsäure (ABA) ist ein monocyclisches Sesquiterpen, entdeckt in den 1960er Jahren, welches ursprünglich wegen seiner fördernden Wirkung auf die Knospenruhe als Dormin bzw. wegen hoher Konzentrationen in abgeworfenen Baumwollblättern als Abscisin II bezeichnet wurde (Ohkuma et al., 1963). Letzterer Effekt konnte als indirekte Konsequenz einer Ethylen-Induktion durch ABA erklärt werden (Osborne et al., 1972). Da die Verbindung viele weitere physiologische Prozesse steuert, wurde der Name in Abscisinsäure (*abscisic acid*) geändert (Addicott et al., 1968). Der systematische Name der natürlich vorkommenden und physiologisch aktiven (+)-S-Form lautet 3-Methyl-5-(1'-hydroxy-4'-oxo-2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexen-1'-yl)-*cis*-2,4-pentadiensäure. Die beiden *cis*-Enantiomere (+)-S-ABA und (-)-R-ABA werden durch UV-Strahlung in die entsprechende *trans*-ABA-Form umgewandelt (siehe Abb. 1.2), *in planta* besitzt (R)-ABA eine eingeschränkte physiologische Aktivität (Nambara et al., 2002).

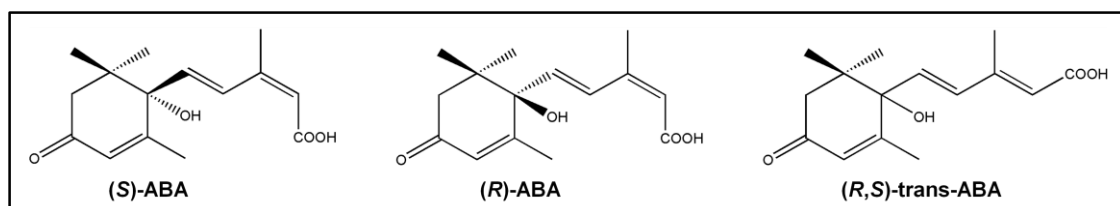


Abb. 1.2: Strukturen der Abscisinsäure-Stereoisomeren.

Zahlreiche Prozesse der pflanzlichen Entwicklung sowie der Adaptation an abiotische (Zhu, 2002) und biotische (Adie et al., 2007; Fujita et al., 2006) Stressbedingungen werden durch das Phytohormon Abscisinsäure gesteuert. In frühen Stadien der pflanzlichen Samen- und Embryonalentwicklung fördert ABA sowohl das Wachstum als auch die Bildung von Speicherlipiden und -proteinen, in der späten Embryogenese

werden bei ungünstigen Wachstumsbedingungen die Weiterentwicklung des Embryos und die Keimung gehemmt, was mit einer Förderung der Samendormanz einhergeht (Finkelstein et al., 2002; Nambara & Marion-Poll, 2005). Abscisinsäure schützt die Pflanze bei abiotischem Stress wie Kälte, Salzstress und Trockenheit durch Induktion der Produktion osmoprotektiver Proteine und Metabolite (Leung & Giraudat, 1998; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Verslues et al., 2006; Zhu, 2002), sowie durch die Regulation des Spaltöffnungsapparates und damit durch die Reduktion stomatärer Transpiration (Chinnusamy et al., 2004; Christmann et al., 2006; Schroeder et al., 2001a; Schroeder et al., 2001b), worauf an anderer Stelle noch genauer eingegangen werden soll. In biotischen Stresssituationen wie Pathogeninvasionen aktiviert Abscisinsäure das Abwehrsystem der Pflanze (Anderson et al., 2004; de Torres-Zabala et al., 2007; Kaliff et al., 2007; Melotto et al., 2006).

Das Vorkommen von Abscisinsäure ist nicht nur auf Pflanzen beschränkt, auch in Metazoen wie Schwämmen (Zocchi et al., 2001), wo sie in die Temperatur-Signalkaskade involviert ist, und im Menschen (Bruzzone et al., 2007) wurde Abscisinsäure entdeckt, hier fungiert sie als proinflammatorisches Cytokin in Granulozyten. Außerdem wurde von einer Verbesserung der Diabetes mellitus Typ2-Symptome durch ABA berichtet, die ähnlich wie die Thiazolidindione den menschlichen Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor PPAR- γ beeinflusst (Bassaganya-Riera et al., 2010).

1.1.1. Biosynthese und Abbau von Abscisinsäure

Die Biosynthese von Abscisinsäure in Pflanzen erfolgt hauptsächlich in den Schließzellen der Blätter, Zellen der Wurzeln, sowie in den Parenchymzellen des Leitgewebes (Christmann et al., 2005; Nambara & Marion-Poll, 2005). Im Gegensatz zu Pilzen, wo die Bildung von Sesquiterpenen über den Mevalonat-Biosyntheseweg verläuft (Hirai et al., 2000; Yamamoto et al., 2000), findet in Pflanzen die Abscisinsäurebildung ausgehend von C₄₀-Epoxy-carotinoiden über die Vorstufe Xanthoxin in den Plastiden, unabhängig vom cytosolischen Mevalonatweg, statt (Abb. 1.3). Die Carotinoide werden über Isopentenyl-diphosphat ausgehend von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat über den Methylerythritol-4-phosphat-Weg gebildet (Eisenreich et al., 2004; Lichtenthaler et al., 1997; Wasilewska et al., 2008). Zeaxanthin, Antheraxanthin und All-*trans*-Violaxanthin aus dem Xanthophyll-Zyklus werden über (De-)Epoxidation ineinander umgewandelt, katalysiert durch die Zeaxanthin-Epoxidase ABA1 (Barrero et al., 2005) und die Violaxanthin-Deepoxidase VDE. All-*trans*-Violaxanthin bzw. All-*trans*-Neoxanthin (Umwandlung von Viola- zu

Neoxanthin katalysiert durch ABA4 (North et al., 2007)) wird konvertiert zu 9-*cis*-Violaxanthin oder 9'-*cis*-Neoxanthin. Beide C₄₀-Carotinoide werden von der 9-*cis*-Epoxy-carotinoid-Dioxygenase NCED (Schwartz et al., 2001) in den C₁₅-Aldehyd Xanthoxin und eine C₂₅-Verbindung gespalten. Diese Prozesse finden in den Chloroplasten statt, Xanthoxin wird anschließend ins Cytoplasma transportiert und in einer Redoxreaktion, katalysiert durch die kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase ABA2, zu Abscisinaldehyd umgewandelt (Cheng et al., 2002; Gonzalez-Guzman et al., 2002), welcher schlussendlich von der Abscisinaldehyd-Oxidase AAO zu (+)-*S-cis*-Abscisinsäure oxidiert wird (Seo et al., 2000). Für die Funktionalität der AAO ist die durch ABA3 sulfurylierte Form eines Molybdän-Cofaktors erforderlich (Xiong et al., 2001b). Die Arabidopsis-Mutanten *aba1*, *aba2*, *aba3* und *aba4*, alle Abscisinsäure-defizient, weisen z.B. schwach ausgeprägte Samendormanz und aufgrund gestörter Stomataregulation Welkerscheinungen auf. Exogene Abscisinsäure hebt den ABA-defizienten Phänotyp auf.

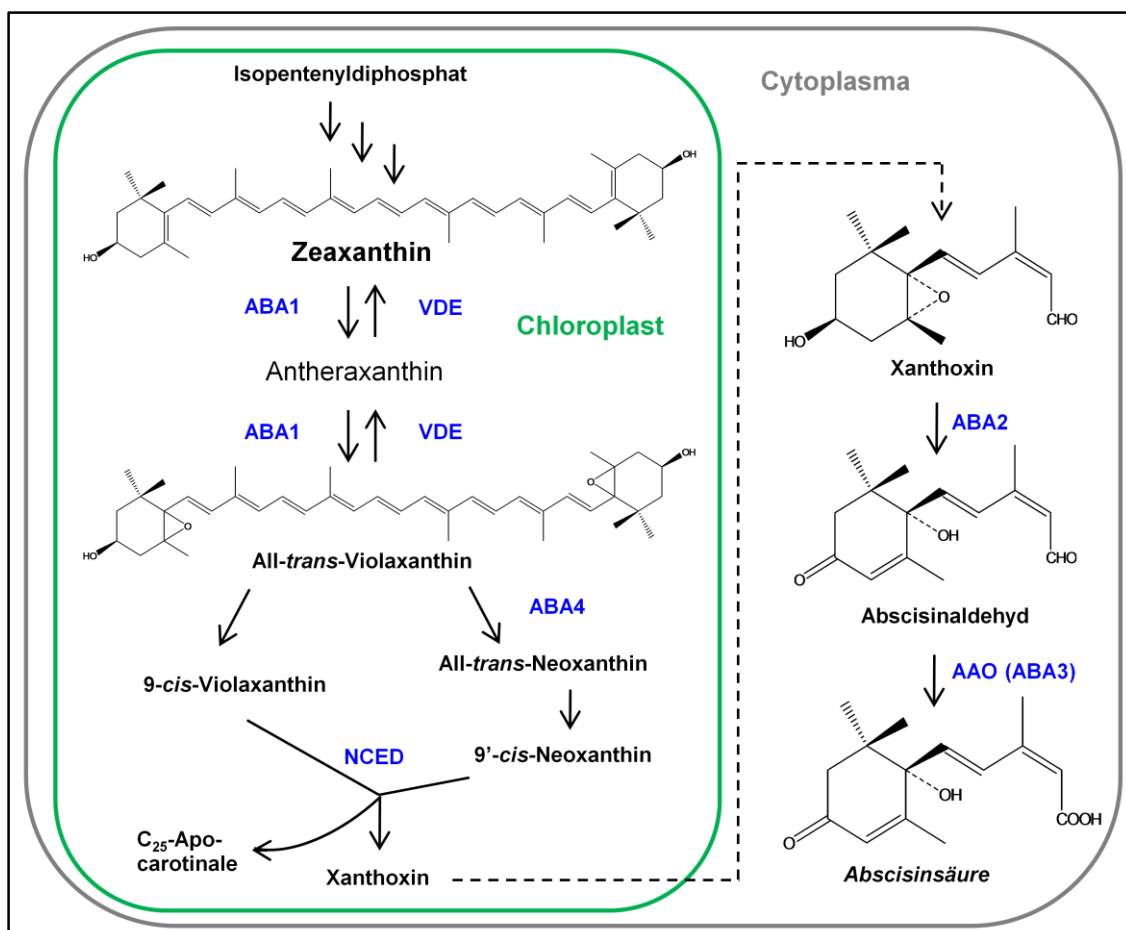


Abb. 1.3: Biosynthese von Abscisinsäure in Pflanzen.

Ausgehend von Isopentenylidiphosphat werden in Chloroplasten C₄₀-Carotinoide gebildet, Zeaxanthin wird über Violaxanthin unter Beteiligung der Enzyme ABA1, ABA4 und NCED in die eigentliche Vorstufe von Abscisinsäure, Xanthoxin, umgewandelt. Dieses wird in das Cytoplasma transportiert, dort erfolgt die Bildung von Abscisinsäure über Redoxreaktionen, katalysiert durch ABA2 und AAO.

Der Abbau bzw. die Inaktivierung von Abscisinsäure erfolgt zum einen durch irreversible oxidative Degradation zu Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure, katalysiert durch Cytochrom P450 CYP707A (Jadhav et al., 2008; Okamoto et al., 2006; Saito et al., 2004), zum anderen durch reversible Glucoseester-Konjugatbildung (Dietz et al., 2000; Lee et al., 2006; Schroeder & Nambara, 2006). Die ABA-Glycosyltransferase koppelt Abscisinsäure über eine Esterbindung an Glucose, das Konjugat dient als Speicher- und Transportform des Hormons; physiologisch aktive Abscisinsäure entsteht bei Bedarf durch Spaltung des Konjugats durch die β -Glucosidase AtBG1 im endoplasmatischen Retikulum der Blattzellen nach dem Transport aus der Vakuole bzw. dem apoplastischen Raum.

1.1.2. Abscisinsäure-Signaltransduktion

Wie beschrieben erfüllt Abscisinsäure viele verschiedene biologische Funktionen in der Pflanze. Um die Zusammenhänge der von Abscisinsäure gesteuerten Prozesse verstehen zu können, bedarf es einer näheren Untersuchung der beteiligten Signaltransduktionswege, welche je nach Entwicklungsstadium, Organ- oder Zelltyp deutlich variieren können (Finkelstein, 2006). Signaltransduktion bezeichnet die Summe der Prozesse, mit deren Hilfe Zellen eine Art von Signal oder Stimulus in eine physiologische Reaktion umwandeln (Chory & Wu, 2001). Wichtige Schritte sind die Erkennung des Phytohormons, die anschließende Produktion und Freisetzung intrazellulärer Botenstoffe, der sogenannten *second messenger*, desweiteren Proteinmodifikationen wie (De-)Phosphorylierungen sowie die Modulation der Genexpression. Um die in der Signaltransduktion beteiligten Enzyme zu identifizieren, besteht zum Beispiel die Möglichkeit der genetischen Analyse durch Untersuchung von Mutanten. Abscisinsäure-defiziente Mutanten wie *aba2*, die in der ABA-Biosynthese gestört sind und deren Phänotyp durch exogene ABA kompensiert werden kann, wurden bereits unter 1.1.1 beschrieben. Bei Mutanten mit Defekten in der Signalerkennung und/oder Weiterleitung, welche einen ähnlichen Phänotyp wie die ABA-defizienten Mutanten aufweisen, kann dieser durch exogene ABA-Applikation nicht aufgehoben werden. Dazu gehören ABA-insensitive Mutationen wie *abi1* bis *abi5* (Finkelstein, 1994; Koornneef et al., 1982; Koornneef et al., 1984; Lopez-Molina & Chua, 2000), *abi8* (Brocard-Gifford et al., 2004) oder auch *gca1* bis *gca8* (Allen et al., 2001; Himmelbach et al., 1998), sowie ABA-hypersensitive Mutationen wie *era1* (Pei et al., 1998) oder *abh1* (Hugouvieux et al., 2001).

Zunächst muss also nach Biosynthese bzw. Freisetzung von Abscisinsäure diese in den betreffenden Zellen erkannt werden, um die spezifische Signaltransduktion zu aktivieren. Die Perzeption des Phytohormons erfolgt durch Rezeptorproteine, wovon für ABA einige lösliche und membranständige Proteine postuliert wurden, diese aber entweder widerlegt oder noch nicht endgültig bestätigt wurden (siehe 1.4.1). Der in einem Teil dieser Arbeit untersuchte cytosolische RCAR-PP2C-Rezeptorkomplex soll in Punkt 1.4.2 genauer vorgestellt werden. Bei der Weiterleitung des ABA-Signals sind neben intrazellulären Faktoren wie pH-Wert oder Redox-Status (Brault et al., 2004; Bright et al., 2006) vor allem *second messenger*-Substanzen wie Ca^{2+} , das eine zentrale Rolle bei der Regulation der Spaltöffnung einnimmt (Schroeder et al., 2001a), beteiligt. Weitere Botenstoffe wären Phosphatidsäure PA, ROS (*Reactive Oxygen Species*) wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 und Stickstoffmonoxid NO, cyclische ADP-Ribose, Inositol-Triphosphat InsP_3 , Inositol-Hexaphosphat InsP_6 oder Diacylglycerinphosphat (Fan et al., 2004; Israelsson et al., 2006; Pei et al., 2000; Schroeder et al., 2001a; Zalejski et al., 2005; Zhang et al., 2004).

Die Regulation zellulärer Aktivitäten fast aller Signalwege in Pflanzen geschieht durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmter Proteine (Luan, 2003). Schlüsselkomponenten in der Proteinmodifizierung durch (De-)Phosphorylierungsreaktionen in der ABA-Signaltransduktion sind Proteinphosphatasen des Typs 2C, PP2Cs, welche eine Rolle als negative Regulatoren einnehmen, und Proteinkinasen wie SnRK2s (*Sucrose non-fermenting 1 Related Kinases 2*) oder CPKs (*Calcium dependent Protein Kinases*) als positive Regulatoren. In *Arabidopsis thaliana* codieren ca. 80 Gene für monomere Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatasen des Typs 2C (Schweighofer et al., 2004; Xue et al., 2008), neben PP2Cs sind in Pflanzen vor allem noch die Typen PP1, PP2A und PP2B wichtig (Luan, 2003). PP2Cs können nach ihrer Sequenzhomologie zu bekannten Phosphatasen/Motiven bzw. nach phylogenetischer Analyse in 10 bzw. 13 Gruppen eingeteilt werden. Meist befindet sich die katalytische Phosphatase-Domäne am C-Terminus, während N-terminal verschiedene Extensionen auftreten. Die Funktion des N-Terminus ist nicht vollständig geklärt, es wird vermutet, dass er für die Bindung spezifischer Substrate oder für spezielle Anlagerungen an Komplexe benötigt wird (Bertauche et al., 1996). Die in dieser Arbeit meistbehandelten neun Mitglieder der Subgruppe A (nach der Schweighofer-Einteilung) sind in Abb. 1.4 dargestellt. Sechs davon wurden bereits als negative Regulatoren in der ABA-Signaltransduktion identifiziert: HAB1 und HAB2 (Leonhardt et al., 2004; Saez et al., 2004), AHG1 und AHG3/PP2CA (Kuhn et al., 2006; Nishimura et al., 2007; Yoshida et al., 2006b), sowie ABI1 und ABI2 (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001).

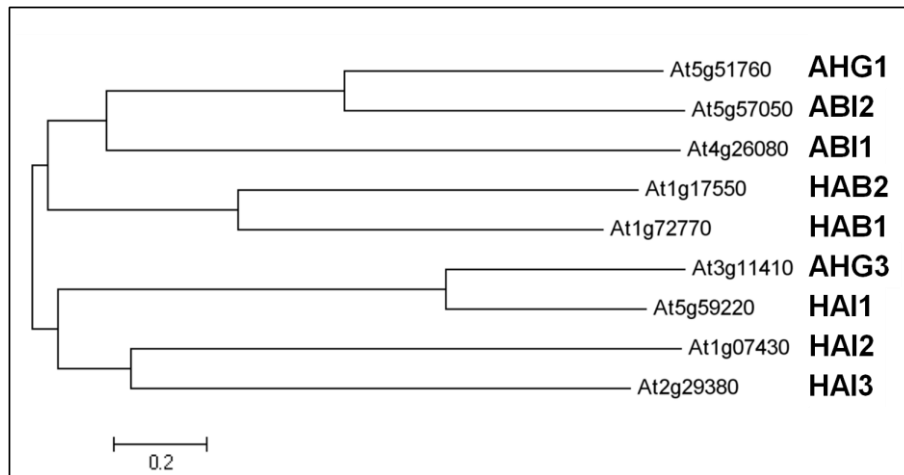


Abb. 1.4: Subgruppe A der PP2Cs in *Arabidopsis* nach Schweighofer et al. (2004).

Insgesamt 10% des gesamten *Arabidopsis thaliana*-Genoms unterliegen einer ABA-abhängigen differenzierten Genexpression (Hoth et al., 2002; Nemhauser et al., 2006), unter anderem eben die PP2Cs, wovon 16 durch ABA hochreguliert werden, darunter alle 9 Phosphatasen der Subgruppe A (Xue et al., 2008). Gleiches gilt für PP2Cs in *Oryza sativa*. ABI1 und ABI2, welche 86% Aminosäureidentität in Bezug auf ihre Phosphatase-Domäne aufweisen, werden beispielsweise durch ABA 15-fach hochreguliert (Leung et al., 1997; Meyer et al., 1994). Als Mutationen wurden zwei dominante Allele, *abi1-1* und *abi2-1*, identifiziert (Koornneef et al., 1984). Deren Phänotypen in *Arabidopsis* zeigen sich als global ABA-insensitiv, betroffen sind sowohl Keimung und Keimungsentwicklung, als auch die Dormanz und die Wachstumsinhibierung durch ABA, zudem ist die Stomataregulation anormal (Allen et al., 1999; Koornneef et al., 1984; Leung et al., 1997). Der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der katalytischen Domäne von Glycin zu Aspartat ($G^{180}D$ in *abi1* bzw. $G^{168}D$ in *abi2*) führt zu einer reduzierten Phosphataseaktivität, welche nur noch etwa 3-10% derjenigen vom Wildtyp entspricht (Leube et al., 1998; Rodriguez et al., 1998b). Die stark reduzierte ABA-Sensitivität in allen genannten Bereichen lässt vermuten, dass ABI1 und ABI2 eine zentrale Rolle am Anfang der ABA-Signaltransduktion einnehmen. Für *abi1* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Mutation mit einer präferenziellen Kernlokalisierung des mutierten Proteins einhergeht (Moes et al., 2008). Dreifach-*knock out*-Linien von PP2Cs der Gruppe A zeigten eine partielle konstitutive ABA-Antwort (Rubio et al., 2009). Die Funktion der Phosphatasen als negative Regulatoren in Signaltransduktionswegen wurde auch schon in Hefe gezeigt, wo die Phosphatase Ptc1 im HOG/MAPK-Signalweg, der bei osmotischem Stress angeschaltet wird, durch Dephosphorylierung die MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Hog1 inaktiviert (Warmka et al., 2001). In Pflanzen wurde durch genetische Analyse von Mutanten und

ihrer intragenen rezessiven Revertanden mit Hilfe von transienten Expressionsstudien und Analysen transgener bzw. *antisense*-Pflanzen der negativ-regulatorische Charakter der PP2Cs im Abscisinsäure-Signaltransduktionsweg gezeigt (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001; Rodriguez et al., 1998a). ABI1-Überexpression in Mais-Protoplasten führt zu einer Blockade ABA-abhängiger Genexpression (Sheen, 1998), gleiches gilt für PP2CA. Überexpression der ebenfalls ABA-hochregulierten Phosphatase HAB1 führt ebenso zu einem ABA-insensitiven Phänotyp (Rodriguez et al., 1998a), und Herunterregulation von PP2CA führt zum Beispiel zu erhöhter Kältetoleranz (negative Regulation der ABA-Antwort auf Kälte (Tahtiharju & Palva, 2001)). Dies alles spricht für die Funktion der Phosphatasen als negative Regulatoren des ABA-Signalwegs. Im Gegensatz dazu wurde jedoch auch gezeigt, dass der negative Effekt des mutierten Proteins *abi1* in Hypokotylzellen aus Tomate durch ABI1-Gabe aufgehoben wurde, woraus geschlossen werden müsste, dass unter bestimmten Umständen ABI1 auch als positiver Regulator wirken kann (Wu et al., 2003).

Die Interaktionspartner von Phosphatasen sind vielfältig und lassen auf eine Beteiligung der PP2Cs in verschiedenen ABA- und stressrelevanten Signalwegen schließen. AHG3/PP2CA interagiert mit AKT2, einem K⁺-Kanal, was die Kontrolle des Kaliumtransportes und der Membranpolarisierung durch die Phosphatase bedeutet (Cherel et al., 2002). Einen Zusammenhang zwischen ABA und der Regulation von Transkriptionsantworten gibt es sowohl bei HAB1, welche mit SWI B3 aus dem SWI/SNF *Chromatin-Remodeling*-Komplex interagieren kann (Saez et al., 2008), als auch bei ABI1, die mit dem Transkriptionsfaktor AtHB6 interagiert, welcher einige Aspekte des ABA-Signalweges negativ reguliert (Himmelbach et al., 2002). Die Interaktion von ABI2 mit Fibrillin deutet auf eine ABA-vermittelte Kontrolle Lichtstress-induzierter Photoinhibition hin (Yang et al., 2006).

Kürzlich wurde bekannt, dass mehrere PP2Cs der Subgruppe A durch sogenannte RCAR (*Regulatory Component of ABA Receptor*)/PYR1/PYL (*Pyrabactin-resistance 1-like*)-Proteine reguliert werden, welche ABA binden; bei Anwesenheit von ABA wird die Phosphataseaktivität inhibiert, was eine Beteiligung der Phosphatasen direkt am Rezeptorkomplex für Abscisinsäure bedeutet (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Näheres dazu siehe Punkt 1.4.2.

Die Kinasen stellen als Interaktionspartner der Phosphatasen mit einen wichtigen Part in der ABA-Signaltransduktion dar, beide wirken in der ABA-induzierbaren Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche mit reversiblen Phosphorylierungsreaktionen einhergeht (Furihata et al., 2006; Johnson et al., 2002; Uno et al., 2000; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Die meisten ABA-aktivierbaren Proteinkinasen sind

positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktion (Sokolovski et al., 2005), man unterscheidet Calcium-unabhängige Kinasen (z.B. SnRK2s) von Calcium-abhängigen Kinasen (SnRK3s/CIPKs und CDPKS/CPKs). In Weizen phosphoryliert PKABA1, eine durch ABA hochregulierte Ca^{2+} -unabhängige Kinase, den bZIP (*basic leucine-Zipper*)-Transkriptionsfaktor TaABF1, welcher ABRE-Sequenzen (*ABA Response Element*) erkennt und dem Protein ABI5 aus *Arabidopsis thaliana* ähnlich ist (Gomez-Cadenas et al., 1999; Johnson et al., 2002). Die ABA-aktivierte Proteinkinase AAPK1 aus *Vicia faba* aktiviert stomatäre Anionenkanäle und fördert so den ABA-induzierten Stomataschluss (Li et al., 2000). Dazu wirkt in Arabidopsis als Ortholog OST1/SnRK2.6 (*Open Stomata 1*) über Phosphorylierung von ABF2. OST1, identifiziert als Schlüsselkomponente in der Anpassung an osmotischen Stress, ist beteiligt an der Signalkaskade des Stomataschlusses (Li et al., 2000; Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). SnRK2.2 und SnRK2.3 sind ebenfalls hoch ABA-induzierbar (Boudsocq et al., 2004) und phosphorylieren *in vitro* Subdomänen der bZIP-Transkriptionsfaktoren AREB1, AREB2 (*ABA Response Element Binding*) und ABI5 (Furhata et al., 2006). Die Doppelmutante *snrk2.2/snrk2.3* ist ABA-insensitiv in Bezug auf Keimung (Fujii et al., 2007), die Dreifachmutante *snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6* zeigt einen stark ausgeprägten Phänotyp mit vielfältigen Defekten in der ABA-Signalkaskade, was die SnRK2-Kinasen als globale positive Regulatoren in der Abscisinsäure-Signaltransduktion ausweist (Fujii & Zhu, 2009). ABI1 interagiert mit OST1/SnRK2.6 bei der Stomataregulation (Fujii et al., 2007; Yoshida et al., 2006a) und mehreren anderen SnRK2-Kinasen (Park et al., 2009). Die physikalische Interaktion von PP2Cs und SnRK2s wird als Inaktivierung der Kinasen über Dephosphorylierung durch die PP2Cs beschrieben (Umezawa et al., 2009).

CIPKs, die mit den Ca^{2+} -Sensoren CBL interagieren, gelten als negative Regulatoren bei Keimung und stomatären ABA-Antworten, z.B. CIPK3, welche Kälte- und Salz-induzierte Genexpression moduliert (Kim et al., 2003). *cipk23* zeigt dagegen reduzierte Transpiration durch erhöhten Stomataschluss und gesteigerte Inhibierung der Wiederöffnung (Cheong et al., 2007). Zusätzlich werden Interaktionen von CIPK und ABI1 bzw. ABI2 und damit eine Verbindung des Calciumsignal-decodierenden Netzwerks mit dem ABA-Signalweg beschrieben (Batistic & Kudla, 2004; Guo et al., 2002; Ohta et al., 2003).

CPKs, welche neben einem variablen N-Terminus die Kinase-Domäne, eine autoinhibierende Domäne und zusätzlich eine Ca^{2+} -Bindedomäne mit 4 EF-Hand-Motiven besitzen, decodieren das Ca^{2+} -Signal und leiten es, ohne Interaktion mit anderen Proteinen wie bei den CIPKs, weiter (Sanders et al., 2002). 34 Mitglieder in Arabidopsis, induziert durch Kälte, Salz und Trockenheit, werden in verschiedensten

Organen exprimiert (Martin & Busconi, 2001; Sanders et al., 2002; Urao et al., 1999; Wan et al., 2007). Sie wirken als positive Regulatoren und phosphorylieren bZIP-Transkriptionsfaktoren wie ABF4 (CPK4, 10, 11, 30 und 32) oder ABF1 (CPK 4 und 11) (Choi et al., 2005; Sheen, 1996; Zhu et al., 2007), oder wirken in der Regulation des Stomataschlusses über die S-Typ Anionenkanäle wie CPK3 und CPK6 (Mori et al., 2006). In Kartoffeln wird die NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Produktion durch CPK-Phosphorylierung reguliert (Kobayashi et al., 2007). Die membranständige CPK23/GCA2 interagiert mit den bereits genannten RCAR-Proteinen und hat einen negativen Effekt auf den ABA-Rezeptor. In der rezessiven *gca2-1* Mutante (*growth control exerted by ABA*, Austausch Cytosin durch Thymin in 5'-UTR) sind CPK23-Transkript und -Protein erhöht, sie ist ABA-insensitiv (Korte, 2009).

Phosphatasen können über intrazelluläre Botenstoffe beeinflusst werden: H₂O₂ führt zu einer reversiblen Inaktivierung von ABI1 und ABI2 über Cysteinoxidation (Meinhard et al., 2002). Die Bindung von Phosphatidsäure an ABI1 führt zu einer Reduzierung der Phosphataseaktivität und verlagert das Protein an die Plasmamembran, wodurch ein limitierter Zugang der Phosphatase zu nukleären Faktoren bzw. Substraten geschaffen wird (Li et al., 2009; Mishra et al., 2006; Zhang et al., 2004).

Allgemein lassen sich ABA-abhängige Prozesse in schnelle, kurzfristige Antworten wie zum Beispiel dem Schließvorgang der Spaltöffnungen (beschrieben in 1.1.2.1), und langfristige Reaktionen unterteilen, bei letzteren beruht die Anpassung auf differentieller Genexpression (siehe 1.1.2.2).

1.1.2.1. Regulation der Stomataapertur

Die ABA-induzierte Schließung der Spaltöffnung ist eine der wichtigsten Funktionen von Abscisinsäure in der Pflanze bei Anpassung an Stresssituationen wie Trockenheit und lässt sich vor allem auf schnelle Ionenfluss-Änderungen zurückführen. Innerhalb weniger Minuten schließen sich die Spaltöffnungen bei exogener ABA-Zufuhr. Hier soll nun näher auf die Funktion von Calcium in der ABA-abhängigen Stomataregulation eingegangen werden (siehe dazu Abb. 1.5).

Die stomatäre Pore wird aus zwei benachbarten spezialisierten Schließzellen gebildet, welche in einigen Pflanzen von Nebenzellen umgeben sind (Bergmann & Sack, 2007). Die Schließzellen übernehmen die Regulation der CO₂-Aufnahme für die Photosynthese und die Wasserabgabe über Transpiration. Durch den Transport von Ionen und Wasser entlang membranständiger Kanalproteine können Turgor und Zellvolumen geregelt werden und damit das Öffnen oder Schließen der Pore

(Schroeder et al., 2001b). Porenöffnung wird unter Normalbedingungen durch Licht induziert (Dietrich et al., 2001), Schließung durch Dunkelheit oder hohe CO₂-Gehalte. Bei Wassermangel wird Abscisinsäure gebildet, welche über einen Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration und dem damit verbundenen Zusammenwirken verschiedener Ionenkanäle den Spaltenschluss fördert, um so den Wasserverlust durch Transpiration zu reduzieren (MacRobbie, 2006a). Hier können auch andere Phytohormone eine Rolle spielen (Acharya & Assmann, 2009; Melotto et al., 2008), sowie Faktoren wie Pathogene, ROS, NO oder Ozon (Evans et al., 2005; Klusener et al., 2002; Kwak et al., 2003; Neill et al., 2008).

Abscisinsäure löst cytosolische Ca²⁺-Oszillationen aus. Über anfangs erhöhte Ca²⁺-Konzentration und ein spezifisches Oszillationsmuster (Allen et al., 2000; Allen et al., 2001; Schroeder & Hagiwara, 1990) sowie reversible Phosphorylierungen werden nach außen gerichtete, an der Plasmamembran lokalisierte R(*rapid*)- und S(*slow*)-Anionenkanäle aktiviert (Levchenko et al., 2005; Schmidt et al., 1995). Dies ruft einen erhöhten Cl⁻-Efflux hervor, der mit einer Hemmung von Protonenpumpen (H⁺-ATPasen), welche für die Öffnung der Pore verantwortlich sind, einhergeht. Dies führt zu einer Depolarisierung der Plasmamembran, wodurch der K⁺-Efflux in den Apoplast stimuliert und gleichzeitig der K⁺-Influx inhibiert wird (Brault et al., 2004). Zusätzlich wird osmotisch wirksames Malat in Stärke umgewandelt. Ionenefflux und passive Wasserabnahme lassen den Turgordruck der Zellen sinken, diese erschlaffen sozusagen und der Spalt schließt sich. In *abi1* und *abi2* Mutanten dagegen sind die Anstiege cytosolischen Calciums erniedrigt (Allen et al., 1999) und die Anionenkanal- und Kaliumkanal-Aktivierung gehemmt (Armstrong et al., 1995; Murata et al., 2001). Die ABA-hypersensitiven Mutanten *era1* und *abh1* hingegen zeigen eine verstärkte S-Typ-Kanal-Aktivierung (Cutler et al., 1996; Hugouvieux et al., 2001), ERA1 codiert für eine Farnesyltransferase, ABH für ein mRNA-CAP-bindendes Protein.

Die erste Erhöhung des Calciumspiegels führt zu weiterer Freisetzung von Ca²⁺, z.B. durch InsP₃/InsP₆, cADPR, oder durch CICR (*Calcium-induced Calcium Release* (Peiter et al., 2005)) aus der Vakuole, und damit zur Verstärkung des primären Signals. ABA aktiviert auch die Sphingosin-Kinase, die Sphingosin-1-phosphat bildet, welches wiederum zusammen mit GPA1, der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins, den K⁺-Influx hemmt (Ng et al., 2001). In der *ost2* Mutante wird die H⁺-ATPase AHA1 (OST2), welche mit dem K⁺-Influx-Kanal KAT1 interagiert, konstitutiv aktiviert und damit die ABA-induzierte Stomataantwort geblockt, was bedeutet, dass zusätzlich zur Aktivierung von Anionen-Effluxkanälen eine Hemmung der ATPasen nötig ist, um

einen Stomataschluss herbeizuführen (Merlot et al., 2007). H⁺-ATPasen werden durch Phosphorylierung inhibiert, AHA2 z.B. durch CIPK11 (Fuglsang et al., 2007).

Das in den Schließzellen exprimierte AtMRP5 (*Multidrug Resistance Protein 5*), ein transmembranes ABC-Protein (*ATP Binding Cassette*), spielt ebenfalls eine Rolle im ABA-induzierten Stomataschluss. In der Mutante treten Defekte in der ABA- und Ca²⁺-Aktivierung der S-Typ Anionenkanäle auf (Gaedeke et al., 2001; Klein et al., 2003).

OST1 reguliert direkt schnelle Antworten auf ABA wie ROS-Produktion und Anionenkanal-Regulation in der Plasmamembran. OST1 interagiert mit der NADPH-Oxidase AtRBOHF (*Respiratory Burst Oxidase Homolog F*), welche in die ABA-vermittelte ROS-Produktion involviert ist (Kwak et al., 2003; Sirichandra et al., 2009). Die ABA-insensitive *ost1* Mutante ist in ihrer H₂O₂-Bildung beeinträchtigt, was keine Aktivierung der Plasmamembran-Calciumkanäle zulässt (Xie et al., 2006). Die MAP-Kinasen 9 und 12 als positive Regulatoren wirken unterhalb im ABA-ROS-Signalweg und aktivieren Anionenkanäle. *Knock out*-Mutanten von AtRBOHF und MAPK9/12 sind insensitiv, was den ABA-induzierten Calciumanstieg im Cytosol und den Stomataschluss betrifft (Jammes et al., 2009; Kwak et al., 2003; Sirichandra et al., 2009).

SLAC1 (*Slow Anion Channel-associated 1*), codierend für einen S-Typ Anionenkanal an der Schließzellen-Plasmamembran (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008), wird durch CPK-Kinasen reguliert, nur bei Anwesenheit von funktionalem OST1 erfolgt die Aktivierung ABI1-abhängig (Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010). Ozon bzw. ROS führen zu einer Phosphorylierung von SLAC1 durch OST1 und damit zum Stomataschluss (Vahisalu et al., 2008). Auch die Interaktionspartner CPK21 und 23 stimulieren SLAC1, die Phosphorylierung wird durch ABI1 und PP2CA unterdrückt (Geiger et al., 2010; Lee et al., 2009). Die SLAC1-induzierte Depolarisierung der Plasmamembran durch Anionenefflux und die Hemmung der H⁺-ATPasen führt zu einer Aktivierung von GORK (K⁺-Efflux-Kanal) und zur Inaktivierung von KAT1 und KAT2 (K⁺-Influx-Kanäle) (Hosy et al., 2003; Pilot et al., 2001). Weitere Details zum ABA-induzierten Ca²⁺-abhängigen Stomataschluss wurden beschrieben (Kim et al., 2010; Pandey et al., 2007; Roelfsema & Hedrich, 2010).

Wenn die ABA-Konzentration in den Zellen zurückgeht, werden wieder Protonen von den H⁺-ATPasen nach außen gepumpt, die Plasmamembran hyperpolarisiert und die Aufnahme von K⁺ aus dem Apoplast wieder möglich, zusätzlich werden osmotisch aktive Substanzen wie Malat und Saccharose resynthetisiert, was zu einer Öffnung des Spalts durch Turgorerhöhung in den Zellen führt (Kwak et al., 2001; Lebaudy et al., 2007; Merlot et al., 2007; Schroeder et al., 2001b).

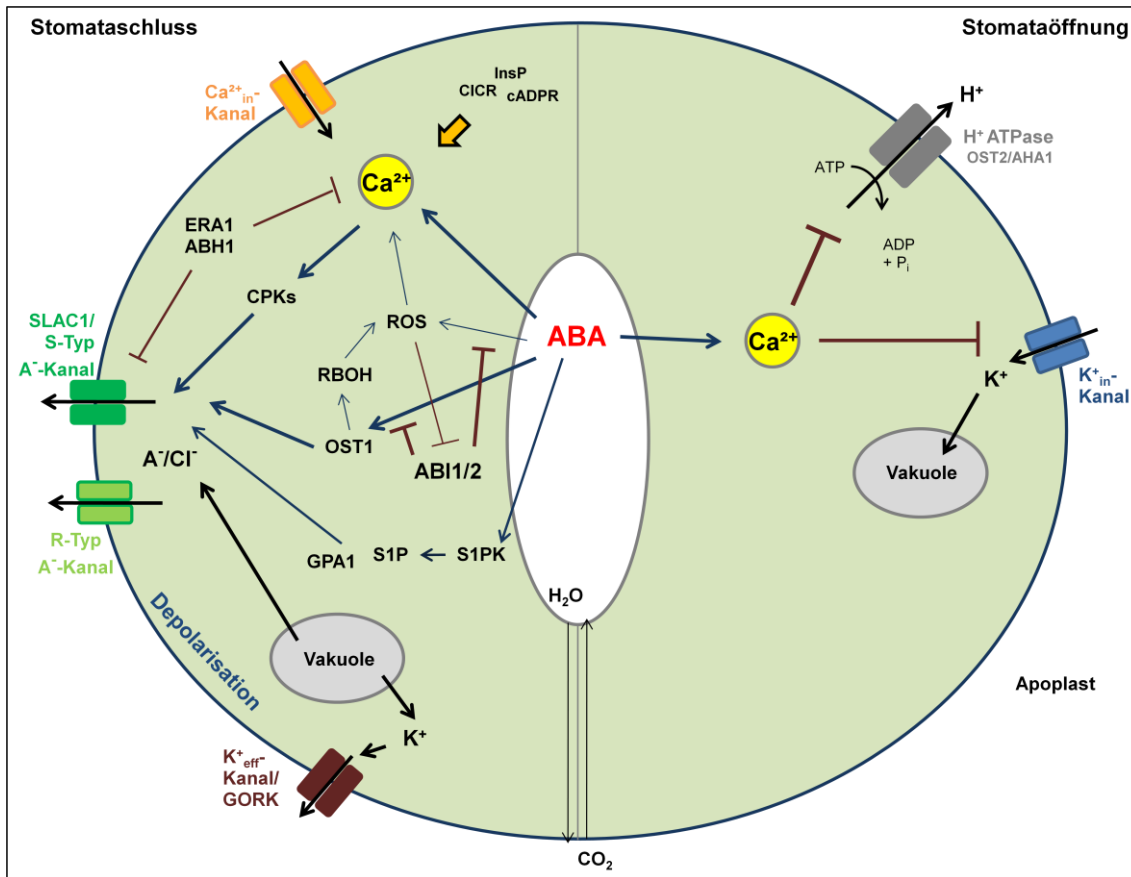


Abb. 1.5: Modell zur Regulation der am Stomataschluss beteiligten Komponenten. Abgebildet sind hier die wichtigsten im Text erwähnten regulatorischen Komponenten, die zur ABA-induzierten Schließung der Spaltöffnungen führen (verändert nach Kim et al., 2010).

1.1.2.2. Genexpressionsregulation

Das ABA-Signal führt bei eher langsam ablaufenden Antworten zu Veränderungen in der Genexpression, ca. 10% des Arabidopsis-Genoms werden durch Trockenheit, Salz und ABA reguliert, darunter Gene, die für Dehydrine, ROS-detoxifizierende Proteine, Transporter, Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Phosphatasen codieren (Nakashima et al., 2009; Nemhauser et al., 2006; Shinozaki et al., 2003). ABA-induzierbare regulatorische Sequenzen können *ABA Response Elements* (ABREs) sein, welche von bZIP-Transkriptionsfaktoren erkannt werden (Nakamura et al., 2001; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005), Bindestellen für MYB/MYC-Proteine (Abe et al., 2003), oder GC-reiche Sequenzen wie in *Drought Response Elements* (DREs) und *Coupling Elements* (CEs), an die *Apetala2* (AP2)-ähnliche Proteine wie DREBs (*Drought Response Element Binding proteins*) bzw. CBFs (*C-repeat Binding Factors*) binden. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors ABI4, ein AP2-Typ, führt ebenso wie die Überexpression von ABI3 und ABI5 zu ABA-Hypersensitivität der Pflanzen. Der B3-

Transkriptionsfaktor ABI3 (Rohde et al., 1999) bzw. VP1 in Mais kann durch Interaktion mit ABI5 (bZIP-Typ) dessen Wirkung verstärken und zudem an RY/Sph-Elemente binden (Sakata et al., 2010; Suzuki et al., 1997). Der *Homeodomain-leucine Zipper* HD-Zip-Transkriptionsfaktor HB6 erkennt eine palindromische Sequenz im Promotor des eigenen Gens, bei Bindung erfolgt ABA-abhängige Expression des HB6-Proteins (Ariel et al., 2007; Himmelbach et al., 2002). Durch ABA aktivierte Transkriptionsfaktoren, meist über Phosphorylierung reguliert, erkennen spezifische *cis*-Elemente in der Promotorsequenz des Zielgens, z.B. die 8 bis 10 Basenpaare langen ABREs mit der Kernsequenz ACGT. Zur Erkennung ist meist ein zweites ABRE oder ein CE im Promotor nötig, in letzterem Fall wird die Erkennungssequenz auch als ABRC (*Abscisic acid Response Complex*) bezeichnet (Hattori et al., 2002; Shen et al., 1996). Noch unbekannte *cis*-Elemente führen zur ABA-abhängigen Aktivierung von RD22 (Abe et al., 2003). Die Transkriptionsfaktor-Bindung erfordert zugängliches Chromatin, wodurch sich zusätzliche Regulationsmöglichkeiten über Veränderung der Zugänglichkeit ergeben. Es wurde gezeigt, dass ABA den Zugang zur DNA über Chromatinumbau modifizieren kann, z.B. durch Induktion rascher Veränderung der Histonmodifikation (Sokol et al., 2007). In Abwesenheit von ABA kann die PP2C HAB1 als negativer Regulator mit einem SWI3-Homolog interagieren, einer Komponente des SWI/SNF-*Chromatin Remodeling*-Komplexes, was die Induktion ABA-regulierter Gene blockiert (Saez et al., 2008). Viele bZIP-Transkriptionsfaktoren wie ABFs/AREBs (*ABA Response Element Binding Factors/proteins*) sind ABA-induzierbar, bleiben aber inaktiv, bis sie durch SnRK2s oder CPKs phosphoryliert werden (Choi et al., 2005; Fujii et al., 2007; Furihata et al., 2006; Kobayashi et al., 2005).

Folgende Proteine sind an der mRNA-Prozessierung einiger Gene in der ABA-Reaktion beteiligt: ABH1 codiert für eine Untereinheit des heterodimeren nukleären CAP-bindenden Proteins und wirkt bei der mRNA-Prozessierung des 5'-Transkriptendes, *abh1* blüht früh und ist ABA-hypersensitiv, die Menge an PP2CA-Transkript ist erniedrigt (Hugouvieux et al., 2001; Kuhn et al., 2007). Weitere mRNA-CAP-bindende Proteine sind CBP80 und 20 (Papp et al., 2004). Bei der Prozessierung des 3'-Transkriptendes wirkt dagegen AHG2 (*ABA Hypersensitive Germination 2*), eine Poly(A)-spezifische Ribonuclease. Sie destabilisiert ABA-induzierte Transkripte, die Mutante weist einen um 50% erhöhten ABA-Gehalt auf (Nishimura et al., 2005). Zu den Proteinen, die doppelsträngige RNA binden, gehören HYL1 (Lu & Fedoroff, 2000) und FIERY1 und 2 (Xiong et al., 2002). Der SAD1-Lokus (*Supersensitive to ABA and Drought 1*) codiert für ein snRNP (*small nuclear Riboprotein*) und ist involviert in Spleißen, Export und Degradation von RNA, wobei direkte Ziele noch nicht bekannt sind. Die *sad1* Punktmutation ist ebenfalls ABA-hypersensitiv (Xiong et al., 2001a).

Die *microRNA159* wird durch ABA und Trockenheit hochreguliert, wobei die Akkumulation abhängig von der ABI3-Funktionalität ist. Sie vermittelt eine Spaltung der MYB101- und MYB33-Transkripte, deren Degradation stellt einen Mechanismus dar, um die ABA-Signaltransduktion bei der Stressantwort in Keimlingen zu desensitivieren (Reyes & Chua, 2007).

Abbildung 1.6 zeigt ein allgemein gültiges Modell der ABA-Signaltransduktion: ABA-Perzeption durch RCARs und PP2Cs und die Aktivierung von Kinasen durch Phosphatase-Inaktivierung im Zuge der ABA-Bindung. Dadurch wird wiederum die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren möglich, welche ihrerseits an spezifische Promotorelemente binden und so zur Ablesung ABA-abhängiger Gene führen.

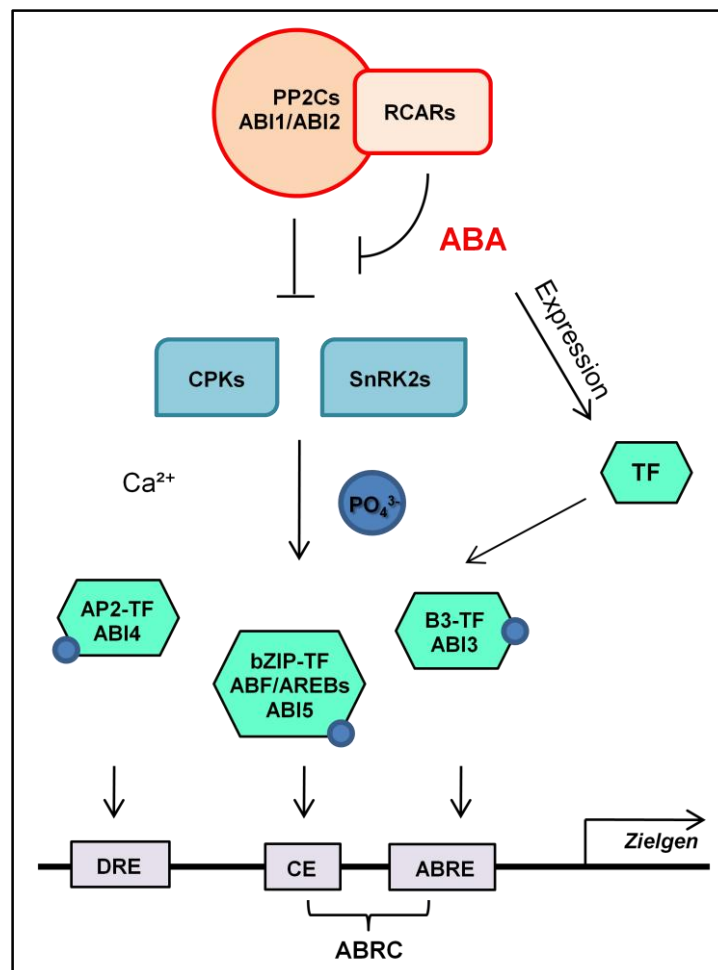


Abb. 1.6: Allgemeines Modell der ABA-abhängigen Genexpression.

Die negativen Regulatoren der ABA-Signaltransduktion, die PP2Cs, werden durch die Ausbildung des ABA-Rezeptors (RCAR-ABA-PP2C) inhibiert. Den Kinasen (SnRK2s, CPKs) wird dadurch ermöglicht, Transkriptionsfaktoren, deren Expression ebenfalls durch ABA aktiviert wird, zu phosphorylieren. Spezifische Promotorelemente können dann von den aktivierten Transkriptionsfaktoren (TF) erkannt werden und die Expression ABA-abhängiger Zielgene findet statt.

1.2. Salzstress

Abscisinsäure wirkt als Stresshormon, unter abiotischen Stressbedingungen wie Trockenheit, Hitze, Kälte oder Salinität wird die Abscisinsäure-Biosynthese und anschließend die ABA-Signaltransduktion in der Pflanze in Gang gesetzt und dadurch diverse Adaptionsmechanismen angeschaltet.

Ein erhöhter Salzgehalt in der Erde bedeutet starken abiotischen Stress für die darauf wachsenden Pflanzen, vor allem für Feldfrüchte ist dies kritisch. Weltweit sind über 800 Millionen Hektar Land betroffen, was ca. 7% der gesamten landwirtschaftlich genutzten Fläche ausmacht (Munns & Tester, 2008). Bodenversalzung limitiert den Ernteertrag beträchtlich und stellt neben Wassermangel ein weiterhin wachsendes Problem für die Ernährung der Weltbevölkerung in der Zukunft dar, begünstigt durch den Klimawandel. Neben natürlichen Ursachen wie der Freisetzung von Chlorverbindungen aus Gestein und Anreicherung von Meersalz im Boden durch Wind und Regen sind die Bewässerung trockener Anbaugelände mit salzhaltigem Wasser sowie eine gleichzeitig hohe Evaporationsrate Gründe für eine starke Anreicherung von Salzen im Boden. Das am besten wasserlösliche und in hohem Maße vorkommende Salz ist Natriumchlorid.

1.2.1. NaCl-Aufnahme durch die Pflanze und Auswirkungen

Molekulare Antworten, die zur Akklimation der Pflanzen auf Wasser- und Salzstress führen, hängen oft zusammen, Wasserdefizit wird nicht nur durch ausbleibenden Regen, sondern auch durch Salinität, Hitze oder Kälte hervorgerufen. So ist die Unterscheidung von Signalwegen und Toleranz vermittelnden Hauptkomponenten schwierig.

Im Boden gelöstes Salz hoher Konzentration führt zu einer Erniedrigung des Wasserpotentials im Boden und damit zu einer erschwerten Wasseraufnahme durch die Wurzeln. In der Pflanze wirkt neben dem schnell einsetzenden primären osmotischen Stress auch ionenspezifischer Stress, dessen Langzeiteffekte für die Pflanze toxisch sind und zu Gewebenekrosen führen. Osmotischer Stress wird ausgehend von der Wurzel über ein hydraulisches Signal schnell in den Spross übertragen und dort in ein chemisches Signal umgesetzt, die Abscisinsäure (Christmann et al., 2007). Diese führt nach Erkennung durch den Rezeptor (siehe 1.4) zu Antworten in der Pflanze wie dem über Ionenkanäle gesteuerten Stomataschluss (1.1.2.1) (Fricke, 2004) oder zu Veränderungen in der Gentranskription (1.1.2.2), z.B.

durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie DREB2A und B und Bindung dieser an DRE-Elemente von Promotoren salzstress-induzierter Gene (Nakashima et al., 2000). NaCl induziert zusätzlich die Expression anderer, ABA- und Trockenstress-unabhängiger Gene (Seki et al., 2002), beruhend auf der ionischen Wirkung.

Setzt man Wurzeln plötzlich einem Medium mit hohem Salzgehalt aus, so kommt es innerhalb weniger Minuten zur Plasmolyse von Wurzelkortexzellen sowie zu einem schnellen Stillstand der Blattausdehnung und damit des Pflanzenwachstums (Munns, 2002). Liegt eine hohe Konzentration an NaCl im umgebenden Medium vor, so wird ein osmotisches Potential generiert, welches zu einer reduzierten Wasseraufnahme der Wurzeln führt, in der Pflanzenzelle wird daher im Cytosol Wasser aus der Vakuole benötigt, wodurch der Zellturgor sinkt und die Blattausdehnung zurückgeht (Shabala & Cuin, 2008). Als Grenzkonzentration für eingeschränkte Blattelongation sowie Wachstum der Pflanzen gelten ca. 40 mM NaCl im Boden.

Neben der passiven Aufnahme von Natriumionen aus dem Boden über nichtselektive Kationenkanäle NSCC (*Non-Selective Cation Channels*) (Demidchik et al., 2002) entlang des elektrochemischen Gradienten konkurrieren Natriumionen mit Kaliumionen, da beide eine vergleichbar große Hydrathülle haben, um den Transport in die Pflanzenzelle über K^+ -selektive Ionenkanäle und HAK/KUP (*High-Affinity K^+ -Uptake*)-Transporter (Rodriguez-Navarro & Rubio, 2006). Die Cytotoxizität von Na^+ beruht auf der Konkurrenz von Na^+ und K^+ um Bindestellen in Enzymen, die für zelluläre Funktionen wichtig sind. Das unter optimalen Bedingungen hohe K^+/Na^+ -Verhältnis in der Pflanzenzelle wird empfindlich durch die Natriumaufnahme gestört, was zu einer Depolarisierung der Plasmamembran und damit zur Aktivierung von Kalium-Effluxkanälen KOR (*K^+ Outward Rectifying*) führt (Shabala & Cuin, 2008), entsprechend ist vor allem Kalium als wichtiger Nährstoff weniger für die Pflanze verfügbar.

Über die Wurzeln aufgenommene Natriumionen werden durch den Transpirationsstrom in den Spross transportiert, wo sie im apoplastischen Raum und in den Zellen akkumulieren. Im Cytosol der Pflanzenzellen soll die Konzentration an Natriumionen höchstens 10 bis 30 mM betragen, mehr Na^+ wirkt sich toxisch aus. Um den zellulären Kaliumionen-Verlust auszugleichen, werden ATPasen gebraucht, um die Membran zu hyperpolarisieren und so eine Aktivierung der Kalium-Influxkanäle herbeizuführen. Die hierfür benötigte ATP-Konzentration wird gleichzeitig aber von der durch den osmotischen Stress ausgelösten erhöhten Synthese osmoprotektiver Substanzen reduziert, so dass sich die Erhaltung der Ionenhomöostase schwierig gestaltet. Eine nicht ausbalancierte Ionenbilanz kann in Folge unter anderem zu einer gesteigerten ROS-Produktion führen (Miller et al., 2010).

Die Pflanze braucht also Mechanismen zur Vermeidung erhöhter Salzaufnahme bzw. erhöhter Salzkonzentration in der Zelle sowie generell zur Toleranz gegenüber osmotischem Stress, um auf versalzten Böden überleben zu können.

1.2.2. Mechanismen der Salztoleranz in Arabidopsis

Um Salztoleranz zu vermitteln, ist vor allem der Ausschluss von Natriumionen aus dem Spross sowie die Modifizierung spezifischer Na^+ -Transportwege von Bedeutung. Halophyten gedeihen trotz hohen Salzgehaltes im Boden, da sie ihren internen osmotischen Status erhalten können. Die Einführung daran beteiligter Mechanismen in Kulturpflanzen, bei denen es sich meist um Glycophyten handelt, wäre eine Möglichkeit die Salztoleranz dort zu verbessern. Neben der Toleranz gegenüber osmotischem Stress spielt die anatomische Adaption eine Rolle. Diese beinhaltet z.B. bei einigen Sukkulenten die Kompartimentierung und Speicherung von Natriumionen in der Vakuole, sowie die Exkretion von Na^+ durch aus Trichomen entstehenden Salzdrüsen oder epidermalen Blasenhaaren bzw. durch die Wurzel. *Arabidopsis thaliana* gehört zwar zur Gruppe der Glycophyten, dennoch dient sie als Modellmechanismus zur Aufklärung der Salztoleranz vermittelnden Mechanismen in Pflanzen.

Der wenig affine Na^+ -Transporter AtHKT1;1 scheint für die Entfernung überschüssiger Natriumionen aus dem Xylemsaft verantwortlich zu sein, so dass die Menge an Na^+ , welche Photosynthese betreibendes Gewebe erreicht und dort toxisch wirkt, minimiert wird (Davenport et al., 2007; Pardo, 2010). Die Überexpression von AtNHX1, einem vakuolären Na^+/H^+ -Antiporter, sowie von SOS1, einem in der Plasmamembran lokalisierten Na^+/H^+ -Antiporter, führen jeweils zu erhöhter Salztoleranz der Arabidopsis-Pflanzen (Apse et al., 1999; Shi et al., 2003). Um der Na^+ -Akkumulation im Cytoplasma vorzubeugen, kommen mehrere Mechanismen in Frage: Reduktion des Natrium-influges in die Zelle, aktive Absonderung von Natriumionen in die Vakuole und aktiver Na^+ -Transport aus der Zelle zurück ins Wurzelmedium.

NHX1, lokalisiert in der Tonoplastenmembran, sorgt für eine Kompartimentierung von Natriumionen in der Vakuole und führt damit zum Erhalt des intrazellulären K^+ -Status bzw. zu einer Senkung der durch Natrium hervorgerufenen Toxizität in der Zelle. Die Transkription von NHX1 wird durch osmotischen Stress in Wildtyppflanzen hochreguliert (Yokoi et al., 2002), nicht jedoch in der *aba2-1* Mutante, was für eine von der ABA-Synthese abhängige Antwort des Na^+/H^+ -Antiporters spricht. Durch die Senkung des Na^+ -Spiegels im Cytoplasma wird außerdem eine osmotische Wiederanpassung der Zelle erreicht.

Der SOS1-Na⁺/H⁺-Antiporter schleust Natriumionen aus den Wurzelzellen, in denen NHX1 nur geringfügig exprimiert wird, zurück ins Medium. Desweiteren ist SOS1 für den Langstreckentransport durch Be- und Entladen von Xylem und Phloem mit Na⁺ verantwortlich, insgesamt führt die Aktivität von SOS1 zu einer verzögerten Akkumulation von Natriumionen im Cytosol von Sprosszellen. Zwei weitere Komponenten der Salzstress-Signaltransduktion, SOS3 und SOS2, führen zu einer erhöhten Expression und Aktivierung von SOS1. Durch Natriumionen-Influx kommt es zu einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration im Cytosol (Knight et al., 1997; Zhu, 2002), welche durch SOS3, ein myristoyliertes Calcineurin B-ähnliches Protein (CBL4), erkannt wird. SOS3 interagiert bei Calcium-Anwesenheit mit dem regulatorischen C-Terminus von SOS2, einer SnRK3-Kinase (CIPK24), wodurch der katalytisch aktive N-Terminus von SOS2 aktiviert wird (Halfter et al., 2000). Der aktive SOS3/SOS2-Komplex kann über die SOS3-Myristinsäure an die Plasmamembran andocken und SOS1 durch Phosphorylierung aktivieren (Ishitani et al., 2000; Liu et al., 2000), siehe dazu Abb. 1.7. Eine Verbindung zwischen SOS-Signalweg und ABA-Signaltransduktion stellten Ohta et al. her, die die Interaktion der Phosphatase ABI2 mit SOS2 untersuchten (Ohta et al., 2003). ABI2 als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion würde die Kinase SOS2 in einem inaktiven Zustand halten, durch Salzstress induzierte ABA-Biosynthese und die im Laufe der Signaltransduktion eintretende Inaktivierung von ABI2 führen demnach zu einer vollen Aktivierung des schon durch Natriumionen in Gang gesetzten SOS-Signalwegs.

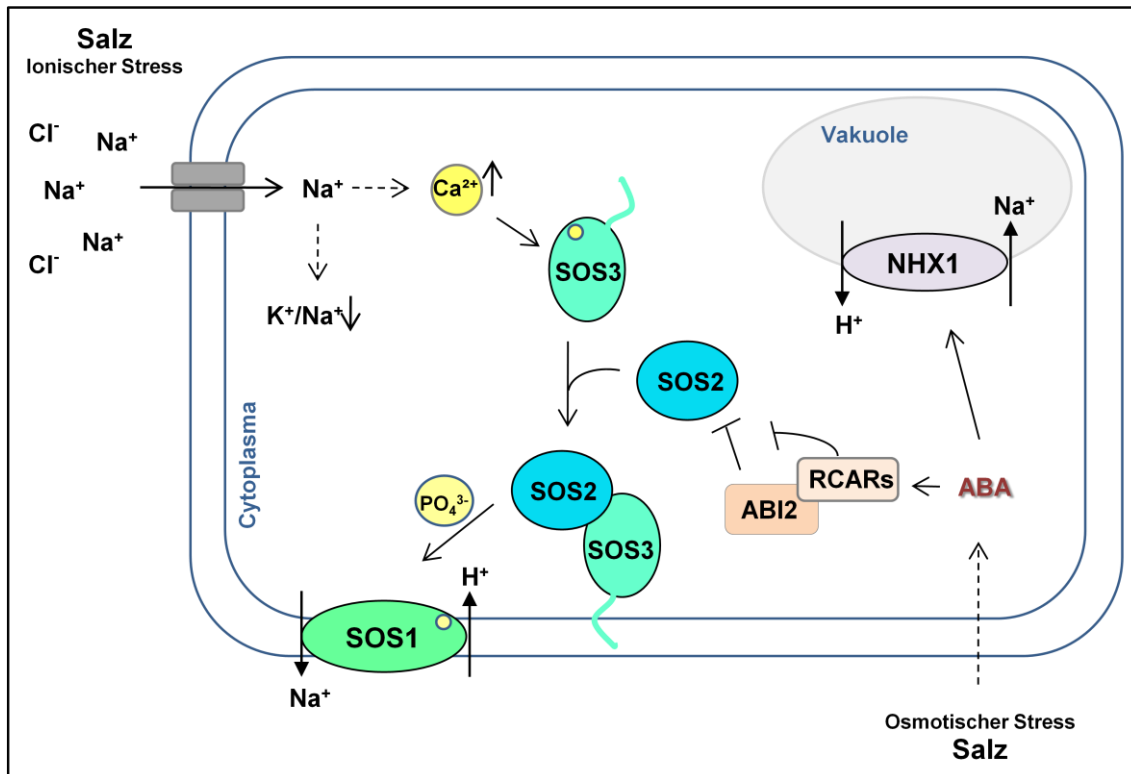


Abb. 1.7: Modell der Signaltransduktion in der Pflanzenzelle bei Salzstress.

Dargestellt ist der durch Natriumionen induzierte SOS-Signalweg, sowie der osmotische Effekt von Salzstress. Der Na⁺-Aufnahme durch nichtspezifische Transporter ins Cytosol folgt eine Erniedrigung des K⁺/Na⁺-Verhältnisses und ein Anstieg der cytosolischen freien Ca²⁺-Konzentration.

Das calciumbindende Protein SOS3 wird aktiviert und interagiert mit der Proteinkinase SOS2. Der Komplex SOS3-SOS2 kann sich über eine Myristinsäure von SOS3 an die Plasmamembran anlagern und durch Phosphorylierung über SOS2 den Na⁺/H⁺-Antiporter SOS1 in der Plasmamembran aktivieren, der überschüssige Natriumionen aus der Zelle pumpt. SOS2 wird durch die Phosphatase ABI2 inhibiert, jedoch wird durch den ebenfalls osmotisch wirkenden Salzstress Abscisinsäure synthetisiert. Durch die Perzeption von ABA wird ABI2 inhibiert, was wiederum zu einer vollen Aktivierung des SOS-Signalwegs führt. ABA führt auch zu einer Aktivierung des NHX1-Na⁺/H⁺-Antiporters, welcher Na⁺ aus dem Cytosol in die Vakuole pumpt, um es dort zu speichern. Durch die Kompartimentierung bzw. den Efflux von Na⁺ aus dem Cytosol sowie anderer hier nicht dargestellter Prozesse wird dort das Verhältnis K⁺/Na⁺ wiederhergestellt, sowie der osmotische Druck angepasst.

1.3. Suche nach Arabidopsis-Mutanten mit gestörter Reaktion auf Trockenheit

Verschiedene Umweltfaktoren wie Hitze, Kälte, Salz oder Trockenheit führen zu Abscisinsäure-Biosynthese und -Signaltransduktion, um die Anpassung der Pflanze an die Stresssituation z.B. durch ABA-induzierten Stomataschluss und Verhinderung der erneuten Öffnung zu unterstützen. Die Schließung der Spaltöffnungen bedeutet für die Pflanze einen verringerten Wasserverlust durch weniger Transpiration. Durch Transpiration erfolgt immer auch eine Kühlung an der Blattoberfläche durch Verdunstung des Wassers. Beim Schließen der Stomata steigt also die Temperatur an der Blattoberfläche, da keine Transpiration und damit keine Kühlung mehr abläuft. Mutanten wie *aba2*, *abi1* und *abi2*, welche ABA-defizient bzw. ABA-insensitiv sind, haben z.B. bei Wassermangel dann eine kühlere Blattoberfläche als der Wildtyp. Diese Differenz in der Blattoberflächentemperatur kann man sehr gut über Infrarotthermographie sichtbar machen und quantifizieren. So ist es möglich, ausgehend von Populationen mutagenisierter Pflanzen (EMS- oder auch RNAi-induziert) diejenigen darunter zu finden, welche bei Applikation von osmotischem Stress oder bei Austrocknung anders als der Wildtyp entweder mit früherem Erwärmen oder konstant kühlerer Temperatur reagieren. Damit sollte es möglich sein, Komponenten des osmotisch induzierten ABA-Signalwegs wie Sensoren für osmotischen Stress oder ABA-Rezeptoren zu identifizieren. Die Infrarotthermographie stellt also eine gute Möglichkeit dar, um nichtinvasiv und mit hohem Durchsatz die negative Korrelation zwischen Transpirationsrate und Blattemperatur sichtbar und messbar zu machen.

Bereits in den 1980er Jahren wurde die Methode der Thermographie auf Pflanzen angewendet, z.B. bei der Untersuchung von Wasserstress an Sonnenblume (Hashimoto et al., 1984) oder der Beschreibung einer Gersten-Mutante mit ABA-insensitiven Stomata (Raskin & Ladyman, 1988). Die Isolierung der *ost1* und *ost2* Mutanten geschah ebenfalls über Infrarotthermographie (Merlot et al., 2002), auch in Feldversuchen ist die Methode einsetzbar (Jones et al., 2002). In jüngster Zeit werden neben dem Einsatz der Infrarotthermographie in der Pflanzenpathologie wie bei einem Befall mit Dunklem Mehltau (Oerke et al., 2006) auch die Samenviabilität und die Erwärmungsvorgänge in Samen während der Imbibition vermessen (Kraner et al., 2010).

1.3.1. Infrarotthermographie

Bei der Infrarotthermographie (IRT) wird Infrarotstrahlung der Wellenlänge 1 μm bis 1 mm detektiert, in ein elektronisches Signal umgewandelt und nach Weiterverarbeitung graphisch als Temperaturwert dargestellt. Da temperaturabhängige Strahlung gemessen wird, ist eine berührungslose Bestimmung der Objekttemperatur möglich. Die von einem Objekt ausgehende Energie der Infrarotstrahlung korreliert mit der Oberflächentemperatur des Objektes. Basierend auf den physikalischen Regeln des Strahlungsgesetzes von Planck und des Verschiebungsgesetzes von Wien kann bei der Bestimmung der Temperatur von Pflanzen der langwellige Infrarotbereich (7,5 bis 14 μm) genutzt werden, bei einer mittleren Temperatur von 300 K erreicht man die maximale Strahlung bei ca. 10 μm . Bei der Durchführung einer Infrarotmessung müssen mögliche Störungen wie Transmissionsstrahlung τ des Hintergrundes, Reflektion von Sonneneinstrahlung ρ , sowie die Dämpfung der Strahlung durch die Messtrecke berücksichtigt und minimiert werden. Allgemein gilt $\tau + \rho + \varepsilon = 1$ (ε = Emission des Objektes). Bei der Anwendung an Pflanzen findet keine Transmission statt und nur sehr wenig Reflektion, der Emissionsgrad ε beträgt zwischen 0,95 und 0,98, was empirisch ermittelt werden kann, im Vergleich dazu hat ein idealer Schwarzer Strahler einen Emissionsgrad von 1 (Gaussorgues, 1994; Schuster, 2000).

1.3.2. RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) stellt einen konservierten Mechanismus der Genabschaltung dar, herbeigeführt durch doppelsträngige RNA (dsRNA). dsRNA-Exposition führt über nachfolgend beschriebene Mechanismen (siehe Abb. 1.8) zur Degradation von mRNA-Sequenzen ohne Beeinträchtigung der Transkriptionsrate, also zur Inhibierung von Translation (*Post-Transcriptional Gene Silencing*, PTGS) bei dsRNA, welche homolog zu codierenden Gensequenzen ist. Die andere Möglichkeit der Genabschaltung durch Blockade der mRNA-Synthese (*Transcriptional Gene Silencing*, TGS) wird durch Chromatinumbau oder Methylierung von zur dsRNA homologen genomischen Promotorsequenzen ausgelöst (Mette et al., 2000; Wassenegger et al., 1994). Die natürliche biologische Funktion von RNAi in Pflanzen ist unter anderem ein Abwehrmechanismus gegen Pathogene durch Kontrolle bzw. Abschaltung viraler Genexpression (Waterhouse et al., 2001).

RNA-Interferenz wird ausgelöst durch *small RNAs* (*microRNAs* - miRNAs oder *small interfering RNAs* - siRNAs), die 21 bis 25 Nukleotide lang sind und aus längerer

doppelsträngiger RNA gebildet werden. miRNAs entstehen dabei aus zurückgefalteten Vorläufern, die aus unvollständigen *inverted repeats* im Genom transkribiert werden. siRNAs entstehen aus exogenen und endogenen dsRNAs. Zusätzlich kann aus bestehender RNA über *RNA-Directed/Dependent RNA-Polymerases* (RDR oder RdRP) weitere dsRNA synthetisiert werden. Die Umsetzung von dsRNA zu kurzen RNA-Stücken wird durch sogenannte *Dicer*-Proteine initiiert, die Endonukleaseaktivität besitzen. Sie wirken als Dimere, 2 von 4 aktiven Zentren sind inaktiv, so dass 22 Nukleotide lange Fragmente (statt 11) beim Verdau von dsRNA entstehen (Bernstein et al., 2001a). Die *small* RNAs dienen der Substraterkennung und werden dazu in den *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) inkorporiert, einen aus mehreren Komponenten bestehenden Nuklease-Effektor-Komplex. Der zunächst inaktive RISC-Komplex wird durch ATP und die Umsetzung von doppelsträngiger siRNA zu Einzelstrang-siRNA aktiviert (RISC*) und erkennt dann seine Zielmoleküle wie mRNA (Hammond et al., 2000). Der RISC-Komplex degradiert über seine Nuklease-Funktion mRNA, welche komplementär zur Einzelstrang-siRNA ist bzw. induziert DNA-Methylierung.

In *Arabidopsis thaliana* gibt es sechs Gene, die für RDRs codieren (Yu et al., 2003), außerdem vier *Dicer-like/DCL*-Gene, die für RNaseIII-ähnliche Ribonukleasen codieren. DCL1 ist z.B. zuständig für die miRNA-Biogenese, während DCL3 siRNAs produziert und bei Chromatinabschaltung benötigt wird (Schauer et al., 2002; Xie et al., 2004). Es gibt zehn Proteine in *Arabidopsis*, *Argonaute* AGO genannt, die Teil des RISC-Komplexes sein können, diese beinhalten eine sogenannte PAZ-Domäne zur *small* RNA-Bindung und eine PIWI-Domäne als ribonukleäres *slicer*-Werkzeug (Hammond et al., 2001; Song et al., 2004).

Die Komplexität der regulatorischen Wirkung kurzer RNA-Stücke in Pflanzen (siehe Zusammenfassung unterschiedlicher Abschaltungsmechanismen (Baulcombe, 2004; Eamens et al., 2008; Xie & Qi, 2008)) kann eine Folge der notwendigen Anpassung der ortsgebundenen und damit verschiedensten Stresssituationen ausgesetzten Pflanzen sein (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009; Sunkar et al., 2007).

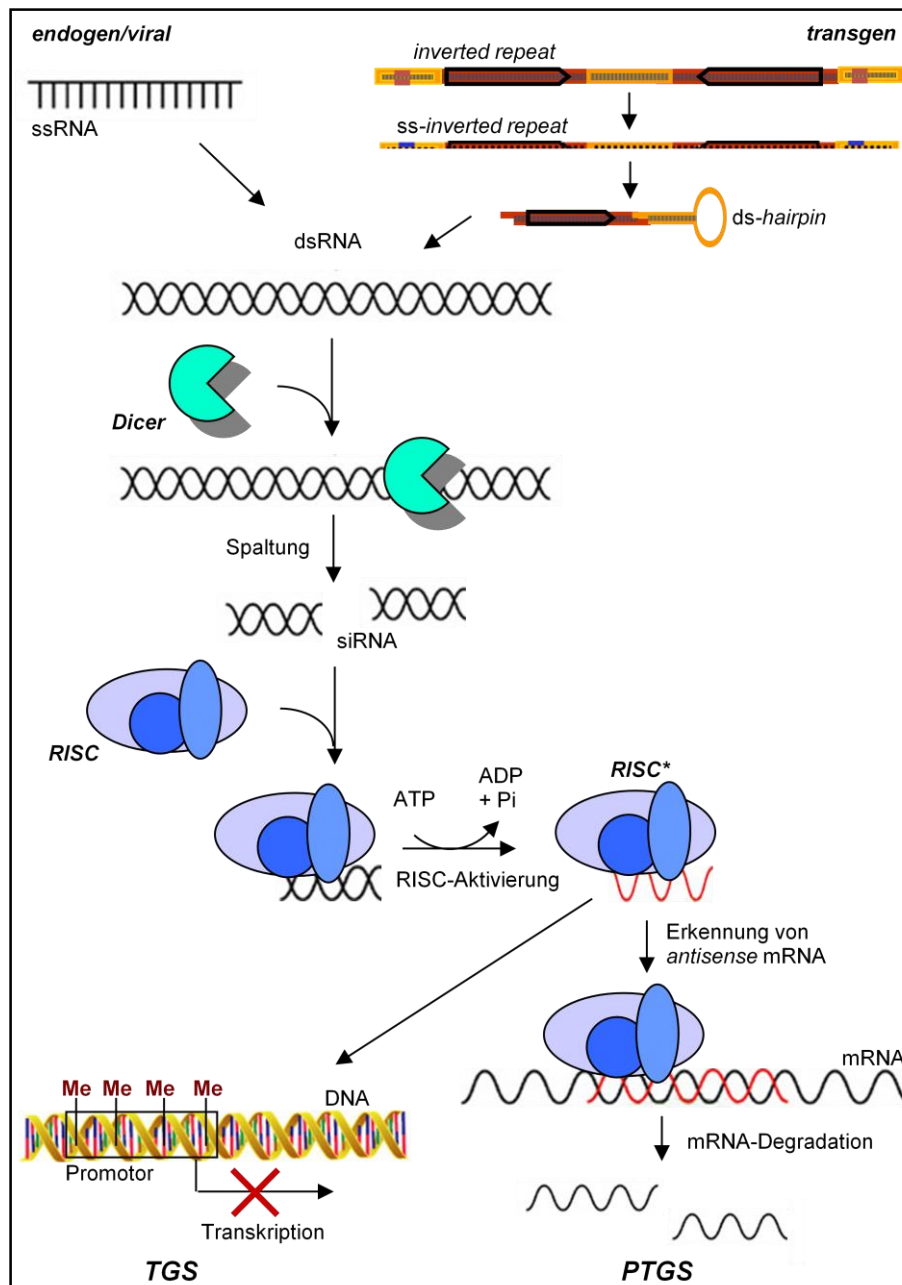


Abb. 1.8: Mechanismus der dsRNA-initiierten Genabschaltung.

Endogene oder exogene dsRNA wird durch *Dicer*-Enzyme in kurze siRNA-Stücke gespalten, welche in den RISC-Komplex integriert werden. Durch ATP und siRNA-Zersetzung zu Einzelstrang-siRNA wird RISC aktiviert und die Erkennung des Substrates (mRNA) kann erfolgen. Im Fall von PTGS wird homologe mRNA degradiert und somit die Translation blockiert, im Fall von TGS werden Promotorelemente methyliert, es kann keine Transkription stattfinden.

Exogene dsRNA kann aus Quellen wie Virusinfektionen stammen (Bernstein et al., 2001b), ebenso kann sie als selbstkomplementäre Sequenz, *artificial* miRNA (Schwab et al., 2006), Amplikon oder *hairpin*-Konstrukt durch stabile Transformation ins Pflanzengenom integriert werden oder durch Mikroprojektilbeschuss, Infiltration mit Agrobakterien, virale Einbringung (VIGS) oder Protoplastentransfektion transient in pflanzliches Gewebe eingebracht werden.

Ausgehend von einem Fragment einer codierenden Gensequenz kann dieses in einer *inverted repeat*-Orientierung vor und hinter einer Abstandsregion zur Generation von dsRNA über *hairpin*-Ausbildung bei Expression in Pflanzen führen (McGinnis et al., 2005). hpRNA wird durch Hybridisierung von RNA mit sich selbst gebildet, die Bezeichnung Haarnadel-Struktur kommt von der komplementären Region, die dsRNA imitiert (aus *inverted repeats*), und der dazwischen liegenden einzelsträngigen Schleife (Abstandsregion). Meist werden *hairpin*-Konstrukte unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) 35S-Promotors verwendet. hp-Konstrukte können auch zur Ausschaltung spezifischer Promotorelemente durch Methylierung und damit zur Blockade der Gentranskription (TGS) verwendet werden (Mette et al., 2000; Sijen et al., 2001; Wesley et al., 2001).

Die Methode der RNA-induzierten Genabschaltung kann dazu benutzt werden, systematisch Gene über PTGS auszuschalten, um ihre Funktion untersuchen zu können (Travella & Keller, 2009; Waterhouse & Helliwell, 2003), auch ist es möglich, vorhandene Redundanzen im Genom mit geeigneter eingeführter DNA zu umgehen, welche sonst zu Problemen bei der Identifizierung von einzelnen Genen über *reverse genetics* bzw. Mutantencharakterisierung führen. Eine einzige Kopie des induzierenden Transgens ist häufig ausreichend für eine Genabschaltung, mehrere Kreuzungsgenerationen können so vermieden werden. Zusätzlich kann das Miteinführen eines selektierbaren Markergens die ersten Schritte der Genotypisierung erleichtern. Durch das Einbringen von genomischen Fragmenten als *inverted repeats* (codierende Regionen: PTGS, nichtcodierende Regionen: TGS) können ganze Bibliotheken in das Pflanzengenom integriert werden, spezifisch nach Phänotypen gesucht und abgeschaltete Gene relativ einfach identifiziert werden (Brummell et al., 2003; Fukano et al., 2006). Vorteil solcher RNAi-Bibliotheken ist die dominante Mutation und Ausschaltung ganzer Genfamilien ohne das Problem von Redundanzeffekten.

Transgen induzierte RNA-Interferenz wurde z.B. in Enzian zur Veränderung der Blütenfarbe genutzt (Nakatsuka et al., 2009) oder bei der Analyse von Lipoxygenasen in Soja (Hayashi et al., 2008). Bei der Charakterisierung von Trockenstress-induzierten Genen kam RNA-induziertes PTGS in Tabak und *Arabidopsis thaliana* zur Anwendung, oder auch bei der Charakterisierung von Promotoren in Tomate, die eine Rolle bei der Fruchtentwicklung spielen (Fernandez et al., 2009). Transient induzierte Genabschaltung wurde in Gerstenepidermis zur Suche nach Genen verwendet, die eine Funktion in der Zellelongation oder in der Stomataregulation haben (Douchkov et al., 2005).

1.4. Abscisinsäure-Rezeptoren

Die Suche nach dem Rezeptor für Abscisinsäure erwies sich als schwierig, es wurden aufgrund elektrophysiologischer Analysen in Schließzellen sowohl membranständige (Hamilton et al., 2000) als auch cytosolische Perzeptionsorte vorgeschlagen (Levchenko et al., 2005). Entscheidend ist vor allem die Fähigkeit des Rezeptorproteins, das Hormon zu binden, und so wurden verschiedene Bindungs-Assays für Abscisinsäure entwickelt (Razem & Hill, 2009). Bei anderen Phytohormonen wurden Mutanten identifiziert, welche anormal auf das jeweilige Hormon reagierten, und durch Klonierung (*map-based cloning*) die Identität des betreffenden Genes festgestellt. Bei Ethylen, Cytokininen und Brassinosteroiden zeigten die Rezeptorkandidaten bereits Homologie zu Rezeptor-ähnlichen Kinasen anderer Organismen, bei Auxinen und Gibberellinen war die Funktion der Rezeptorkandidaten weniger offensichtlich, so dass auch biochemische Analysen herangezogen wurden. Bei der Suche nach dem ABA-Rezeptor wurden zwar durch *forward genetics* diverse Komponenten des ABA-Signaltransduktionsweges identifiziert, nicht aber der eigentliche Rezeptor. Erst in den letzten vier Jahren wurden mehrere Rezeptorsysteme publiziert, wobei aber ein Teil bereits durch andere Gruppen widerlegt wurde. Im folgenden Abschnitt sollen diese putativen ABA-Rezeptoren vorgestellt werden.

1.4.1. Bis Ende 2008 beschriebene Abscisinsäure-Rezeptoren in *A. thaliana*

Das erste für einen ABA-Rezeptor codierende Gen in *Arabidopsis thaliana* wurde Anfang des Jahres 2006 veröffentlicht: das nukleäre RNA-Bindeprotein FCA (*Flowering time Control protein A*) (Razem et al., 2006). Dieses spielt eine Rolle in der Regulation der Blütezeit und bindet FY, *Flowering Locus Y*. Dieser Komplex reguliert negativ den Blütenbildungsrepressor *Flowering Locus C* (FLC), was zu einer Induktion der Blütenbildung führt (Bäurle & Dean, 2006). Es wurde aufgrund der Homologie zu ABAP1 in Gerste, welches ABA bindet (Razem et al., 2004), postuliert, dass die Bindung von ABA an FCA zu einer Störung des Komplexes führt und so die Blütenentstehung unterdrückt wird (Razem et al., 2006), was zur inhibierenden Wirkung von ABA bei der Blütenbildung passen würde. Allerdings besitzt ABAP1 kein RNA-Bindemotiv und ist auch nicht im Kern wie FCA, sondern an der Plasmamembran lokalisiert. Inzwischen wurde der Artikel bereits zurückgezogen (Razem et al., 2008), nachdem bewiesen werden konnte, dass FCA nicht die Fähigkeit besitzt, ABA zu binden (Risk et al., 2008).

Die H-Untereinheit der Magnesium-Protoporphyrin IX-Chelatase (CHLH/ABAR/GUN5), die in der Chlorophyll-Biosynthese wichtig ist und unter Stressbedingungen eine Rolle im retrograden Signalweg zwischen Chloroplast und Nukleus spielt, zeigt hochaffine Bindung von ABA (Shen et al., 2006). RNAi-Pflanzen zeigten einen ABA-insensitiven Phänotyp, Überexpression resultierte in hypersensitiven Phänotypen. Wegen der Proteinlokalisierung in Chloroplasten müsste ABA allerdings nach der Biosynthese zurück in diese geschleust werden, was aufgrund ihres schwach sauren Charakters ($pK_S=4,7$) eher unwahrscheinlich ist. Der genaue Mechanismus ABA-kontrollierter Reaktionen wie Stomataschluss, Samenruhe und Genexpression mit ABAR als Rezeptor blieb unklar. Das entsprechende Protein in Gerste, XanF, kann ABA nicht binden (Muller & Hansson, 2009), die Bindung von ABA an ABAR konnte aber kürzlich nach ähnlichen Zweifeln wie bei FCA, bestätigt werden (Wu et al., 2009). Shang et al. berichteten, dass der cytosolische C-Terminus von ABAR mit WRKY-Transkriptionsfaktoren interagiert, welche negative Regulatoren im ABA-Signalweg in der Keimlingsentwicklung sind (Shang et al., 2010). Der Transkriptionsfaktor AD1A inhibiert die Expression ABA-abhängiger Gene wie ABI5, ABAR unterdrückt die AD1A-Expression und setzt so ABI5 frei, was einen neuen Signaltransduktionsweg für ABA beschreibt.

Ein weiterer Kandidat, das membranlokalisierte GCR2, wurde aufgrund des ABA-spezifischen Phänotyps der Mutanten und der vermuteten Homologie zur Familie der *G-protein Coupled Receptors* als ABA-Rezeptor postuliert (Liu et al., 2007). G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine sind bekannt dafür, dass sie mit trimeren G-Proteinen interagieren, in diesem Fall mit der α -Untereinheit, GPA1, die eine Rolle in der ABA-Signaltransduktion einnimmt (siehe 1.1.2) (Pandey & Assmann, 2004; Ullah et al., 2002). Diese Homologie konnte nicht bestätigt werden, GCR2 besitzt nicht die typischen sieben Transmembrandomänen (Gao et al., 2007; Johnston et al., 2007), außerdem findet keine Bindung von ABA durch GCR2 statt (Risk et al., 2009).

Da G-Proteine die ABA-Signaltransduktion modulieren, unter anderem durch GPA1-Interaktionen, wurde in diesem Bereich weiter nach Rezeptoren gesucht. GTG1 und GTG2 (*GPCR-type G proteins*) wurden als ABA-bindende Interaktionspartner von GPA1 identifiziert (Pandey et al., 2009). Sie besitzen sowohl Nukleotidbinde- als auch GTPase-Domänen, und es konnte gezeigt werden, dass GPA1, welches aktivierte PLD freisetzt und so PA-Bildung und damit den Stomataschluss fördert, die GTPase-Aktivität der GTGs inhibiert, nicht aber die ABA-Bindung beeinflusst. Die Doppelmutante *gtg1 gtg2* ist ABA-hyposensitiv, allerdings sind die ABA-abhängigen Reaktionen nur beeinträchtigt und nicht komplett aufgehoben, was wiederum für die

Existenz eines weiteren Rezeptors bzw. ABA-Signaltransduktionswegs intrazellulär spricht (Christmann & Grill, 2009).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die beschriebenen ABA-Rezeptoren die an ABA-Rezeptoren als Schlüsselkomponenten der ABA-Signaltransduktion gestellten Erwartungen nicht erfüllen. FCA und GCR2 wurden ja bereits als ABA-Rezeptoren ausgeschlossen, ABAR als plastidärer Rezeptor und die GTGs als plasmamembranständige Rezeptoren geben noch kein komplettes Bild ab, in das auch die weiter oben beschriebenen Komponenten des ABA-Signaltransduktionswegs und der ABA-induzierten Genexpression einwandfrei passen würden.

1.4.2. Der cytosolische Abscisinsäure-Rezeptorkomplex

Es stellt sich also die Frage nach einem weiteren ABA-Rezeptor mit eventuell anderer Lokalisation und einem weniger spezifischen Signalweg wie z.B. bei ABAR. Tatsächlich wurden im Jahr 2009 dann von zwei unabhängigen Gruppen mit verschiedenen Forschungsansätzen die ABA-bindenden cytosolischen RCAR-Proteine (*Regulatory Component of ABA Receptor*) bzw. PYR1/PYL-Proteine (*Pyrabactin-resistance 1/-like*) im Zusammenspiel mit Proteinphosphatasen 2C der Klasse A als Abscisinsäure-Rezeptoren vorgestellt (Ma et al., 2009; Park et al., 2009).

1.4.2.1. RCAR-Proteine und die Bet v 1-Superfamilie in *A. thaliana*

Bei den RCAR-Proteinen handelt es sich um eine Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* von insgesamt 14 Mitgliedern, die in drei Klassen eingeteilt werden können (Abb. 1.9).

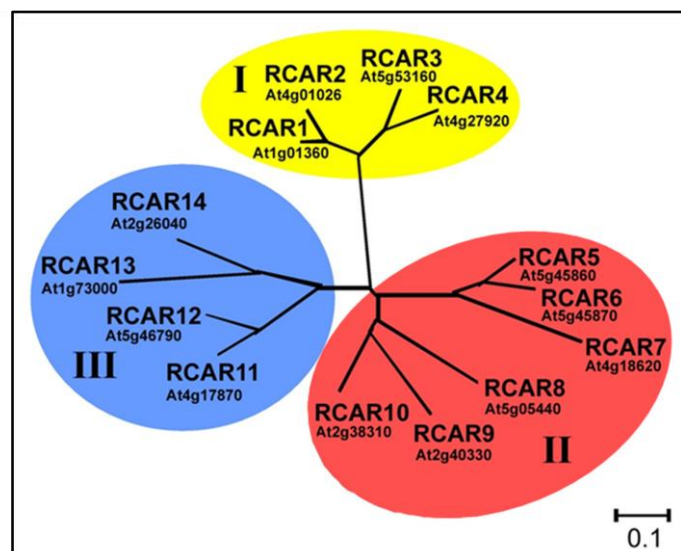


Abb.1.9: Phylogenetischer Baum der RCAR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*.

Diese Proteine weisen eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu dem Birkenpollenallergen Bet v 1a auf (ca. 75%), welches wiederum der großen Gruppe der *Pathogenesis-Related proteins 10* (PR-10) angehört, deren Expression durch Pathogeninfektion, Pflanzenhormone, Verwundung und Stress wie Salz oder Kälte hervorgerufen wird (Jain et al., 2006; Radauer & Breiteneder, 2007; van Loon et al., 2006). Allerdings ist die Sequenzähnlichkeit von RCAR/PYR1/PYL-Proteinen und PR-10 Proteinen nicht sehr hoch (Osmark et al., 1998). Die ubiquitäre Bet v 1 *fold*-Superfamilie wird auch der START-Domänen-Superfamilie (*Steroidogenic Acute Regulatory related lipid Transfer*) zugeordnet, welche ebenfalls eine Rolle in der Adaption der Pflanze an biotischen und abiotischen Stress spielt (Fu et al., 2009; Iyer et al., 2001). In Säugern dienen diese Proteine dem Lipidtransfer und binden beispielsweise Cholesterin (Lavigne et al., 2010). Die RCAR-Proteine und weitere Untergruppen der Bet v 1 *fold*-Proteine unterscheiden sich jedoch in ihrer Sequenz stark von den START-Proteinen und wurden separat davon in die Subfamilie der pflanzlichen Polyketidcyclase-ähnlichen Proteine eingeteilt (Radauer et al., 2008). In Bakterien katalysieren diese Proteine die Cyclisierung von Polyketiden in der Biosynthese von Pigmenten, Antibiotika und Antitumor-Verbindungen, in Pflanzen ist die Funktion solcher Proteine weitgehend ungeklärt.

Neben den Polyketid-ähnlichen Proteine zählen noch acht andere pflanzliche Subfamilien zur aus insgesamt elf Gruppen bestehenden Bet v 1 *fold*-Superfamilie, unter anderem die *Cytokinin-Specific Binding* CSBP-Proteine in Leguminosen, die Norcochlorinsynthasen, oder auch die MLP/RRP-Proteine (*Major Latex/Ripening Related Proteins*) (Radauer et al., 2008).

Die zentrale gemeinsame Eigenschaft der Bet v 1 *fold*-Mitglieder ist die Proteinstruktur: Sieben β -Faltblattstrukturen und zwei α -Helices umfassen eine lange C-terminale α -Helix, alle drei Komponenten formen zusammen das *helix-grip fold* Motiv (Iyer et al., 2001), wodurch eine Kavität entsteht, die hydrophobe Liganden wie Lipide und Hormone binden kann (Gajhede et al., 1996). Neben Membranlipiden, polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und RNA kommen als Liganden auch Sekundärmetabolite und Pflanzenhormone in Frage.

Die Norcochlorinsynthase aus *Thalictrum flavum* beispielsweise katalysiert den ersten Schritt der Benzylisochinolinalkaloid-Synthese, die Kondensation von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetat, in der Substanzen wie Morphin entstehen (Berkner et al., 2008; Ilari et al., 2009; Liscombe et al., 2005; Samanani et al., 2004). Das Enzym Hyp-1 aus *Hypericum perforatum* katalysiert den letzten Schritt in der Alkaloid-Biosynthese von Hypericin aus zwei Molekülen Emodin (Bais et al., 2003). Die CSBP-Proteine von *Vigna radiata* (Pasternak et al., 2006) und *Lupinus luteus* (Fernandes et al., 2008)

binden Cytokinine wie Zeatin, und Bet v 1 kann unter anderem Cytokinine und Brassinosteroide binden (Koistinen et al., 2005; Markovic-Housley et al., 2003). Über die Funktion der MLP-Proteine ist noch wenig bekannt, entdeckt wurden sie ursprünglich im Latexsaft von *Papaver somniferum* (Nessler et al., 1990), bisher wurde außerdem über MLP-Proteine in *Panax ginseng* (Sun et al., 2008) und Baumwolle (Chen & Dai, 2009) berichtet, außerdem ist die Kristallstruktur von zwei Arabidopsis-MLPs bekannt, At1g70830 und At1g24000, letzteres kann Progesteron *in vitro* als repräsentatives Hormon binden (Lytle et al., 2009).

Es ist damit nicht überraschend, dass die RCAR-Proteine die Fähigkeit besitzen, Abscisinsäure zu binden, was z.B. über Isothermale Titrationskalorimetrie bestätigt wurde (Ma et al., 2009). Die Rolle der ABA-bindenden RCAR-Proteine in der ABA-Perzeption wird im folgenden Abschnitt erläutert.

1.4.2.2. RCAR-Proteine in der ABA-Perzeption als Interaktionspartner von PP2Cs

Wie bereits erwähnt führten verschiedene Ansätze zur Entdeckung der RCAR/PYR1/PYL-Familie. Park et al. entdeckten PYR1 (RCAR11) bei der Charakterisierung eines neuen synthetischen selektiven ABA-Agonisten, Pyrabactin (Park et al., 2009). Diese Verbindung ist ein Wachstumsinhibitor und blockt die Samenkeimung bei Stress, bei einem Screen auf Pyrabactin-resistente Mutanten wurde PYR1 (*Pyrabactin-Resistance 1*) identifiziert. Bei diesem chemisch-genetischen Ansatz konnte die Redundanz innerhalb der Proteinfamilie umgangen werden, da in Samen nur PYR1, nicht aber die anderen PYLs (*Pyrabactin-resistance Like*), so hoch exprimiert wird. Bei der weiteren Suche nach möglichen Effektorproteinen, an die PYR1 infolge der Pyrabactin-Antwort binden könnte, wurden in einem *Yeast Two-Hybrid* Screen mit Pyrabactin und ABA PP2Cs der Subgruppe A (ABI1, ABI2 und HAB1) als Interaktoren der PYR1/PYL-Proteine identifiziert.

Einen anderen Ansatz verfolgten Ma et al., hier wurde nach Interaktionspartnern der als negative Regulatoren in der ABA-Signaltransduktion wirkenden Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 gesucht (Ma et al., 2009). Als konstitutive Bindungspartner, das heißt auch bei Abwesenheit von ABA, konnten RCAR1 und RCAR3 im *Yeast Two-Hybrid* Screen identifiziert werden. Santiago et al. fanden eine entsprechende Interaktion zwischen PYL5, 6 und 8 und HAB1 (Santiago et al., 2009b). Bei einem proteomischen Ansatz, der MS-Analyse ABI1-coaufgereinigter Proteine aus Pflanzenextrakt und somit *in vivo*-Interaktionspartnern, wurden neun der 14 RCAR-Proteine identifiziert (Nishimura et al., 2009b).

Im Folgenden werden die RCAR/PYR1/PYL-Proteine zur Vereinfachung nur noch als RCAR-Proteine bezeichnet, eine Übersicht der Gene und ihrer Bezeichnungen bietet Tabelle 1.1.

Nummer	RCAR	PYR1/PYL
At1g01360	RCAR1	PYL9
At4g01026	RCAR2	PYL7
At5g53160	RCAR3	PYL8
At4g27920	RCAR4	PYL10
At5g45860	RCAR5	PYL11
At5g45870	RCAR6	PYL12
At4g18620	RCAR7	PYL13
At5g05440	RCAR8	PYL5
At2g40330	RCAR9	PYL6
At2g38310	RCAR10	PYL4
At4g17870	RCAR11	PYR1
At5g46790	RCAR12	PYL1
At1g73000	RCAR13	PYL3
At2g26040	RCAR14	PYL2

Tabelle 1.1: Die RCAR/PYR1/PYL-Proteine.

PP2Cs sind bekannt als negative Regulatoren, wirkend zu Beginn des ABA-Signalweges, aber es fehlte noch eine Komponente, die mit hoher Affinität und Stereoselektivität physiologisch aktive (*S*)-ABA binden kann. Die im *Yeast Two-Hybrid* System beobachtete Interaktion von PP2Cs mit RCAR-Proteinen konnte über Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in Arabidopsis-Protoplasten sowie Coimmunopräzipitations-Versuche für Cytoplasma und Nukleus bestätigt werden (Ma et al., 2009; Santiago et al., 2009b). Die Bindung von ABA an RCAR1 wurde mit einer Dissoziationskonstante K_d von 660 nM über Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) bestätigt, bei gleichzeitiger Anwesenheit der Phosphatase ABI2 ist der K_d -Wert um das 10-fache erniedrigt und liegt bei 64 nM, einhergehend mit einer 10-fach höheren Bindungsaffinität für ABA (Ma et al., 2009), diese nanomolaren Konzentrationsbereiche liegen im Rahmen physiologisch auftretender ABA-Konzentrationen in der Pflanze. Ähnliches wurde für RCAR8 und ABA ($K_d = 1,1 \mu\text{M}$) bzw. RCAR8, HAB1 und ABA ($K_d = 38 \text{ nM}$) beobachtet (Santiago et al., 2009b). Dies würde bedeuten, dass PP2Cs die ABA-Bindung von RCAR stabilisieren, möglicherweise aufgrund von Strukturänderungen während der Interaktion, und RCAR zusammen mit den Phosphatasen als Rezeptorkomplex wirkt.

Die Überexpression von RCAR-Proteinen führt zu globaler ABA-Hypersensitivität mit beeinträchtigter Stomataregulation, aber auch die Überexpression von RCAR und PP2C zusammen ergibt eine erhöhte ABA-Antwort, was darauf hindeutet, dass RCAR der PP2C-Aktivität entgegenwirkt (Ma et al., 2009). In *in vitro* Phosphatase-Assays wurde eine Inhibierung der Phosphatasen festgestellt, wenn gleichzeitig RCAR und (S)-ABA vorhanden waren, nicht aber wenn nur RCAR oder ABA angeboten wurde (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Das heißt in Abwesenheit von ABA binden die RCARs nicht an PP2Cs oder zumindest nicht so, dass dadurch die Phosphataseaktivität beeinträchtigt würde, damit ist die PP2C-Aktivität relativ hoch, es finden keine Autophosphorylierungen und damit Aktivierungen von z.B. SnRK2s statt. Dementsprechend werden unterhalb der SnRK2s wirkende Transkriptionsfaktoren nicht phosphoryliert und ABA-abhängige Gene nicht abgelesen. Bei Anwesenheit von ABA bindet RCAR ABA und inhibiert die Phosphatase, so dass ABA-induzierte Antworten in der Pflanze ablaufen können. *Loss-of-function* Mutationen einzelner RCARs zeigten keinen Phänotyp in *Arabidopsis* aufgrund hoher Redundanz innerhalb der Proteinfamilie, die Quadrupelmutante weist aber starke Insensitivität auf, was ABA-induzierten Stomataschluss betrifft (Nishimura et al., 2009b). Bei transienter Expression in Protoplasten konnte eine spezifische Aktivierung des ABA-Signalwegs durch RCAR1 nachgewiesen werden (Korte, 2009; Ma et al., 2009). RCAR1 als ABA-Rezeptor bzw. Corezeptor und positiver Regulator der ABA-Signaltransduktion interagiert neben den PP2Cs auch mit dem negativen Regulator GCA2 (Korte, 2009). Nachdem es 14 Mitglieder der RCAR-Familie und 9 Mitglieder der PP2C Subgruppe A in *Arabidopsis thaliana* gibt, ist es wahrscheinlich, dass sich aufgrund unterschiedlicher Expression bei bestimmten Stressbedingungen oder in unterschiedlichen Geweben bzw. nach dem Entwicklungsstand der Pflanze, Kombinationen zusammenfinden, die spezifisch wirken.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Phytohormon Abscisinsäure spielt eine essentielle Rolle bei der Anpassung von Pflanzen an veränderte Umweltbedingungen wie Kälte, Hitze, Trockenheit oder Salzstress. Einige an der Abscisinsäure-Signaltransduktion beteiligte Komponenten wurden bereits identifiziert, jedoch sind die molekularen Mechanismen, die vor allem auf der Funktion negativer und positiver Regulatoren aufbauen, noch nicht vollständig geklärt. Ebenso bleibt unklar, welche Sensoren die veränderten Umweltbedingungen wahrnehmen und die Abscisinsäurebildung auslösen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der Abscisinsäure bei der pflanzlichen Anpassung an Salzstress untersucht werden. Das zeitliche und räumliche Muster der ABA-Antwort von Arabidopsis-Keimlingen auf osmotischen und ionischen Stress, den hohe Salzgehalte auslösen, sollte dabei unter Verwendung verschiedener Reportersysteme *in vivo* untersucht und mit dem Muster rein osmotischen Stresses (Christmann et al., 2005) verglichen werden. Dabei sollte der Beitrag, den Abscisinsäure an der Salztoleranz von Pflanzen leistet, erforscht werden.

Die an der Perzeption von osmotischem Stress beteiligten Komponenten sind noch unbekannt, daher sollte ein System entwickelt werden, um eben diese Sensoren sowie andere Komponenten der Signalweiterleitung zu identifizieren. Ein Screening-System, basierend auf einer RNAi-Bibliothek in transgenen Arabidopsis-Pflanzen und der Anwendung der Infrarotthermographie-Technik wurde entwickelt, um Mutanten zu entdecken, welche eine veränderte Reaktion auf osmotischen Stress aufweisen.

Kürzlich wurden Komponenten der Abscisinsäure-Perzeption beschrieben, welche ABA binden (RCAR-Proteine) und mit den negativen Regulatoren der ABA-Signaltransduktion (PP2Cs) interagieren (Ma et al., 2009). Beide Proteinfamilien bestehen aus mehreren Mitgliedern, so dass in dieser Arbeit die Regulation diverser Phosphatasen des Typs 2C aus der Subgruppe A durch unterschiedliche RCAR-Proteine untersucht wurde, um eine eventuelle Feinregulation der ABA-Antwort durch unterschiedliche Kombinationen differentiell exprimierter Rezeptorkomponenten zu untersuchen. Der Mechanismus der ABA-Bindung und die Interaktion von RCAR-Proteinen mit PP2C-Phosphatasen sollte über Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des Rezeptorkomplexes mit seinem Liganden ABA aufgeklärt werden.

Eine Beteiligung RCAR-verwandter MLP-Proteine sowie Proteinphosphatasen anderer Subgruppen an einer Hormonperzeption bzw. Ligandenbindung sollte durch Einsatz eines *Yeast Two-Hybrid* Interaktionsscreens geprüft werden.

2. Ergebnisse

2.1. Salzstress

Die durch Salzstress in der Pflanze ausgelösten Signaltransduktionswege und Toleranzmechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. Dem ionischen Effekt von NaCl auf die Pflanzen geht der primäre osmotische Effekt voraus, welcher zum einen die ABA-induzierte Signaltransduktion in die Wege leitet, zum anderen jedoch auch ABA-unabhängig auf die Gentranskription Einfluss nimmt (Nakashima et al., 2000). Wasserdefizit in der Umgebung des Wurzelsystems löst ein hydraulisches Signal aus, welches in den Spross weitergeleitet wird und dort zur ABA-Freisetzung bzw. Biosynthese vor allem im vaskulären System und in den Schließzellen führt. Nachfolgende ABA-abhängige Antworten wie der Stomataschluss tragen zur Adaption der Pflanze an die Stressbedingungen bei (Christmann et al., 2005; Christmann et al., 2007). Das Zusammenspiel ABA-abhängiger Komponenten wie der Phosphatase ABI2 und ioneninduzierter Komponenten wie der Kinase SOS2 während der Salzstress-Signaltransduktion ist kompliziert. Konträre Ergebnisse wurden bezüglich der Salztoleranz von *abi1* bzw. *abi2* Mutanten veröffentlicht (Achard et al., 2006; Ohta et al., 2003), so dass eine genauere Untersuchung der bei Salzstress ablaufenden Mechanismen nötig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen die Funktion von Abscisinsäure bei der Anpassung von *Arabidopsis thaliana* an hohe Salzkonzentrationen unter Zuhilfenahme verschiedener Reportersysteme und Mutanten geklärt und mit Auswirkungen von durch Mannit verursachtem osmotischen Stress verglichen werden. Außerdem sollten Einblicke in ABA-unabhängige Vorgänge sowie die durch Natriumionen induzierte Toxizität gewonnen werden.

2.1.1. Reporteraktivierung durch ABA

Zur Untersuchung ABA-abhängiger Vorgänge in *Arabidopsis*-Keimlingen wurden bereits etablierte Luciferase-Reportersysteme wie *pAtHB6::LUC* und *pRD29B::LUC* (Christmann et al., 2005), sowie die im Rahmen dieser Arbeit klonierten und getesteten Reporterkonstrukte *pAtHB6::EGFP* und *pRD29B::EGFP* (*Enhanced GFP*) bei der Untersuchung von Salzstresseffekten eingesetzt. Die stabil in Pflanzen eingebrachten Reporterkonstrukte bestehen aus Sequenzen, die für Luciferase bzw. EGFP codieren, ihnen vorgeschaltet sind die Promotoren der ABA-induzierten Gene HB6 und RD29B mit einem bzw. drei ABRE-Elementen (ACGTG G/T C), RD29B besitzt außerdem ein

DRE-Element (A/G CCGAC). Durch den Einsatz dieser Reportersysteme ist ein *in vivo imaging* hervorgerufener Effekte nichtinvasiv im Detail möglich, es kann gewährleistet werden, dass keine experimentellen Manipulationen der Pflanze für die gezeigte Wirkung verantwortlich sind. Zunächst wurde die Reporteraktivierung durch exogen zugeführte Abscisinsäure untersucht, um sicherzustellen, dass die Reportersysteme funktionieren. Abbildung 2.1 zeigt Aufnahmen von 5 Tage alten, homozygoten *pAtHB6::LUC*-Pflanzen, die für 24 h auf Medium, welches 20 μM (S)-ABA enthielt, umgesetzt wurden. Deutlich zu erkennen ist die Wirkung von ABA im Spross von Wildtyppflanzen (a), mit einer Akkumulation von ABA (dunkelrote Punkte) in den Schließzellen (vergrößert dargestellt in b), im Gegensatz dazu zeigt die ABA-insensitive Mutante *abi1-1* keine Induktion des *AtHB6*-Promotors. Ähnlich sieht es beim Leitgewebe der Wurzeln aus (c und d). Das *pAtHB6::LUC*-Reportersystem wird also in den transgenen Pflanzen ABA-abhängig induziert.

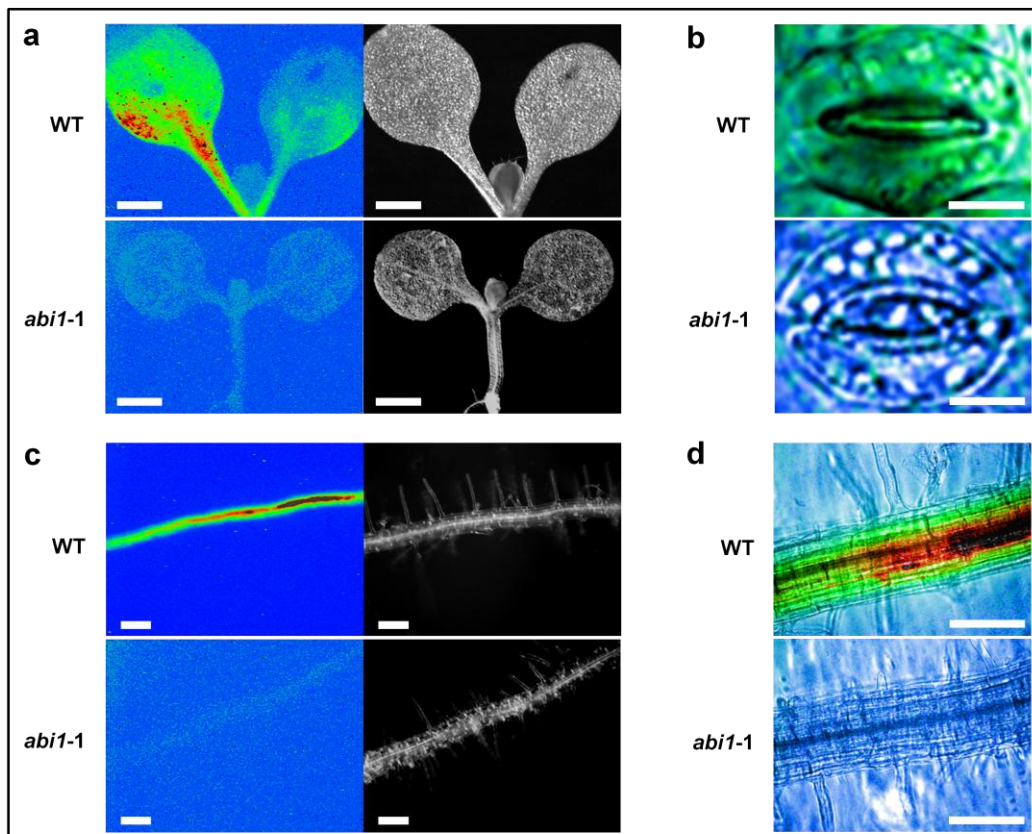


Abb. 2.1: *In vivo imaging* des ABA-Effekts auf *pAtHB6::LUC*-Pflanzen.

pAtHB6::LUC- und *abi1-1* x *pAtHB6::LUC*-Keimlinge, 5 Tage lang angezogen auf MS-Medium mit 0,5% Saccharose, wurden auf Medium mit 20 μM ABA transferiert und die LUC-Aktivität nach 24 h detektiert. Die Intensität der Lumineszenz ist in Falschfarben (blau - geringe, rot/schwarz - hohe Intensität) dargestellt. (a) Die Aufnahmen vom Spross wurden in 2,5-facher Vergrößerung am inversen Mikroskop mit der CCD-Kamera gemacht, die weißen Balken entsprechen jeweils 1 mm. (b und d) Die Spaltöffnungen und Wurzeln wurden bei einer Vergrößerung von 40x aufgenommen, die Balken entsprechen 10 μm (b) bzw. 100 μm (d). (c) Die Emission der Wildtypwurzel wurde im Vergleich zu den anderen Abbildungen vierfach reduziert, um das Muster deutlich erkennbar zu machen. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 10-fachen Vergrößerung, die Balken entsprechen 200 μm .

Nach erfolgreicher Klonierung des HB6- bzw. RD29B-Promotors zusammen mit der für das EGFP-Reportergen codierenden Sequenz in pSK-Vektoren wurden die Plasmide im Protoplastensystem getestet, um vor einer stabilen Transformation in Arabidopsis-Pflanzen die Funktionalität und die ABA-induzierte Aktivierung der Reportergene zu überprüfen. Zur Kontrolle wurden der leere pSK-Vektor sowie der konstitutiv aktive CaMV 35S-Promotor mit EGFP verwendet (Abb. 2.2 links).

Für das Konstrukt *pRD29B::EGFP* ist die ABA-abhängige Aktivierung der EGFP-Expression deutlich zu erkennen (Abb. 2.2 rechts unten), jedoch konnte für *pAtHB6::EGFP* kein ABA-abhängiges EGFP-Signal erhalten werden.

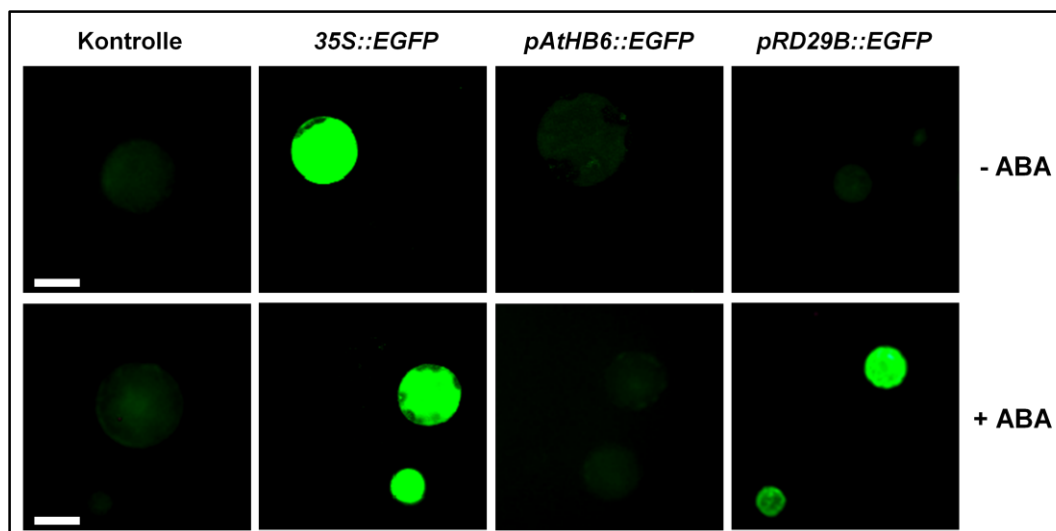


Abb. 2.2: Test der EGFP-Konstrukte im Protoplastensystem.

pSK Ascl *pAtHB6::EGFP* und pSK Ascl *pRD29B::EGFP* wurden im Protoplastensystem (Columbia) auf ABA-abhängige Reportergenaktivierung getestet. Ohne ABA (oben) zeigt weder die Leervektorkontrolle noch das HB6- bzw. RD29B-Konstrukt ein EGFP-Signal (Inkubation über Nacht; Anregung 480 nm, Emission 535 nm, Kamerabelichtung 1 Sekunde). Bei einer Inkubation der Protoplasten mit 30 μ M (S)-ABA über Nacht wird die Expression von EGFP unter der Kontrolle des RD29B-Promotors induziert (rechts unten). Die Positivkontrolle mit 35S::EGFP zeigt ABA-unabhängige konstitutive Expression. Die Balken entsprechen 15 μ m.

Die in stabilen Transformanden beobachtbare ABA-Induktion des HB6-Promotors konnte auch schon beim LUC-Konstrukt im Protoplastensystem nicht hervorgerufen werden (Hoffmann, 2002; Moes, 2006). Die Störung der HB6-Induktion im Protoplastensystem, unabhängig vom Reportergen, könnte beispielsweise auf die bei der Protoplastierung ablaufende, enzymatische Auflösung der Zellwand zurückzuführen sein. Dabei könnte es zum Verlust einer zur ABA-abhängigen Aktivierung des HB6-Promotors benötigten membranständigen Komponente kommen. Eine andere Erklärung für die Deregulation des Promotors wäre der in den zellwandlosen Protoplasten fehlende Turgordruck, welcher eventuell als Signal bei der ABA-Signaltransduktion über AtHB6 fungieren könnte.

Das *pRD29B::EGFP*-Fragment wurde vom pSK-Vektor in den binären Vektor pBI121 Ascl überführt und dieses Plasmid stabil in Arabidopsis-Pflanzen des Ökotyps Columbia über die *Floral Dip*-Methode transformiert. Beim Test der ABA-Induzierbarkeit homozygoter Linien der T₃-Generation stellte sich heraus, dass das *pRD29B::EGFP*-Konstrukt ähnlich wie das *pAtHB6::LUC*-Konstrukt in allen Geweben eine starke ABA-abhängige Reporterexpression zeigte.

2.1.2. Reporteraktivierung durch Salzstress

Nachdem die Funktionalität der Reporterkonstrukte, was die ABA-abhängige Aktivierung betrifft, abgesichert war, wurde die ABA-Antwort von *pAtHB6::LUC* auf Salzstress untersucht. Dazu wurden 5 Tage alte Keimlinge für 24 h auf 200 mM NaCl-MS-Platten transferiert, allerdings hatten nur die Wurzeln Kontakt zum Stressmedium. Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung der LUC-Expression um einen Faktor von 30 im Spross (siehe Abb. 2.3), Salzstress an den Wurzeln führt also zu einer ABA-abhängigen Genexpression im Spross.

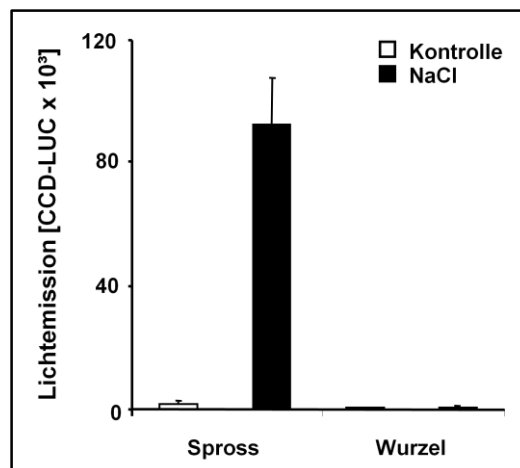


Abb. 2.3: ABA-abhängige Aktivierung des *pAtHB6::LUC*-Reporterkonstrukts, ausgelöst durch Salzstress.

Wurzeln 5 Tage alter Keimlinge wurden 24 h lang salzgestresst (200 mM NaCl), und anschließend die LUC-Emission mit einer CCD-Kamera detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 3 x 15 Keimlingen (15 Keimlinge auf drei unabhängigen Stress-MS-Platten) samt Standardabweichung.

2.1.2.1. Zeitliches Muster der Reporteraktivierung

Im nächsten Schritt sollte das zeitliche und räumliche Muster der ABA-abhängigen Reporterinduktion durch Salzstress geklärt werden. Dazu wurden Wurzeln von *pAtHB6::LUC*-Keimlingen für 0 bis 48 Stunden einem osmotischen Potential von insgesamt -1,1 MPa ausgesetzt, dieser Wert setzt sich aus -0,2 MPa vom MS-Medium mit 0,5% Saccharose und dem Zusatz von 200 mM NaCl zusammen.

Wie in Abb. 2.4 gut zu erkennen ist, erfolgt während der 48 h Stress an den Wurzeln keine gesteigerte LUC-Expression in diesen, die Sprosse salzgestresster Keimlinge weisen jedoch eine Erhöhung der Lichtemission, hervorgerufen durch Luciferase, bis zu 24 h Exposition auf, wo diese ein Maximum erreicht und danach wieder absinkt. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen der *pAtHB6::LUC*-Reporteraktivität bei Mannit-Stress (Christmann et al., 2005).

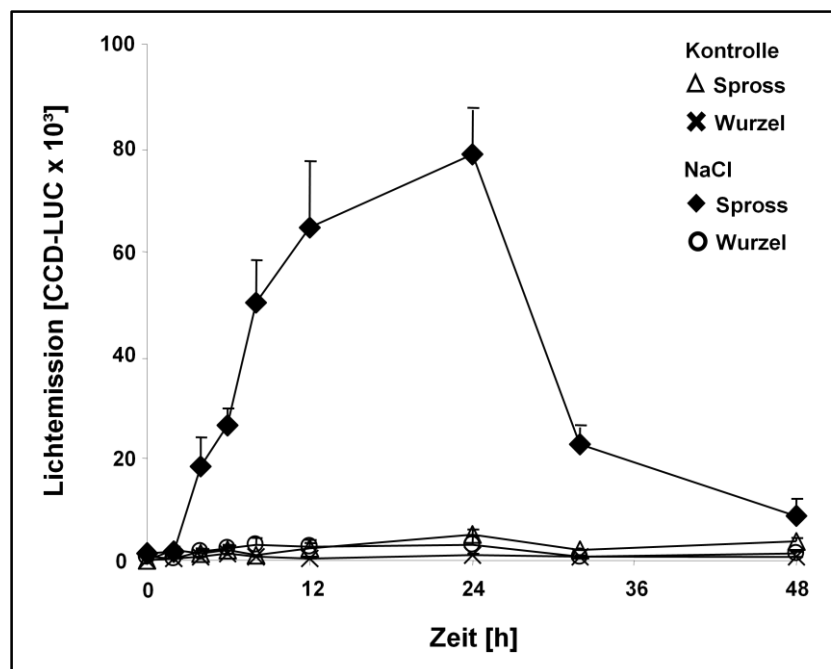


Abb. 2.4: Zeitliches Muster der ABA-Aktivität bei Salzstress.

Die Antwort auf ABA nach einer Exposition der Pflanzenwurzeln auf 200 mM NaCl von 0 bis 48 Stunden führt nach 24 h Stress zu einer maximalen LUC-Reporteraktivität im Spross 5 Tage alter Keimlinge. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 3 x 15 Keimlingen mit Standardabweichung.

Bei hohen Salzkonzentrationen im Medium verändert sich das osmotische Potential in der Pflanze sehr schnell, das Reportersystem zeigt einen rapiden Anstieg der Luciferase-Aktivität bereits nach zwei Stunden und ein Maximum nach 24 Stunden.

Die durch osmotischen Stress der Wurzeln im Spross ausgelöste ABA-Aktion, welche zum Schluss der Spaltöffnungen führt, findet relativ schnell innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden statt, während die Signaltransduktion, die zur Expression des

Reportergens führt, eher langsam abläuft. Es dauert eine gewisse Zeit, bis sich ausreichend hohe Mengen an Luciferase-Protein gebildet haben, um sie mit dem Reportersystem über eine Detektion der Lumineszenz nach Luciferin-Umsatz sichtbar machen zu können.

Die Akkumulation der exprimierten Luciferase im Spross ist somit nach 24 Stunden Salzstress maximal, danach erfolgt entweder ein Abbau dieser oder die Toxizität durch die Konzentration der Natriumionen in den Zellen ist dann so hoch, dass die gesamte Genexpression gestört wird und der Keimling langsam abstirbt, dies ist nach 3 bis 4 Tagen tatsächlich der Fall.

2.1.2.2. Räumliches Muster der Reporteraktivierung

Vergleich der LUC-Aktivität in Spross und Wurzel

Nachdem, wie in den Abbildungen 2.3 und 2.4 gezeigt, die Reporteraktivierung von *pAtHB6::LUC* bei Keimlingen mit salzgestressten Wurzeln vor allem im Spross stattfand, wurde dies ebenfalls für *pRD29B::LUC*-Keimlinge überprüft (Abb. 2.5). Hierbei zeigte sich eine geringere Lichtemission für das RD29B-Konstrukt im Vergleich zum HB6-Konstrukt, die Aktivierung im Spross erfolgt 6-fach bei *pRD29B::LUC*, dagegen 16-fach bei *pAtHB6::LUC*, wenn die Wurzeln für 24 h einem osmotischen Potential von -0,68 MPa ausgesetzt werden, was einer NaCl-Konzentration von 150 mM im Medium entspricht. Bei beiden Reportertypen erfolgte nur eine geringe Aktivierung um einen Faktor von 2 bzw. 3 in der Wurzel. Salzstress führt also zu einer ABA-abhängigen Genexpression im Spross, kaum jedoch in der dem Stressmedium ausgesetzten Wurzel, was mit Beobachtungen bei Mannit-Stress auf Wurzeln einhergeht (Christmann et al., 2005), es konnte gezeigt werden, dass die ABA-Biosynthese im Spross durch ein in den Wurzeln generiertes hydraulisches Signal induziert wird (Christmann et al., 2007).

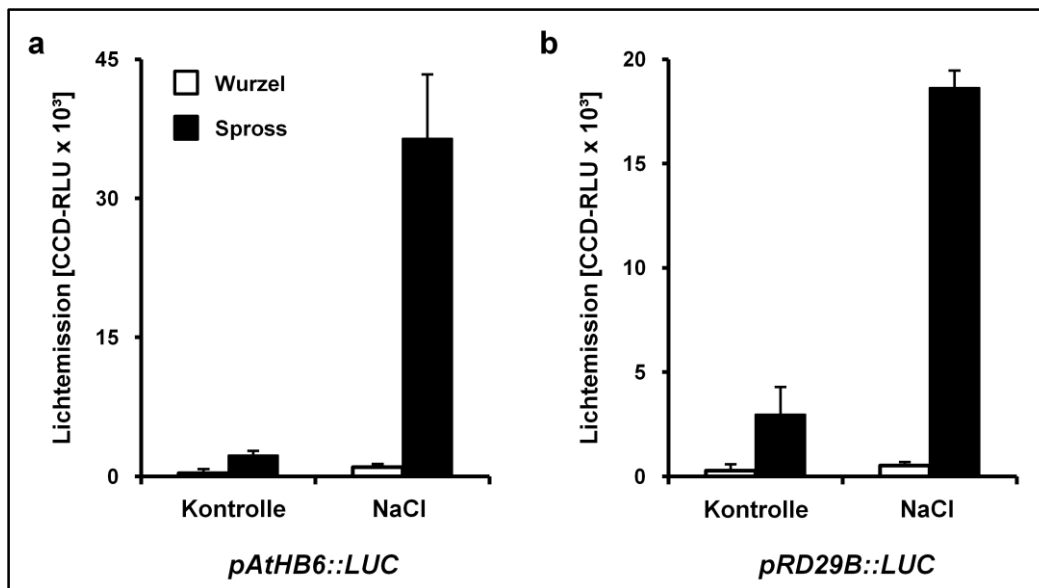


Abb. 2.5: Vergleich der Reporteraktivierung von *pAtHB6::LUC* und *pRD29B::LUC* in Spross und Wurzel.

Wurzeln 5 Tage alter transgener Keimlinge wurden 24 h lang salzgestresst (150 mM NaCl), und anschließend die LUC-Emission mit einer CCD-Kamera detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 3 x 15 Keimlingen mit Standardabweichung.

Mikroskopische Aufnahmen der LUC-Aktivität im gestressten Keimling

Die Unterschiede in Spross und Wurzel wurden nun genauer auf zellulärer Ebene untersucht, um eine gewebespezifische Aktivierung, wie es bei Mannit-Stress der Fall ist, beobachten zu können. Dazu wurden gestresste Keimlinge mit Hilfe eines inversen Mikroskops untersucht und bei einer maximalen Vergrößerung von 40x die Lichtemission gemessen. Die räumliche Verteilung der ABA-induzierten Genexpression passt genau zu dem Muster, welches für osmotischen Stress bei Christmann et al. (2005) vorgestellt wurde.

Betrachtet man den Spross (Abb. 2.6), so zeigen sich nach 4 h NaCl-Stress auf die Wurzel im Hypokotyl erste erhöhte Lichtemissionswerte (hellgrün), nach 8 h sieht man bereits erste Punkte erhöhter Lichtintensität in den Keimblättern vor allem in der Nähe des Hauptleitgewebes. Die Lichtpunkte zeigen eine erhöhte ABA-Konzentration in den beiden Zellen der Spaltöffnungen an (Vergleich Vergrößerung der geschlossenen Spaltöffnung bei 8 h). Noch deutlicher zu sehen ist dieses Muster nach 24 h (unten), hier zeigen rote und schwarze Punkte hoher Intensität die Region der Schließzellen an. Im linken Blatt ist ebenfalls die erhöhte Aktivierung des Reportersystems im vaskulären System gut zu erkennen, im rechten die erhöhte Reporteraktivität nahe der Hydathode. In der Wurzel dagegen sind im Vergleich zur Kontrolle kaum erhöhte Aktivitäten auszumachen, nur ganz schwach tritt nach 8 h ein leichter Intensitätsanstieg im Leitgewebe auf.

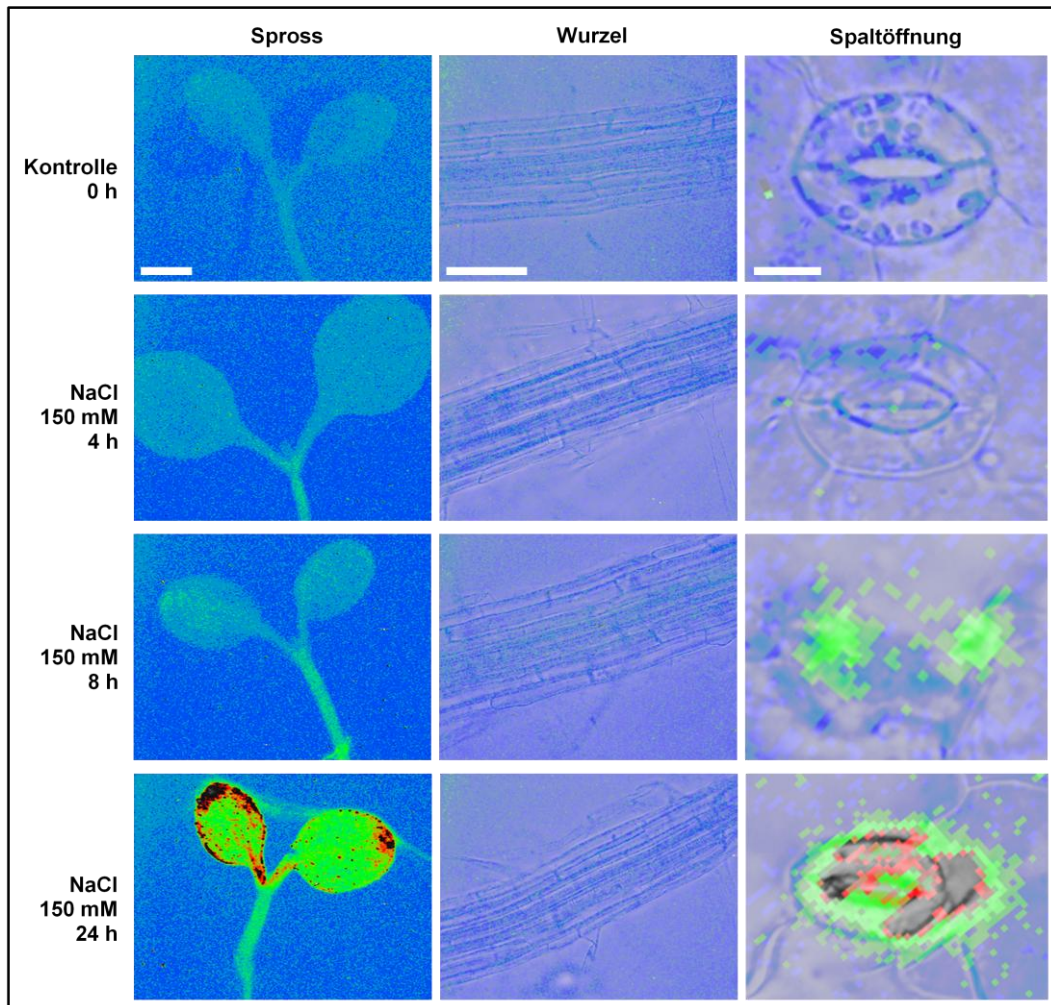


Abb. 2.6: Räumliche Verteilung der Salzstress-induzierten *pAtHB6::LUC*-Aktivität.
 5 Tage alte *pAtHB6::LUC*-Keimlinge wurden über ihre Wurzeln für 0, 4, 8 und 24 h einer Salzkonzentration von 150 mM ausgesetzt. Die Aufnahmen erfolgten bei Vergrößerungen von 2,5x (Spross) bzw. 40x (Wurzel und Schließzellen). Steigende Lichtintensität ist in Falschfarben dargestellt (blau über grün bis rot/schwarz), die weißen Balken entsprechen 200 µm (Spross), 100 µm (Wurzel) und 10 µm (Schließzellen).

Mikroskopische Aufnahmen der EGFP-Aktivität im gestressten Keimling

Bei der Salzstress-induzierten Aktivierung des AtHB6-Promotors konnte kaum Reporteraktivität in den Wurzeln festgestellt werden, im Vergleich dazu war es bei den *pRD29B::EGFP*-Konstrukten möglich, nach 24 h Salzstress eine leichte Aktivierung des Systems rund um das Wurzeleitgewebe zu beobachten, noch mehr bei Mannit-Stress (Abb. 2.7 links). Ansonsten konnte wie beim LUC-Reportersystem eine erhöhte EGFP-Expression im Cytosol der Sprosszellen vor allem rund um das Leitgewebe im Hypokotyl, im Blatt und den Zellen der Spaltöffnungen (Abb. 2.7 rechts) gezeigt werden.

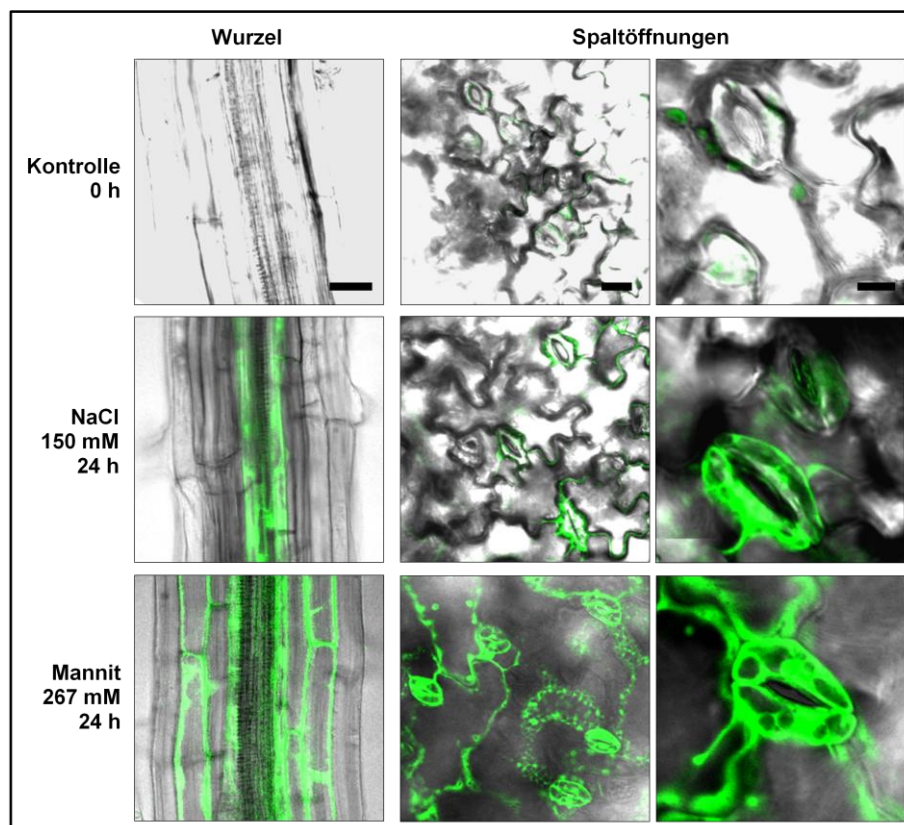


Abb. 2.7: Räumliche Verteilung der Salzstress-induzierten *pRD29B::EGFP*-Aktivität.

5 Tage alte *pRD29B::LUC*-Keimlinge wurden über ihre Wurzeln für 0 h (Kontrolle) und 24 h einer Salzkonzentration von 150 mM ausgesetzt (Mitte), zum Vergleich von Salz- und Mannit-Stress wurden Keimlinge mit ihren Wurzeln auf Mannit-MS mit gleichem osmotischen Potential (-0,68 MPa, 267 mM Mannit) transferiert. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 40-fachen Vergrößerung am konfokalen Mikroskop (Laser- λ 488 nm Anregung, rechts zweifache elektronische Vergrößerung). Die Balken entsprechen jeweils 20 μ m für Wurzel- und Blattepidermisaufnahmen, sowie 10 μ m für die vergrößerten Spaltöffnungen.

Im Vergleich zu Mannit-Stress desselben osmotischen Potentials fiel die EGFP-Intensität bei Salz deutlich schwächer aus, was bei der *pAtHB6::LUC*-Aktivierung ebenfalls beobachtet wurde (Vergleich mit Christmann et al. (2005)).

2.1.3. Vergleich der Auswirkungen von NaCl- und Mannit-induziertem osmotischen Stress auf die ABA-Antwort

Als nächstes wurde daraufhin die Induktion der ABA-Antwort bei verschiedenen auf die Wurzeln wirkenden Konzentrationen von NaCl mit der von osmotisch äquivalenten Mannit-Konzentrationen verglichen. Es zeigte sich unabhängig von der Konzentration des Osmotikums und der Art des ABA-induzierbaren Promotors ab -0,6 MPa eine 1,6- bis 2-fach höhere Induktion der Genexpression durch Mannit im Vergleich zu NaCl, was eine weniger effektiv induzierte ABA-Antwort durch Salz bedeutet. Auch hier kann man bei beiden osmotisch wirksamen Substanzen wieder gut die auf den Spross beschränkte ABA-Antwort erkennen. Die Reporterexpression findet beim HB6-Promotor sowohl für NaCl als auch für Mannit ein Maximum bei -1,2 MPa (Abb. 2.8 a; entspricht 220 mM NaCl bzw. 390 mM Mannit), während sie beim RD29B-Promotor kontinuierlich weiter ansteigt (Abb. 2.8 b).

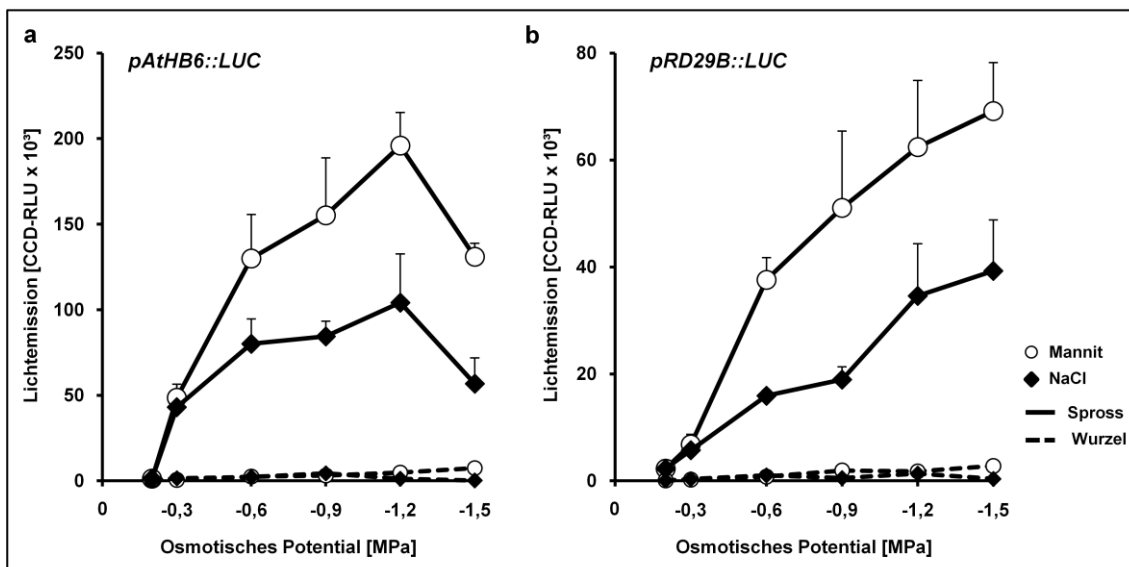


Abb. 2.8: Vergleich der ABA-abhängigen Aktivierung der Genexpression bei NaCl und Mannit.

Die LUC-Reporterexpression unter der Kontrolle des HB6-Promotors (a) bzw. des RD29B-Promotors (b) wurde bei verschiedenen osmotischen Potentialen des Wurzelmediums von -0,2 bis -1,5 MPa, hervorgerufen durch NaCl bzw. Mannit, nach 24 h gemessen und verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 3 x 15 Keimlingen mit Standardabweichung.

Der Unterschied in der ABA-Antwort auf Salz bzw. Mannit könnte auf die generelle toxische Wirkung von NaCl auf die Pflanze zurückzuführen sein, eine Möglichkeit wäre, dass bei NaCl-Stress die ABA-Signaltransduktion negativ beeinflusst wird, ebenso könnte die ABA-Biosynthese blockiert bzw. nicht im selben Maß wie bei Mannit-Stress induziert sein.

2.1.4. Einfluss von NaCl auf Genexpression und Signaltransduktionswege

Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion

Die ABA-abhängige Reporterantwort wird bei NaCl-Stress weniger stark induziert als bei Mannit-Stress gleichen osmotischen Potentials, während Mannit als ungiftig für die Pflanzen gilt und einzig osmotischen Stress auslöst, ist bekannt, dass NaCl zusätzlich zu ionischem Stress, zu ROS-Bildung und Beeinträchtigung von Proteinstruktur und Proteinfunktion in Pflanzen führt. Es wurde daher untersucht, wie sich ein ansteigender NaCl-Anteil in Mannit-Medien bei gleichbleibendem osmotischen Potential von -1,2 MPa über eine längere Expositionsdauer von 6 Tagen auf Wachstum und Zustand von Arabidopsis-Keimlingen auswirkt (Abb. 2.9 a). Bei osmotischem Stress durch 427 mM Mannit (entspricht -1,2 MPa) wird das Wachstum im Vergleich zu nichtgestressten Keimlingen deutlich auf ca. 30% eingeschränkt, jedoch bleiben die Keimlinge grün. Gibt man zu 160 mM Mannit 150 mM NaCl (entspricht insgesamt wieder -1,2 MPa) ist das Wachstum der Keimlinge stärker beeinträchtigt, die Keimblätter bleichen teilweise aus. Werden die Keimlinge einem Medium ausgesetzt, welches kein Mannit, sondern nur NaCl enthält (238 mM, -1,2 MPa), bleichen alle aus. NaCl-Stress wirkt sich auf den Chlorophyllgehalt der Keimlinge aus, bei erhöhter Toleranz gegenüber NaCl gehen der durch den osmotischen Stress und durch Natrium- bzw. Chloridionen ausgelöste Chlorophyllabbau und die damit verbundene Inaktivierung des photosynthetischen Elektronentransports weniger schnell voran (Parida & Das, 2005; Zhang & Xing, 2008). Beim Vergleich der Chlorophyllgehalte gestresster Keimlinge zeigte sich bei einem osmotischen Stress von -0,9 MPa, dass 150 mM NaCl zu einem Rückgang des Chlorophylls auf 61% im Vergleich zum Gehalt der MS-Kontrolle führt, 267 mM Mannit jedoch nicht (Abb. 2.9 b). Durch Zugabe von 160 mM Mannit zu 150 mM NaCl wird ein osmotisches Potential des Stressmediums von -1,2 MPa generiert, was aber nur wenig zusätzlichen negativen Einfluss von 8% auf den Chlorophyll-Rückgang hat. Wird der Mannit-Anteil durch weitere 88 mM NaCl ersetzt, so bleibt nach 6 Tagen Stress nur ein Rest-Chlorophyllgehalt von 4,5% in den gestressten Keimlingen. Ebenso konnte bei Stressversuchen mit gleichbleibendem osmotischen Potential und einem steigendem Anteil von NaCl im Mannit-Stressmedium eine sinkende ABA-abhängige Reporteraktivität von *pAtHB6::LUC*- und *pRD29B::LUC*-Keimlingen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass die ABA-Signaltransduktion durch steigende NaCl-Konzentrationen inhibiert wird und dadurch die Anpassung an den Stress weniger intensiv stattfinden kann, was wiederum den hohen Verlust an Chlorophyll und das stärker eingeschränkte Wachstum erklären würde.

Die Funktionalität der ABA-Signaltransduktion bei NaCl-Stress der Wurzeln wurde im Folgenden dadurch getestet, dass Abscisinsäure bereits 24 h lang vorgestressten Keimlingen (-0,9 MPa) exogen für 8 h über das Wurzelmedium (-0,2 MPa) zugeführt und später die ABA-abhängige Reporterantwort der *pAtHB6::LUC*-Pflanzen untersucht wurde.

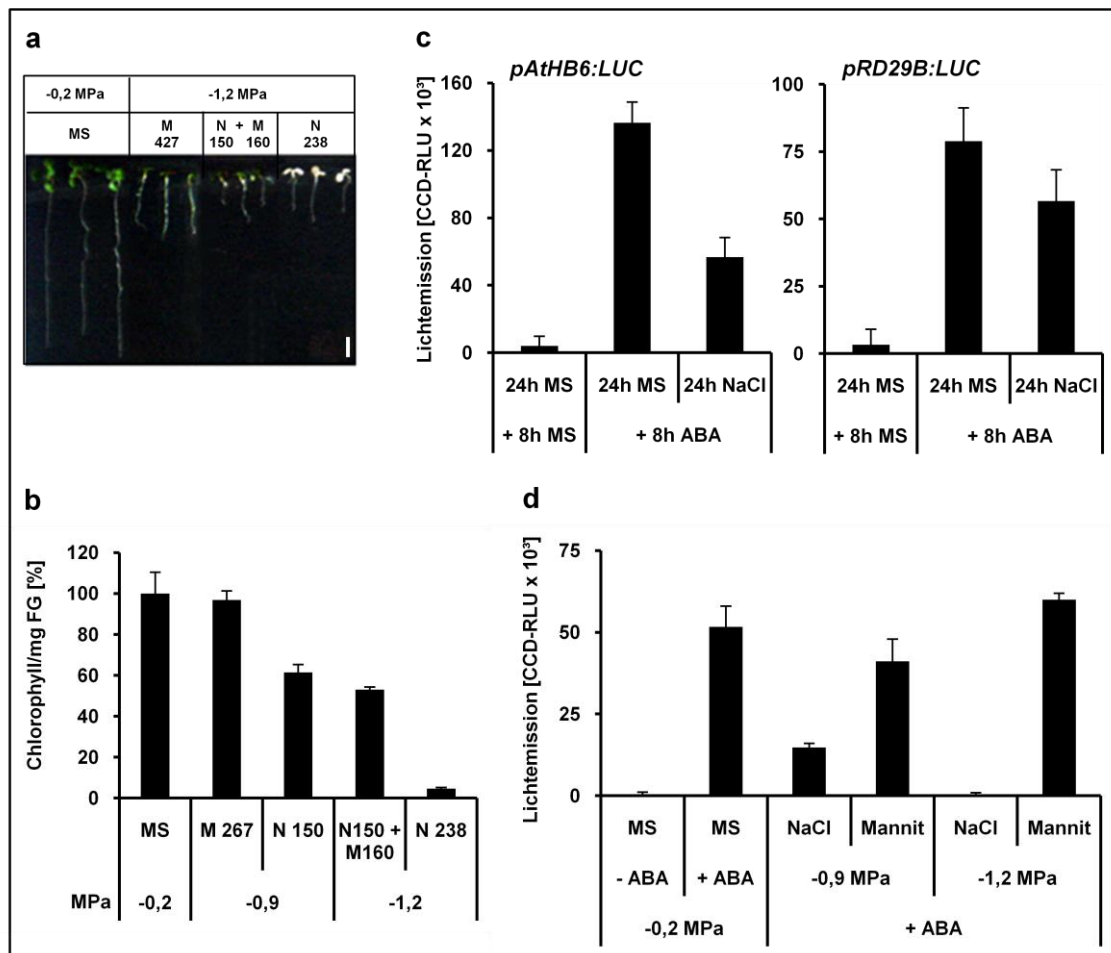


Abb. 2.9: Einfluss von NaCl auf die ABA-Signaltransduktion.

(a) Abgebildet sind Col-Keimlinge, die im Alter von 5 Tagen umgesetzt wurden und 6 Tage lang auf Mannit- oder NaCl-Medium bzw. beides kombiniert inkubiert wurden, der Balken entspricht 1 cm. Teilabbildung (b) zeigt die Chlorophyllgehalte so behandelter Keimlinge, bezogen auf die MS-Kontrolle (n=16 x 2, mit Standardabweichung). Der Einfluss von 24 h NaCl-Vorstress (150 mM) auf die Reporteraktivierung in den Wurzeln von *pAtHB6::LUC*- und *pRD29B::LUC*-Reporterlinien nach 8 h Inkubation mit 30 μ M exogener ABA ist in (c) dargestellt (3 x 15 Keimlinge, mit Standardabweichung). (d) Vergleich von NaCl-Stress mit Mannit-Stress gleichen osmotischen Potentials: Reporteraktivierung in *pAtHB6::LUC*-Wurzeln nach 24 h Vorstress und 8 h ABA-Behandlung (Mittelwerte aus je 3 x 15 Messungen mit Standardabweichung).

Dabei konnte zum einen festgestellt werden, dass die LUC-Reporteraktivität in den Wurzeln auf MS-Kontrollmedium durch ABA 33-fach induziert wurde, während bisher in den Wurzeln keine gesteigerte Reporteragenaktivierung durch NaCl-Stress beobachtet wurde, was noch einmal bestätigt, dass die in Abwesenheit exogener ABA ausbleibende Reporterantwort in den Wurzeln bei Mannit- und NaCl-Stress nicht auf eine Funktionsstörung des Reporters zurückgehen kann.

Unter solchen Stressbedingungen werden also keine aktiven ABA-Pools in den betroffenen Wurzeln gebildet. Bei NaCl-Vorstress der Keimlingswurzeln wird die HB6-Promotoraktivierung im Vergleich zur ungestressten Kontrolle um 58% inhibiert (Abb. 2.9 c). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen HB6-spezifischen Effekt handelt, wurde dieser Versuch auch mit *pRD29B::LUC*-Keimlingen durchgeführt, wo es ebenfalls zu einer Inhibition der Promotoraktivierung, allerdings nur um 28% kam (Abb. 2.9 c).

Ob dieser Effekt der ABA-Signaltransduktionsstörung allein auf den osmotischen Stress zurückzuführen oder abhängig von der Stressart (NaCl oder Mannit) ist, wurde bei einem Vergleich der beiden Substanzen untersucht (Abb. 2.9 d). Es zeigte sich, dass bei Mannit-Stress die ABA-abhängige Reporterogenaktivierung in *pAtHB6::LUC*-Pflanzen nicht bzw. nur geringfügig (bis zu 20%) inhibiert wird, während bei gleichem osmotischen Potential von -0,9 MPa eines NaCl-Stressmediums nur 28% der Reporteraktivierung stattfand. Bei höheren Konzentrationen von NaCl sinkt die Reporteraktivierung durch exogene Abscisinsäure sogar auf 1% ab. Die Beeinträchtigung der ABA-Signaltransduktion wird durch die Anwesenheit von NaCl ausgelöst. Dies konnte hier unabhängig von der durch den osmotischen Stress durch NaCl eventuell weniger stark induzierten ABA-Biosynthese gezeigt werden. Ob NaCl spezifisch die ABA-Signaltransduktion inhibiert oder generell zu einer Blockade stressabhängiger Vorgänge führt, wurde weiter untersucht.

Einfluss auf die ABA-unabhängige Signaltransduktion

Der Einfluss von NaCl auf die osmotische Signaltransduktion der Pflanzen wurde in *IDA::LUC*-Pflanzen untersucht. Zur Generierung dieser Pflanzen wurden Columbia-Transgene mit dem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des RD29A-Promotors mit *abi1-1* und *aba2-1* gekreuzt. Der RD29A-Promotor enthält in seiner Sequenz vier DRE-Elemente (A/G CCGAC) sowie ein ABRE. Dieses *ABA-Response Element* trägt aber kaum zur Reporterogenaktivierung bei, denn die Pflanzen sind sowohl ABA-defizient (*aba2-1*) und können ihre ABA-Bildung infolge osmotischen Stresses nicht steigern, als auch ABA-insensitiv (*abi1-1*), so dass die durch in geringsten Konzentrationen vorhandene Abscisinsäure ausgelöste ABA-Signaltransduktion nicht stattfinden kann. Die Verwendung dieser speziellen Reporterpflanzen ermöglicht somit eine Untersuchung der osmotischen Signaltransduktion über DREB-Transkriptionsfaktoren ohne Beteiligung ABA-abhängiger Prozesse.

IDA::LUC-Pflanzen zeigen im Gegensatz zu ABA-abhängigen Reporterpflanzen auch in den Wurzeln ein starkes Signal, hier werden zwar weder bei Mannit- noch bei Salzstress ABA-Pools gebildet, jedoch der ABA-unabhängige DRE-Signalweg schon in

Gang gesetzt. Allgemein weisen *IDA::LUC*-Linien eine bis zu 8-fach höhere Induzierbarkeit im Vergleich zu *pRD29B*- und *pAtHB6*-Reporterlinien auf. Die *pRD29A::LUC*-Reporteraktivierung soll bei 300 mM Salzstress ein Maximum nach bis zu 5 h aufweisen (Ishitani et al., 1997), so wurde die LUC-Aktivität nach 6 h im Vergleich zu der nach 24 h Stress bestimmt. 6 h führten zu einer 25-fachen Induktion durch NaCl, während nach 24 h nur noch eine 5-fache Induktion vorlag, was wiederum mit der Tatsache des sehr früh wirkenden osmotischen Signals einhergeht. Für weitere Versuche wurde eine Stressexposition der Keimlingswurzeln von 6 h gewählt. Es zeigte sich, dass bei geringen Konzentrationen an Mannit bzw. NaCl, welche ein osmotisches Potential des Mediums von -0,7 MPa generieren, die 2- bis 3-fache Reporterinduktion sowohl im Spross als auch in den Wurzeln vergleichbar ist (Abb. 2.10 a und b), bei höheren Konzentrationen führt Mannit zu einer 22-fachen bzw. 10-fachen Induktion in Sprossen bzw. Wurzeln, NaCl bei gleichem osmotischen Potential dagegen nur zu 7- bzw. 3-facher Induktion in Spross bzw. Wurzel.

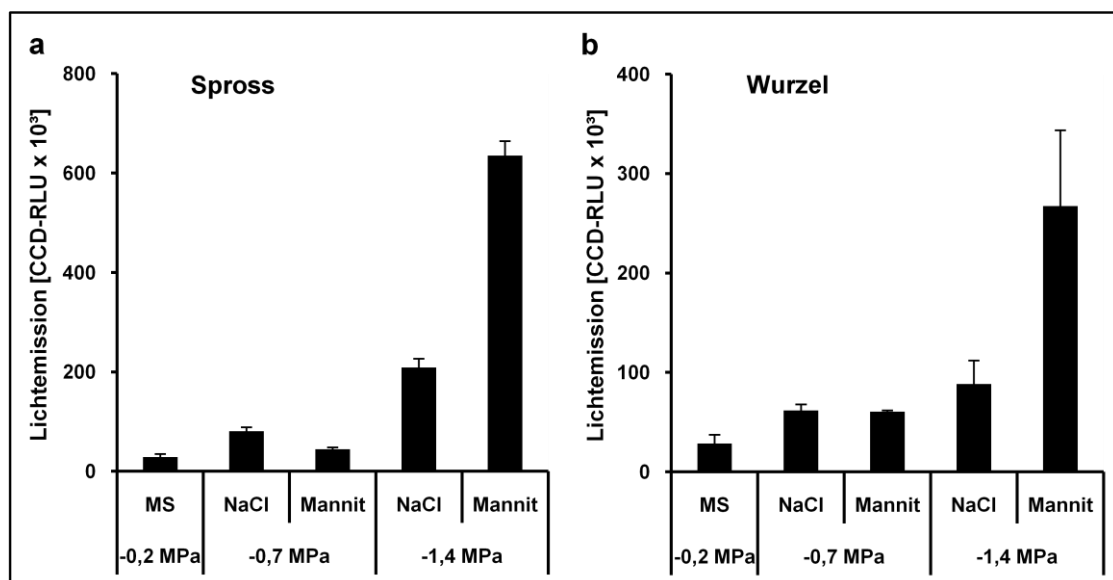


Abb. 2.10: Einfluss von NaCl auf die ABA-unabhängige Reporterexpression von *IDA::LUC*.

Die LUC-Aktivität von *abi1-1 x aba2-1 x pRD29A::LUC*-Reporterlinien (je 3 x 15 Keimlinge, mit Standardabweichung) nach 6 h NaCl- bzw. Mannit-Stress ist dargestellt. (a) Sprosse, (b) Wurzeln.

Die Aktivierung des RD29A-Promotors wird durch NaCl im Vergleich zu Mannit nur zu einem Drittel angeschaltet, bei hohen Konzentrationen wird der osmotische Signalweg nicht blockiert, wie es beim ABA-Signalweg der Fall ist. Das könnte für eine bessere und schnellere osmotische Anpassung der Pflanzenzellen bei NaCl-Stress sprechen.

Einfluss auf die allgemeine Genexpression

Neben dem Einfluss von NaCl auf die ABA-unabhängige osmotische Signaltransduktion wurde der Effekt von NaCl auf einen anderen Phytohormon-Signalweg, den von Auxin, getestet, sowie die generelle Genexpression unter NaCl-Stress mit Hilfe eines konstitutiv aktiven 35S-Reporterkonstruktes untersucht, um toxische Effekte genauer einschätzen zu können. Zur Untersuchung des NaCl-Einflusses auf die Auxin-Signaltransduktion wurden *DR5::GUS*-Reporterlinien verwendet. Bei DR5 handelt es sich um ein hoch aktives synthetisches *Auxin Response Element* AuxRE mit der Erkennungssequenz TGTCTC, an das z.B. der Auxin-Transkriptionsfaktor ARF1 binden kann (Ulmasov et al., 1997). DR5 entstand durch ortsgerichtete Mutagenese des 5'-Endes eines natürlichen AuxRE des Sojabohnen GH3-Promotors, D1-4 (Liu et al., 1994), und vermittelt eine Auxin-abhängige Expressionsaktivierung von Reporter genen, in diesem Fall der β -Glucuronidase (GUS). Wie bereits oben beschrieben, wurden auch hier die Keimlingswurzeln erst NaCl-vorgestresst (150 mM), um anschließend auf 50 μ M Indol-3-essigsäure (IAA) enthaltendes MS-Medium gesetzt zu werden. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (MS-Medium ohne NaCl) nur eine wenig eingeschränkte (8% weniger) Reporter genaktivierung durch die Auxinverbindung im Spross (Abb. 2.11 a). Im Vergleich mit Mannit konnte kein Unterschied in der Reporter genaktivierung durch 3 μ M 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), ein synthetisches Auxin, bei -0,7 MPa festgestellt werden. Erst bei einem relativ hohen osmotischen Potential von -1,4 MPa und damit hohen Konzentrationen an NaCl (270 mM) bzw. Mannit (430 mM) wird die Auxin-Signaltransduktion sowohl von Mannit als auch von NaCl mit einer Reporter genaktivierung von nur mehr 35% bzw. 12% deutlich blockiert (Abb. 2.11 b). Wenn hohe Konzentrationen an NaCl vorliegen, schränkt dies die Auxin-Signaltransduktion mehr ein als es Mannit bei einem vergleichbaren osmotischen Potential tut, bei Konzentrationen von 150 bis 200 mM NaCl dagegen wird die Auxin-Signaltransduktion nicht beeinflusst, im Gegensatz zur ABA-Signaltransduktion.

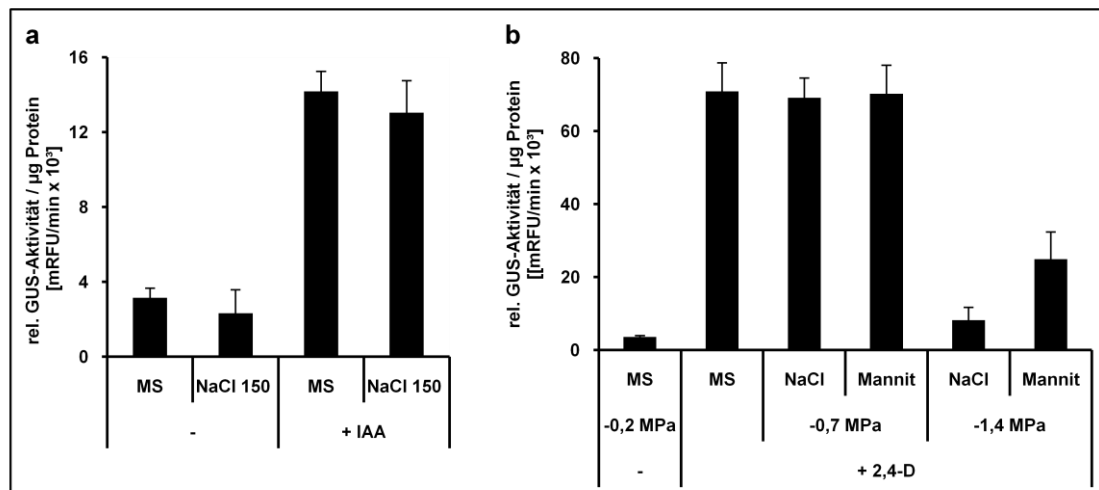


Abb. 2.11: Einfluss von NaCl auf die Auxin-Signaltransduktion.

Abgebildet ist jeweils die GUS-Reporteraktivität von *DR5::GUS*-Keimlingen (je 3 x 15 Keimlinge, mit Standardabweichung), induziert durch Auxinverbindungen nach NaCl- bzw. Mannit-Vorstress. (a) Die GUS-Aktivität von Sprossen, deren zugehörige Wurzeln 16 h lang mit 150 mM NaCl vorgestresst und dann für 8 h auf Medium, welches 50 µM Indol-3-essigsäure enthielt, transferiert wurden, ist hier dargestellt. (b) zeigt das Ergebnis bei ganzen Keimlingen, die entweder NaCl- oder Mannit-vorgestresst wurden (16 h), um dann auf Medium mit 3 µM 2,4-D umgesetzt zu werden (8 h).

Zur Untersuchung toxischer NaCl-Effekte auf die generelle Genexpression gestresster Pflanzen wurde das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CaMV 35S-Promotors verwendet. Im Vorfeld des Versuches wurden die Keimlinge mit Luciferin-Substratlösung besprüht, um die akkumulierte Luciferase durch eine 1:1-Komplexbildung mit Luciferin abreagieren zu lassen. Bei dieser Reaktion ist keine Wiederfreisetzung von Luciferase möglich, so dass die im Versuch gemessenen Werte nur die neugebildete Luciferase erfassen, es können so auch geringe stressabhängige Unterschiede erfasst werden.

Nach 16 h Vorstress von Mannit oder NaCl wurden die Keimlinge auf Medium umgesetzt, welches 30 µM ABA enthielt. Bei einem osmotischen Stress von -0,7 MPa auf die Wurzeln wirkt NaCl wenig inhibierend im Spross (Abb. 2.12), bei sehr hohen Konzentrationen von 270 mM NaCl beträgt die Inhibierung der Luciferase-Expression bis zu 75%, bei Mannit nur 10%. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den Wurzeln (nicht abgebildet). NaCl-spezifische toxische Effekte im Spross scheinen dort die Genexpression zu stören, oder es werden in der Wurzel Signale generiert bzw. Botenstoffe gebildet, die zu einer verringerten Genexpression im Spross führen.

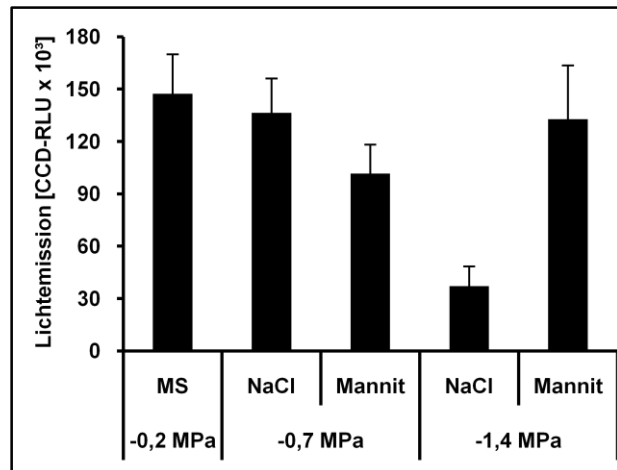


Abb. 2.12: Einfluss von NaCl auf die Genexpression.

Abgebildet ist die LUC-Reporteraktivität von *35S::LUC*-Sprossen (je 3 x 15 Keimlinge, mit Standardabweichung) nach Behandlung 5 Tage alter Keimlinge mit 16 h Vorstress (NaCl oder Mannit) und nachfolgenden 8 h 30 μ m ABA.

Die allgemeine Genexpression wird somit bei den im Rahmen dieser Arbeit zumeist verwendeten Konzentrationen von 100 bis 200 mM NaCl für 24 h nicht eingeschränkt, was zu Daten aus der Literatur passt, die besagen, dass erst ab einer Konzentration von 200 mM NaCl eine letale Wirkung auf Keimlinge eintritt, bis zu 200 mM NaCl werden ca. 20 Tage lang von *Arabidopsis* toleriert (Inan et al., 2004). Der osmotische Signalweg wird durch NaCl weniger stark angeschaltet als durch Mannit. NaCl induziert ABA-abhängige Reporterantworten weniger stark, die ABA-Signaltransduktion ist bei NaCl-Stress gestört. Ob zusätzlich ein Effekt von NaCl auf die ABA-Biosynthese vorliegt, sollte im nächsten Schritt geklärt werden.

2.1.5. ABA-Akkumulation während Salzstress

Die beobachteten Unterschiede in der ABA-abhängigen Antwort auf NaCl-Stress im Vergleich zu Mannit-Stress könnten neben der bereits gezeigten gestörten ABA-Signaltransduktion auf einer geringeren ABA-Biosynthese bei Salzstress beruhen, daher wurden die ABA-Gehalte in salzgestressten *pAtHB6::LUC*-Wurzeln und den dazugehörigen Sprossen, die keinen Kontakt zum Medium hatten, über Massenspektrometrie quantifiziert und mit für Mannit-Stress ermittelten Werten verglichen (Abb. 2.13). Es stellte sich heraus, dass wie bereits bei der Reporterexpression beobachtet in den Wurzeln ein eher geringer ABA-Gehalt von ca. 2 pmol pro 100 Keimlingen (unabhängig von NaCl- oder Mannit-Stress) vorliegt. Bei steigenden Konzentrationen der osmotisch wirksamen Substanzen erhöht sich der Gehalt nicht. In den Sprossen führte -1,5 MPa NaCl-Stress auf die Wurzeln zu einer 8-fachen Induktion der ABA-Bildung im Vergleich zu Sprossen nichtgestresster

Keimlinge. Bei Mannit dagegen kam es bei gleichem osmotischen Potential zu einer 43-fachen Steigerung des ABA-Gehaltes. In den Sprossen ist der ABA-Gehalt nach 24 h Salzstress im Vergleich zu Mannit deutlich reduziert, ab einem osmotischen Potential von -0,6 MPa bis hin zu -1,5 MPa beträgt der durch Mannit hervorgerufene Anstieg des ABA-Gehaltes das 2,7- bis 6,8-fache der durch NaCl hervorgerufenen ABA-Bildung.

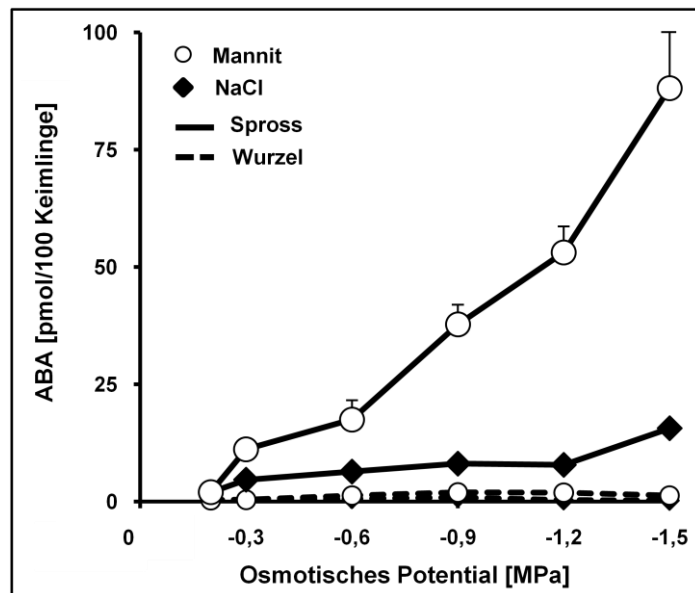


Abb. 2.13: Anstieg der ABA-Gehalte als Antwort auf NaCl- und Mannit-Stress.

Abscisinsäure wurde aus *pAtHB6::LUC*-Keimlingen, deren Wurzeln zuvor 24 h lang Stressmedien verschiedenen osmotischen Potentials ausgesetzt waren, extrahiert und über HPLC-MS/MS quantitativ bestimmt. Die ABA-Konzentration ist hier in pmol pro 100 Wurzeln bzw. Sprossen mit Standardabweichung angegeben.

Die Unterschiede in den ABA-Gehalten bei Mannit- und Salzstress (bis zu 7-fach) im Vergleich zu der ABA-induzierten Reporterexpression (zweifach) fallen deutlicher aus, die weniger genaue Detektion der LUC-Expression, die von der äußerlichen Zugabe einer Substratlösung abhängt, mag dafür mit ein Grund sein. Durch die MS-Analyse der ABA-Gehalte in gestressten Pflanzen kann der Unterschied in der Reporterexpression bei NaCl bzw. Mannit erklärt werden: Die ABA-Freisetzung bzw. Biosynthese wird unter NaCl-Stress weniger stark induziert bzw. durch ionentoxische Effekte auf die dabei beteiligten Enzyme blockiert, insgesamt wird bei NaCl-Stress die ABA-Bildung weniger intensiv stimuliert als vom osmotischen Potential des Mediums zu erwarten gewesen wäre. Zusätzlich ist die ABA-Signaltransduktion bei NaCl-Stress relativ stark eingeschränkt.

Zur Untersuchung einer eventuell schnelleren osmotischen Adaption der Pflanze bei Salzstress im Vergleich zum Mannit-Stress können die Dynamik der Stomataantwort sowie Änderungen des Turgordrucks untersucht werden, eventuell erholt sich der Wasserstatus der Pflanzen bei NaCl-Stress im Gegensatz zu Mannit leichter durch Kompartimentierung osmotisch wirksamer Natriumionen in der Vakuole.

2.1.6. Einfluss von ABA auf die Salztoleranz

Durch osmotischen Stress an den Wurzeln wird ein hydraulisches Signal generiert, das im Spross zu ABA-Freisetzung bzw. ABA-Biosynthese und anschließend unter anderem zum Schließen der Spaltöffnungen führt (Christmann et al., 2007). Bei NaCl-Stress wurde im Gegensatz zu Mannit-Stress eine deutlich reduzierte ABA-Biosynthese und eine eingeschränkte ABA-Signaltransduktion beobachtet. Der Einfluss von Abscisinsäure auf die Salztoleranz von Arabidopsis-Keimlingen kann durch den Einsatz von ABA-defizienten und ABA-insensitiven Mutanten aufgeklärt werden. Das Verhalten verschiedener Arabidopsis-Mutanten bei Salzstress im Vergleich zum Wildtyp kann zum Verständnis beitragen. Ein Unterschied dahingehend, dass Pflanzen mit nicht funktionierender ABA-Antwort schlechter mit Salz umgehen können, würde bedeuten, dass ABA einen gewissen Anteil an der Vermittlung von Salztoleranz hat.

Die LUC-Reporteraktivierung in Sprossen von *pAtHB6::LUC*-, *abi1-1 x pAtHB6::LUC* und *aba2-1 x pAtHB6::LUC*-Reporterlinien als Antwort auf NaCl- bzw. Mannit-Stress wurde überprüft. Wie angenommen fällt diese bei den Mutanten deutlich geringer aus (Abb. 2.14). Es ist aber zu erkennen, dass bei beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp die Aktivierung um den gleichen prozentualen Anteil sinkt (*abi1* 7-8%, *aba2* 3-4%). Das Verhältnis $\text{Induktion}_{\text{NaCl}}$ zu $\text{Induktion}_{\text{Mannit}}$ bleibt gleich.

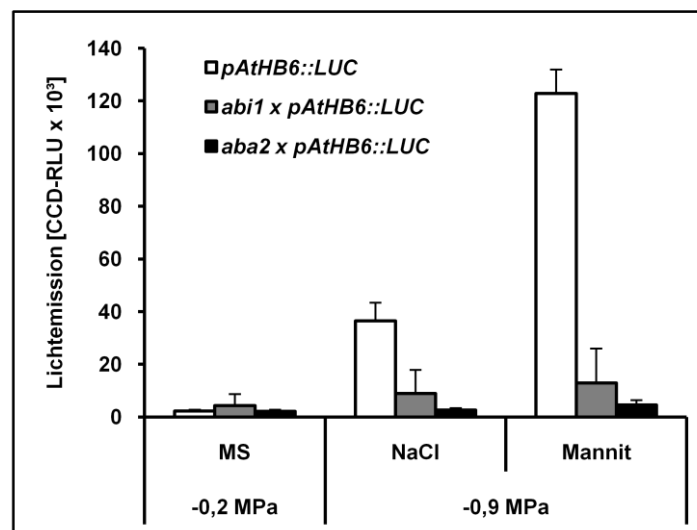


Abb. 2.14: Vergleich der Reporterexpression von Wildtyp und ABA-Mutanten.

Dargestellt ist die LUC-Aktivität von Wildtyp-, *abi1-1*- und *aba2-1*-Sprossen nach 24 h NaCl- bzw. Mannit-Stress der Wurzeln (3 x 15 Keimlinge, mit Standardabweichung).

Im Hinblick auf die deutlich reduzierte ABA-Akkumulation im Spross bei Salzstress im Vergleich zu Mannit-Stress wurde untersucht, ob dies Auswirkungen auf die Überlebensrate salzgestresster Pflanzen hat. Die ABA-defiziente Mutante *aba2-1* und die ABA-insensitiven Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* wurden Salzstress ausgesetzt und

ihre Überlebensrate nach einer gewissen Expositionsdauer bestimmt. Als Salzsensitive Mutante wurde *sos1-1* (Shi et al., 2000) getestet, außerdem wurde die Reaktion einer Kreuzung aus der Ethylen-insensitiven und NaCl-sensitiven *etr1-3* Mutante mit *abi1-1* untersucht. NaCl führt zu einer reduzierten Expression des Ethylen-Rezeptors ETR1, Ethylen spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase sowie bei der Induktion eines alternativen Respirationswegs bei Salzstress (Wang et al., 2009; Wang et al., 2010; Zhao & Schaller, 2004).

Alle getesteten Mutanten sowie die zugehörigen Wildtypen zeigten ein eingeschränktes Wachstum auf NaCl (Abb. 2.15 a). Im Vergleich zum *Landsberg erecta*-Wildtyp verhielten sich die Mutanten *abi1* und *abi2* nicht unterschiedlich, was ihre Überlebensrate nach 6 Tagen bei 150 mM NaCl betraf (Abb. 2.15 a und b). Im Vergleich dazu überlebte nur ein Drittel der *etr1 x abi1*-Kreuzung. Die *sos1*-Mutanten hielten dem Salzstress nicht stand, im Vergleich dazu konnte für die ABA-defiziente Mutante *aba2* sowie für die Kreuzung dieser mit *abi1*, *abi1 x aba2*, eine deutlich höhere Überlebensrate von bis zu 95% festgestellt werden, was bedeutet, dass Pflanzen, die zugleich ABA-defizient und ABA-insensitiv sind, also weder ABA bilden noch auf das wenig vorhandene ABA reagieren können, eine im Vergleich zum Wildtyp Columbia (60%) gesteigerte Salztoleranz aufweisen.

Bei einem Vergleich des Chlorophyllgehalts der Mutanten (Abb. 2.15 c) zeigte sich, dass der Gehalt an Chlorophyll a und b nur bei *sos1*-Mutanten auf fast 0% im Vergleich zum Wildtyp mit 30% Restchlorophyll zurückgeht, alle anderen Mutanten unterschieden sich kaum von den Wildtyp-Pflanzen, wobei auch hier *abi1 x aba2* einen leicht erhöhten Restchlorophyllgehalt von 50% aufwies. Untersuchte man jedoch die Überlebensrate nach einer Regenerationszeit von weiteren 6 Tagen auf MS-Medium ohne Salz, so konnte kein vom Wildtyp und den anderen Mutanten (außer *sos1*) abweichender Effekt gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Bis zu 40% der den sechstägigen NaCl-Stress überlebenden Keimlinge konnten sich nicht mehr erholen.

Die ABA-Biosynthese sowie die ABA-Signaltransduktion beeinflussen somit das Überleben der Keimlinge bei Experimenten mit hoher Luftfeuchte, wie es hier der Fall war, nach Salzstress kaum, sie stellen eher eine erste Reaktion auf den osmotischen Effekt von NaCl dar, werden aber dann wie viele andere physiologische Prozesse in der Pflanze negativ von der toxischen Wirkung der steigenden Konzentration an Natriumionen beeinflusst.

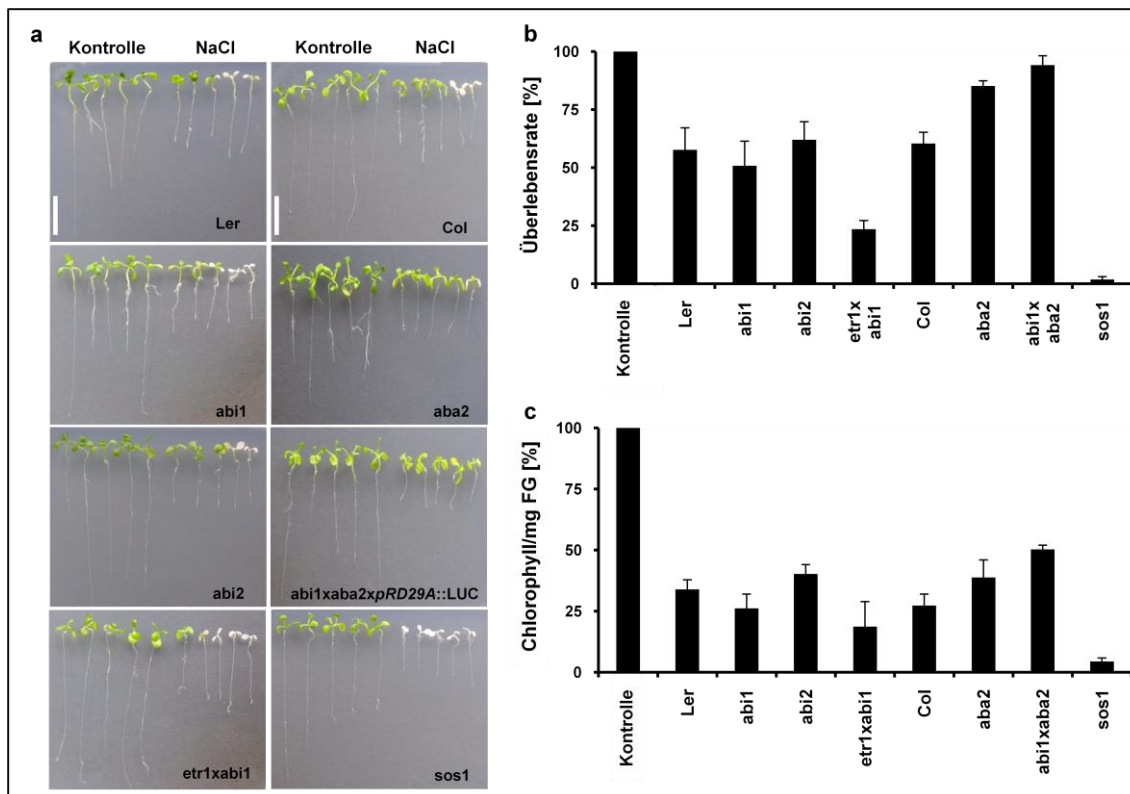


Abb. 2.15: Verhalten von in der ABA-Biosynthese und in der ABA-Signaltransduktion gestörten Mutanten bei Salzstress.

5 Tage alte Keimlinge wurden mit den Wurzeln auf 150 mM NaCl enthaltendes Medium transferiert und Wachstum, Ausbleichung sowie Überlebensrate bestimmt. Dargestellt sind Aufnahmen verschiedener Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp, die 6 Tage auf NaCl verbracht hatten (a, die Balken entsprechen 1 cm), sowie die Überlebensrate nach 6 d (b, n=20) bzw. der Gesamtchlorophyllgehalt pro mg Frischgewicht (c), jeweils mit Standardabweichung.

2.2. Etablierung eines Screens auf in der Perzeption von osmotischem Stress oder in der ABA-Signaltransduktion gestörte Arabidopsis-Mutanten

Eine der wichtigsten Funktionen des Phytohormons Abscisinsäure ist die Regulation der Stomataapertur. Unter abiotischen Stressbedingungen wie Trockenheit, hohem Salzgehalt oder Kälte wird das Schließen der Spaltöffnungen induziert (siehe 1.1.2.1). Durch Wassermangel oder Salz- bzw. Mannitexposition hervorgerufenem osmotischen Stress schließen die Pflanzen also ihre Spaltöffnungen und reduzieren damit den Wasserverlust, den sie durch Transpiration erfahren. Für die Blattoberfläche bedeutet dies ebenso eine Reduktion der Kühlung, welche durch Transpiration hervorgerufen wird, das heißt die Temperatur der Blattoberfläche steigt an. Bei Arabidopsis-Mutanten, die entweder insensitiv oder hypersensitiv auf ABA oder osmotischen Stress reagieren und in der Biosynthese, Perzeption oder Signaltransduktion von Abscisinsäure, oder auch in der Perzeption und Weiterleitung des osmotischen Signals gestört sind, würde das Schließen der Spaltöffnung daher entweder verspätet bzw. nicht auftreten, oder im anderen Fall verfrüht. Dadurch würden sich, was die Oberflächentemperatur der Blätter betrifft, Unterschiede von wenigen °C wie z.B. bei Merlot et al. (2002) beschrieben im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ergeben. Die Infrarotthermographie ist gut dazu geeignet, eben diese Unterschiede sichtbar zu machen und somit aus einer mutierten Arabidopsis-Population unter Stressbedingungen solche Mutanten mit höherer Temperatur (hypersensitiv) oder niedrigerer Temperatur (insensitiv) der Blattoberfläche im Vergleich zum Wildtyp zu identifizieren. Die Suche nach Sensoren des osmotischen Signals oder Rezeptoren für ABA gestaltet sich insofern schwierig, als z.B. bei EMS-mutagenisierten Pflanzen nur ein Gen aus einer eventuell größeren Familie mit ähnlichen Eigenschaften verändert wird, so dass mögliche Redundanzen nicht berücksichtigt werden können und die Mutanten keinen Phänotyp zeigen, wenn andere Proteine der Familie die Funktion übernehmen. Eine elegante Möglichkeit Redundanzeffekte zu umgehen ist die Verwendung einer Population, bei der die Transkription oder Translation aller Gene mit ähnlicher Sequenz abgeschaltet wird, z.B. durch RNA-Interferenz. Bei der zur Verfügung gestellten RNAi-Bibliothek waren die Pflanzen bereits vorgescreent, um sicher zu stellen, dass RNAi-Konstrukte stabil eingebracht waren, was über ein Markergen geschah (siehe 4.2.1). Es sollte ein Screen auf der Basis dieser RNAi-Bibliothek unter Verwendung der Infrarotthermographie zur Isolierung von Mutanten, die in der Perzeption von osmotischem Stress oder ABA gestört sind, entwickelt und etabliert werden, um nachfolgend die ausgeschalteten, den Phänotyp induzierenden Gene schnell über PCR und Sequenzierung identifizieren und anschließend charakterisieren zu können.

2.2.1. Verhalten von bekannten ABA-insensitiven und -hypersensitiven Mutanten

Um möglichst gute Bedingungen für einen späteren Einsatz der Infrarotthermographie zu schaffen, wurde in Vorversuchen zuerst die Anzucht und Behandlung der Pflanzen optimiert. Dies geschah über die Ermittlung der Stomataapertur bereits bekannter Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen. Dann folgte die Infrarotthermographie gestresster bekannter Mutanten (siehe Tabelle 3.1) bei optimierten Bedingungen, um diese später als Kontrolle beim Screen der T₂-Generation der beschriebenen RNAi-Bibliothek in großem Maßstab zu verwenden.

Die Pflanzen im Gewächshaus wurden in Erde angezogen und nach ca. 8 bis 10 Tagen entweder mit Mannit gestresst oder ausgetrocknet. Dann wurde die Stomataapertur der Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp über Mikroskopie ermittelt. Da in einem Zeitraum von 0 bis 4 Tagen aber keine signifikanten Unterschiede auftraten, weil die von der Aussaat noch mit Wasser gesättigte Erde die Mannitlösung nicht schnell genug aufnahm bzw. nicht austrocknete, wurde für die Aussaat ein Erde/Sand-Gemisch mit einem 1:1-Verhältnis für weitere Versuche gewählt. Hier ließ sich die Reaktion auf die gewählten Stressbedingungen gut beobachten, da das Erde/Sand-Gemisch insgesamt schneller austrocknet. Zur IRT im Gewächshaus war es nötig, über Topf und Kamera (Abstand bis zu 30 cm), sowie seitlich Pappkarton anzubringen, um durch Lichteinstrahlung ausgelöste Reflexionseffekte des Topfmaterials zu eliminieren. Die IRT-Kamera wurde senkrecht von oben auf die Pflanzen gerichtet, um Effekten von seitlich auf die Blätter einstrahlendem Licht vorzubeugen.

Infrarotthermographie gestresster bekannter Mutanten

Bei ABA-insensitiven und ABA-defizienten Mutanten ist zu erwarten, dass ihre Blattoberflächentemperaturen nach einigen Stunden osmotischen Stresses unverändert und damit deutlich geringer als die des Wildtyps sind und die Differenz über IRT gut bestimmbar ist. Bei diesen Mutanten kommt es nicht zur ABA-Bildung bzw. ABA-Signaltransduktion, es findet kein Spaltenschluss statt und damit läuft weiterhin Transpiration und Kühlung ab. Dagegen wird die ABA-hypersensitive Mutante *abh1-1* schneller als der Wildtyp auf osmotischen Stress reagieren und ihre Blattoberfläche dann wärmer als die der Kontrolle sein. Allerdings konnte das bisher über Infrarotthermographie an Pflanzen nicht beobachtet und bestätigt werden (Merlot et al., 2002). Die Auflösung der hier genutzten Kamera beträgt weniger als 0,08 K, damit sollten zumindest die in der Literatur beschriebenen Differenzen von bis zu 1,5 °C bei kühleren Mutanten sehr gut zu visualisieren sein.

Abbildung 2.16 zeigt nun Keimlinge verschiedener Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp nach 6 h Mannit-Stress bzw. nach 3 h für *abh1*.

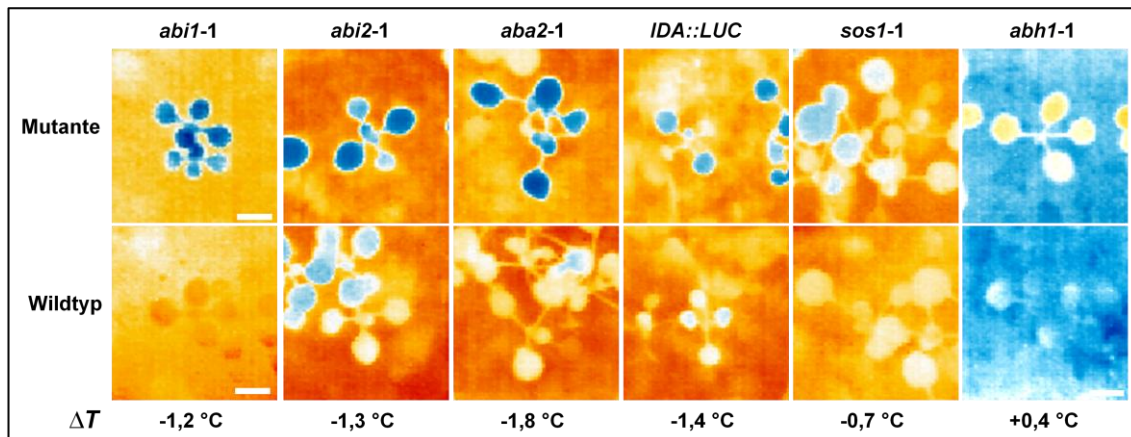


Abb. 2.16: Effekt von osmotischem Stress auf die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Abbildung zeigt 10 Tage alte Keimlinge in Erde/Sand (1:1), die für 6 h (bzw. 3 h bei *abh1-1*) einem osmotischen Potential von $-0,6$ MPa, vermittelt durch Mannit, ausgesetzt wurden. Anschließend wurde die Temperatur der Blattoberflächen erster Folgeblätter über Infrarotthermographie bestimmt, die in der Abbildung unten dargestellte Temperaturdifferenz ($T_{\text{Mutante}} - T_{\text{Wildtyp}}$) beruht auf Messungen von je dreimal 10 Keimlingen. Farbpalette „blau (kalt) > rot (warm)“ der Auswertesoftware Irbis 2.2. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 0,5 cm.

Gut zu erkennen in Abbildung 2.16 ist der Unterschied vor allem bei der *aba2*-Mutante, die im Mittel $1,8^{\circ}\text{C}$ kühlere Blätter aufweist als der Col-Wildtyp. Mit geringerer Differenz, aber trotzdem deutlich zu erkennen, sind *abi1* mit $1,2^{\circ}\text{C}$ und *abi2* mit $1,3^{\circ}\text{C}$ kühleren Oberflächen im Vergleich zum Ler-Wildtyp. Auch die Kreuzung aus *abi1* x *aba2* x *pRD29A::LUC* zeigt im Vergleich zu Ler (und Col, nicht abgebildet) deutlich kühlere Blattoberflächen mit $1,4^{\circ}\text{C}$ Differenz, allerdings handelt es sich hier um eine Kreuzung von drei verschiedenen Ökotypen, deren Wildtyp-Kreuzung Ler x Col x Ws (Wassilewskija) als Kontrolle nicht zur Verfügung stand. Es ist aber aufgrund der Unterschiede zu Ler und Col, sowie der Tatsache, dass sich diese untereinander kaum unterscheiden (bis zu $0,25^{\circ}\text{C}$ Differenz, je nach Stressdauer), davon auszugehen, dass bei $1,4^{\circ}\text{C}$ Temperaturunterschied dieser auf dem nicht stattfindenden Stomataschluss beruht. Für *sos1* ist die Differenz zu Col weniger deutlich ausgeprägt, der *gl1-1* Hintergrund wurde hier nicht getestet. SOS1 spielt vor allem in der Signaltransduktion bei der Antwort auf Salzstress eine Rolle, die Mutante sollte auf Trockenstress oder Mannit-Stress wie der Wildtyp reagieren.

Zur Überprüfung der Rate falsch-positiver Ergebnisse wurden 15000 Keimlinge des Wildtyps Columbia gescreent, mit dem Ergebnis von 0 Keimlingen mit abweichender Temperatur (erlaubte Spanne $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$) und damit 0 % Chance, falsch-positive nicht mutierte Keimlinge im IRT-Screen zu entdecken.

Alle bisher erwähnten Mutanten bzw. Transgenen zeigten bereits nach 3 h Stress eine sehr deutliche Temperaturdifferenz im Vergleich zum Wildtyp, diese blieb bei 6 h, 9 h und ÜN gleich oder vergrößerte sich. Bei Trockenstress über mehrere Tage konnte ebenfalls ein klarer Temperaturunterschied beobachtet werden. Durch die Zugluft im Gewächshaus trocknet jedoch die Erde an der Oberfläche relativ schnell aus, wodurch die Pflanzen vorgestresst sind, so dass bei der Kontrolle von 0 h Stress die Mutanten bereits eine kühlere Blattoberfläche als der Wildtyp aufweisen. Nur bei gründlichster Wässerung konnten keine Unterschiede zwischen Mutanten wie *aba2* bzw. *abi1* und deren Wildtyp festgestellt werden. Insgesamt stellt die Infrarotthermographie eine geeignete Methode zur Unterscheidung von Pflanzen über ihre Temperatur dar, alle Mutanten mit erwarteter weiterer Transpiration bei osmotischem Stress im Gegensatz zum Wildtyp zeigten diese auch mit Temperaturdifferenzen von 1 bis 2 °C.

Anders verhält es sich bei der *abh1*-Mutation: Hier ist nur ein geringer Unterschied mit 0,4°C wärmerer Blattoberfläche nach 3 h Stress im Vergleich zum Wildtyp feststellbar (siehe Abbildung 2.16), der 30 min bis 1 h nach Stressbeginn zum ersten Mal deutlich wird, sich steigert, dann aber nach 9 h nur noch 0,2°C beträgt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Merlot et al. (2002) war es hier möglich, die ABA-Hypersensitivität über Infrarotthermographie darzustellen. Für den geplanten Hochdurchsatz-Screen über Trockenstress statt Mannit ist es aufgrund der geringen Differenz aber wahrscheinlich, dass nur ein geringer Prozentsatz der ABA- bzw. osmo-hypersensitiven RNAi-Mutanten gefunden werden kann, außer es handelt sich um stark ausgeprägte Phänotypen mit Spaltöffnungen, die über längere Zeit als beim Wildtyp geschlossen bleiben. Als Kontrollen für den RNAi-Screen wurden *aba2*, *abi1* und *abh1* ausgewählt.

Untersuchung der gca2-Mutation über Infrarotthermographie

Desweiteren wurde die Infrarotthermographie auch zur Charakterisierung der *gca2-1* EMS-Mutante im Vergleich zum Wildtyp Ler und der T-DNA-Insertionsmutante *gca2-2* verwendet. Abbildung 2.17 zeigt das Verhalten von homozygoten Mutationslinien, die bei gleichen Anzuchtbedingungen mit 10 µM (S)-ABA besprüht wurden. Die Infrarotthermographie zeigte nach 1 h bereits einen deutlichen Unterschied der beiden Mutanten in ihrer Blattoberflächentemperatur an (2.17 b und c), Blätter von *gca2-1* wiesen eine niedrigere Temperatur als der Wildtyp auf ($\Delta T = -0,6^{\circ}\text{C}$), was bedeutet, dass die Spaltöffnungen nicht als Reaktion auf exogene ABA geschlossen wurden, dagegen zeigte die *gca2-2* Mutante eine erhöhte Sensitivität mit einer Temperaturdifferenz von $+0,7^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zum Wildtyp und $+1,3^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zur CPK23-überexprimierenden *gca2-1*. Um einen Effekt eventueller Unterschiede in der

Stomataanzahl auszuschließen, wurde diese bestimmt. Sie beträgt bei allen drei getesteten Linien bei einem Alter von 11 Tagen in der unteren Blattepidermis ca. 80 Stomata pro mm². Abbildung 2.17 (a) gibt Aufschluss über die Stomataapertur (= Breite/Länge der Öffnung) in den untersuchten Pflanzen, auch hier konnte eindeutig die ABA-Insensitivität der *gca2-1* Mutante gezeigt werden. Die *gca2-2* Mutante unterscheidet sich nicht ganz so deutlich vom Wildtyp, weist aber eine schwache Hypersensitivität auf, was sich in einer geringeren Spaltöffnungsweite ausdrückt.

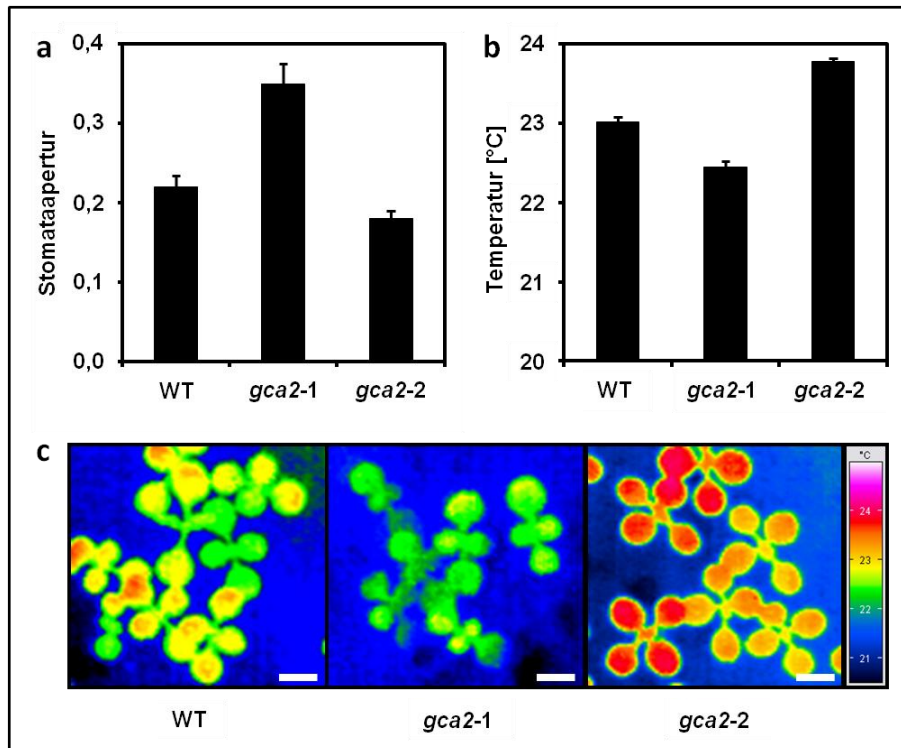


Abb. 2.17: Stomataapertur und Temperatur der Blattoberflächen von *gca2*-Mutanten nach Behandlung mit (S)-ABA.

Abbildung (a) zeigt die Stomataapertur von *gca2-1* im Vergleich zu *gca2-2* und dem Wildtyp Ler 1 h nach Besprühen 11 Tage alter Pflanzen mit 10 µM (S)-ABA (n=15). Die Insensitivität von *gca2-1* auf ABA und damit das nicht erfolgende Schließen der Spaltöffnungen zeigt sich ebenso deutlich in (b), wo die Temperatur der Blattoberflächen der Pflanzen dargestellt ist (n=30), diese wurden über IRT ermittelt. Die Anzahl *n* der Spaltöffnungen pro mm² ist in allen drei Fällen gleich bei ca. 80/mm². (c) zeigt die Aufnahmen der IRT-Kamera mit einer Farbskala von 21 bis 24 °C (blau → pink), die Balken entsprechen einer Länge von 0,5 cm.

Bei gleichen Anzuchtbedingungen zeigen die beiden unterschiedlichen Mutationen also ein anderes Reaktionsverhalten auf Behandlung mit ABA. Die *gca2-1* Mutante, bei welcher das Gen At4g04740 aufgrund einer Mutation im Bereich der 5'-UTR überexprimiert wird, weist neben der ABA-Insensitivität in der Stomataregulation auch einen ABA-insensitiven Phänotyp in Bezug auf Wurzelwachstumshemmung und Keimungshemmung auf (Korte, 2009). Die T-DNA-Insertion im ersten Exon desselben Gens bei *gca2-2* führt dagegen zu erhöhtem Stomataschluss als Antwort auf exogene ABA, auch das Keimungsverhalten auf ABA ist dem von *gca2-1* entgegengesetzt.

Diese unterschiedlichen Effekte beruhen auf der Tatsache, dass bei der T-DNA-Insertion kein vollständiges Transkript des Gens und damit kein voll funktionstüchtiges Protein entsteht, während für *gca2-1* nachgewiesen werden konnte, dass die Transkript- und Proteinmenge von CPK23 im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht ist (Korte, 2009). Ma und Wu beschrieben ebenfalls CPK23-Mutationen, hier wurde das Verhalten einer Col-Pflanzenlinie mit einer T-DNA-Insertion im 7. Intron untersucht, die Unterbrechung der CPK23-Expression führte zu einer erhöhten Toleranz der Pflanze auf Trockenheit und Salzstress mit stärker schließenden Spaltöffnungen, während die Überexpression von CPK23 zu erhöhter Sensitivität führte (Ma & Wu, 2007). Die Calcium-abhängige Proteinkinase 23 funktioniert demnach als negativer Regulator in der Signaltransduktion, die als Antwort auf osmotischen Stress abläuft.

Neben CPK23 sind auch andere Kinasen, z.B. CPK21, negative Regulatoren des ABA-Signalweges (Franz et al., 2010; Kim et al., 2003), allerdings gilt dies nicht für die meisten der bisher neben CPK23 untersuchten CPKs wie CPK3, 4, 6 oder 11 (Mori et al., 2006; Zhu et al., 2007). Aufgrund der generellen Insensitivität auf Abscisinsäure wird die Funktion von CPK23 am Anfang der Signaltransduktion vermutet. Über *Yeast Two-Hybrid* konnte eine Interaktion des GCA2-Proteins mit den ABA-Rezeptorkomponenten, den RCARs, nicht aber mit den an der Signaltransduktion beteiligten PP2Cs wie ABI1 oder ABI2, nachgewiesen werden (Korte, 2009). Die RCAR-Proteine könnten eventuell durch GCA2/CPK23 phosphoryliert werden (Korte, 2009). Auf der anderen Seite könnte das membranständige CPK23-Protein bei Überexpression in der *gca2-1* Mutante durch mehr Phosphorylierungsereignisse und damit zusammenhängenden Öffnungen von Calciumkanälen zu einer Erhöhung der Frequenz von Calcium-Oszillationen führen. Diese Eigenschaft von *gca2-1* wurde bereits beschrieben (Allen et al., 2001). Die durch Stress erhöhte ABA-Konzentration in der Zelle wäre bei ebenfalls hoher Kinaseaktivität dann eventuell nicht mehr ausreichend, um ein Schließen der Stomata bei Stress zu induzieren, was für den Wildtyp beschrieben wurde (Klusener et al., 2002). Nachdem GCA2/CPK23 auch als Interaktionspartner des Anionenkanals SLAC1 identifiziert wurde (Geiger et al., 2009), könnte auch die Fehlregulation von SLAC1 in der *gca2-1* Mutante zur Erklärung von deren ABA-insensitiver Stomataregulation beitragen.

2.2.2. Isolierung und Verifizierung von Kandidaten

Nachdem die Methode der Infrarotthermographie für die meisten bekannten Mutanten, die getestet wurden, gut funktionierte, konnten nun die Pflanzen mit den eingebrachten RNAi-Konstrukten untersucht werden. Dazu wurden jeweils ca. 600 Samen pro 15 Töpfe auf Erde/Sand (Mengenverhältnis 1:1) ausgebracht und nach 8 bis 10 Tagen gestresst bzw. ausgetrocknet. Es wurde dann an jedem Topf zweimal im Abstand von zwei Tagen die IRT durchgeführt und Pflänzchen, die auffällig in ihrer Blattoberflächentemperatur waren, pikiert und mit lichtdurchlässigen Abdeckungen versehen, damit sie sich vom Stress des Wassermangels bei höherer Luftfeuchtigkeit gut erholen konnten. So konnten Samen für die T₃-Generation der meisten putativen Kandidaten amplifiziert werden. Außerdem wurden DNA-Proben von jedem Kandidaten vorbereitet und daraus über PCR die eingebrachten Sequenzen amplifiziert und anschließend sequenziert. Um auszuschließen, dass der bei der IRT beobachtete Effekt auf eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte oder geringere Anzahl an Spaltöffnungen zurückzuführen ist, wurde von jeder Mutante die Spaltöffnungsanzahl pro mm² Blattfläche bestimmt. In der nächsten Generation T₃ wurde bei einem Rescreen noch einmal die Reaktion auf Stress überprüft und von einigen vielversprechenden „Putanten“ geeignete *Knock out*-Linien (SALK, Nottingham Arabidopsis Stock Centre NASC) in ihrer Reaktion auf osmotischen Stress über IRT getestet.

Putative Mutanten und ihre Bestätigung im Rescreen

Aus den vorhandenen fünf Teilbibliotheken, die sich in der eingebrachten Länge der DNA-Fragmente unterscheiden (0-140 bp, 140-210 bp, 210-350 bp, 350-500 bp, 500-750 bp), wurden jeweils ca. 30 bis 35 Samenchargen getestet (234 Schalen mit je 15 Töpfen und ca. 40 Keimlingen pro Topf), was insgesamt ca. 140400 gescreente Pflanzen ausmacht. Aus dieser Population von 140400 Pflanzen wurden 153 „kältere“ und „wärmere“ Mutanten isoliert, was einer Rate von 0,11 % entspricht.

Einige Beispiele von IRT-Aufnahmen des Screens der T₂-Generation der RNAi-Bibliothek mit über die Auswertesoftware Irbis 2.2 bestimmter Temperatur der Blätter beinhaltet Abbildung 2.18. Die Bezeichnung der einzelnen Mutanten *A-B-C* setzt sich aus den Komponenten Nummer der Bibliothek (*A*), Nummer der Samencharge (*B*) und Nummer der isolierten Mutante aus dieser Charge (*C*) zusammen. Die Abbildung 2.18 (a) zeigt sechs im Vergleich zur Umgebung kühlere Mutanten, die Temperaturdifferenzen befinden sich im Bereich von 0,8 bis 2,2°C. Abb. 2.18 (b) zeigt fünf isolierte wärmere Mutanten, hier konnten Differenzen von bis zu 1,2°C beobachtet werden.

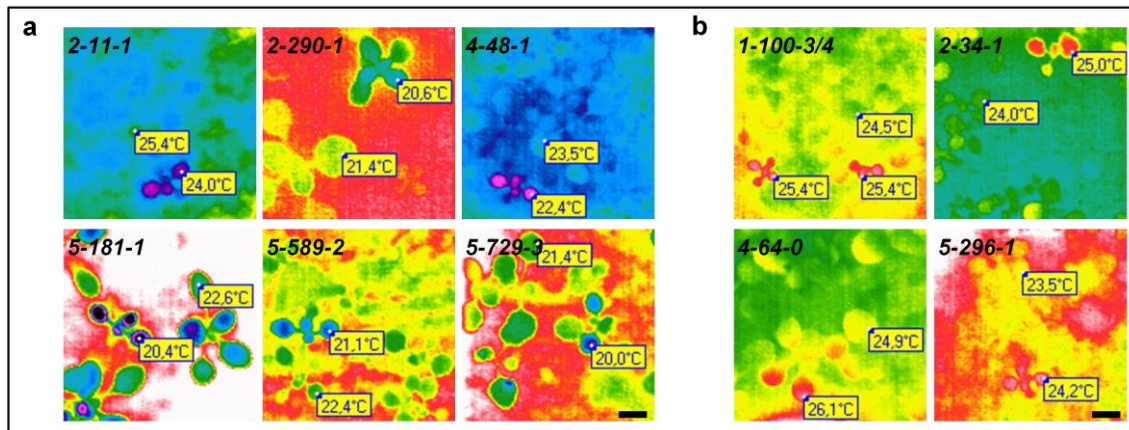


Abb. 2.18: IRT-Aufnahmen putativer Mutanten.

Die Abbildung zeigt Aufnahmen aus dem Screen der T_2 -Generation der RNAi-Bibliothek von 12 Tage alten Keimlingen, die zwei Tage Trockenstress ausgesetzt waren. Links oben in jeder Aufnahme ist die Bezeichnung der jeweiligen Mutante zu sehen, die Temperatur der kühleren (a) bzw. wärmeren (b) Mutanten und umgebender Keimlinge ist ebenfalls dargestellt (Farbpalette „Rainbow“ (schwarz-violett kalt, rot-weiß warm) der Auswertesoftware Irbis 2.2). Schwarze Balken entsprechen einer Länge von 0,5 cm.

Nach Amplifizierung der isolierten Mutanten wurde die T_3 -Generation ebenfalls auf ein Erde/Sand-Gemisch zusammen mit dem Wildtyp und Kontrollmutanten wie *aba2* ausgebracht und nach 10 Tagen je mehrere Töpfe folgenden Stressbedingungen ausgesetzt: zur Kontrolle gute Wässerung, -0,6 MPa Mannitlösung und Trockenstress für mehrere Tage. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick darüber, wie sich die nächste Generation im Rescreen verhalten hat.

Anzahl (von 153)	Verhalten der T_3 -Generation im Rescreen	Anteil gesamt	Anteil (von 153)
41	konnten nicht bestätigt werden	0,029 %	26,8 %
2	bestätigte höhere Blattoberflächentemperatur im Vergleich zum Wildtyp, hypersensitiv auf osmotischen Stress und Trockenstress	0,001 %	1,3 %
91	bestätigte niedrigere Blattoberflächentemperatur im Vergleich zum Wildtyp, insensitiv auf osmotischen Stress und Trockenstress	0,065 %	59,6 %
19	kein Rescreen möglich	0,013 %	12,4 %

Tab. 2.1: Übersicht über die Anteile bestätigter bzw. nicht bestätigter Mutanten.

Bei 19 von 153 Kandidaten war eine Durchführung nicht möglich, bei einem Teil davon hatten die isolierten Mutanten den Trockenstress nicht überlebt. Ein weiterer Teil der Mutanten bildete keine Samen bzw. die gebildeten Samen waren nicht keimungsfähig. 41 der 153 isolierten Mutanten wiesen in der nächsten Generation keinen zur Wildtyp-Kontrolle unterschiedlichen Phänotyp auf. Nachdem durch den Test einer Columbia-Population das Auftreten spontaner Mutationen mit einem derartigen Phänotyp ausgeschlossen werden konnte, können die Gründe dafür z.B. in einer unterschiedlich

weiten Entwicklung der Keimlinge während des Screens liegen, da durchaus einzelne Samen ein bis zwei Tage später gekeimt waren. RNAi-unabhängige Mutationen können durch Insertion der T-DNA in Gensequenzen entstanden sein und so unabhängig von dem eingebrachten Fragment einen Stomata-Phänotyp hervorgerufen haben. Die Gene, die bei diesen Mutanten abgeschaltet sind, können nach Rückkreuzung über positionelle Klonierung identifiziert werden. Neben der Rückkreuzung der T₃-Generation in *Ler* wurde für alle Mutanten auch die Anzahl der Stomata pro mm² über Mikroskopie bestimmt, um sicher zu gehen, dass vorhandene Phänotypen geringerer bzw. höherer Temperatur nicht auf mehr bzw. weniger Spaltöffnungen im Vergleich zum Wildtyp zurückzuführen sind. Dies konnte für sämtliche im Rescreen bestätigte Kandidaten ausgeschlossen werden. Wie bereits aufgrund geringer Temperaturdifferenzen für die ABA-hypersensitive Mutante *abh1-1* bei osmotischem Stress vermutet wurde, war der Anteil isolierter und bestätigter Trockenstress-hypersensitiver Mutanten mit 1,3% gering im Vergleich zu den insensitiven Mutanten mit 60% (bezogen auf 153 gefundene Kandidaten). Bei einem optimierten Screen auf hypersensitive Mutanten müsste mit Lösungen osmotisch aktiver Substanzen wie Mannit und einer Stressdauer von wenigen Minuten bis einigen Stunden gearbeitet werden, was hohen Durchsatz erschwert.

Abbildung 2.20 zeigt den Vergleich Wildtyp (oben) zu Kandidat (unten) im durchgeführten Rescreen, neben der Kontrolle *aba2* sind zwei bestätigte Trockenstress-insensitive Mutanten (*2-290-1* und *5-729-3*) sowie eine bestätigte hypersensitive Mutante (*4-64-0*) abgebildet.

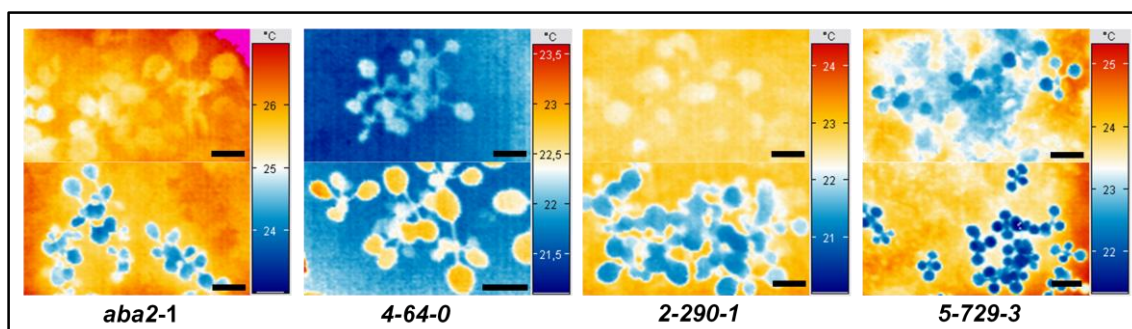


Abb. 2.20: IRT-Aufnahmen vom Rescreen der T₃-Generation im Vergleich zu *aba2-1*.

Dargestellt ist in jedem Bild oben der Wildtyp (Col) und unten der Kandidat bzw. die Kontrolle *aba2*, sowie rechts die Temperaturfarbskala in °C (blau-kalt > rot-warm). Bei *4-64-0* handelt es sich um eine bestätigte hypersensitive Mutante im Gegensatz zu *2-290-1* und *5-729-3*, die bestätigte insensitive Mutanten darstellen. Schwarze Balken entsprechen jeweils einer Länge von 0,5 cm.

Identifizierung eingebrachter RNAi-Fragmente

Von den ursprünglich isolierten putativen Mutanten der T₂-Generation wurde zum einen versucht, über PCR die stabil ins Genom eingebrachten Fragmente der RNAi-Bibliothek zu amplifizieren, um dann über Sequenzierung der PCR-Produkte Rückschlüsse auf die ausgeschalteten Gene ziehen zu können. Da hier bereits Probleme auftraten, auf welche noch genauer eingegangen wird, wurde dabei auch die Kanamycin-Resistenz, die sich mit auf dem ins Pflanzengenom integrierten Teil des Plasmids befindet (NptII), überprüft. Einige Ergebnisse von PCR und Sequenzierung sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Mutante	PCR-Amplifikat	Kan-Resistenz	Ergebnis der Sequenzierung (BLAST)	Bestätigung im Rescreen
2-38-2	300 bp	+/-	At3g53970 (<i>Proteasome inhibitor-related</i>)	+
2-290-1	500 bp	+	At1g23690 (unbekannte Funktion)	+
2-290-2	500 bp	+	At1g23690 (unbekannte Funktion)	+
4-286-1	100 bp	+	At1g51805 (<i>Leucine-rich repeat</i> Proteinkinase) und ATMG01390 (RRN18, mitochondriale 18S ribosomale RNA)	-
5-729-1	100 bp	+	At1g51805 (<i>Leucine-rich repeat</i> Proteinkinase)	+
5-729-3	900 bp	+	At2g26140 (FtsH4-Protease)	+
5-729-7	300 bp	+/-	At1g54490 (EIN5, <i>Ethylen-insensitive 5</i>)	+

Tab. 2.2: Ergebnisse der Sequenzierung.

Nachdem es mit den gegebenen Primerpaaren Pro1 for/Ter1 rev und 35s for/Ter1 ext (siehe Anhang 5.1 und Abbildung 2.21) in 95% aller Fälle nicht möglich war, das stabil ins Genom integrierte Fragment zu amplifizieren und damit keine Identifizierung der durch RNA-Interferenz abgeschalteten Gene über Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgen konnte, wurde nach Überprüfung der Qualität isolierter DNA (über Actin-Amplifizierung) versucht, die Kanamycin-Resistenz zu bestimmen. Über PCR war es bei einigen Mutanten möglich, die Existenz eines Teils von NptII nachzuweisen. Weitere Versuche, aus der isolierten genomischen DNA Amplifikate zu erhalten, wurden mit Hilfe von Primern in der *right* und *left border* des transformierten Plasmids sowie von Primern, die in der Nähe der Ascl-Schnittstellen binden sollten, durchgeführt, blieben aber erfolglos. Es erschien damit denkbar, dass die erwartete Plasmidsequenz (siehe Abb. 2.21), auf deren Basis die erwähnten Primer entworfen worden waren, nicht völlig korrekt war. Es wurde daher auf die Ausgangsplasmide pSK Ascl und pBI121 Ascl aus der angelegten Bibliothek ohne eingefügte Fragmente zurückgegriffen, um hier die tatsächliche Sequenz des gesamten Plasmids zu

bestimmen. Die Sequenzierung war nicht über den gesamten Bereich zwischen *right* und *left border* möglich, da sich laut Aussage von GATC und MWG *hairpin*-Strukturen im Plasmid ausbildeten. Die Sequenzierung stoppte im Bereich zwischen NptII und dessen Nos-Terminator sowie zwischen *left border* und AscI-Schnittstelle. Eine Kartierung des Vektors ergab unerwarteterweise zusätzliche Restriktionsschnittstellen im Plasmid, die darauf hindeuten, dass möglicherweise bereits Fragmente (*inverted repeats*) im genannten Ausgangsvektor vorhanden waren. Damit ist nicht geklärt, welches Plasmid zur Konstruktion der Bibliothek verwendet wurde (zur Konstruktion der Bibliothek durch C. Heidersberger siehe Abbildung 4.3 unter Punkt 4.2.1). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch nicht geklärt werden, ob in den mutierten Pflanzen aus der zur Verfügung gestellten Bibliothek, welche im IRT-Screen hypersensitiv oder insensitiv auf Trockenstress reagierten, die den Phänotyp auslösende Mutation auf RNAi beruht oder durch T-DNA-Insertionen hervorgerufen wurde. Falls mit der AscI-Kassette ebenfalls funktionelle *inverted repeat*-Sequenzen stabil in Arabidopsis transformiert wurden, ist trotzdem nicht bekannt, ob der Mechanismus der RNA-Interferenz bzw. PTGS ablaufen könnte, da auch die Vollständigkeit von 35S-Promotor und Nos-Terminator nicht eindeutig nachgewiesen wurde. Zur Überprüfung könnten die identifizierten Fragmente spezifisch in RNAi-vermittelnde Vektoren kloniert werden und diese Konstrukte z.B. über transiente Transfektion in Protoplasten-Versuchen oder stabile Transformation in *Arabidopsis thaliana* auf ihren Phänotyp getestet werden.

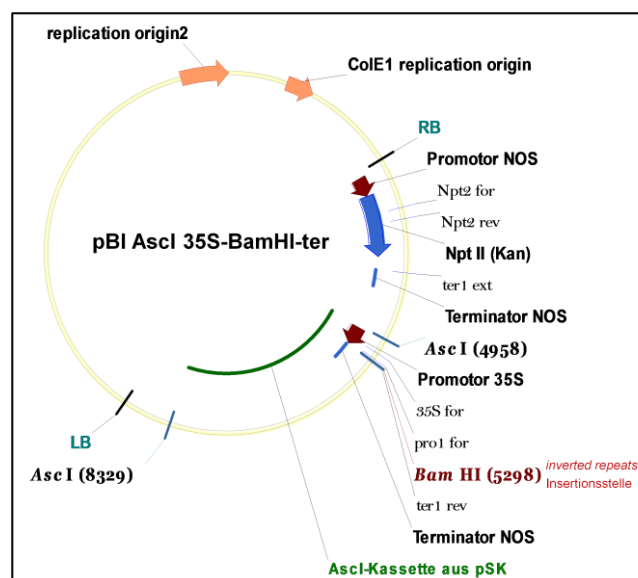


Abb. 2.21: Vektorkarte des gewünschten pBI AscI-Plasmids.

Die AscI-Kassette enthält eine BamHI-Schnittstelle zwischen 35S-Promotor und NOS-Terminator, über die die *inverted repeats* ins Plasmid eingebracht werden. Die Kassette wurde in den pBI AscI kloniert, so dass der abgebildete Vektor entstand (Programm Vector NTI 9.1.0, Invitrogen). Bei der stabilen Transformation wird die Sequenz zwischen RB und LB ins Pflanzengenom integriert. Bisher war es nicht möglich, die AscI-Kassette mit Promotor im Ausgangsvektor zu identifizieren.

Untersuchung von SALK-Linien mit Insertionen in den identifizierten RNAi-Genen

Von denjenigen Kandidaten bzw. Genen, für die eindeutige Ergebnisse bei PCR-Amplifizierung und Sequenzierung erhalten wurden, die Kanamycin-Resistenz zumindest über PCR eindeutig nachzuweisen war, und die gleichzeitig im Rescreen bestätigt werden konnten (Vergleich Tabelle 2.3) wurden T-DNA-Insertionslinien bestellt, in der T₃-Generation auf Homozygotie der Insertion getestet und charakterisiert:

Mutante	SALK-Linie	Gen	Primer zum Test auf Homozygotie
2-290-1 2-290-2	034365.29.25.X	At1g23690 (unbekannt)	for: 5'-caa ctc tat gtg cat gtg gc-3' rev: 5'-gca gtg acc ctt aaa agc ag-3'
5-729-3	035105.24.20.X	At2g26140 (FtsH4)	for: 5'-cga ttt tgg ttg cct gct ca-3' rev: 5'-cgt ctg gga gga aag ctt cc-3'
	011563.55.00.X	zwischen At2g26140 und At2g26150 (HSFA2)	for: 5'-atc aaa cca aag tcg aaa cc-3' rev: 3'-cca ttg gtc tag gag agg aa-3'
			#220 LB for: 5'-tgg ttc acg tag tgg gcc atc g-3'

Die Kandidaten 2-38-2 und 5-729-7 waren in Bezug auf die mit dem RNAi-Konstrukt eingebrachte Kanamycin-Resistenz (NptII) nicht eindeutig positiv, was entweder bedeutet, dass es zu einem *Silencing* des Kanamycin-Gens gekommen ist, oder nur ein Teil der *Ascl*-Kassette (ein Teil von NptII) eingebracht wurde und damit eventuell auch keine RNAi-*inverted repeat*-Sequenz. 4-284-1 konnte im Rescreen nicht bestätigt werden, für 5-729-1 wurde das gleiche Gen bei der Sequenzierung identifiziert.

Für die Mutanten 2-290-1 bzw. 2-290-2 wurde die SALK-Linie 034365 und für die Mutante 5-729-3 die Linien 035105 und 011563 zum Test auf Insensitivität gegenüber Trockenstress verwendet. Die Struktur der beiden identifizierten Gene sowie die Lage der SALK-Insertionen sind in Abbildung 2.22 (a) dargestellt. Hier wird auch gezeigt, welcher Teilbereich der Gensequenz über PCR aus der genomischen DNA der jeweiligen Mutanten identifiziert werden konnte. Die auf Homozygotie der T-DNA-Insertion getesteten T₄- und T₅-Generationen der SALK-Linien wurden osmotischem Stress und Trockenstress ausgesetzt, wie beim Rescreen der putativen Mutanten bereits beschrieben. Hier konnte jedoch keine Temperaturdifferenz im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, was durch eventuelle Redundanzeffekte erklärt werden könnte. Einen Vergleich der Wachstumsphänotypen unter Normalbedingungen zeigt Abbildung 2.22 (b). Die im IRT-Screen der RNAi-Population isolierten auf Trockenstress insensitiven Mutanten links im Bild zeigen im Vergleich zum Wildtyp in der Mitte deutlich reduziertes Wachstum, 5-729-3 weist zusätzlich mehr Blätter und Infloreszenzen auf. Im Gegensatz dazu sind die SALK-Linien im Vergleich zum Wildtyp gleich (011563) oder eher größer, das heißt also, dass die *Knock out*-Linien auch unter Normalbedingungen einen anderen Phänotyp als die RNAi-Linien haben.

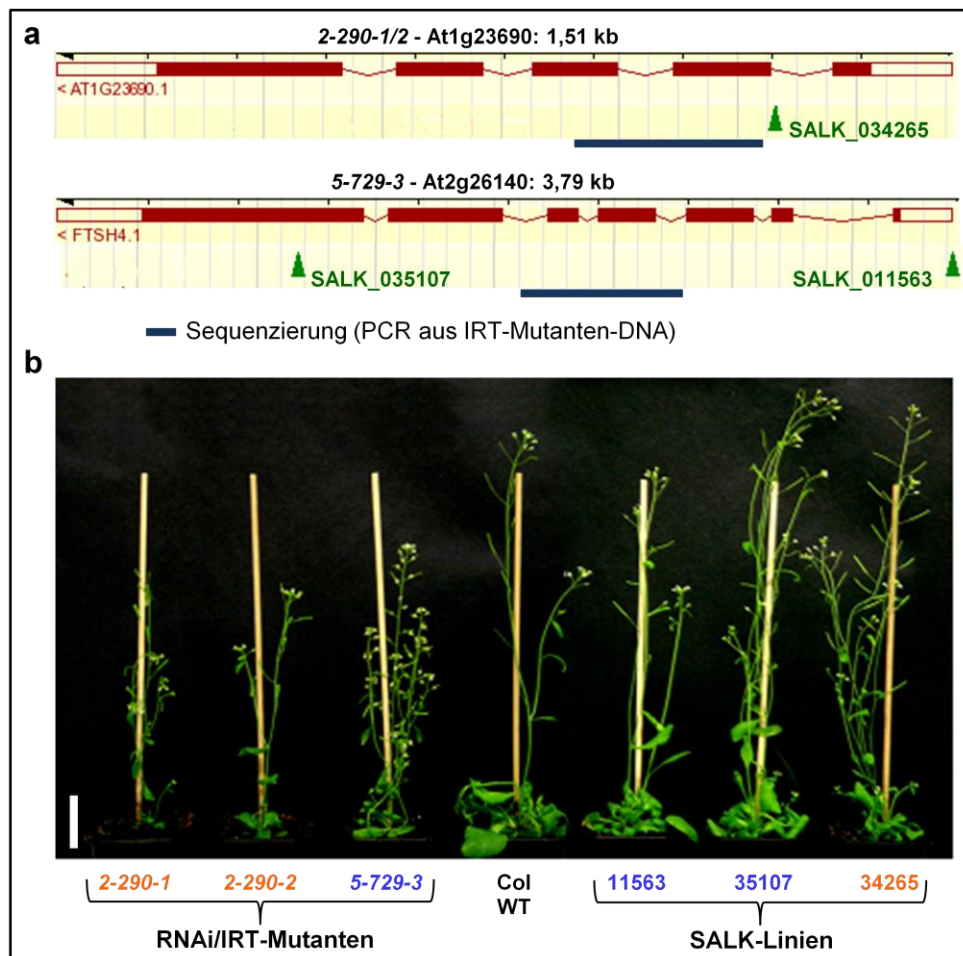


Abb. 2.22: Phänotypen der SALK-Linien und Positionen der T-DNA-Insertionen.

Dargestellt sind in (a) die Genstrukturen und die jeweilige Position der T-DNA-Insertion der verwendeten SALK-Linien (grün) nach AtEnsembl ContigView, der blaue Balken gibt die Fragmentsequenzen an, die über PCR aus genomischer Mutanten-DNA amplifiziert wurden. (b) 6 Wochen alte Pflanzen, angezogen in Phytokammern unter Normalbedingungen, der T₄-Generation von RNAi-Linien (links) und den zugehörigen T-DNA-Insertionslinien (rechts) werden im Vergleich zum Wildtyp Col gezeigt. SALK-Linien 11563 und 35107 entsprechen dem Gen At2g26140, das bei 5-729-3 identifiziert wurde (blau), 34265 dem Gen At1g23690, welches bei 2-290-1 und 2-290-2 identifiziert wurde (orange). Der weiße Balken entspricht 10 cm.

Das Gen At1g23690 codiert für ein Protein mit der Länge von 273 Aminosäuren mit noch unbekannter Funktion. Aufgrund der DUF220-Domäne (*Domain of Unknown Function*), die es beinhaltet, gehört es einer größeren Familie von ca. 20 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana* an, weitere Homologe gibt es in *Arabidopsis lyrata*, *Oryza sativa* und *Physcomitrella patens*. Das Protein wird hauptsächlich in Blüten exprimiert, Genevestigator-Daten zeigen eine mehr als vierfache Hochregulation der Expression durch Methyljasmonat und Hypoxie, eine Herunterregulation (bis zu achtfach) findet bei UV-Licht statt. Durch ABA, Kälte oder Trockenheit wird die Expression etwas herunterreguliert. Die Daten lassen nicht unbedingt darauf schließen, dass dieses Protein in der Perzeption und Weiterleitung von osmotischem Stress oder in der Abscisinsäure-Signaltransduktion eine tragende Rolle spielt. Bei Betrachtung der Tatsache, dass

eventuell die stabile Transformation von RNAi-Konstrukten nicht funktioniert hat, kann es auch sein, dass nicht das abgeschaltete identifizierte Gen Grund des Phänotyps ist, sondern ein anderes Gen über eine durch T-DNA-Insertion hervorgerufene Mutation Auslöser dessen ist, was zu überprüfen wäre.

Das Gen At2g26140 codiert für FtsH4 (*Filamentation temperature sensitive H*), einer an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Protease (Urantowka et al., 2005). Das 717 Aminosäuren lange Protein wird hauptsächlich in Samen exprimiert, bei Hitze und Trockenheit wird die Expression um einen Faktor von 2 bis 4 erhöht, bei ABA nur leicht. 2,4-D und Hypoxie führen zu einer Herunterregulation um Faktoren von 2 bis 4. Das Protein besitzt die AAA+-Domäne (*ATPases associated with a variety of cellular activities*, Chaperon-ähnliche Aktivität), eine metallabhängige Peptidase M41-Domäne und eine Proteasom-aktivierende Nukleotidase-Domäne. Es ist Mitglied der AAA-Typ ATPase-Familie mit ca. 100 Mitgliedern in Arabidopsis, die FtsH-Subfamilie besteht aus 12 Mitgliedern (Garcia-Lorenzo et al., 2006; Sokolenko et al., 2002). Aufgrund der Expressionsinduktion durch Trockenheit und Hitze ist es nicht unwahrscheinlich, dass das Protein bei der Reaktion auf osmotischen Stress eine Rolle spielt.

FtsH-Proteine von Bakterien sind ATP-abhängige Metalloproteasen in der cytoplasmatischen Membran, sie sind z.B. beteiligt am Einbau membranständiger Proteine und bei der Degradation denaturierter oder beschädigter Proteine wie dem Hitzeschock-Transkriptionsfaktor $\sigma 32$. Es ist bekannt, dass in Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Oenococcus oeni* oder der *Synechocystis*-Spezies die Expression der FtsH-Protease bei Erhöhung der Temperatur oder des osmotischen Drucks induziert wird, außerdem bei Salzstress. Hier ist das Protein in der Stressantwort und Anpassung der Zellen an Stress involviert (Bourdineaud et al., 2003; Deuerling et al., 1997; Fischer et al., 2002; Stirnberg et al., 2007).

Die Arabidopsis-Familie der FtsH-Proteine besteht aus 16 homologen Genen, wobei vier davon kein Zink-Bindemotiv und damit keine proteolytische Aktivität aufweisen. Neun der übrigen 12 Proteine sind in Chloroplasten lokalisiert, fünf davon sind in der Degradation oxidativ geschädigter photosynthetischer Proteine bei der Reparatur des PhotosystemII-Komplexes während Lichtstress involviert (Nixon et al., 2005; Yamamoto et al., 2008; Zelisko et al., 2005). 10 der Proteine wirken in hoch homologen Paaren, AtFtsH1 und 5, AtFtsH2 und 8, AtFtsH7 und 9 in Chloroplasten und AtFtsH3 und 10 in Mitochondrien. Das ebenfalls mitochondriale AtFtsH4 bildet eine Paarung mit AtFtsH11, welches sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten zu finden ist. Deletionsmutanten von 1/5 bzw. 2/8 führen zu gefleckten Blattyphen, deshalb auch die Namen VAR1 und VAR2 (*yellow variegated*), in den gelblichen Blatteilen ist die Akkumulation von Photosynthese-Proteinkomponenten in den Thylakoidmembranen

beeinträchtigt (Kato et al., 2009; Sakamoto et al., 2002; Yu et al., 2008). FtsH11, welches die höchste Homologie zu FtsH4 aufweist, wurde als Mediator in der Thermotoleranz von Arabidopsis-Pflanzen beschrieben (Chen et al., 2006), wirkt jedoch nicht bei Lichtstress. AtFtsH4-Mutanten zeigen unter Kurztagbedingungen eine asymmetrische Form der Blätter und unregelmäßig gezackte Blattspreiten (Gibala et al., 2009). Dieser Phänotyp geht einher mit strukturellen Veränderungen von Chloroplasten und Mitochondrien und gleichzeitig einem erhöhten Level von ROS und carbonylierten mitochondrialen Proteinen, denn die bei Kurztagbedingungen ausgedehnte vegetative Phase führt zu oxidativem Stress in den Mutanten. Es wird eine Funktion für FtsH4 in der Verhinderung einer Akkumulation oxidiertes Proteine durch Degradation während des vegetativen Wachstums diskutiert. In *Xerophyta viscosa*, einer austrocknungstoleranten *Resurrection*-Pflanze, die nach langer Trockenheit bei Wässerung wieder voll lebensfähig ist, wurde bei der Dehydrierung neben einem Anstieg von dehydrationsresponsiven Proteinen wie PP2Cs auch eine erhöhte Abundanz von FtsH-Proteinen festgestellt (Ingle et al., 2007).

Eine weitere Untersuchung der FtsH4- und anderer FtsH-Mutanten und ebenso der im IRT-Screen identifizierten Mutante ist unter diesen erläuterten Gesichtspunkten durchaus sehr vielversprechend, da die FtsH-Proteasen sowohl in Bakterien als auch in Pflanzen als Stress-induzierbar bekannt und an Antworten zur Adaption der Pflanze beteiligt sind. Eine Möglichkeit zur Überprüfung, ob das eingebrachte Konstrukt wirklich FtsH-Gene abschaltet und somit Redundanzeffekte verhindert, was auch den unterschiedlichen Phänotyp der *single knock out*-Mutation erklären könnte, wäre mit der identifizierten Gensequenz definierte *inverted repeats* zu konstruieren und diese stabil in Arabidopsis einzubringen, um dann durch IRT den Effekt der RNA-Interferenz zu testen.

2.3. Charakterisierung des cytosolischen ABA-Rezeptorkomplexes

Mit als wichtigste Schlüsselkomponenten der Abscisinsäure-Signaltransduktion in Pflanzen gelten die Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -abhängigen Serin/Threonin-Phosphatasen des Typs 2C (PP2Cs) wie ABI1 und ABI2, welche als negative Regulatoren der ABA-abhängigen Genexpression wirken (Kuhn et al., 2006; Merlot et al., 2001; Nishimura et al., 2007; Saez et al., 2006; Yoshida et al., 2002). Als Interaktionspartner von ABI2 wurde in einem *Yeast Two-Hybrid* System unter anderem das Protein At1g01360.1 entdeckt (Yang, 2003). Ma et al. (2009) und Park et al. (2009) konnten zeigen, dass eben dieses At1g01360.1-Protein ABA bindet. Das Protein wurde *Regulatory Component of ABA Receptor 1* (RCAR1) genannt und gehört einer kleinen Subgruppe der Bet v 1-Familie in Arabidopsis, bestehend aus 14 Mitgliedern, an. In entsprechenden *in vitro* Assays wurde gezeigt, dass RCAR1 die Fähigkeit besitzt, bei Anwesenheit von Abscisinsäure die Phosphataseaktivität von ABI2 zu inhibieren und damit die nachfolgende ABA-induzierte Genexpression zu regulieren (Ma et al., 2009). Nachdem in den letzten Jahren diverse Proteine als ABA-Rezeptoren vorgestellt wurden, aber nicht eindeutig deren Fähigkeit ABA zu binden und nachfolgende Antworten auf das ABA-Signal zu regulieren bewiesen wurde bzw. die in der Pflanze ablaufende ABA-Signaltransduktion in ihrer Gesamtheit nicht erklärt werden konnte (siehe Punkt 1.4.1), war es nun also gelungen, den ABA-Rezeptor bzw. den Rezeptorkomplex zweifelsfrei zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Wechselwirkung bzw. Bindung zwischen RCAR- und PP2C-Proteinen sowie der Mechanismus dahinter über eine Aufklärung der Kristallstruktur näher untersucht werden.

2.3.1. Optimierung der Expression von ABI2 und diversen RCARs in *E. coli*

Ein erster Schritt dazu ist die Verfügbarkeit ausreichender Mengen reiner Proteine, dazu wurde eine ausführliche Optimierung der rekombinanten Expression von Arabidopsis-Proteinen in *E. coli* durchgeführt.

2.3.1.1. Proteinexpression im pQE-System

In vitro-Tests wurden mit rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden ausgehend von cDNA (*Arabidopsis thaliana*) über PCR die entsprechenden Gene amplifiziert und in Expressionsvektoren von Qiagen kloniert (Ma, Y.). Das heterologe QIAexpress[®]-System mit den Vektoren pQE-30 und pQE-70

Ergebnisse

(6xHis N- bzw. C-terminal) erlaubt eine anschließende Aufreinigung der im bakteriellen System exprimierten sechsfach Histidin-markierten Proteine über Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) mit Ni-NTA oder Ni-TED-Säulen.

Die Expression basiert auf einem T5-Promotor/*lac*-Operator Transkriptions-Translations-System. Als Expressionsstamm dient in fast allen Fällen M15 [pREP4], welcher das pREP4-Plasmid enthält und so das *lac*-Repressor-Protein konstitutiv exprimiert. Induziert wird die Expression des gewünschten Gens über Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG), welches an das *lac*-Repressor-Protein bindet und es inaktiviert, so dass die *E. coli* RNA-Polymerase die auf den Promotor folgende Sequenz transkribieren kann. Nach Expression und Aufreinigung erfolgte die Identifizierung der Proteine nach Färbung von SDS-PAGE-Gelen und immunologischem Nachweis (*Western Blot*).

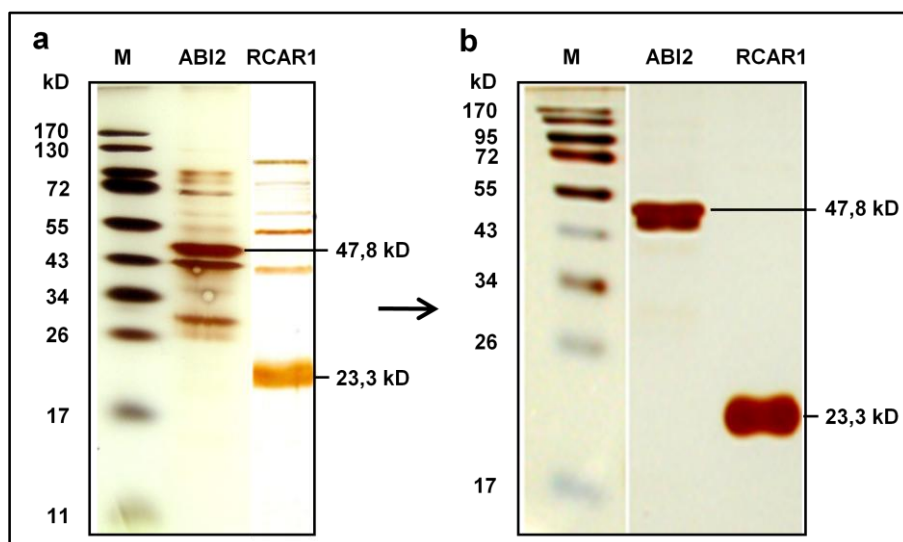


Abb. 2.23: SDS-PAGE der Proteine ABI2 und RCAR1.

Die Proteine wurden für 4 h (RCAR1) bzw. 2h (ABI2) nach Induktion durch 0,75 mM IPTG im pQE-System exprimiert. Nach SDS-PAGE wurden die denaturierten und aufgetrennten Proteine über die Methode der Silberfärbung sichtbar gemacht. Abgebildet sind jeweils 1 μ g RCAR1 und 0,5 μ g ABI2 neben dem Marker M von 11 bzw. 17 bis 170 kD. (a) zeigt die Proteine nach einfacher IMAC-Aufreinigung, (b) nach zweifacher Aufreinigung und Dialyse. Auch hier ist noch deutlich die Doppelbande bei ABI2 zu sehen.

Konstrukt	Resistenz	Stamm	max. Ausbeute (pro l Kultur)	Bedingungen	#
pQE-30 RCAR1	Amp	XL1 blue	300 μ g	37°C, 4 h	2023
pQE-70 ABI2	Amp, Kan	M15 [pREP4]	150 μ g	37°C, 2 h	1168

Das pQE-System führt bei RCAR8 und RCAR11 zu hohen Ausbeuten von bis zu 5 μ g/ μ l aus 1 Liter Kultur, die für die vorgesehenen weiteren Untersuchungen ausreichend sind. Die im beschriebenen bereits optimierten System exprimierte Menge an rekombinantem Protein sowie die erhaltene geringe Reinheit vor allem bei ABI2

(2. Bande, Abbildung 2.23) ist dagegen nur ausreichend für Experimente wie Phosphatase-Assays.

Bei einer massenspektrometrischen Untersuchung über MALDI-TOF-MS/MS nach Verdau der Proteine mit Trypsin bzw. der V8-Protease sollte aufgrund des gemessenen Peptidmusters die Identität der einzelnen Proteine in der Lösung bestimmt werden (Mascot Search). Dabei konnte mit einer Sequenzabdeckung von 81% bestätigt werden, dass es sich bei der 23,3 kD-Bande tatsächlich um RCAR1 handelt, Verunreinigungen der über IMAC aufgereinigten Proteinlösung durch unspezifische *E. coli*-Proteine waren kaum ausmachbar.

Bei ABI2 war es nötig zu ermitteln, ob es sich bei der zweiten Bande dicht unterhalb der eigentlich erwarteten von 47,8 kD um ein Abbauprodukt von ABI2 oder ein unbekanntes *E. coli*-Protein handelt. Die Bande zwischen 47 und 48 kD konnte mit einer Sequenzabdeckung von 37% als ABI2 identifiziert werden (siehe Abb. 2.23), die 44 kD-Bande enthält ebenfalls ABI2 (28%). Die 38 kD entsprechen einer Verunreinigung von *lac*-Repressor-Protein aus *E. coli* (Sequenzabdeckung 28%). Desweiteren wurden in der ABI2-Probe noch andere unspezifische Proteine wie eine D-Aminosäure-Dehydrogenase identifiziert. Sehr wahrscheinlich ist, dass das Protein mit einer Größe von 44 kD durch einen alternativen Startpunkt in der Sequenz von ABI2 entsteht und eine verkürzte Form von ABI2 darstellt. Da es kaum möglich ist, die Proteine, welche beide eine Histidin-Markierung tragen, voneinander zu trennen, wurden alternative Methoden der Expression getestet (siehe 2.3.1.2), um ausreichende Mengen an möglichst reinem Protein zu erhalten, welches für die Untersuchung des Mechanismus der Interaktion RCAR-ABA-PP2C sowie für die Strukturaufklärung der einzelnen Proteine und des Rezeptorkomplexes benötigt wurde. Dazu wurden zum einen die Proteine verkürzt und Vektoren mit Schnittstellen zur Abspaltung der 6xHis-Markierung versehen, um die Kristallisation zu fördern, zum anderen wurden mehrere neue Expressionssysteme getestet.

2.3.1.2. Etablierung weiterer Expressionssysteme sowie Proteinverkürzung

pRSET A His6 TEV

Die Expression im pRSET-System von Invitrogen wird durch den T7-Promotor kontrolliert. Eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors, welcher durch die Zugabe von IPTG induziert wird. Nach Inaktivierung des *lac*-Repressor-Proteins bindet dann die exprimierte RNA-Polymerase

an den T7-Promotor und startet die Transkription des einklonierten Genes. Ebenso wie beim pQE-System findet eine sechsfache Histidin-Markierung (N-terminal) des gewünschten Proteins statt, was die Aufreinigung des Proteins über Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht. Der ursprüngliche Vektor pRSET A enthält eine Erkennungssequenz für die Enterokinase, welche hier durch eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease (ENLYFQ-G) ersetzt wurde, um nach Aufreinigung die z.B. bei Kristallisation störenden sechs Histidine abzuspalten. Als Expressionsstamm, der das *lac*-Gen beinhaltet, wird z.B. BL21 (DE3) vorgeschlagen. Ist im *E. coli*-Stamm außerdem T7-Lysozym integriert (pLysS), erfolgt eine Bindung der geringen Menge an vor Induktion gebildeter RNA-Polymerase in Form eines Komplexes mit Lysozym, eine Expression toxischer Gene vor dem Erreichen einer bestimmten Zelldichte kann so wirksam unterbunden werden. Dies ist beispielsweise für Phosphatasen angebracht, da sie in das Signaltransduktionsnetzwerk der Zellen durch Dephosphorylierung bakterieller Proteine eingreifen. Dies dürfte auch die Ursache dafür sein, dass die Expressionsrate vor allem bei ABI2 sehr gering ist. Daher ist ein effektives Repressorsystem wichtig, um die basale Expression zu minimieren und damit das Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Außerdem wird die Zellyse vor der Aufreinigung vereinfacht, da das Lysozym die Peptidglycanschicht der Zellwand beeinträchtigt. Auch der Vektor pQE-30 His6 TEV enthält eine TEV-Erkennungssequenz, um Aminosäuremarkierungen vor der Kristallisation abzuspalten.

IMPACT™-System

Das IMPACT™-System (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) von NEB basiert auf der Expression aus einem pTYB-Vektor unter Kontrolle des T7-Promotors (*lacI*-Gen auf Vektor), die Induktion erfolgt wie oben bereits beschrieben mit IPTG. Die Aufreinigung der Proteine, welche C-terminal eine Intein-Markierung mit induzierbarer Selbstabspaltungsaktivität und Chitin-Bindedomäne tragen, erfolgt über eine Chitin-Säule. Bei Anwesenheit von Thiolen wie DTT oder β -Mercaptoethanol spaltet sich das Intein selbst ab und führt so zu einer Freisetzung und Elution des gewünschten Proteins.

Dieses System wurde zum einen verwendet, um ein anderes Aufreinigungssystem zu testen, zum anderen aber auch um durch N-terminale Fusion eines 6x-Histidin-Peptids samt TEV-Schnittstelle (aus pRSET-Konstrukten) die Möglichkeit einer zweiten Aufreinigung basierend auf IMAC zu eröffnen und gleichzeitig auch diese Markierung abspalten zu können. Damit sollte eine eventuell höhere Expressionsrate, vor allem aber eine besonders hohe Reinheit des Proteins erreicht werden.

pET-System

Beim pET-System von Novagen wird die Expression wiederum über ein T7/*lac*-Promotor-System kontrolliert, induzierbar durch IPTG wie oben beschrieben. Verwendet wurden die Vektoren pET-21a(+) und pET-24a(+), sie beinhalten in der Expressionskassette nach T7-Promotor, *lac*-Operator und ribosomaler Bindungsstelle zusätzlich eine T7-Markierung, welche in dem Fall nicht beansprucht und über Klonierung mit den entsprechenden Enzymen herausgeschnitten wurde, die sechsfache Histidin-Markierung befindet sich C-terminal. Als Expressionsstamm wird Rosetta™(DE3)pLysS vorgeschlagen, er enthält auf dem gleichen Plasmid, auf dem die tRNAs liegen, zusätzlich ein Gen, welches für T7-Lysozym codiert. Dieses reduziert die basale Expression von T7-RNA-Polymerase und verstärkt somit die Repressorwirkung des Systems. Zusätzlich ist der Stamm für die Expression eukaryotischer Gene optimiert, da er Gene für sechs weitere in *E. coli* seltene tRNA-Spezies (für die Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) trägt, womit die Expression, die durch die Codon-Verwendung von *E. coli* limitiert sein kann, verbessert wird.

Coexpression von Phosphatase und RCAR unter ABA-Anwesenheit

Da die Expression ausreichender Mengen an reinem ABI2 in sämtlichen getesteten Systemen scheiterte, bestand ein neuer Ansatzpunkt darin, die Phosphatase gemeinsam mit einem RCAR-Protein in ein und derselben Zelle zu exprimieren. Da man *in vitro* bereits zeigen konnte, dass ABI2 von RCAR11, welches sich sehr gut in fast jedem System exprimieren lässt, bei Anwesenheit von S(+)-ABA stark inhibiert wird, ist es durchaus denkbar, dass bei Expression beider in einer Zelle bei gleichzeitiger Anwesenheit von ABA in der Zelle die für die Bakterienzelle toxische Phosphatase im ABA-Rezeptor-Komplex inaktiv vorliegt, somit keine schädigende Wirkung mehr auf die Signaltransduktion in der Bakterienzelle nimmt und so in größeren Mengen produziert werden kann. Dazu war es nötig, Plasmide in die Expressionszelle einzubringen, die unterschiedliche Antibiotika-Resistenzen besitzen, da sonst im Laufe der Zellteilung ein Plasmid von den Bakterien ausgeschleust werden würde. Dazu wurde das bereits beschriebene pET-System verwendet: einmal der pET-21a(+)-Vektor mit Ampicillin-Resistenz und zum anderen der pET-24a(+)-Vektor mit Kanamycin-Resistenz. Durch Cotransformation in chemisch kompetente Rosetta (DE3) pLysS bzw. BL21 (DE3) und anschließende Selektion auf LB-Medium (Amp, Kan, Cam) war es möglich Klone mit beiden Plasmiden zu isolieren. Beide Möglichkeiten der Kombination pET21-PP2C + pET24-RCAR und pET21-RCAR + pET24-PP2C wurden getestet. Zur Expression wurde schon vor der Induktion mit IPTG S(+)-ABA (bis zu 1

mM) zugegeben, um eine ausreichende Aufnahme von ABA in die Bakterienzellen zu gewährleisten. Um auch die selektive Aufreinigung nur eines Proteins zu ermöglichen, wurden ebenso Konstrukte hergestellt, die keine His-Markierung enthalten und diese zusammen mit dem jeweils anderen His-markierten Protein exprimiert.

Bei der Phosphatase ABI2 gestaltete sich die Optimierung in anderen Systemen sehr schwierig, verkürzte Konstrukte konnten nur schlecht exprimiert werden, zumindest nicht ausreichend für die Kristallisation, wofür bis zu 4 mg Protein pro Ansatz nötig waren. Erst die Coexpression zusammen mit RCAR-Proteinen verbesserte die Ausbeute an ABI2 wesentlich, es konnte die fünf- bis zehnfache Menge an rekombinantem Protein im Vergleich zum pQE-System erhalten werden (siehe Abb. 2.24). Am besten funktionierte hier das System pET-21a(+) ABI2 zusammen mit pET-24a(+) RCAR11 für 2h bei 37°C (0,75 mM IPTG; 0,5 mM (S)-ABA), das zu 2 mg ABI2 pro Liter Kultur führte. Außerdem konnte die Menge an verkürztem mitexprimiertem ABI2 (44 kD-Bande Abb. 2.23) sowie die Anwesenheit des *lac*-Repressor-Proteins nach der Aufreinigung über IMAC deutlich reduziert werden. Eine Aufstellung aller getesteter Systeme, klonierter und exprimierter Proteine sowie optimierter Expressionsbedingungen findet sich im Anhang 5.2.

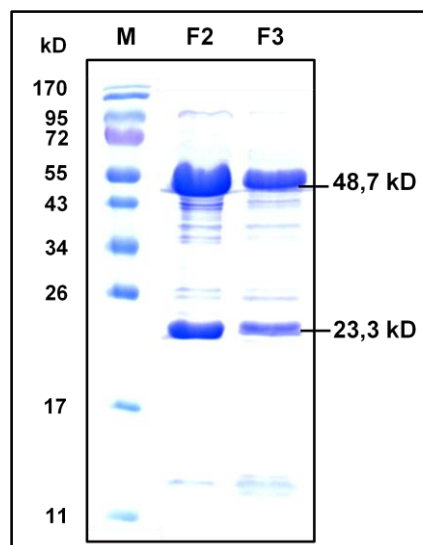


Abb. 2.24: SDS-PAGE von ABI2, coexprimiert mit RCAR11.

Die Proteine wurden für 2 h bei 37°C nach Induktion durch 0,75 mM IPTG bei Anwesenheit von 0,5 mM (S)-ABA im Medium in BL21 (DE3)-Zellen exprimiert. Nach SDS-PAGE wurden die denaturierten und aufgetrennten Proteine über die Methode der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Beide Proteine tragen in dem Fall die 6xHis-Markierung. Abgebildet sind Aliquots der Fraktionen 2 und 3 (0,75 ml/Fraktion) aus der einfachen Aufreinigung einer 400 ml-Kultur über Ni-TED neben dem Marker M (11 bis 170 kDa). Die Ausbeute von ABI2 im Vergleich zum pQE-System ist bis zu zehnfach.

2.3.1.3. Funktion der RCARs und Einfluss auf die Phosphataseaktivität

Der genaue Mechanismus der ABA-Perzeption war bislang nicht bekannt, es konnte zwar gezeigt werden, dass die Aktivität der negativ-regulatorischen PP2Cs ABI1 und ABI2 durch ABA auf ca. 80% gesenkt wird, jedoch in nicht-stereoselektiver Weise und ohne dass Bindung von ABA an die Phosphatasen nachgewiesen werden konnte (Leube et al., 1998). Zur ABA-Rezeption fehlte die Komponente, die sowohl hohe Affinität als auch Stereoselektivität zum Liganden bietet.

Die Interaktion zwischen PP2C-Proteinen und RCAR-Proteinen wurde über den Ansatz eines *Yeast Two-Hybrid* Screens zur Suche nach ABI2-Interaktionspartnern aufgedeckt (Yang, 2003). Zwei der dabei identifizierten Proteine mit unbekannter Funktion (RCAR1 und RCAR3 benannt) wiesen hohe Sequenzähnlichkeit auf. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Aminosäureaustausch (G→D) in den *abi*-Mutanten, der die Phosphataseaktivität von ABI1 und ABI2 stark beeinträchtigt, die Interaktion mit RCAR-Proteinen fast ganz aufgehoben wurde (Ma et al., 2009). Damit stellte sich die Frage, inwiefern die RCAR-Proteine als Interaktionspartner der negativen Regulatoren ABI1 und ABI2 eine Rolle in der ABA-Signaltransduktion spielen. Tatsächlich konnte durch Isothermale Titrationskalorimetrie nachgewiesen werden, dass RCAR1 und RCAR3 in der Lage sind, die physiologisch aktive (S)-ABA in einer exothermen Reaktion zu binden, und zwar bei Anwesenheit von ABI1 bzw. ABI2 mit einer zehnfach höheren Dissoziationskonstante (Ma et al., 2009; Szostkiewicz et al., 2010). Das bedeutet, dass bei Vorliegen eines RCAR-PP2C-Komplexes die Bindungsaffinität für (S)-ABA deutlich erhöht ist. Bei Untersuchung der PP2C-Phosphataseaktivität in einem Assaysystem, das auf dem fluoreszenzspektroskopischen Nachweis von Methylumbelliferon beruht, welches durch Abspaltung von Phosphat freigesetzt wird, wurde festgestellt, dass es keine Änderung der Phosphataseaktivität bei Zusatz von RCAR-Protein oder (S)-ABA gibt, wenn jedoch alle drei Komponenten im Ansatz vorliegen, wird die Phosphataseaktivität inhibiert (siehe Abb. 2.25).

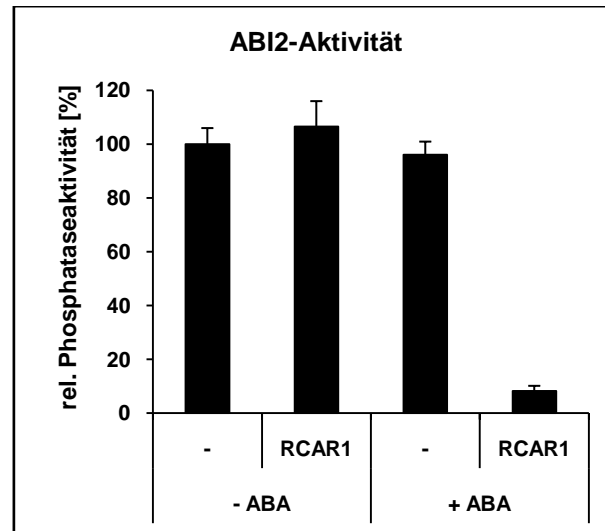


Abb. 2.25: Phosphataseaktivität von ABI2, inhibiert durch RCAR1 und (S)-ABA.

Bei einem molaren Verhältnis von ABI2:RCAR1 = 1:2 wird die Phosphataseaktivität von ABI2 erst bei Anwesenheit von 10 μM (S)-ABA auf ca. 8% herunter reguliert. Wenn nur RCAR1 oder nur (S)-ABA im Ansatz neben ABI2 vorhanden ist, bleibt die Aktivität erhalten. Dargestellt sind relative Werte, bezogen auf den Wert der Aktivität von ABI2 allein ($n = 3$).

2.3.2. Regulation der Aktivität von Phosphatasen durch RCARs und Homologe

RCAR1 ist in der Lage, bei gleichzeitiger Anwesenheit von ABA und nur dann, die Phosphataseaktivität von ABI1 und ABI2, beides Proteine aus der Subgruppe A der PP2Cs, zu regulieren. Abhängig von der RCAR- und der ABA-Konzentration kann diese Regulation unterschiedlich ausfallen. Bei Anwesenheit und Bindung von ABA an RCAR ist dieses in der Lage, die Aktivität der negativen Regulatoren des ABA-Signalwegs zu inhibieren, was zu einer Aktivierung von positiv wirkenden Komponenten der ABA-Signaltransduktion wie Kinasen führt. ABA-abhängige Pflanzenantworten werden so in Gang gesetzt. Da die Subgruppe A der PP2Cs aus neun und die RCAR-Proteinfamilie aus 14 Mitgliedern besteht, ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten von Interaktionskombinationen, die sich sowohl in der Stereoselektivität als auch in der ABA-Sensitivität des Rezeptorkomplexes unterscheiden können. Abhängig von Wirkort, Entwicklungsstand oder entsprechenden exogenen Faktoren können sich spezifische Interaktionspaare ergeben. Betrachtet man die Transkriptrate verschiedener RCARs, kann man beispielsweise erhöhte Expression von RCAR3 im Xylem von der starken Expression von RCAR11 im Samen unterscheiden. Bei Behandlung der Pflanze mit Abscisinsäure werden RCAR3 und RCAR11 herunterreguliert, während das Expressionslevel von RCAR1 leicht angehoben wird. Bei osmotischem Stress verhält es sich ähnlich. Exogen verabreichte Abscisinsäure sowie

äußere Umstände wie Salzstress oder Trockenheit, die zu einem Anstieg von endogener Abscisinsäure führen, bewirken größtenteils eine Herabregulation der RCAR-Expression bis zu einem Faktor von 25, die Expression von Phosphatasen wie ABI2 dagegen wird meist sowohl durch ABA als auch durch osmotischen Stress bis zu 75-fach hochreguliert (Genevestigator Datenbank (Zimmermann et al., 2005)). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation verschiedener Proteinphosphatasen 2C durch unterschiedliche RCARs charakterisiert werden, sowie ein Einfluss RCAR-homologer Proteine der Bet v 1-Superfamilie auf Phosphatasen der Arabidopsis-Abscisinsäuresignaltransduktion getestet werden.

2.3.2.1. Regulation von ABI2 durch RCAR11

Zusätzlich zu der unter Punkt 2.3.1.3 erwähnten Regulation der Phosphatasen ABI1 und ABI2 durch RCAR1 aus der Subgruppe I der RCAR-Familie wurde hier der Einfluss eines Proteins aus der Subgruppe III, RCAR11, auf die Phosphatase ABI2 untersucht. RCAR11 ist vor allem in Samen hoch exprimiert, was es von anderen Mitgliedern der RCAR-Familie unterscheidet. Fällt RCAR11 aus, schränkt dies die Reaktionsfähigkeit der betroffenen Samen auf ABA stark ein. RCAR11 konnte daher durch den Pyrabactin-insensitiven (Pyrabactin ist ein ABA-Agonist) Keimungsphänotyp einer RCAR11-Mutante (*pyr1-1*) unter Umgehung von Redundanzeffekten von Park et al. (2009) als Komponente des ABA-Signalwegs identifiziert werden.

In Abwesenheit von ABA findet keine Wirkung von RCAR11 auf die enzymatische Aktivität von ABI2 bei einem molaren Verhältnis von 1:2 (ABI2:RCAR11) statt (Abb. 2.26 a). Wird allerdings die physiologisch aktive (S)-ABA in einer Konzentration von 10 μM zur Verfügung gestellt, so inhibiert RCAR11 die Phosphataseaktivität auf 8 bis 5% der Ausgangsaktivität (100% entsprechen der Aktivität von ABI2 bei Abwesenheit von RCAR-Protein und ABA). Auch bei Zugabe des Enantiomers (R)-ABA wird die Phosphatase inhibiert, allerdings um einen Faktor von 3 geringer. *trans*-ABA zeigt hier keinen Effekt (Abb. 2.26 b). Die Stereoselektivität für (S)-ABA ist damit für den RCAR11-ABA-ABI2-Komplex eingeschränkt.

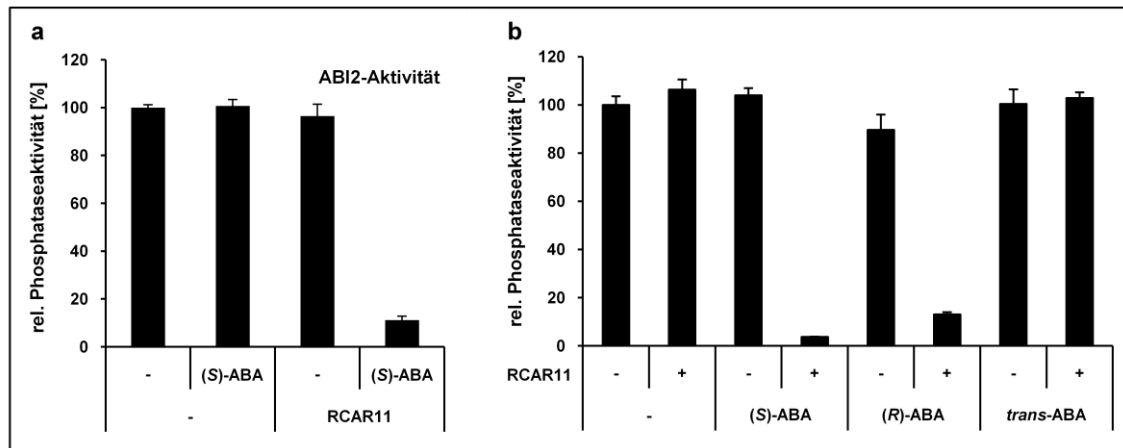


Abb. 2.26: Einfluss von RCAR11 auf die Aktivität von ABI2 in Abhängigkeit von ABA.

Eine Inhibition der Phosphataseaktivität von ABI2 erfolgt bei Anwesenheit von (S)-ABA (10 μ M) durch RCAR11 (molares Verhältnis 1:2; a). Gleiche Konzentration der (R)- und *trans*-Isomere bewirkt nur in ersterem Fall ebenfalls eine Reduktion der enzymatischen Aktivität von ABI2 (b). Die Versuche wurden mit 0,05 μ M ABI2 pro Ansatz durchgeführt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Messungen.

Mit steigender (S)-ABA-Konzentration bei konstantem molarem Verhältnis von ABI2 zu RCAR11 nimmt der Inhibierungsgrad zu (Abb. 2.27), die Regulation der Phosphataseaktivität erfolgt abhängig von der ABA-Konzentration. Das würde *in vivo* bedeuten, dass unter Normalbedingungen bei geringen ABA-Konzentrationen die Phosphatase als negativer Regulator durch Unterdrückung von Aktivierung weiterer Komponenten der Signaltransduktion wie Transkriptionsfaktoren durch Kinasen wirken kann. Unter Stressbedingungen steigt die ABA-Konzentration in den Zellen bis zu 50-fach an (siehe Abb. 2.13 bzw. Christmann et al. (2005)), was zu einer verstärkten Inhibierung der PP2Cs führt und somit zum Ablauf der ABA-Signaltransduktion und zur ABA-abhängigen Adaptierung der Pflanze an den Stress.

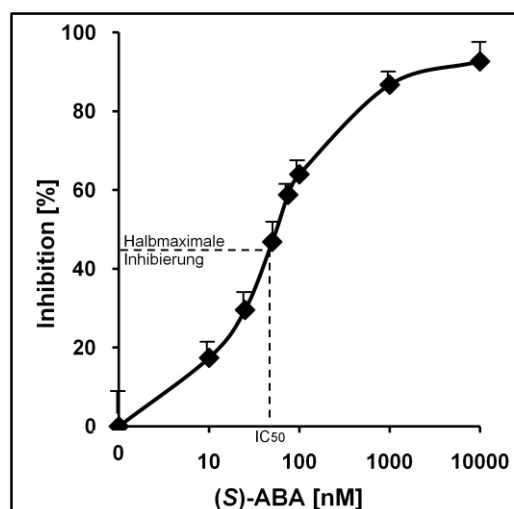


Abb. 2.27: Inhibierung von ABI2 in Abhängigkeit von der ABA-Konzentration.

Bei konstantem molarem Verhältnis von 1:2 (ABI2:RCAR11) und steigender ABA-Konzentration nimmt der Inhibierungsgrad stark zu. Die halbmaximale Inhibierung wird bei einer ABA-Konzentration von 60 nM, die dem IC₅₀-Wert entspricht (gestrichelte Linie), erreicht.

Um Aussagen über die Sensitivität der PP2C-Regulation treffen zu können, wurde die halbmaximale inhibitorische ABA-Konzentration bei verschiedenen molaren Verhältnissen von ABI2 zu RCAR11 bestimmt (IC_{50}). Dies erfolgte jeweils wie in Abb. 2.27 dargestellt bei gleichbleibenden Konzentrationen an Phosphatase (0,05 μ M) unter Variation des RCAR-Gehalts. Das Verhältnis PP2C zu RCAR hat großen Einfluss auf die Sensitivität der Regulation, bei ansteigendem RCAR-Anteil fallen die IC_{50} -Werte, was eine ABA-sensitivere Regulation der PP2C-Aktivität bedeutet (Abb. 2.28 a, molares Verhältnis geht gegen Null). Bei Senkung des RCAR-Anteils geht der Anstieg der IC_{50} -Werte mit einer weniger sensitiven Regulierung der Phosphatase einher. Der Schnittpunkt mit der y-Achse gibt Aufschluss über die minimale ABA-Konzentration, die bei einem theoretischen totalen Überschuss von RCAR zur Inhibierung der Phosphatase um 50% nötig wäre.

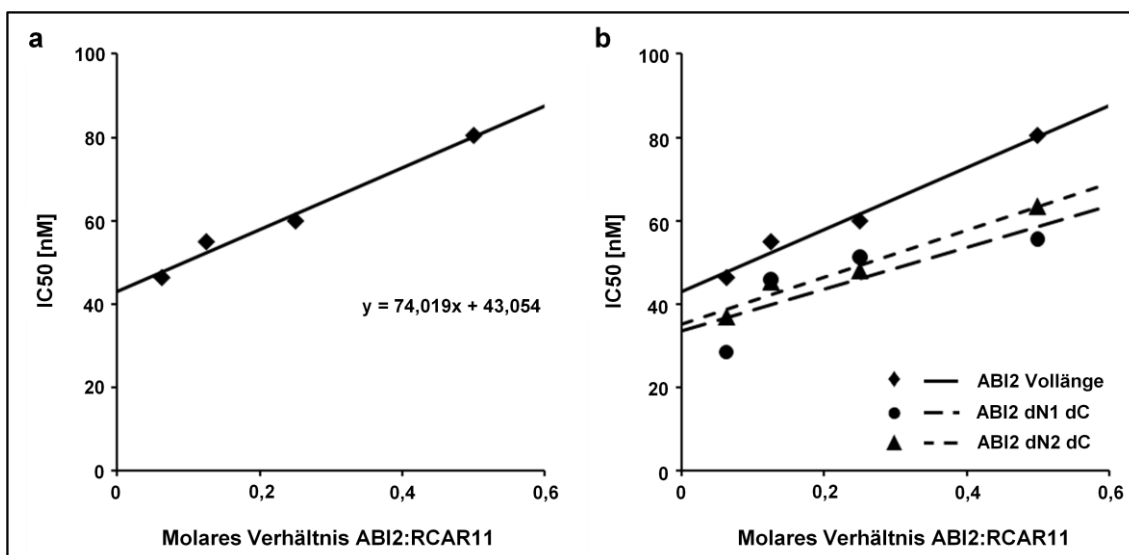


Abb. 2.28: Abhängigkeit der ABA-vermittelten PP2C-Inhibition vom Verhältnis der Komplexkomponenten.

ABI2 (a) bzw. N-terminale Deletionsversionen von ABI2 (b) (gleichbleibende Konzentration von 0,05 μ M) wurden mit RCAR11 steigender Konzentration versetzt und über eine ABA-Verdünnungsreihe jeweils die halbmaximale inhibitorische Konzentration bestimmt.

Um zu testen, ob der N-Terminus der Phosphatasen, welcher unter den einzelnen Mitgliedern der PP2C-Subgruppe A variabel ist, Einfluss auf die ABA-Sensitivität nimmt, wurden zwei verschiedene Deletionsversionen dN1 (Aminosäuren 52-411) und dN2 (Aminosäuren 89-411) mit der Vollängenversion von ABI2 (Aminosäuren 1-423) verglichen (Abb. 2.28 b). Beide Versionen unterscheiden sich in der Steigung nicht signifikant von der Volllänge, sie weisen jedoch grundsätzlich etwas niedrigere IC_{50} -Werte (5-20 nM) auf, was auf eine erhöhte Affinität der RCAR11-dABI2-Komplexe zu ABA und eine höhere Effizienz der ABA-vermittelten PP2C-Inhibition schließen lässt. Diese leicht erhöhte Affinität könnte mit dem Fehlen des in der Sekundärstruktur-

vorhersage (Jpred3, Punkt 2.3.3) als flexible Region eingestuften N-Terminus einhergehen. Der flexible Bereich könnte dazu führen, dass die Interaktion PP2C-RCAR sterisch behindert wird, ist dieser Bereich jedoch verkürzt, kann der Zugang zur Interaktionsstelle erleichtert sein.

Diverse Studien zur Ligandenbindung verschiedener Mitglieder der Bet v 1-Superfamilie zeigten ein breites Spektrum an möglichen Liganden, für Bet v 1 wurde unter anderem die Bindung von Brassinosteroiden und Cytokinin nachgewiesen (Fernandes et al., 2008; Koistinen et al., 2005; Mogensen et al., 2002; Pasternak et al., 2006). So wurde hier untersucht, ob auch andere Phytohormone außer Abscisinsäure durch RCAR-Proteine, in diesem Fall RCAR11, gebunden werden und so an der Regulation der Phosphatase ABI2 beteiligt sind, zumal unterschiedliche Phytohormone bei vielen Prozessen oft zusammen- oder entgegenwirken. Beispielsweise zeigten Analysen, dass Brassinosteroide und Abscisinsäure bei der Regulation der Genexpression interagieren. Dabei zeigte sich, dass exogene ABA den Brassinosteroid-Signalweg inhibiert und die Regulation abhängig von ABI1 und ABI2 ist (Zhang et al., 2009). Getestet wurden verschiedene Brassinosteroide, Jasmonsäure-Derivate, Auxine, Gibberellinsäure, Kinetin und strukturverwandte Verbindungen sowie die Ethylenvorstufe ACC und Salicylsäure.

Keine der Verbindungen, jeweils in physiologisch vorkommenden Konzentrationen eingesetzt, führte zu einer Veränderung der Phosphataseaktivität. Abb. 2.29 zeigt *in vitro* Tests mit einigen ausgewählten Substanzen, verwendet einzeln bzw. zusammen mit (S)-ABA, welches bei einer Konzentration von 0,3 μM bei RCAR11-Anwesenheit zu einer Reduktion der ABI2-Aktivität um ca. 60% führt. Durch den gewählten Versuchsansatz wären sowohl additive Effekte durch das zusätzliche Phytohormon als auch einschränkende Wirkungen auf die ABA-vermittelte Inhibierung zu beobachten gewesen. Es konnte jedoch keine Wechselwirkung mit Abscisinsäure bei deren Erkennung durch den RCAR-PP2C-Komplex festgestellt werden. Das heißt, Abscisinsäure führt durch die Bindung an RCAR zur Regulation der Phosphataseaktivität, ohne dabei von anderen Phytohormonen in seiner Bindung an das RCAR-Protein beeinflusst zu werden.

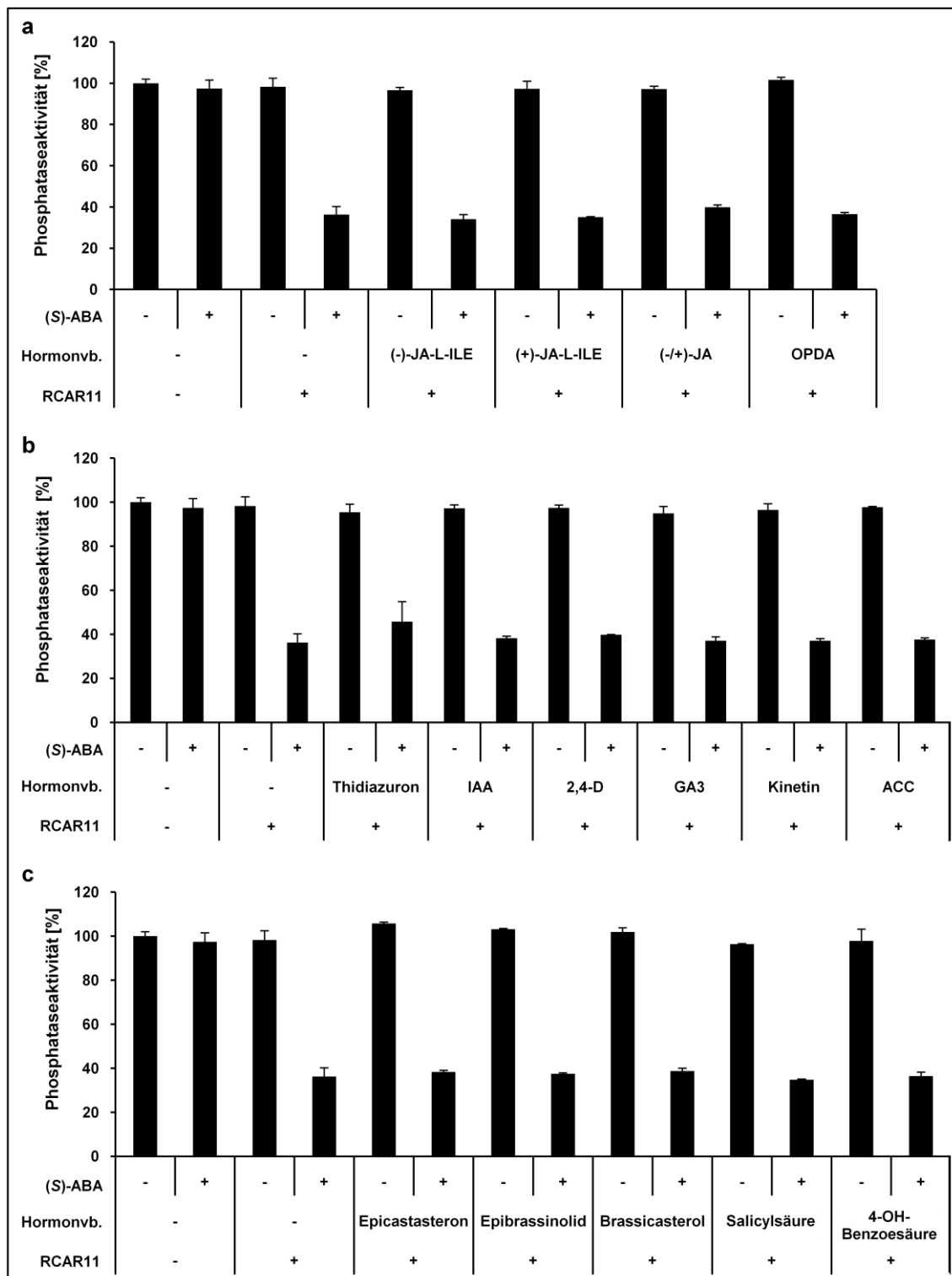


Abb. 2.29: Regulation der ABI2-Aktivität durch RCAR11 und ABA unter Zusatz von anderen Phytohormonen.

Bei einem konstanten molaren Verhältnis von 1:2 (ABI2:RCAR11) wurde die Wirkung weiterer Pflanzenhormone untersucht. Es ist jeweils die Phosphataseaktivität bei Zugabe des jeweiligen Phytohormons ohne und mit 0,3 μM (S)-ABA dargestellt. Als Referenzwert dient die Phosphataseaktivität von 0,05 μM ABI2 ohne RCAR11 und Ligand.

(a) Jasmonsäureverbindungen (10 μM). (b) IAA und synthetische Auxine (50 μM), Gibberellinsäure (10 μM), Aminocyclopropanensäure (1 μM), und Cytokinine (10 μM). (c) Brassinosteroide (80 μM) sowie Salicylsäure und die physiologisch inaktive 4-Hydroxybenzoessäure (10 μM).

2.3.2.2. Differentielle Regulation unterschiedlicher Phosphatasen durch verschiedene RCARs

RCAR11 reguliert *in vitro* die Phosphatase ABI2 ABA-abhängig, die Fähigkeit von RCAR11 zur Regulation anderer Phosphatasen aus der Subgruppe A der PP2Cs wurde ebenfalls untersucht. Außerdem wurden weitere RCARs in die Analysen miteinbezogen, um deren Effekt im Vergleich zu RCAR11 auf ABI2 und im Hinblick auf die Stereoselektivität der PP2C-Inhibierung zu überprüfen.

Vergleicht man die Genexpression der im Versuch verwendeten Phosphatasen 2C aus der Subgruppe A untereinander (Genevestigator-Datenbank), kann man feststellen, dass diese bei den vier getesteten Phosphatasen relativ spät in der Entwicklung hochreguliert wird, vor allem in reifen Schoten und seneszierenden Blättern. Die Hochregulation der Expression in Keimlingen bei 10 μ M ABA erfolgt 60-fach für ABI2 (At5g57050), HAI2 (AIP1, At1g07430) und ABI1 (At4g26080) folgen mit Faktoren von 24 und 13. Bei Trockenstress werden vor allem HAI2 und ABI2 in der Pflanze hochreguliert, ABI1 dagegen nur sehr schwach (1,8-fach). AHG3 (PP2CA, At3g11410) wird unter diesen Bedingungen um Faktoren von 8 bzw. 10 hochreguliert. Der Hochregulation der Phosphatasen steht die Herabregulation der meisten RCARs durch ABA und ABA-induzierende Stressbedingungen gegenüber. RCAR11, vor allem in keimenden Samen und jungen Keimlingen exprimiert, wird durch ABA leicht herunterreguliert (0,37-fach), bei Trockenheit schwach hochreguliert (1,3-fach). Auch RCAR3 und 12 werden durch ABA 0,4- bzw. 0,5-fach herunterreguliert, RCAR1 dagegen um den Faktor 1,7 hochreguliert. Durch Trockenheit werden RCAR1, 3 und 12 nur schwach herunterreguliert. RCAR1 und RCAR3 (Subgruppe I) sowie RCAR12 (wie RCAR11 Subgruppe III) werden während der gesamten Pflanzenentwicklung exprimiert, ein erhöhtes RCAR1-Level besteht vor allem in der Blütezeit sowie später in den Samenschalen. RCAR3 und 12 dagegen werden bis zur Samenbildung exprimiert, in reifen Schoten sinkt die Expressionsrate dagegen stark ab. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Genexpression könnten auf differentielle Regulation bei den verschiedenen Paarungen hindeuten.

Im Vergleich zu ABI2 (Abb. 2.30 a), deren enzymatische Aktivität durch RCAR11 bei Abwesenheit von (S)-ABA kaum, bei Anwesenheit (10 μ M) jedoch um 92-95% inhibiert wird (molares Verhältnis 1:2), inhibiert RCAR11 schon ohne ABA die Phosphatase ABI1 um 20 bis 25% (Abb. 2.30 b), Zugabe von (S)-ABA wirkt sich nicht mehr ganz so stark aus, es bleibt eine Restaktivität von 20%. AHG3 wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von (S)-ABA und RCAR11 um 55% inhibiert, HAI2 nur um 30% (Abb. 2.30 c und d). So werden durchaus Unterschiede in der Regulation der Phosphatasen

durch RCAR11 deutlich, RCAR11 kann PP2Cs wie ABI1 und ABI2 sehr effektiv in Anwesenheit von (*S*)-ABA inhibieren, andere wie AHG3 und HAI2 dagegen benötigen für die gleiche Inhibierung eine höhere Konzentration an RCAR11.

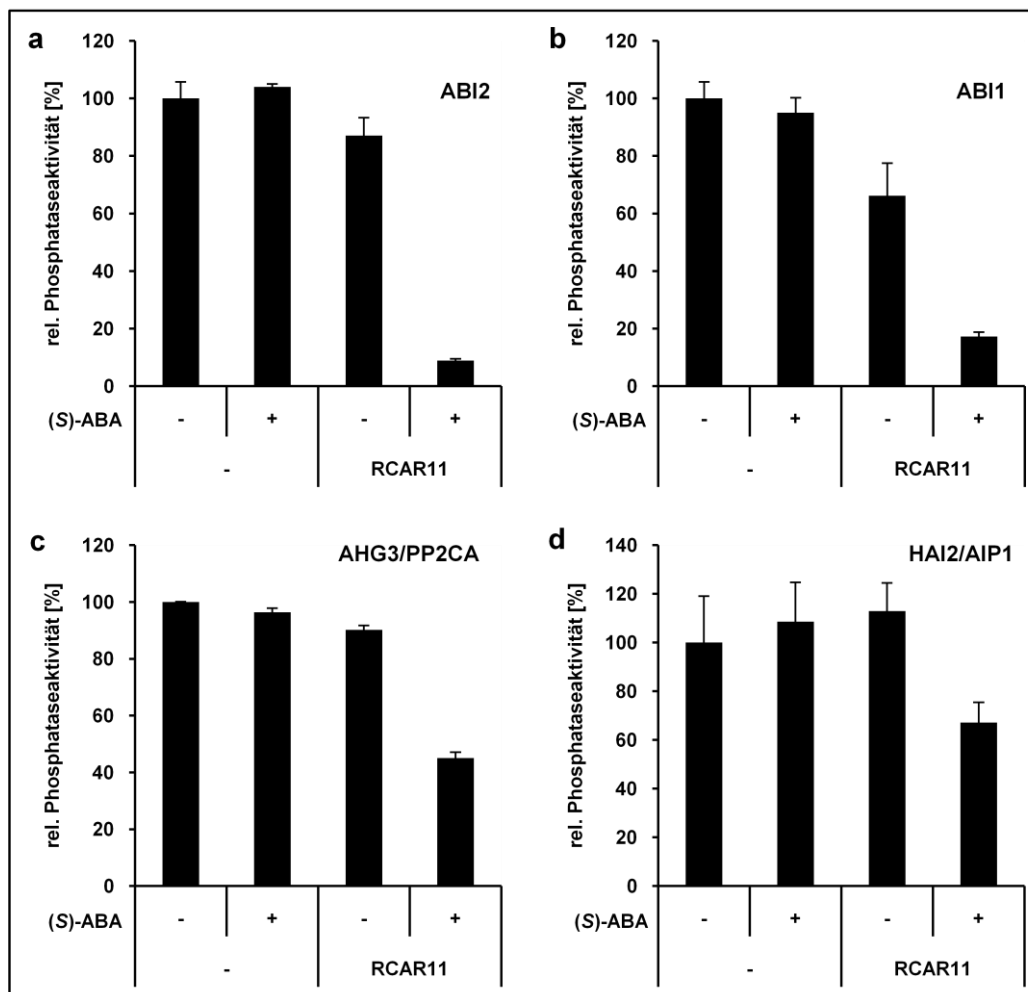


Abb. 2.30: Einfluss von RCAR11 auf verschiedene Phosphatasen.

Dargestellt sind im Vergleich ABI2 (a), ABI1 (b), AHG3 (c) und HAI2 (d). Bei einem konstanten Level von 0,05 μM PP2C und einem 1:2-Verhältnis von PP2C zu RCAR11 wurde die Phosphataseaktivität bei \pm 10 μM (*S*)-ABA ermittelt und auf die Kontrolle ohne RCAR und ABA bezogen.

Die Wirkung von RCAR11 auf die ABI2-Aktivität wurde nun mit der von den RCARs 1, 3 und 12 verglichen und die Stereoselektivität für die physiologisch aktive (*S*)-ABA-Form überprüft (Abb. 2.31).

Die für den RCAR11-ABI2-Komplex (Abb. 2.26 b) schon bei einem molaren Verhältnis von ABI2 zu RCAR von 1:2 beobachtete wenig stark ausgeprägte Stereoselektivität für die natürlich vorkommende (*S*)-Form der Abscisinsäure mit einer starken Inhibierung von ABI2 auch durch die (*R*)-Form trat auch bei einem molaren Verhältnis von 1:4 auf (Abb. 2.31 c). Die Restaktivität der Phosphatase betrug 8% bei 10 μM (*S*)-ABA und 15% bei 10 μM (*R*)-ABA, allerdings führt hier auch 10 μM *trans*-ABA zu einer Reduktion der Phosphataseaktivität um 40%, was zuvor nicht festgestellt werden

konnte. Der RCAR1-ABI2-Komplex (Abb. 2.31 a) weist dagegen fast absolute Stereoselektivität für (S)-ABA auf, 4% Restaktivität stehen 70% bzw. 80% bei (R)- und *trans*-Isomeren gegenüber. Wenig stereospezifisch verläuft die Regulation der Phosphatase beim RCAR3-ABI2-Komplex (Abb. 2.31 b), auch (R)- und *trans*-ABA führen zu starker Inhibition der Phosphatase, wenn auch mit einer um den Faktor 6 bzw. 10 geringeren Sensitivität als bei (S)-ABA. Im RCAR12-ABI2-Komplex inhibieren (R)- und (S)-Form ABI2 (Abb. 2.31 d), fast gleich um 59% bzw. 65%, während *trans*-ABA kaum zu einem Effekt (nur 4% Inhibierung) führt.

Demnach ist die Bindungsaffinität für unterschiedliche ABA-Isoformen abhängig davon, welches RCAR als Corezeptor im Komplex mit der Phosphatase vorliegt. Je nach Kombination ist für die Inhibition von ABI2 eine geringere oder höhere Konzentration von (S)-ABA nötig, manche Komplexe sind hochaffin und sehr sensitiv für (S)-ABA, z.B. RCAR1-ABI2, während andere wie RCAR3-ABI2 weniger stereospezifisch zur Inhibition der Phosphataseaktivität führen.

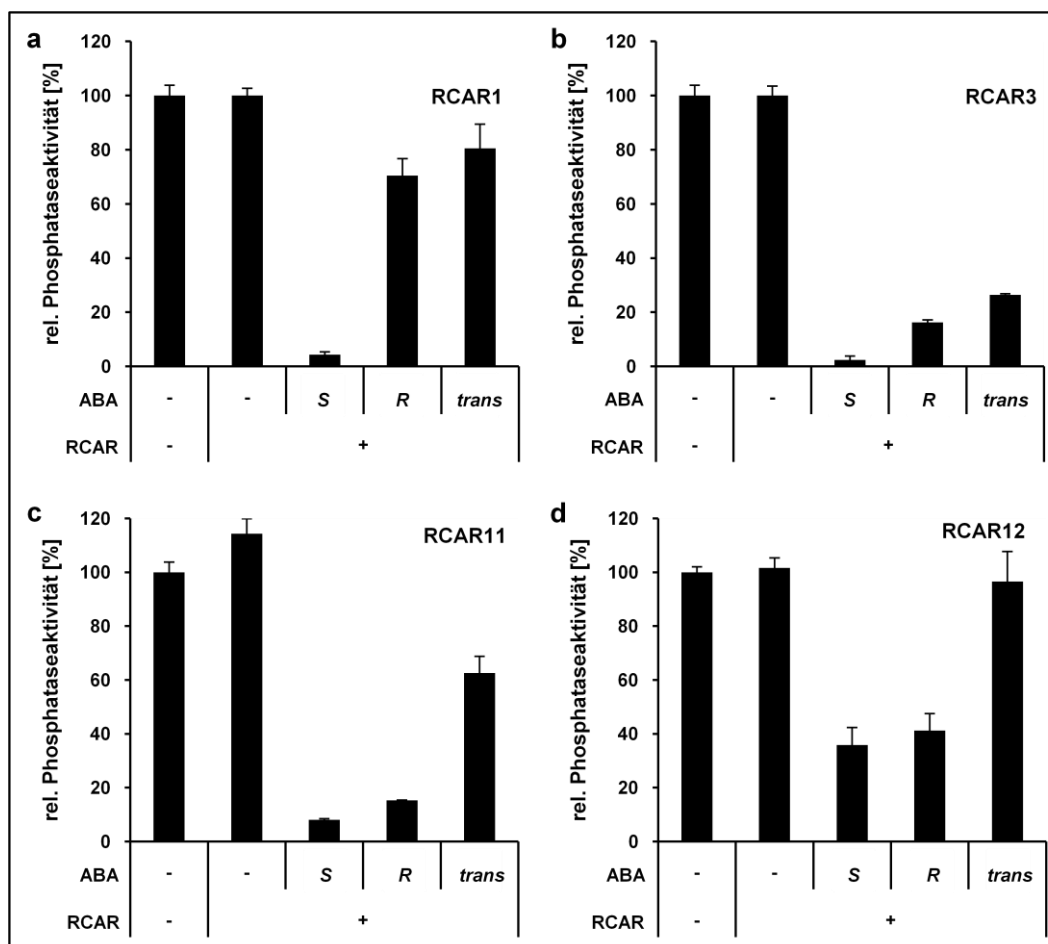


Abb. 2.31: Einfluss unterschiedlicher RCARs der Subgruppen I und III auf die ABI2-Aktivität bei Zugabe von (S)-, (R)- und *trans*-ABA.

Verglichen wird die Regulation der Phosphataseaktivität von ABI2 im Komplex mit RCAR1 (a), RCAR3 (b), RCAR11 (c) und RCAR12 (d) bei einem konstanten molaren Verhältnis von ABI2:RCAR von 1:4 mit 0,05 μM ABI2 pro Ansatz. Die eingesetzte Konzentration der ABA-Isomeren beträgt jeweils 10 μM .

Um die Sensitivität und Effektivität der PP2C-Regulation genauer zu untersuchen, wurden für die Kombinationen ABI2 bzw. ABI1 mit RCAR1 bzw. RCAR3 bei variierenden molaren Verhältnissen, wie bereits unter Punkt 2.3.2.1 erläutert, die (S)-ABA-Konzentrationen ermittelt, welche zur halbmaximalen Inhibierung der Phosphatasen im jeweiligen Komplex (IC_{50} -Werte) führen (Abb. 2.32).

Die Effizienz der ABA-vermittelten PP2C-Inhibition war für ABI1 größer als für ABI2 mit insgesamt doppelt so hohen IC_{50} -Werten für ABI2. Für die Komplexe mit RCAR3 ist jeweils zweimal weniger ABA für denselben Inhibierungsgrad der Phosphatasen nötig als für Komplexe mit RCAR1. Bei einem molaren Verhältnis von 1:2 (ABI:RCAR) wurde die halbmaximale Inhibierung bei ABI1-RCAR3 mit 23 nM (S)-ABA im Vergleich zum ABI2-RCAR1-Komplex mit einem vierfach höheren Wert von 95 nM bestimmt. Auch hier werden wieder große Unterschiede der PP2C-Regulation durch RCARs abhängig von der Zusammensetzung der Komplexe offensichtlich.

Bei einer Erhöhung des RCAR-Levels wird das Gleichgewicht zur Bildung des Komplexes mit der Phosphatase verschoben, was heißt, dass bei einem Überschuss an RCAR nahezu alle PP2C-Moleküle interagieren können und dementsprechend weniger ABA zur Inhibierung der Phosphatasen nötig wird. Die Unterschiede in den IC_{50} -Konzentrationen zwischen RCAR1-ABI2 und RCAR3-ABI1 werden geringer, allerdings für RCAR3 weniger ausgeprägt als für RCAR1, was wiederum eine höhere Affinität zur PP2C-Interaktion für RCAR3 bedeutet.

Die Regulierung bzw. Inhibierung der Phosphatasen, nötig für die anschließende Aktivierung positiver Regulatoren des ABA-Signalwegs wie SnRKs, ist bei ABI1- und RCAR3-Komplexen ABA-sensitiver als bei ABI2- und RCAR1-Komplexen. Abhängig von der Zusammensetzung der Komplexe kann so die ABA-Rezeption und anschließende Signaltransduktion differentiell in der Pflanzenzelle geregelt werden.

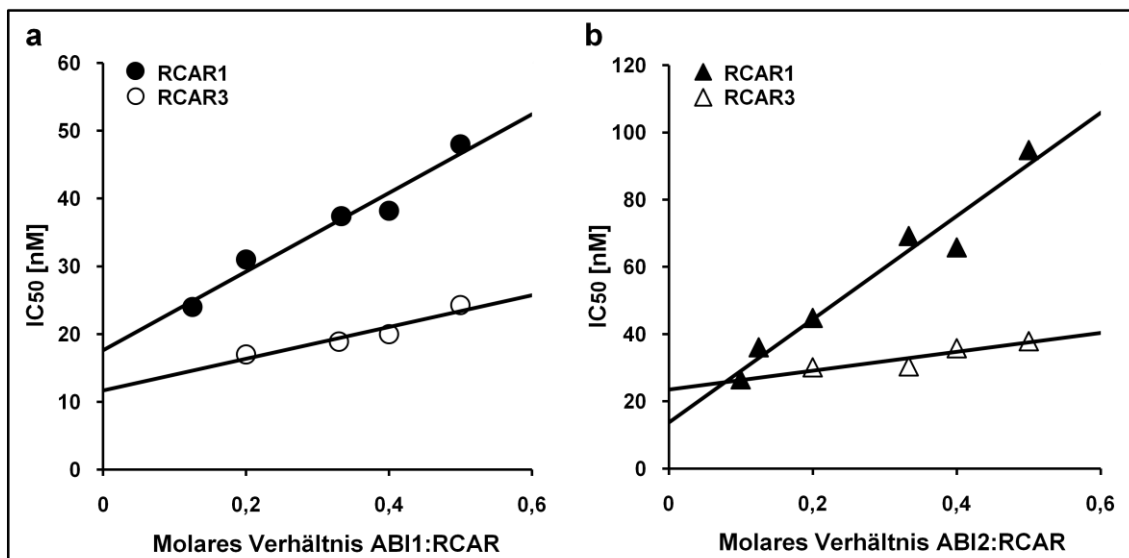


Abb. 2.32: Abhängigkeit der ABA-vermittelten Inhibition von Rezeptorkomplex-Zusammensetzung und Corezeptor-Konzentrationsverhältnis.

Für ABI1 (a) und ABI2 (b) wurden die IC₅₀-Werte bei konstantem PP2C-Level von 0,05 μ M und steigenden RCAR1- (gefüllte Kreise/Dreiecke) bzw. RCAR3-Konzentrationen (offene Kreise/Dreiecke) ermittelt; veröffentlicht in Szostkiewicz et al. (2010).

2.3.2.3. RCAR-Homologe aus Birke und Erdbeere

Bet v 1

Das Birkenpollenallergen *Bet v 1* und seine Homologen in Birke können verschiedenste kleine hydrophobe Liganden binden, darunter Flavonoidglycoside, Cytokinine und Brassinosteroide (Koistinen et al., 2005; Mogensen et al., 2002).

Ob Bindung von Abscisinsäure und ein damit entstehender Einfluss von *Bet v 1* auf diverse Phosphatasen möglich ist, wurde durch Bestimmung der Phosphataseaktivität bei An- und Abwesenheit von *Bet v 1* und (*S*)-ABA untersucht. Dabei konnte keine ABA-abhängige oder ABA-unabhängige Regulation der getesteten Phosphatasen ABI2, ABI1, AHG3 und HAI2 durch *Bet v 1* festgestellt werden (Abb. 2.33). Neben (*S*)-ABA wurden auch die (*R*)- und *trans*-Isomeren im selben System getestet, allerdings mit dem gleichen negativen Ergebnis (Daten nicht gezeigt), im *Yeast Two-Hybrid* System wurde ebenfalls keine Interaktion zwischen *Bet v 1* und ABI2 beobachtet.

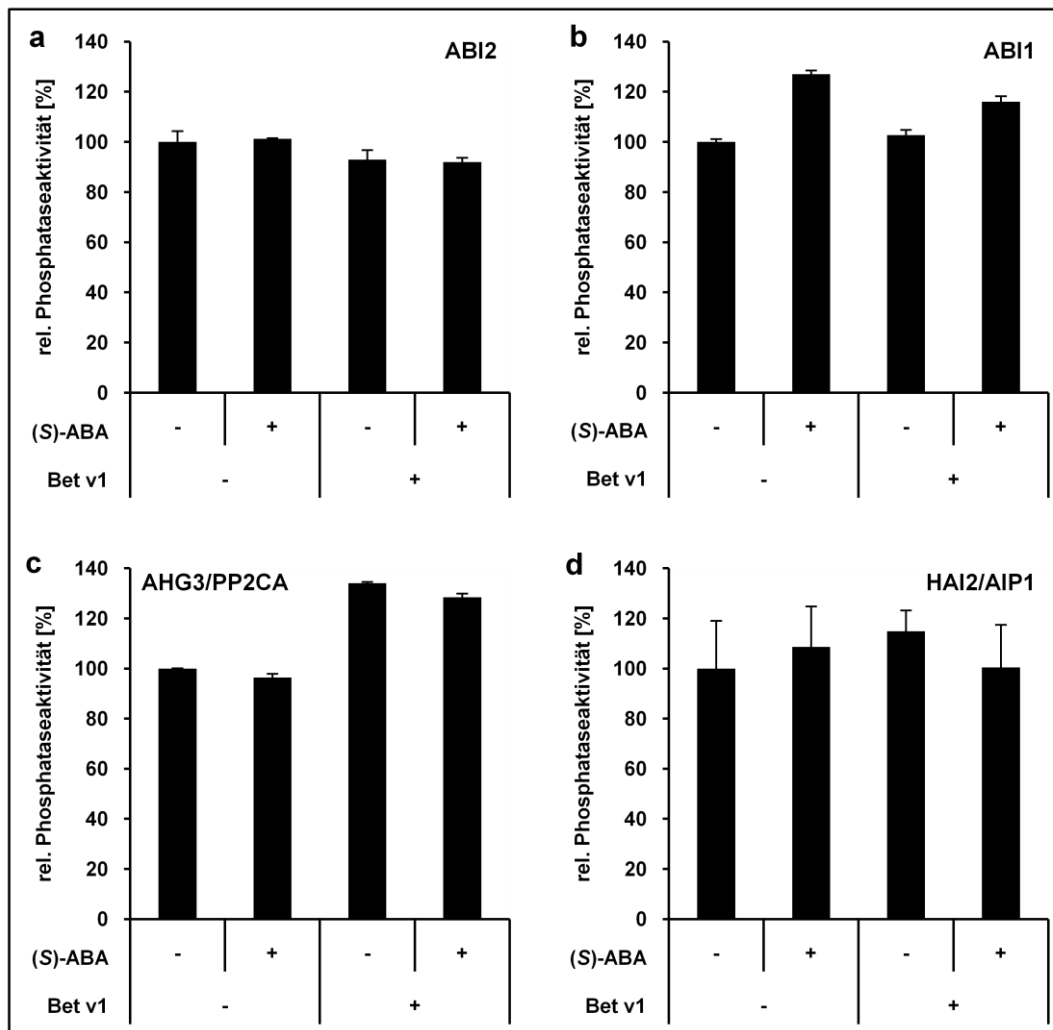


Abb. 2.33: Einfluss von Bet v 1 auf diverse Phosphatasen.

Dargestellt ist die enzymatische Aktivität von jeweils 0,05 μM ABI2 (a), ABI1 (b), AHG3 (c) und HAI2 (d) bei Ab- und Anwesenheit von Bet v 1 (molares Verhältnis PP2C:Bet v 1 = 1:2) und 10 μM (S)-ABA.

Um nicht auszuschließen, dass das gewählte molare Verhältnis von 1:2, welches beste Regulation der Phosphatasen durch RCARs gewährleistete (1:1-Komplex), hier nicht ideal für eine Wechselwirkung ist, wurde dieses variiert und ebenfalls der Effekt von (S)-ABA getestet (Abb. 2.34). Nach einer schwachen Stimulation bei Verhältnissen von 1:1 und 1:2, was auch für die Phosphatase AHG3 beobachtet werden konnte (siehe Abb. 2.33 c) führte ein 25-facher Überschuss an Bet v 1-Protein zu einer Reduktion der Phosphataseaktivität von ABI2 um 40%, allerdings vollkommen ABA-unabhängig.

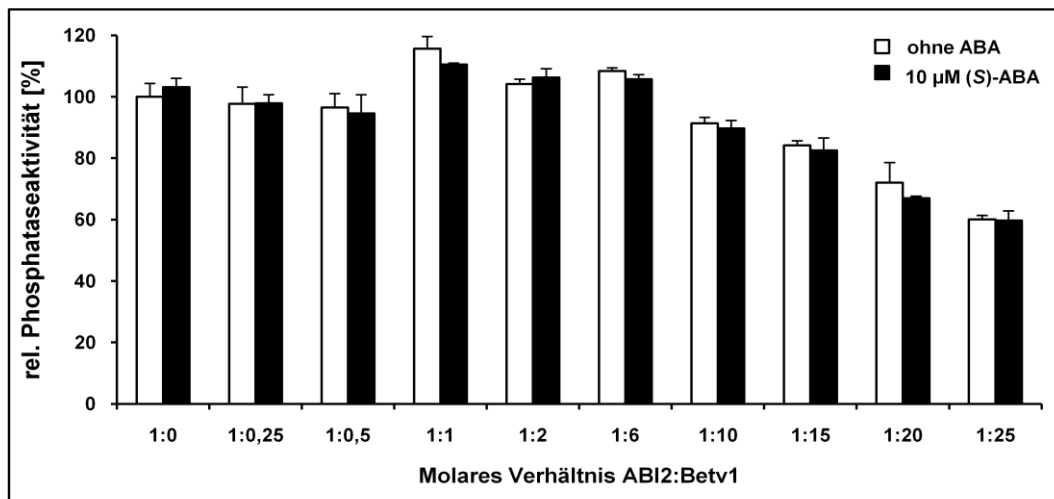


Abb. 2.34: Effekt unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse auf die Phosphataseaktivität von ABI2.

Bei einer konstanten Konzentration von 0,05 µM ABI2 wurde der Anteil an Bet v 1-Protein variiert und die Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von (S)-ABA (10 µM) bestimmt.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde überprüft, ob Bet v 1 möglicherweise nach Bindung anderer Liganden als Abscisinsäure die Phosphatase ABI2 zu regulieren vermag, wenn kein Überschuss an Bet v 1-Protein vorliegt. Dazu wurden Vertreter der Pflanzenhormone wie Jasmonate, Auxine, Gibberellinsäure, Cytokinine und Brassinosteroide auf ihre Wirkung untersucht (Abb. 2.35). Jedoch konnte kein Effekt auf die enzymatische Aktivität der PP2C ABI2 durch Bet v 1 und eine der Hormonverbindungen beobachtet werden. Phosphatasen aus Birke, die homolog zu denen aus der ABA-Signaltransduktion in Arabidopsis wären, wurden hier nicht getestet. Eine Regulation dieser wäre wahrscheinlicher, wenn das Birkenpollenallergen in der Erkennung und Weiterleitung von Hormonsignalen involviert ist. Allerdings könnten auch andere Enzyme außer Phosphatasen als Interaktionspartner von Bet v 1 in Frage kommen.

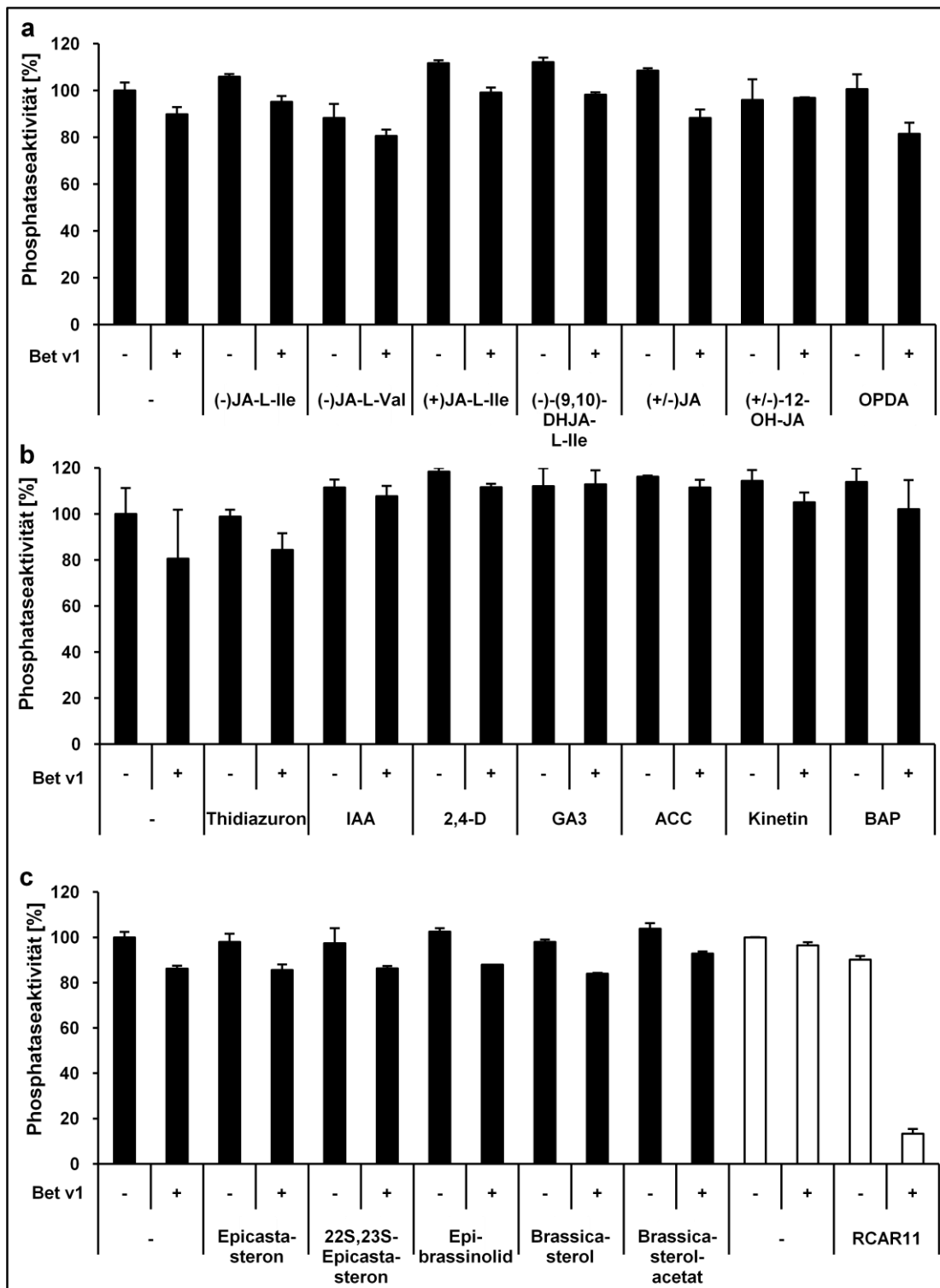


Abb. 2.35: Regulation der ABI2-Aktivität durch Bet v 1 bei Anwesenheit von diversen Phytohormonen.

Bei einem konstanten molaren Verhältnis von 1:2 (ABI2:Bet v 1) wurde die Wirkung weiterer Pflanzenhormone untersucht. Als Referenzwert dient die Phosphataseaktivität von 0,05 μM ABI2 ohne Bet v 1 und Ligand. (a) Jasmonsäureverbindungen (10 μM). (b) IAA und synthetische Auxine (50 μM), Gibberellinsäure (10 μM), Aminocyclopropanensäure (1 μM), und Cytokinine (10 μM). (c) Brassinosteroide (80 μM) und zum Vergleich die Inhibition von ABI2 durch RCAR11 und 10 μM (S)-ABA.

Fra a 1, 2 und 3 - Nahrungsmittelallergene aus der Erdbeerfrucht

Die Bet v 1-Superfamilie umfasst neben Cytokinin-bindenden Proteinen, *Major latex*-Proteinen und Norcochlorinsynthasen auch die Subfamilie der PR-10 Proteine (*Pathogenesis-related 10*) in Mono- und Dicotylen (Radauer & Breiteneder, 2007). Vertreter davon sind neben dem Birkenpollenallergen Bet v 1 auch Allergene aus der Erdbeerfrucht (*Fra a 1*), nah verwandt zu Pru av 1 aus Kirsche, Mal d 1 aus Apfel oder Cor a 1 aus Haselnuss.

Fra a 1 wird in reifen roten Früchten der Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) exprimiert, nicht aber in weißen Früchten eines mutierten Genotyps. Hier ist die Expression, genau wie bei Proteinen des Anthocyan- bzw. Flavonoid-Biosynthesewegs, beispielsweise der Phenylalanin-Ammoniumlyase oder der Chalkonsynthase, herunterreguliert (Munoz et al., 2010). Wegen hoher Sequenzidentität der Aminosäuren im Vergleich zu Bet v 1 und damit einer hohen Wahrscheinlichkeit, dass auch diese Vertreter in der Lage sind, Liganden wie Pflanzenhormone, Fettsäuren oder Flavonoide zu binden, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Isoformen des *Fra*-Proteins, *Fra a 1E*, *Fra a 2* und *Fra a 3* mit einer Sequenzidentität von 54%, 58% bzw. 59% im Vergleich zu Bet v 1 auf mögliche Abscisinsäurebindung und Wechselwirkung mit Phosphatasen aus *Arabidopsis thaliana* untersucht (vorerst standen keine Phosphatasen aus Erdbeere zur Verfügung). *Fra a 1* wird vor allem in Wurzeln exprimiert, die Transkriprate sinkt in der reifenden Frucht, *Fra a 3*-Expression findet sich in der ganzen Pflanze, vor allem aber in Blüten, *Fra a 2* dagegen wird in reifen Früchten, vor allem roten, hoch exprimiert. Im Y2H-Screen auf Interaktion zwischen *Fra*-Proteinen und den Phosphatasen ABI1 und ABI2 konnte kein positives Ergebnis erzielt werden (Daten nicht gezeigt), trotzdem wurde der Effekt von *Fra* auf diese und zusätzlich auf AHG3 und HAI2 im Phosphatase-Assay unter Verwendung rekombinant in *E. coli* exprimierter *Fra*-Proteine getestet. Wie in Abbildung 2.36 zu sehen ist, fand weder mit noch ohne Zugabe von 10 µM (S)-ABA eine Inhibierung der enzymatischen Aktivitäten statt, bei HAI2 konnte eine leichte Stimulierung durch *Fra a 1* festgestellt werden.

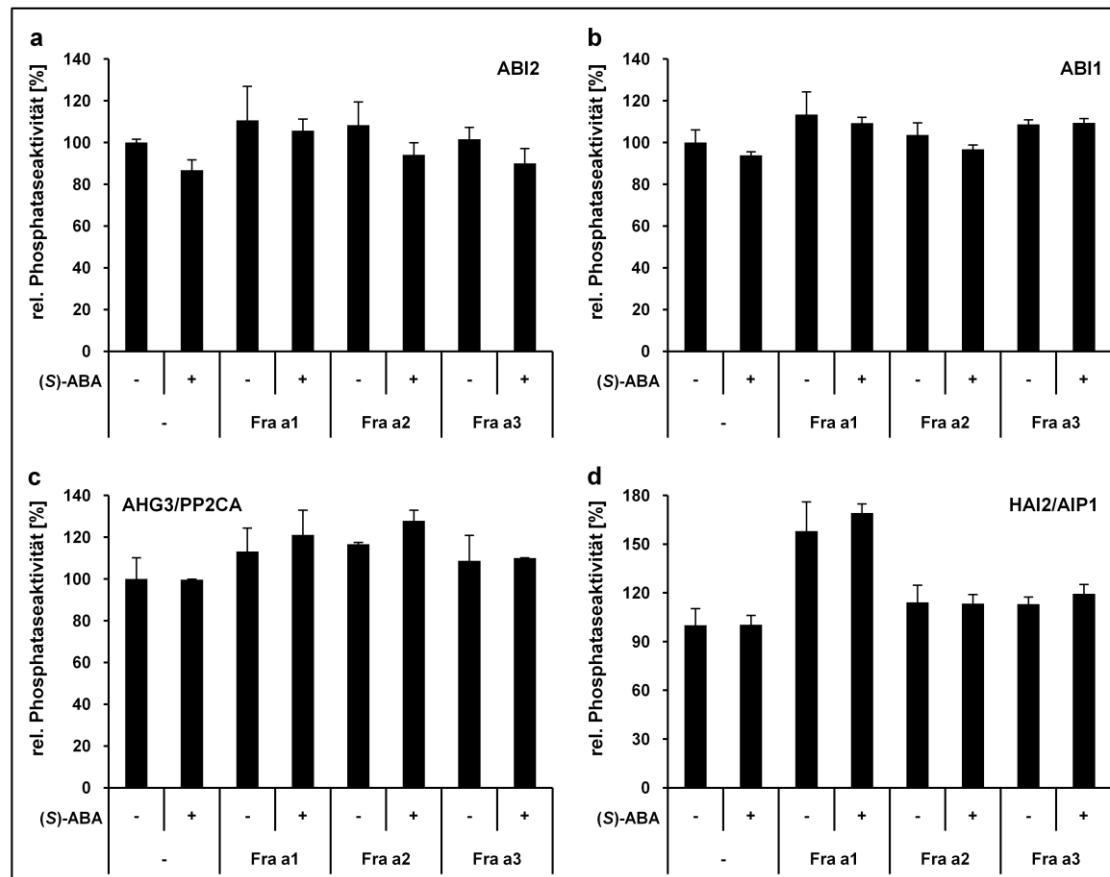


Abb. 2.36: Einfluss der Fra-Proteine auf verschiedene Phosphatasen.

Gezeigt ist die Regulierung der Phosphataseaktivität (jeweils 0,05 μ M) von ABI2 (a), ABI1 (b), AHG3 (c) und HAI2 (d) durch die Proteine Fra a 1, 2 und 3 im molaren Verhältnis PP2C:Fra von 1:2 in Gegenwart von 10 μ M (S)-ABA.

Nachdem die Funktion der Fra-Proteine in der Anthocyan-Biosynthese vermutet wird, was die zusammenhängende Expressionsregulation mit dabei beteiligten Enzymen erklären würde, aber der genaue Mechanismus noch unbekannt ist, wurde auf andere Bindungspartner als Abscisinsäure getestet. Beim Flavonoid-Biosyntheseweg wird ausgehend von Phenylalanin über Zimtsäure p-Cumarsäure gebildet, welche zu Kaffeesäure und Ferulasäure sowie Glucosederivaten davon weiterreagieren kann. Als p-Cumaryl-CoA reagiert es mit 3 Molekülen Malonyl-CoA zur Vorstufe der Flavonoide, dem Naringeninchalkon, diese Reaktion wird katalysiert durch die Chalkonsynthase. Aus jener Verbindung entstehen Flavonole, Epicatechin, Proanthocyanidine und Anthocyane (Abb. 2.37) (Hoffmann et al., 2006).

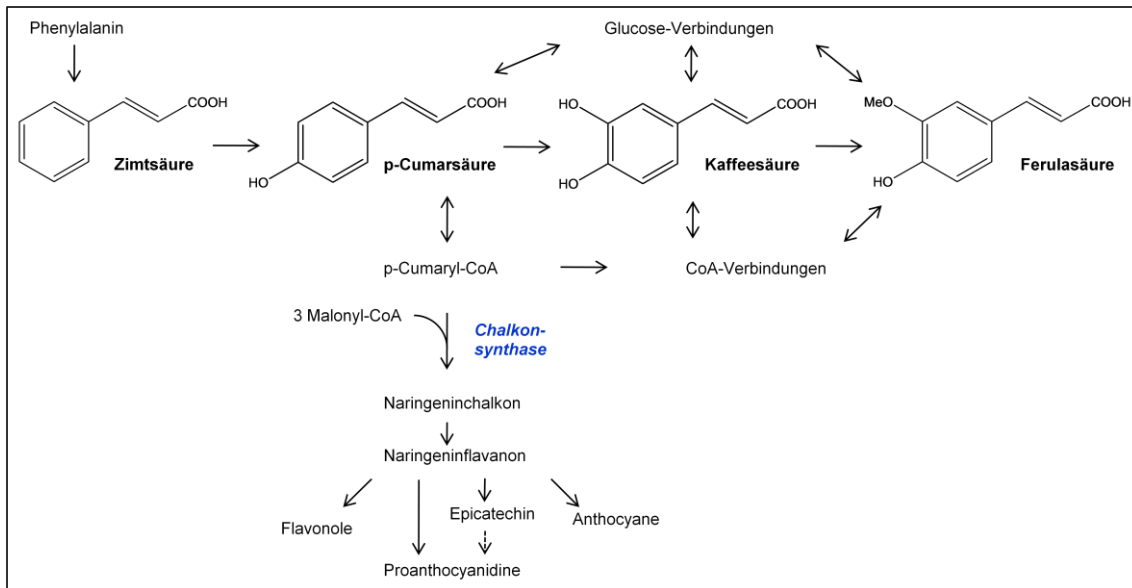


Abb. 2.37: Flavonoid-Biosynthese in der Erdbeerfrucht nach Hoffmann et al. (2006).

Ausgehend von Phenylalanin wird p-Cumarsäure gebildet, welche über p-Cumaryl-CoA zusammen mit 3 Molekülen Malonyl-CoA zu Naringenchalkon reagiert. Diese Reaktion wird von der Chalkonsynthase katalysiert. Über weitere Schritte werden Flavonole, Proanthocyanidine und Anthocyane gebildet.

Wie bereits für (S)-ABA beschrieben wurden als mögliche Liganden Zimtsäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure untersucht. Auch hier konnte kein Effekt der Fra-Proteine auf die Phosphatasen aus Arabidopsis beobachtet werden (Abb. 2.38). Es bleibt zu prüfen, ob die Liganden zwar an Fra-Proteine binden können, dies jedoch unabhängig von Phosphatasen ist bzw. nur Phosphatasen aus der Erdbeere beteiligt sind, oder, was wahrscheinlicher ist, eine Interaktion mit Proteinen (ligandenabhängig oder -unabhängig) aus dem beschriebenen Flavonoid-Biosyntheseweg besteht bzw. die Fra-Proteine möglicherweise als Transportproteine für Flavonoide oder deren Vorstufen dienen.

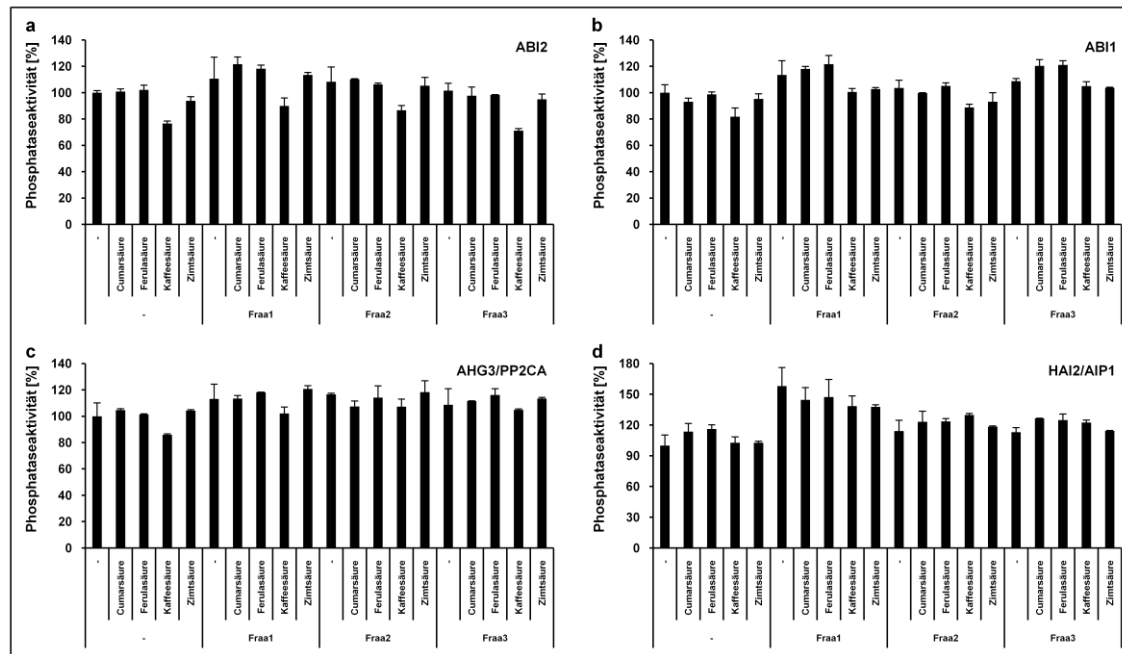


Abb. 2.38: Regulation der ABI2-Aktivität durch Fra-Proteine bei Anwesenheit diverser Liganden aus der Flavonoid-Biosynthese.

Bei einem konstanten molaren Verhältnis von 1:2 (PP2C:Fra) wurde die Wirkung von Komponenten (jeweils 10 µM) aus dem Flavonoid-Biosyntheseweg untersucht. Als Referenzwert dient die Phosphataseaktivität von 0,05 µM PP2C ohne Fra und Ligand. (a) ABI2, (b) ABI1, (c) AHG3 und (d) HAI2.

Somit konnte für die Arabidopsis-Phosphatasen gezeigt werden, dass die Regulation durch RCAR-Proteine und (S)-ABA spezifisch ist, und auch die RCAR-Proteine, trotz sequenzieller und struktureller Homologien zu Bet v 1 und Fra a-Proteinen nicht durch diese ersetzt werden können. Andere Phytohormone spielen bei der Regulation von PP2Cs durch RCARs ebenfalls keine Rolle, weder stimulierende noch inhibierende Effekte konnten beobachtet werden. Nachdem die Proteinstruktur sowie die Bindung von Liganden für Bet v 1 und mehrere andere Mitglieder der Superfamilie bereits aufgeklärt ist, die Bindung von ABA und die gleichzeitige Interaktion mit Phosphatasen aber für die RCAR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* bisher einzigartig ist, war die nächste Aufgabe, den Mechanismus der Bindung des Liganden sowie der Inhibierung der Phosphatase durch RCAR und ABA, durch Strukturanalysen näher zu untersuchen.

2.3.3. Kristallisation des Abscisinsäure-Rezeptorkomplexes

Eine Möglichkeit zur Aufklärung des Mechanismus der ABA-Bindung an RCAR-Proteine sowie der Interaktion von RCARs mit PP2Cs kann die Strukturaufklärung der einzelnen Corezeptoren ohne bzw. mit Ligand sowie des Corezeptor-Komplexes, bestehend aus RCAR, Abscisinsäure und PP2C, über Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse darstellen. Aufgrund der Strukturhomologie der RCAR-Proteine zu Proteinen aus der Bet v 1-Superfamilie war bereits eine Überlagerung der RCAR1-Sequenz über die aufgeklärte dreidimensionale Proteinstruktur von Bet v 1a als Vorlage angefertigt worden (siehe Abb. 2.39 (Ma et al., 2009)).

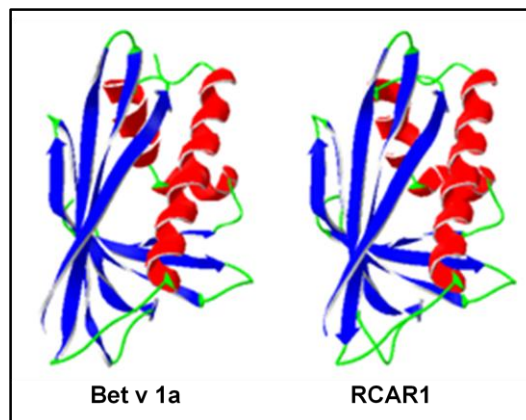


Abb. 2.39: Vergleich der Bet v 1a-Struktur mit der von RCAR1 (Ma et al., 2009).

Überlagerung der RCAR1-Primärstruktur auf die dreidimensionale Struktur von Bet v 1a (1B6F, RCSB-Datenbank), generiert mit Hilfe von Swiss-PDB Viewer.

Eine zentrale Eigenschaft der Bet v 1 *fold*-Superfamilie ist die aus sieben β -Faltblattstrukturen (in Abb. 2.39 blau dargestellt) und zwei α -Helices (rot in Abb. 2.39) bestehende Struktur, welche eine längere C-terminale α -Helix umfassen und so zusammen das sogenannte *helix-grip fold*-Strukturmotiv formen. Dieses Motiv, ähnlich einer greifenden Hand, stellt eine größere Kavität dar, die hydrophobe Liganden wie Lipide und Hormone binden kann (Iyer et al., 2001; Radauer et al., 2008).

Die Strukturen von Bet v 1 und homologen Bet-Proteinen mit diversen gebundenen Liganden (Gajhede et al., 1996; Markovic-Housley et al., 2003; Osmark et al., 1998) sowie von Pru av 1 (Neudecker et al., 2001) sind bereits veröffentlicht. Auch die Strukturen von pflanzlichen CSBP-Proteinen im Komplex mit Cytokininen (Fernandes et al., 2008; Pasternak et al., 2006), sowie die von Hyp-1 (Michalska et al., 2009) und die der Norcoclaurinsynthase aus *Thalictrum flavum* mit Dopamin als Liganden (Ilari et al., 2009), allesamt Proteine der Bet v 1-Superfamilie in Pflanzen, wurden aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Bindung von (*S*)-ABA an RCAR-Proteine und damit verbundene Strukturveränderungen im RCAR-Protein durch

Kristallisation von RCAR mit und ohne ABA und anschließende Strukturaufklärung untersucht werden. Außerdem sollten so die Interaktion von RCAR- und PP2C-Proteinen sowie die Stabilisierung der ABA-RCAR-Bindung durch PP2Cs, welche bei ITC-Versuchen beobachtet wurde (Ma et al., 2009), und der Mechanismus der PP2C-Inhibierung durch RCARs und ABA erforscht werden.

Kristallstrukturen von PP2C-Proteinen aus Pflanzen sind bisher nicht aufgeklärt worden, die Struktur der katalytischen Domäne der Human-Phosphatase 2C besteht aus β -Faltblättern, zwei dazwischen gebundenen Manganionen, die über Wassermoleküle Kontakt zum Phosphat der Substrate herstellen, und umgebenden α -Helices (Das et al., 1996). Außerdem sind noch Strukturen von PP2Cs aus *Thermosynechococcus elongatus* und *Toxoplasma gondii* bekannt.

Es wurde versucht, RCAR1, 8 und 11 mit und ohne (S)-ABA sowie mit und ohne ABI2 zu kristallisieren und anschließend über Röntgenstrukturanalyse die Struktur der einzelnen Corezeptoren sowie des Rezeptorkomplexes aufzuklären. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Groll am Lehrstuhl für Biochemie der TU München.

2.3.3.1. Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation von Proteinen sind ausreichende Mengen an hochreinem Protein (bis zu 20 mg/ml im Kristallisationsansatz) und die für das jeweilige Protein richtigen Bedingungen. Die Kristallisation erfolgt nach Mischen der Proteinlösung mit Pufferlösungen, die unterschiedliche Substanzen als Fällungsmittel enthalten. Entscheidende Parameter, die zur Herabsetzung der Proteinlöslichkeit und damit zur Ausbildung von ersten Kristallkeimen führen sollen, sind neben Salzen zur Veränderung der Ionenstärke organische Lösungsmittel bzw. Polymere, die durch Änderung der Dielektrizitätskonstante der Proteinlösung die Löslichkeit beeinflussen können, der pH-Wert (am besten nahe des isoelektrischen Punktes des Proteins) und die Temperatur. Für die Kristallstrukturaufklärung sind Einkristalle hoher Qualität und Reinheit nötig, die eine ausreichende Größe in mindestens zwei Dimensionen erreichen.

Proteinkristallisation

In einem ersten Ansatz wurden RCAR1 (pI 6,42) und ABI2 (pI 6,58) getrennt jeweils mit und ohne (S)-ABA zur Kristallisation eingesetzt. Die Lösungen von 20 mg/ml Protein wurden in einer 1:1-Mischung mit den Primärscreen-Lösungen (Refill-Hit Solutions, Qiagen) Nr. 1 bis 4 (pHClear und Classics, siehe 4.5.1) verwendet, welche unterschiedliche Puffersysteme (pH-Werte), Salze und Präzipitanten beinhalten.

Weder bei 4°C noch bei 20°C konnte Kristallbildung beobachtet werden. Die Analyse der Aminosäuresequenzen ergab einen Prozentsatz von 12,4 bzw. 12,2 an Glycin- und Prolin-Resten für RCAR1 bzw. ABI2 (ProtParam). Je höher der Anteil dieser zwei Aminosäuren, desto weniger wahrscheinlich ist eine ideale Kristallisation, denn beide können zur Unterbrechung einer geregelten Sekundärstruktur führen. Glycin kann aufgrund seiner geringen Größe und durch das Fehlen der Seitenkette einen größeren Bereich erlaubter Torsionswinkel und damit Konformationen einnehmen und ist so oft für ungewöhnliche Richtungsänderungen in der Peptidkette verantwortlich. Außerdem begünstigt es die Ausbildung der energetisch ungünstigeren *cis*-Peptidbindung, die zu sterischen Spannungen innerhalb der Kette führt. Glycin und Prolin treten häufig in Kehren auf oder sind für starke Knicke und Schleifen verantwortlich. Die Seitenkette von Prolin bindet sowohl an das α -Kohlenstoffatom, als auch an die Aminogruppe, da diese folglich sekundär ist, ist keine Ausbildung von Wasserstoffbrücken möglich, so dass α -Helices abgebrochen werden. Aufgrund seiner starren Ringstruktur fungiert Prolin oft als Ecke der Polypeptidkette und unterstützt die Ausbildung enger Windungen.

Zusätzlich stellt der N-Terminus von ABI2 ein großes Problem dar, für die ersten ca. 100 Aminosäuren ist die Vorhersage der Sekundärstruktur über Jpred3 bzw. GOR4 *random coil*, so dass der N-Terminus aufgrund hoher Flexibilität die Einlagerung der Proteinmoleküle in ein Kristallgitter erschweren kann. Gleiches gilt für die ersten ca. 40 Aminosäuren von RCAR1. Bei beiden Proteinen, ABI2 und RCAR1 war ein weiteres Problem auch die zu geringe Expression und die Abtrennung weiterer Expressionsprodukte von *E. coli* wie unter Punkt 3.4 beschrieben. So wurden verkürzte Versionen beider Proteine kloniert und in verschiedenen Systemen exprimiert (siehe Punkt 2.3.1.1 und Anhang 5.2.), jedoch war die Ausbeute dieser Versionen nicht groß genug für Kristallisationsansätze, wo bis zu 40 mg/ml benötigt wurden.

In einem weiteren Ansatz wurden RCAR8 (pI 6,42) sowie RCAR11 (pI 6,30), jeweils in einer Konzentration von 10 mg/ml im Ansatz mit und ohne (S)-ABA im sechsfachen Überschuss, versucht zu kristallisieren. Die Sekundärstrukturvorhersage über Jpred3 ergab für beide Proteine keine größeren undefinierten Bereiche (siehe Abb. 2.40 b), der Anteil von Glycin und Prolin beträgt zusammen 12% für RCAR8, aber nur 9% für RCAR11.

Hier war die Kristallisation für RCAR11 mit (S)-ABA mit den erwähnten Primärscreen-Lösungen bei 20°C in vielen Fällen erfolgreich, so dass anschließend eine Feinoptimierung dieser Kristallisation durchgeführt werden konnte.

Neben des höheren Anteils an Glycin und Prolin in RCAR8 zeigt Abb. 2.40 (a) die Unterschiede in der Aminosäuresequenz von RCAR8 und 11, deutlich ist eine

Diskrepanz im N-Terminus der beiden Proteine (Aminosäuren 21-49 von RCAR8, schwarzer Rahmen) zu erkennen, welche sich in der Ausbildung zweier weiterer α -Helices bei RCAR8 (siehe Pfeile, Abb. 2.40 b) in diesem Bereich äußert. Dadurch wird auch eine α -Helix (B in RCAR11) nicht ausgebildet, dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Kristallisation aufgrund eines weniger kompakten Proteins RCAR8 bei den gleichen Bedingungen wie bei RCAR11 nicht möglich war. Auch die Sekundärstrukturvorhersage von RCAR1 ist erst ab der β -Faltblattstruktur C der von RCAR11 ähnlich. Die in der Abbildung 2.40 2b dargestellten sieben β -Faltblattstrukturen C, E, F, G+H, I, J sowie die α -Helices D und L entsprechen den für Proteine aus der Bet v 1-Superfamilie beschriebenen Strukturen, der Unterschied zwischen den einzelnen RCAR-Proteinen besteht somit vor allem im N-terminalen Bereich.

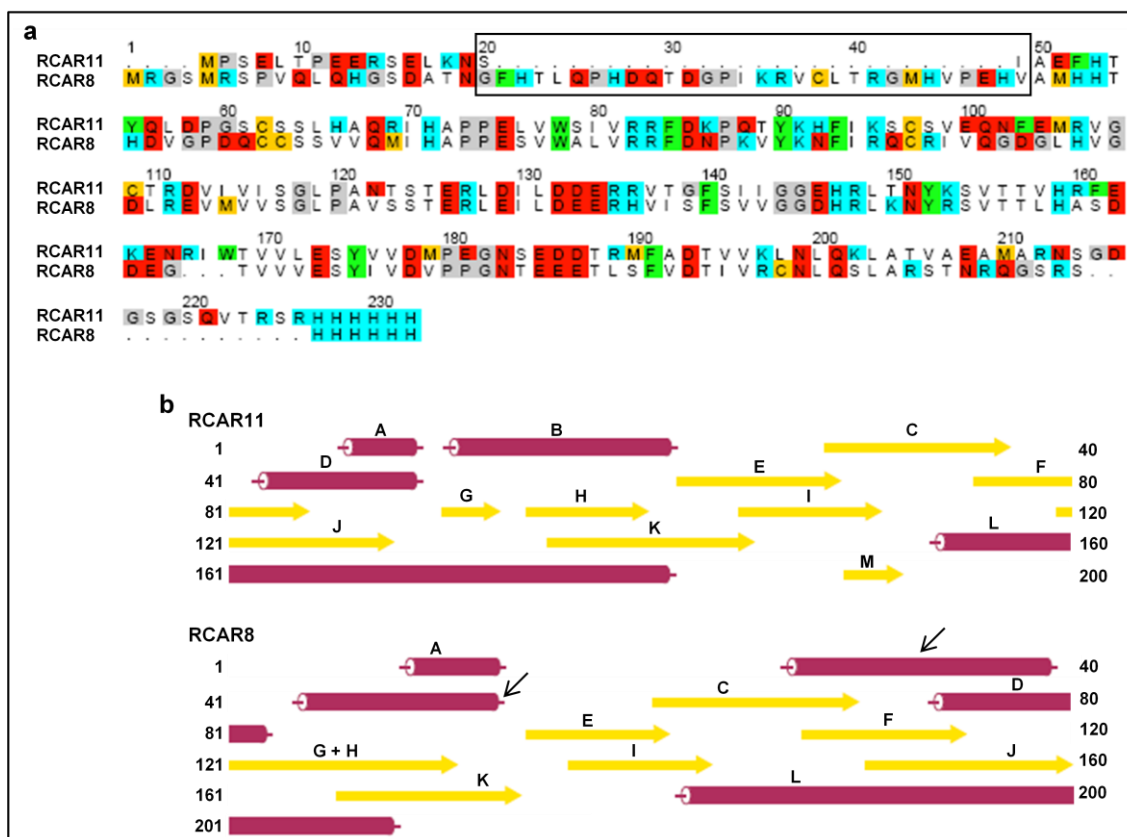


Abb. 2.40: Vergleich von Primär- und Sekundärstruktur der Proteine RCAR11 und RCAR8.

Im oberen Teil der Abbildung (a) ist ein Abgleich der Aminosäuresequenzen von RCAR11 und 8 abgebildet, deutlich zu erkennen ist der Sequenzunterschied bei AS 21 bis 49 von RCAR8 (schwarz eingerahmt). Die Vorhersage der Sekundärstruktur (b) unterscheidet sich dadurch von der von RCAR11. α -Helices sind violett, β -Faltblattstrukturen gelb dargestellt (in alphabetischer Reihenfolge von A bis M). Zusätzliche Helices in der Struktur von RCAR8 (schwarze Pfeile) sind statt der Helix B in RCAR11 vorhergesagt (Jpred3/Jalview).

Besonders vielversprechende Kristalle von RCAR11 mit (S)-ABA erhielt man mit Lösungen der Refill-Hit Solutions Nr. 2 und 4 (siehe Punkt 4.5.1). Salze wie Natrium-/Kaliumphosphat, Natriumchlorid, Ammoniumsulfat und Magnesium- bzw. Calciumchlorid sowie Tris- und HEPES-Puffersysteme mit Polyethylenglycolen (PEGs) als Präzipitanten kamen für einen Feinscreen in Frage.

Nach geglückter Optimierung der Expression der Vollängen-Version von ABI2 im pET-System durch gleichzeitige Expression von RCAR11 in derselben *E. coli*-Zelle in Anwesenheit von ABA (siehe Punkt 2.3.1.2) konnte reines Protein in ausreichenden Mengen von bis zu 40 mg/ml in der Ausgangslösung zur Kristallisation gemeinsam mit RCAR11 und ABA verwendet werden. Um die Flexibilität des N-Terminus von ABI2 einzuschränken, wurde in den Kristallisationsansatz MUS (Methylumbelliferylsulfat) als Phosphataseinhibitor zugegeben, welches wie die entsprechende Phosphatverbindung von der Phosphatase als Substrat erkannt und gebunden, aber nicht umgesetzt wird. Hier wurden ebenfalls die bereits erwähnten Primärscreen-Lösungen bei Temperaturen von 4°C bzw. 20°C eingesetzt, um Kristalle zu erhalten. Tatsächlich war es nun möglich, erste kleine Kristalle des mutmaßlichen Komplexes zu erhalten, mit Bedingungen ähnlich denen für RCAR11 und (S)-ABA.

Feinoptimierung der Proteinkristallisation

Zur Herstellung von Einkristallen, deren Bausteine ein einheitliches homogenes Kristallgitter bilden, war es nötig, die Kristallisationsbedingungen zu optimieren. Nach den ersten Hinweisen auf geeignete Bedingungen zur Kristallisation von RCAR11 im Komplex mit (S)-ABA bei 20°C aus dem Vorscreen mit vorgefertigten Lösungen (Beispiele siehe Abb. 2.41 a) wurden mehrere davon im nachfolgenden Feinscreen weiter verfolgt. Einige Beispiele sollen hier erwähnt werden.

Neben der Optimierung des Na/K-Phosphat-Systems, das zwar zu großen geordneten polarisierenden Kristallen (siehe Abb. 2.41 (b) rechts), nicht aber zu einem proteintypischen Beugungsmuster der Röntgenstrahlen führte (es handelte sich um Salzkristalle), wurden verschiedene Salze wie NaCl, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄ und Li₂SO₄ und diverse Calciumverbindungen wie CaCl₂, Ca(NO₃)₂, Ca₃(PO₄)₂, CaSO₄, CaCO₃, CaF₂, Calciumacetat und Calciumcitrat in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Desweiteren wurden pH-Wert und Konzentration der Puffersysteme HEPES, Tris oder Bis-Tris verändert, sowie die Art und Konzentration des Präzipitanten PEG (200-20000) variiert. Die Proteinlösung wurde in verschiedenen Verhältnissen zur Kristallisationslösung zugegeben (1:1, 2:1, 3:1), die Art des Kristallisationsvorgangs (*sitting drop* oder *hanging drop*) verändert bzw. die *Seeding*-Methode zum Animpfen frischer Lösungen mit bereits vorhandenen Kristallen erprobt, um spontane

Kristallkeimbildung zu erleichtern. Am besten funktionierten *hanging drop*-Ansätze von bis zu 4 μl Lösung, hier entstanden die größten Kristalle. Additive und Detergenzien wurden zugesetzt, um eine verbesserte Kristallordnung zu erreichen. Die größten (ca. 60 μm Durchmesser) und von der Oberfläche her schönsten Kristalle mit nur leichten Fächerungen und Aufplattungen wurden mit dem System 0,14 M CaCl_2 / 0,1 M Tris pH 8,0 / 18-19% PEG 4000 erhalten (Abb. 2.41 (b) 1. und 2. von links), welche die Röntgenstrahlen auch beugten, aber für weitere Analysen wie Raumgruppenbestimmung noch zu klein waren. Es konnte kein System gefunden werden, das größere Kristalle ohne Fehlorderungen hervorbrachte. Durch Zusatz von Dextransulfat entstanden wiederum geordnete Kristalle ohne Aufplattungen (Abb. 2.41 (c) rechts), bei deren Analyse sich dann wie bei den Na/K-Phosphat-Kristallen herausstellte, dass es sich nicht um Protein-, sondern um Salzkristalle handelte.

Für den Ansatz von RCAR11, (S)-ABA und ABI2 mit MUS war das Problem beim Kristallisationspuffer 0,1 M CaCl_2 / 0,1 M HEPES pH 7,0 / 19% PEG 3350 ähnlich: Die meisten größeren Kristalle (bis zu 150 μm), welche auch Licht polarisierten (siehe Abb. 2.42 rechts) wiesen zahlreiche Aufplattungen auf (siehe Abb. 2.41 (c) 2. von links). Daher war es nicht überraschend, dass diese Kristalle nicht in alle Richtungen beugten, eine Achse war jeweils fehlgeordnet. Die besten Ergebnisse zumindest nicht sichtbar aufgeplatteter Kristalle wurden hier mit bis zu 0,4 M MgCl_2 , 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 und 18-28% PEG 3350 erzielt (Abb. 2.41 (c) 1. und 3. von links). Sämtliche Pufferzusammensetzungen lagen vom pH-Wert recht nah am isoelektrischen Punkt $p\text{I}$ der eingesetzten Proteine (siehe oben).

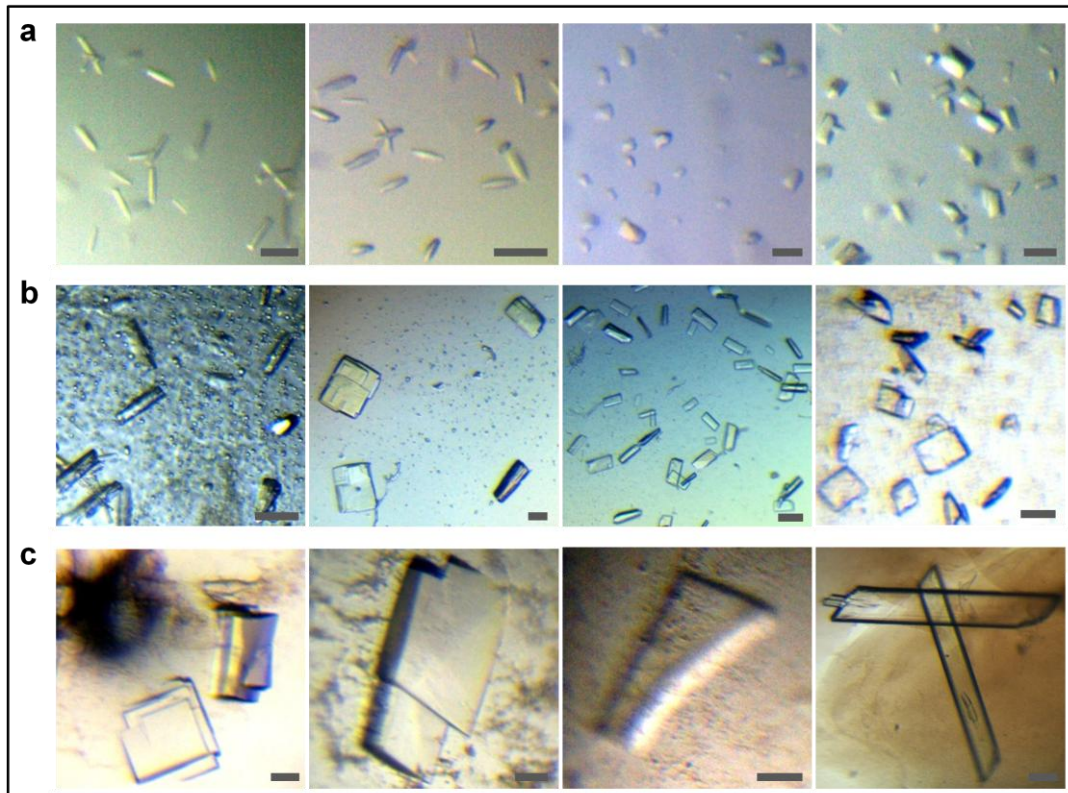


Abb. 2.41: Abbildungen verschiedener Kristalle von RCAR11 mit (S)-ABA sowie von RCAR11, (S)-ABA und ABI2.

Beispiele für Kristalle von RCAR11 (10 mg/ml) und (S)-ABA (2,5 mM) aus der Voroptimierung sind in (a) abgebildet. Von links nach rechts: 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 / 25% PEG 3350; 0,2 M MgCl_2 / 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 / 25% PEG 3350; 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 0,1 M HEPES pH 7,5 / 2% PEG 400; 1,4 M Na/K-Phosphat. Die Balken entsprechen jeweils 10 μm .

(b) Kristalle aus dem Additiv-Screen sowie anderen Feinoptimierungen. Von links nach rechts: RCAR11 + ABA (5 mM DTT) in 0,14 M CaCl_2 / 0,1 M Tris pH 8,0 / 18% PEG 4000 / 5 mM Na_2EDTA ; 0,14 M CaCl_2 / 0,1 M Tris pH 8,0 / 18% PEG 4000 / 0,625% Ethylacetat; 0,14 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ / 0,1 M Tris pH 8,0 / 22% PEG 4000; RCAR11 + ABA + ABI2 + MUS in 0,2 M MgCl_2 / 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 / 22% PEG 2000MME. Die Balken entsprechen jeweils 25 μm .

(c) Von links nach rechts: RCAR11 + ABI2 + ABA + MUS in 0,2 M MgCl_2 / 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 / 18% PEG 3350; 0,1 M CaCl_2 / 0,1 M HEPES pH 7,0 / 19% PEG 4000; 0,4 M MgCl_2 / 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 / 20% PEG 3350; RCAR11 + ABA (5 mM DTT) in 0,14 M CaCl_2 / 0,1 M Tris pH 8,5 / 18% PEG 4000 / 3% Na-Dextransulfat. Die Balken entsprechen jeweils 25 μm .

Insgesamt konnte durch die Feinoptimierung der Kristallisationsbedingungen die Größe der Kristalle um das 30- bis 50-Fache gesteigert (siehe Abb. 2.42) und amorphe Niederschläge in den Kristallisationstropfen vermindert werden, jedoch blieb das Problem von aufgewachsenen bzw. aufgeplatteten, verzwilligten und zersplitterten fehlgeordneten Kristallen bestehen, welche nicht zur Röntgenstrukturanalyse verwendet werden konnten.

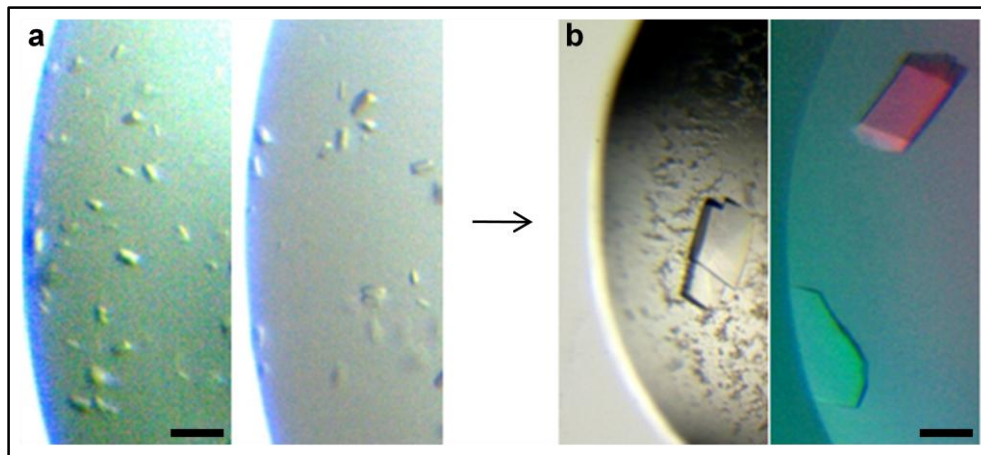


Abb. 2.42: Die Optimierung der Bedingungen führte zu 30- bis 50-fach größeren Kristallen von RCAR11 mit (S)-ABA.

Ausgehend von Bedingungen des Primärscreens mit Kristallen von ca. 5 µm Größe (a) konnten durch Optimierung der Konzentrationen von Salz und Präzipitanten sowie des Puffersystems und des pH-Werts Kristalle einer Größe von 100 bis 200 µm erzeugt werden (b). Die Balken entsprechen jeweils 25 µm. Bedingungen von (a): links 0,2 M CaCl_2 / 0,1 M HEPES pH 7,5 / 28% PEG 400, rechts 1,4 M Na/K-Phosphat. Bedingungen von (b): links 0,1 M CaCl_2 / 0,1 M HEPES pH 7,0 / 19% PEG 4000 (mit ABI2 und MUS), rechts 1,8 M Na/K-Phosphat pH 7,6.

Zahlreiche Kristalle wurden auf Beugung der Röntgenstrahlen am Lehrstuhl für Biochemie untersucht, sie wurden, mit passendem Kryopuffer versetzt, am Bruker AXS-Röntgenstrahlgerät montiert und unter Stickstoffstrom vermessen, und dabei ihr Beugungsmuster analysiert.

2.3.3.2. Auswertung der Kristallstruktur

Bei der Röntgenstrukturanalyse wird durch die Beugung der Röntgenstrahlen am Kristallgitter der atomare Aufbau des Kristalls bestimmt. Aus dem Beugungsmuster und den gemessenen Röntgenintensitäten kann durch Fourier-Transformation die Elektronendichte-Verteilung im Kristall errechnet werden, wobei die Positionen von errechneten Maxima der Elektronendichte den Atompositionen in der Elementarzelle (kleinste repräsentative Einheit im Kristall) entsprechen. Anschließend wird die Aminosäuresequenz des Proteins mit der Elektronenverteilung verglichen und die genaue Struktur bestimmt.

Für die meisten Kristalle konnte leider kein für weitere Analysen brauchbares Beugungsmuster bestimmt werden, da sich jeweils eine Achse als fehlgeordnet herausstellte. Bei einem Kristall (RCAR11, ABI2, (S)-ABA und MUS) war jedoch eine Bestimmung der Raumgruppe sowie der Parameter der Elementarzelle möglich (Abb. 2.43).

Dieser Kristall entstand unter folgenden Bedingungen: Die eingesetzte Proteinlösung enthielt 870 μM (20 mg/ml) RCAR11, 300 μM (15 mg/ml) ABI2 und 1,5 mM (S)-ABA in 10 mM Tris pH 7,9, 40 mM NaCl und 2 mM DTT unter Zusatz von 1,4 mM MUS, der Kristallisationspuffer enthielt 0,2 M MgCl_2 , 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 und 18% PEG 3350. Es wurde die Methode der hängenden Tropfen angewandt, mit einer Mischung aus 1 μl Proteinlösung und 1 μl Kristallisationspuffer. Bei einer Auflösung von 2,8 \AA ergab die Messung, dass der Kristall in der Raumgruppe P1 (triklin, $a \neq b \neq c$ und $\alpha \neq \beta \neq \gamma$) vorlag, mit Kanten der Elementarzelle von 49, 61 und 70 \AA bzw. Winkeln von 74°, 78° und 90° (Werte gerundet; Abb. 2.43).

Diese Daten über die Größe der Elementarzelle würden eher dafür sprechen, dass es sich um den RCAR11-ABA-Komplex ohne die Phosphatase als um den RCAR11-ABA-ABI2-Komplex handelt. Zur gleichen Zeit erschienen bereits mehrere Veröffentlichungen mit der Strukturaufklärung von RCARs mit und ohne Ligand sowie von Corezeptor-Komplexen mit (S)-ABA (Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009; Nishimura et al., 2009a; Santiago et al., 2009a; Yin et al., 2009).

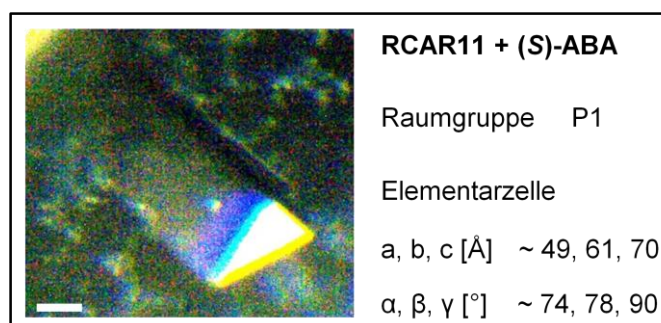


Abb. 2.43: Kristall, Raumgruppe und Parameter der Elementarzelle des Komplexes RCAR11 mit (S)-ABA.

Der Balken entspricht einer Länge von 25 μm .

Santiago et al. veröffentlichten Ergebnisse kristallographischer Analysen von RCAR11/(S)-ABA-Kristallen mit der Raumgruppe P1 und einer Elementarzelle von $a = 49,8\text{\AA}$, $b = 61,3\text{\AA}$, $c = 72,5\text{\AA}$ und $\alpha = 105,6^\circ$, $\beta = 102,2^\circ$ sowie $\gamma = 89,9^\circ$ bei einer Auflösung von 2,0 \AA . Protein einer Konzentration von 25 mg/ml (in 20 mM Tris pH 7,5 / 150 mM NaCl / 1 mM β -Mercaptoethanol) mit 1 mM (S)-ABA wurde in 0,2 M Na/Mg-acetat / 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 / 18% PEG 8000 kristallisiert. Die Daten stimmen bis auf die angegebenen Winkel mit denen der oben erwähnten Vermessung meines Kristalls überein. Bei Nishimura et al. dagegen wurde die Raumgruppe P2 (monoklin) mit $a = 50,2\text{\AA}$, $b = 61,4\text{\AA}$, $c = 82,8\text{\AA}$ und $\beta = 98,9^\circ$ ($\alpha = \gamma = 90^\circ$) der Elementarzelle bei einer Auflösung von 1,7 \AA bestimmt. Der Kristallisationspuffer (1:1 mit RCAR11-ABA gemischt) enthielt 0,2 M Ammoniumsulfat / 0,25 M NaCl / 0,2 M Imidazol/Malat pH 6,2 / 20% MPEG 2000.

Anfang 2010 veröffentlichten auch Shibata et al. Daten der Raumgruppenbestimmung von RCAR11 mit ABA, sie kamen ebenfalls bei 20°C mit einer Auflösung von 2,0 Å auf die Raumgruppe P1 mit Werten von 60,6, 71,2 und 49,4 Ångström für die Kantenlänge sowie 115,6°, 113,2° und 100,2° für die Winkel. Ihr Ansatz enthielt 14,6 mg/ml RCAR11, 1,3 mM ABA, 13,3 mM Tris pH 8,0 und 100 mM NaCl plus 67 mM MES pH 6,5 / 5,8 % PEG 6000 in einem Kristallisationspuffer von 0,2 M MgCl₂ / 0,1 M MES pH 6,5 / 17,5% PEG 6000 (Shibata et al., 2010). Dieser Ansatz stimmt sowohl von der Proteinkonzentration sowie der Konzentration und Art der Bestandteile im Puffer am ehesten mit meinem Ansatz (siehe oben) überein, wo neben MgCl₂ derselbe pH-Wert von 6,5 und eine ähnliche Konzentration an PEG (18%) verwendet wurden.

Sowohl die Raumgruppe P1 als auch die Kantenlängen der Elementarzelle meines Kristalls stimmen mit den Daten von Shibata et al. und Santiago et al. überein, was bedeutet, dass der Kristall nur aus RCAR11 und (S)-ABA bestand, die Phosphatase ABI2 dagegen nicht mit auskristallisierte, was wie bereits oben erläutert auf den wohl trotz MUS-Zugabe sehr flexiblen N-Terminus der ABI2-Vollängenversion zurückzuführen ist. Auch Shibata et al. beschreiben das Aussehen ihrer RCAR11-ABA-Kristalle so wie es hier beobachtet wurde, nämlich entweder aus mehreren Platten bestehend (siehe Abb. 2.41 (c) 2. von links), oder aus angehäuften kleinen bzw. zersplitterten Kristallen aufgebaut bzw. unförmig klobig (siehe Abb. 2.41 (c) 2. von rechts).

Nachdem die Struktur von RCAR11 im Komplex mit (S)-ABA sowie auch die anderer RCARs mit und ohne den Liganden zeitgleich mit unseren ersten Messungen Ende 2009 bereits aufgeklärt worden war, wurde darauf verzichtet, weitere Analysen der Daten aus der Röntgenstrukturanalyse vorzunehmen. Im Folgenden soll daher kurz auf die veröffentlichte Struktur von Santiago et al. (2009) eingegangen werden. RCAR11 liegt sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von ABA als Homodimer vor. Das *helix-grip fold*-Motiv konnte bestätigt werden, außerdem sind N-terminal noch zwei kurze Helices α 1 und α 2 (zum Vergleich A und B in Abb. 2.40 b) vorhanden. Die sieben β -Faltblattstrukturen formen eine zentrale Kavität, diese wird durch die lange α -Helix am C-terminalen Ende (α 5 bzw. L) komplettiert. Zwei kleine Helices, α 3 und α 4 (als eine α -Helix D vorhergesagt) schließen die untere Seite der Tasche ab. Die Dimerisationsregion liegt bei den Schleifen zwischen α 4 und β 2 (D und E) sowie zwischen β 3 und β 4 (F und G+H) und dem N-terminalen Part der Helix α 5 (Abb. 2.44 a). Eins von zwei Molekülen des Dimers bindet ABA. Der Ligand ist ganz in der beschriebenen Tasche „vergraben“, was durch diverse hydrophobe und polare Wechselwirkungen stabilisiert wird. Die meisten polaren Interaktionen finden durch Wassermoleküle statt, es gibt nur zwei direkte polare Kontakte: Die Carboxylgruppe

von ABA interagiert mit Lysin 59, die Ketongruppe mit Alanin 89 (siehe Abb. 2.44 b). Die Stereospezifität der (S)-ABA-Bindung wird durch hydrophobe Reste von RCAR11, die über van der Waals-Kräfte mit dem ABA-Molekül wechselwirken, vermittelt. Außerdem sind die ABA-Methylgruppen von C2' und C6' jeweils in engen von RCAR-Aminosäureseitenketten geformten Räumen zu finden.

Durch die Bindung von ABA verändert sich die Konformation von RCAR11 (siehe Abb. 2.44 (a) rechts ohne, links mit Ligand), die Schleifen β 3- β 4 und β 5- β 6 falten sich wie Tor und Riegel (*gate - latch* bzw. *cap - lock*) zusammen und bedecken so das gebundene ABA-Molekül, formen aber auch gleichzeitig eine hydrophobe Oberfläche (β 3- β 4) nach außen, die als Interaktionsregion für PP2Cs in der Struktur heteromere Corezeptorkomplexe identifiziert wurde. Die geschlossene Konformation wird durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitenketten und der Cyclohexanon-Ringstruktur von ABA stabilisiert. Die Dimerstruktur mit nur einem ABA-bindenden Molekül RCAR11 wird als eine Folge der Einlagerung in das Kristallgitter angenommen, in Lösung binden wahrscheinlich beide ABA in einem Verhältnis von 1:1. Eine ausführliche Diskussion der Strukturen von RCAR und ABA ohne und mit Phosphatase sowie des Mechanismus der PP2C-Interaktion folgt in der Diskussion (Punkt 3.2.3).

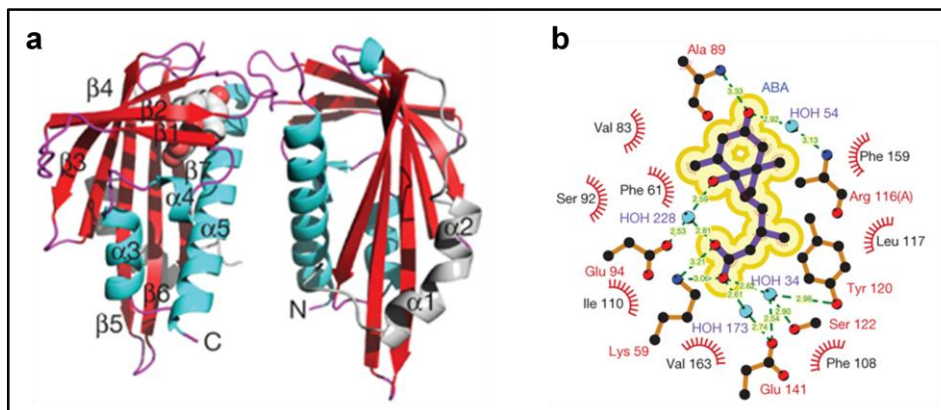


Abb. 2.44: Struktur des Homodimers RCAR11 mit (S)-ABA sowie Bindung des ABA-Moleküls (Santiago et al., 2009).

Die Struktur eines RCAR-Dimers mit einem ABA-bindenden Molekül (links) und einem Molekül RCAR11 ohne ABA (rechts) ist in (a) abgebildet. β -Faltblattstrukturen sind rot, α -Helices blau und Schleifen violett dargestellt, die N-terminale Expansion zweier α -Helices grau (rechts zu sehen). ABA-Atome sind als Kugeln in der Bindetasche dargestellt. (b) zeigt hydrophobe (rote Halbkreise) sowie polare (grüne Linien mit violetten Wassermolekülen) Interaktionen zwischen ABA (gelb umrandet) und den Seitenketten der an der Wechselwirkung beteiligten RCAR11-Aminosäuren.

Melcher et al. präsentierten den ternären Komplex bestehend aus RCAR14, (S)-ABA und HAB1, Miyazono et al. und Yin et al. den Rezeptorkomplex RCAR12-ABI1 zusammen mit (S)-ABA. Die dazu verwendeten Versionen der Phosphatasen waren beide N-terminal stark verkürzt (Abb. 2.45), so dass es naheliegt, dass die Kristallisation der ABI2-Vollängenversion wegen des flexiblen N-Terminus nicht möglich war.

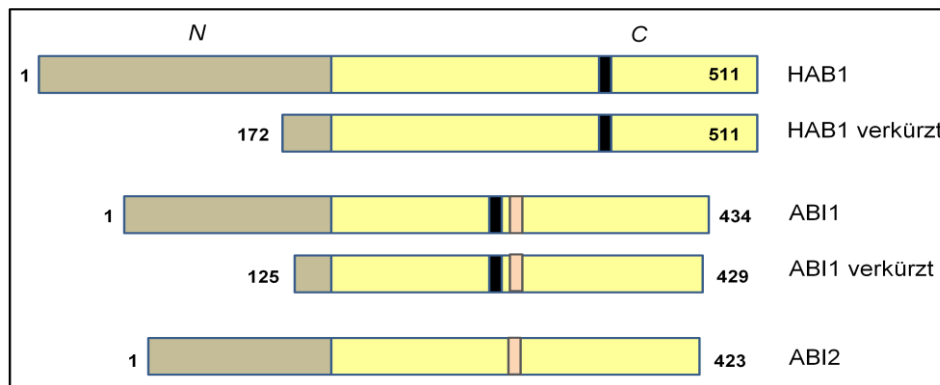


Abb. 2.45: Vergleich der im Rezeptorkomplex kristallisierten Phosphatasen HAB1 und ABI1 mit ABI2.

Es wurden jeweils die verkürzten Versionen von HAB1 und ABI1 zur erfolgreichen Kristallisation eingesetzt (Melcher et al., 2009; Yin et al., 2009). Zum Vergleich sind die Vollängenversionen von HAB1, ABI1 und ABI2 abgebildet. Der N-Terminus mit der nicht-katalytischen Domäne ist grau, die katalytische Domäne gelb dargestellt, das ATP/GTP-Bindemotiv rosa, die potentielle transmembrane Region schwarz (nach Schweighofer et al. (2004)).

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Verkürzungen des ABI2-Proteins konnten nicht in für die Kristallisation ausreichenden Konzentrationen in *E. coli* überexprimiert werden (Anhang 5.2.), daher war es auch nicht möglich, die ebenfalls hinderliche 6-fache Histidinmarkierung am C-Terminus abzuspalten und diese Proteine auf ihre Fähigkeit zur Kristallisation mit RCAR11 und ABA zu testen. Daher findet die Erläuterung der durch andere Gruppen aufgeklärten und bereits veröffentlichten Struktur von RCAR-ABA-PP2C-Rezeptorkomplexen in der Diskussion statt.

2.3.4. Charakterisierung der Superfamilie der Bet v 1-Proteine aus Arabidopsis

Die Bet v 1-Superfamilie in Pflanzen besteht nicht nur aus PR-10 Proteinen (Allergenen) wie Bet v 1, Fra a 1 oder Pru v 1, sondern auch aus Norcoclaurin-synthasen, CSBPs und MLPs (*Major Latex Proteins*). Zur Bet v 1-Familie in *Arabidopsis thaliana* gehören neben den 14 RCAR-Proteinen noch die MLP- und die MLP-related-Proteine (siehe Abb. 2.46). Zur Gruppe der MLPs werden auch einige als Bet v 1-family-Proteine bezeichnete, sowie zwei Proteine noch unbekannter Funktion gerechnet. *Major latex proteins* sind Proteine, die nur in Pflanzen vorkommen und zuerst im Latexsaft von *Papaver somniferum* entdeckt wurden (Nessler et al., 1985; Nessler et al., 1990). Außer in Arabidopsis findet man sie auch in Pflanzen wie Pfirsich, Erdbeere, Melone und der Sojabohne. Ihre Funktion ist weitgehend ungeklärt. Nachdem die Struktur einiger Proteine aus der pflanzlichen Bet v 1-Superfamilie aufgeklärt und eine gemeinsame Struktureigenschaft, die *helix grip*-Faltung und damit die Ausbildung einer hydrophoben Bindetasche, entdeckt worden war, sowie gezeigt werden konnte, dass diese Proteine Pflanzensteroid binden können, wurde 2009 auch die Struktur zweier Arabidopsis-MLP-Proteine, At1g24000.1 und At1g70830.1 (MLP28) (schwarze Pfeile, Abb. 2.46), aufgeklärt (Lytle et al., 2009). Die Struktur der beiden Proteine weist zwar die Bet v 1-typische Faltung auf, jedoch mit signifikanten Unterschieden zum Protein Bet v 1. Zum Beispiel sind bei den MLP-Proteinen die Substrukturen $\alpha 4$ und $\beta 2$ (siehe Abb. 2.44 (a) zum Vergleich) durch eine lange flexible Schleife ersetzt, insgesamt sind die MLP-Proteine kompakter und weisen eine kleinere hydrophobe Kavität auf. Bei NMR-Analysen zur Bindung hydrophober Liganden durch diese MLPs konnte gezeigt werden, dass Progesteron - als repräsentative Verbindung mit hoher struktureller Ähnlichkeit zum pflanzlichen Hormon Brassinolid - von MLPs gebunden wird. Die Expression von MLP28 und 43 (At1g70890) wird durch einen Gravitationsstimulus hochreguliert, was bedeutet, dass den MLP-Proteinen eventuell eine Rolle im Gravitropismus durch Bindung von Hormonen zukommt. Auxin, in Verbindung mit Brassinosteroiden, nimmt eine zentrale Funktion im Gravitropismus ein, zusammen mit anderen Phytohormonen wie Cytokinin (Kimbrough et al., 2004; Li et al., 2005), so dass diverse Hormone als Liganden für MLPs in Frage kommen. Die Expression der MLP- und MLP-verwandten Proteine wird zum Großteil durch ABA und ABA-induzierende Stressbedingungen herunterreguliert, so wie dies auch bei den RCAR-Proteinen der Fall ist.

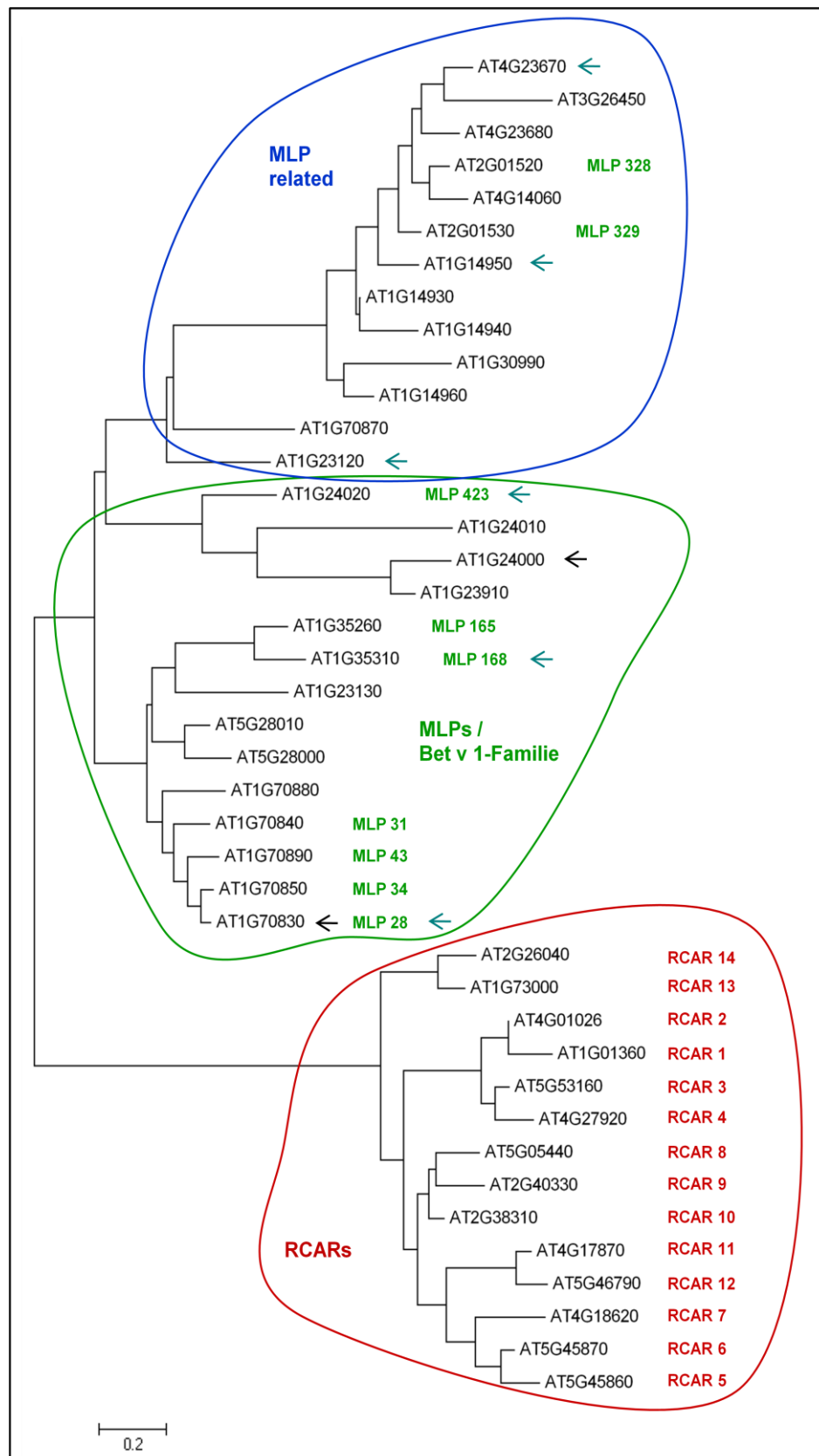


Abb. 2.46: Phylogenetischer Baum der Bet v 1-Superfamilie in *A. thaliana*.

Der Baum wurde auf der Grundlage einer BLAST-Suche nach Sequenzhomologen von Bet v 1 bzw. RCAR-Proteinen in *Arabidopsis* über die *Minimal Evolution*-Methode mit dem Programm MEGA 4.0 erstellt. Die Struktur von mit schwarzen Pfeilen gekennzeichneten MLPs ist bekannt, mit blauen Pfeilen gekennzeichnete Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit für den Y2H-Screen in passende Vektoren kloniert.

Die PP2C-Familie in *Arabidopsis thaliana* mit über 80 Mitgliedern besteht neben der Subgruppe A noch aus diversen anderen Untergruppen (Schweighofer et al., 2004; Xue et al., 2008). Expressionsanalysen lassen darauf schließen, dass die meisten PP2Cs der Subfamilie A primäre Rollen in der Stresstoleranz, vor allem in der ABA-Signaltransduktion einnehmen, und die der Subfamilie D als positive Regulatoren in ABA-vermittelten Signalwegen wirken (siehe Abb. 2.47).

		ABA	Osmotischer Stress	Salz	Kälte	Hitze			ABA	Osmotischer Stress	Salz	Kälte	Hitze
→	AT4G26080	↑	↑	↑	↑		J	AT3G63320		↑			↑
→	AT5G57050	↑	↑	↑	↑	↑		AT3G63340		↑			↑
→	AT1G72770	↑	↑	↑			→	AT1G48040					↓
→	AT1G17550	↑	↑					AT3G17250					↓
A	→ AT3G11410	↑	↑	↑	↑		G	AT3G62260	↑	↑	↑	↑	↑
→	AT2G29380	↑	↑	↑	↑	↑	→	AT2G25620	↑	↑	↑	↑	
→	AT5G59220	↑	↑	↑	↑	↑		AT2G33700		↑			
→	AT1G07430	↑	↑	↑	↑	↑		AT3G51470	↓				↓
→	AT5G51760	↑	↑	↑		↑		AT4G27800				↓	
	AT4G08260		↑	↑	↑			AT1G18030					
	AT3G27140					↑		AT4G28400		↑			
	AT2G30020							AT2G20630	↓				
B	→ AT1G07160		↑	↑			F1	AT3G15260	↑				
→	AT2G40180		↑	↑	↑			AT1G78200					
	AT1G67820							AT1G34750					↓
	AT5G02400							AT1G22280					
	AT3G09400							AT2G34740					
	AT1G07630	↓	↑				F2	AT5G24940	↑				
C	→ AT2G28890						→	AT5G10740	↑	↑			
	AT2G35350							AT4G31750					
	AT2G46920							AT5G53140					
→	AT3G16560				↑	↑		AT1G43900					
	AT3G51370							AT3G23360					
→	AT5G66080	↑	↑			↓		AT5G36250					
	AT4G38520	↓	↓	↓			→	AT3G02750					↓
	AT3G12620							AT1G79630		↑			↑
	AT3G55050							AT1G16220					
D	→ AT5G02760	↓	↓	↓				AT4G03415					
	AT3G17090						E	AT1G03590					
	AT4G33920		↑	↑	↑			AT5G01700	↓				
	AT5G06750							AT5G26010					
	AT4G33500					↓		AT4G32950					
→	AT5G66720							AT3G05640		↑		↑	
K	→ AT4G16580						→	AT5G27930	↑	↑	↑		↓
	AT2G30170							AT3G16800	↓	↑		↑	
→	AT4G11040						L	AT3G06270					
	AT5G19280						→	AT2G20050					
	AT2G40860							AT1G09160		↓			↓
I	→ AT2G25070					↑	H	AT1G68410					↓
	AT4G31860				↓	↓	→	AT1G47380					↓

Abb. 2.47: Einteilung der PP2Cs aus *Arabidopsis* und ihr Expressionsmuster nach ABA- bzw. Stressbehandlung, nach Xue et al. (2008).

Die Einteilung der PP2Cs in 13 Untergruppen und die Hoch- bzw. Herabregulation (graue Pfeile) ihrer Genexpression als Antwort auf ABA und ABA-induzierende Stressbedingungen sind hier dargestellt. Für den Y2H-Screen verwendete Phosphatasen sind mit blauen Pfeilen (Klonierung durch S. Fuchs) und schwarzen Pfeilen (bereits vorhandene) gekennzeichnet.

Nachdem die Interaktion zwischen RCAR-Proteinen und PP2Cs aus der Subgruppe A und ihre Rolle in der ABA-Perzeption festgestellt und ausführlich untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob andere Proteinfamilien (MLPs) aus der Bet v 1-Familie eventuell ebenfalls eine Rolle als Interaktionspartner von PP2Cs der Klasse A ohne oder mit ABA bzw. anderen Phytohormonen als Liganden spielen bzw. ob andere PP2C-Subgruppen mit RCARs interagieren können, oder ob die MLP-Gruppe vielleicht spezifisch mit einer der PP2C-Gruppen außer A in Wechselwirkung treten kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen über das *Yeast Two-Hybrid* System die Interaktion sämtlicher RCAR-Proteine mit sämtlichen Mitgliedern der PP2C-Gruppe A und die Abhängigkeit ihrer Interaktion von (S)-ABA überprüft werden, da sich bei Park et al. (2009) Unterschiede in dieser zwischen den einzelnen RCAR-Untergruppen mit HAB1 andeuteten. Zum anderen aber sollten mögliche bisher unbekannte Interaktionen zwischen Mitgliedern der Bet v 1-Familie und Vertretern der PP2C-Familie überprüft werden. Alle Kombinationen der in Abb. 2.46 und 2.47 mit Pfeilen gekennzeichneten Proteine sowie alle RCAR-Proteine (außer RCAR8) wurden auf Interaktion getestet, sowie jeweils der Einfluss von (S)-ABA, anderen Phytohormonen und einem Extrakt aus Pflanzenzellen überprüft.

2.3.4.1. Einfluss von Hormonen und Pflanzenzellextrakt auf die Interaktion von Bet v 1-Proteinen mit Phosphatasen

Zur Durchführung der Tests war es nötig, vorher die cDNA-Sequenz in Vektoren zu klonieren, die im Y2H-System verwendet werden konnten. Dazu wurden als Vektoren pGAD424 (Aktivierungsdomäne), der das Wachstum der AH109-Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Leucin ermöglicht, und pBridge (Bindedomäne), der Wachstum ohne Tryptophan ermöglicht, verwendet. MLPs und die RCAR-Proteine 1 und 6 als Positivkontrollen wurden als pGAD-Konstrukte, PP2Cs mit ABI1 und ABI2 als Positivkontrollen als pBridge-Konstrukte verwendet. Die Interaktion von RCAR1 und ABI1 bzw. ABI2 findet in Hefe unabhängig von der Anwesenheit von (S)-ABA statt (Ma et al., 2009). Trat Autoaktivität mancher Proteine (Leervektoren als Negativkontrolle) auf, wurde die Kombination pGAD-PP2C und pBridge-MLP/RCAR getestet. Die Konstrukte wurden nacheinander durch Einzeltransformationen in die Hefezellen transformiert und Interaktionen durch Wachstumstests auf Selektionsmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin festgestellt, außerdem durch β -Galactosidase-Assays. Durch Interaktion der beiden Proteine wird nämlich neben dem Histidin-Auxotrophievermittelnden Reporter gen auch das *lacZ*-Reporter gen aktiviert.

Beim Wachstumstest konnte keine Interaktion der sechs getesteten MLP-Proteine mit Phosphatasen aus der Subgruppe A oder aus anderen Subgruppen beobachtet werden, insgesamt wurden hier 150 mögliche Kombinationen samt ihrer jeweiligen Kontrollen getestet. Dagegen zeigten die RCAR-Proteine 1 und 6 mit Phosphatasen aus der Subgruppe A Interaktion (näheres dazu siehe Punkt 2.3.4.2). Die Möglichkeit einer nur schwachen und deshalb nicht feststellbaren Interaktion zwischen MLPs und PP2Cs bei Abwesenheit des richtigen Liganden wie ABA konnte durch Zugabe von Abscisinsäure bzw. von einem Hormonmix mit jeweils 50 μM Thidiazuron, Indoleessigsäure, 2,4-D, Methyljasmonat und Salicylsäure, je 10 μM Gibberellinsäure GA3, Kinetin und BAP, sowie 1 μM ACC vermindert werden. Um auch andere mögliche Liganden wie Lipide für die Interaktion bereitzustellen, wurde dem Selektionsmedium Pflanzenzellextrakt zugegeben, auch hier zeigte sich kein Interaktionswachstum. Abb. 2.48 (b) zeigt Beispiele des Wachstumstests auf Selektivmedium, Abb. 2.48 (a) beispielhafte Ergebnisse aus der β -Galactosidase-Aktivitätsmessung. Unter den gegebenen Bedingungen konnte außer der Interaktion zwischen RCARs und Phosphatasen der Subgruppe A keine Interaktion von anderen Bet v 1-Proteinen und weiteren getesteten PP2C-Subgruppen festgestellt werden.

Um Interaktionspartner von MLPs zu identifizieren, könnte zukünftig ein Screening im Hefesystem mit Hilfe einer cDNA-Bibliothek mit den MLPs als Köderproteine durchgeführt werden. Falls eine Interaktion mit anderen Proteinen allerdings nur bei Anwesenheit eines Liganden möglich ist, muss dazu die Methode der Zellextrakt-Zugabe noch verbessert werden, da es durchaus sein kann, dass spezifische Verbindungen nicht in ausreichender Konzentration im Extrakt enthalten sind, um eine Aufnahme aus dem Medium in die Hefezelle zu gewährleisten.

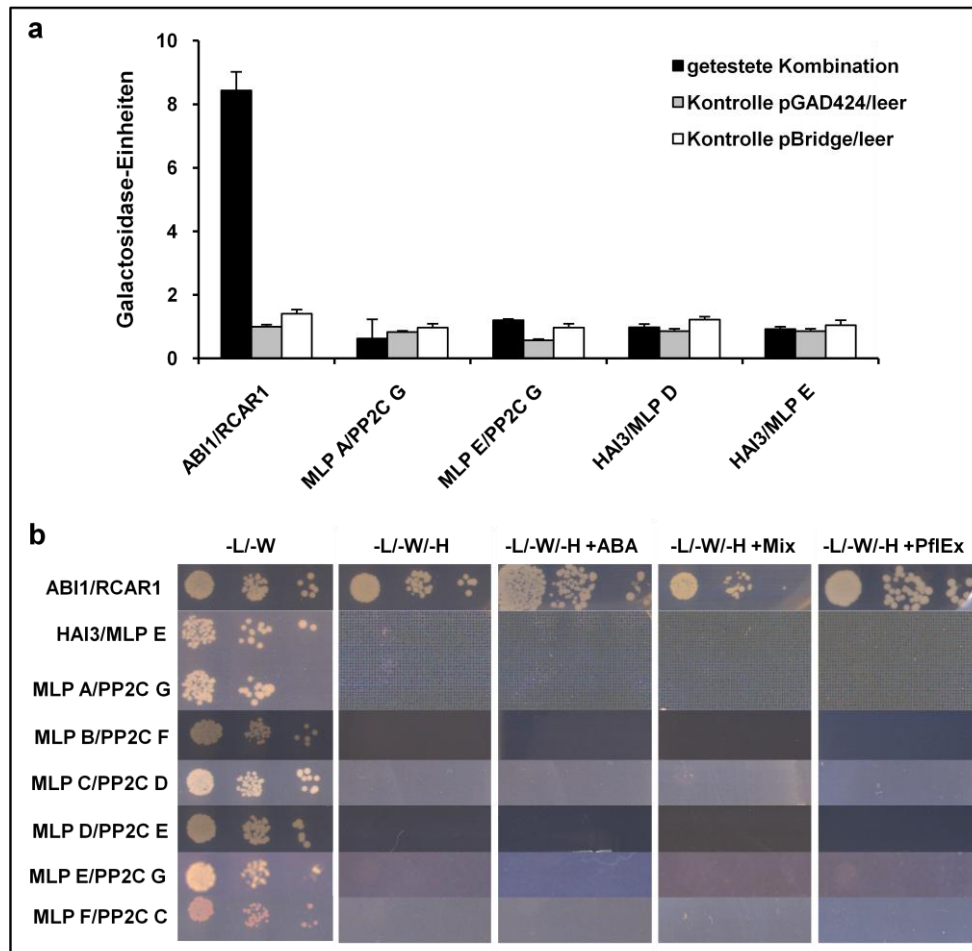


Abb. 2.48: Test auf Interaktion zwischen MLP-Proteinen und Phosphatasen.

In (a) sind mehrere Beispiele der Untersuchung auf Interaktion von MLPs A und E mit PP2Cs der Subgruppen A und G durch Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität dargestellt, ABI1/RCAR1 dient dabei als Positivkontrolle. Die Werte setzen sich aus jeweils zwei Doppelbestimmungen (mit Standardabweichung) zusammen. Abbildung (b) zeigt Wachstumstests verschiedener MLP/PP2C-Kombinationen auf Selektivmedium -L/-W/-H, mit 30 μ M (S)-ABA bzw. einem Hormonmix oder Pflanzenextrakt (Verdünnung von links nach rechts: 1500, 150 und 15 Zellen pro Spot). Zur Benennung MLP A-F siehe 2.7.2. Bei den PP2Cs handelt es sich (von oben nach unten) um At1g48040, At1g72770, At5g66080, At1g79630, At1g48040, At1g07630.

2.3.4.2. Interaktion von Phosphatasen des Typs 2C mit RCAR-Proteinen

Wie bereits unter Punkt 2.3.4.1 beschrieben, wurden RCARs als pGAD424-Konstrukte und PP2Cs als pBridge-Konstrukte eingesetzt, außer bei Autoaktivierung der Histidin-Auxotrophie durch manche Phosphatasen. Wie bei den MLP-Proteinen wurde die Interaktion mit Phosphatasen bei Ab- und Anwesenheit diverser Liganden neben ABA bzw. Pflanzenzellextrakt untersucht. Zwischen PP2Cs, die nicht der Subgruppe A angehören, und den RCAR-Proteinen kam unter den gegebenen Bedingungen keine Interaktion zustande.

Nun sollten Unterschiede in der Wechselwirkung zwischen den RCAR-Proteinen 1-14 (außer RCAR8, welches zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht in Y2H-Vektoren kloniert war) und PP2C-Proteinen der Subgruppe A (AHG3, HAI2, HAI3, ABI1, ABI2) im Hinblick auf Abhängigkeit vom Liganden (S)-ABA untersucht werden.

Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Für RCAR-Mitglieder der Klasse I (RCAR1-4) konnte in allen getesteten Kombinationen eine Interaktion mit den Phosphatasen der Subgruppe A im Hefesystem gezeigt werden, und zwar ABA-unabhängig, was bedeutet, dass die Affinität zum Kontakt mit Phosphatasen für diese Proteine sehr hoch sein muss. Die Inhibierung der Phosphatasen ist im *in vitro*-Testsystem nur bei Anwesenheit von Abscisinsäure möglich, was im Rahmen dieser Arbeit zum Beispiel für RCAR1 und RCAR3 gezeigt wurde und charakteristisch für die Funktion von RCARs und PP2Cs als Corezeptoren von ABA ist. Für RCAR-Mitglieder der Klasse II ist die ABA-unabhängige Interaktion abhängig von der jeweiligen Phosphatase, RCAR6 bis RCAR9 weisen eine stärkere Interaktion mit AHG3 und ABI2 auf, als mit den beiden getesteten HAI-Proteinen. Die RCARs 5, 6 und 7 sind in ihrer Wechselwirkung mit den getesteten Phosphatasen vergleichbar mit der von Klasse I-Mitgliedern, was jedoch nicht für die HAI2-Interaktion gilt. RCAR10 hingegen verhält sich eher wie die Klasse III der RCARs, wo nur vereinzelt unter Anwesenheit von ABA eine Interaktion über den Histidin-Auxotrophie-Wachstumstest nachweisbar war. Betrachtet man die Homologie der RCARs, so ist RCAR10 dasjenige Protein der Klasse II, welches am nächsten zu Klasse III-Proteinen verwandt ist.

RCAR11 interagiert nicht mit HAI2 und HAI3, *in vitro* konnte passenderweise gezeigt werden, dass HAI2 bei gleichzeitiger Anwesenheit von RCAR11 und (S)-ABA nur zu 60% inhibiert wird, andere Phosphatasen wie ABI2 und ABI1 dagegen bis zu 90% (siehe Abb. 2.30), die Affinität zur Interaktion sowie die Sensitivität der PP2C-Inhibierung ist damit deutlich geringer als zum Beispiel bei RCAR1. Für RCAR12 konnte in Hefe keine Interaktion mit PP2Cs der Subgruppe A nachgewiesen werden, es inhibiert *in vitro* die ABI2-Aktivität um 60% (Abb. 2.31), im Vergleich dazu können RCAR1 und RCAR3 diese um bis zu 95% bei gleicher (S)-ABA-Konzentration blockieren, so dass RCAR12 wohl eine eher geringe Affinität zur ABA-Bindung bzw. PP2C-Interaktion aufweist. Park et al. (2009) konnten in ihrem Hefesystem (Galactosidase-Test) für RCAR12 bei Anwesenheit von ABA eine im Vergleich zu anderen RCARs eher schwache Interaktion mit AHG3 und HAB1 zeigen.

Interaktion PP2Cs / RCARs		AHG3		HAI2		HAI3		ABI1		ABI2	
		- ABA	+ ABA	- ABA	+ ABA	- ABA	+ ABA	- ABA	+ ABA	- ABA	+ ABA
Klasse I	RCAR1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RCAR2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RCAR3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RCAR4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Klasse II	RCAR5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	RCAR6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	RCAR7	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	RCAR9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	RCAR10	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Klasse III	RCAR11	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	RCAR12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RCAR13	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	RCAR14	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+

Tabelle 2.3: Übersicht über die Interaktion von RCAR-Proteinen mit Phosphatasen aus der Subgruppe A in Abhängigkeit von ABA.

RCAR-Proteine (pGAD424-Vektor) und PP2Cs (pBridge-Vektor) wurden nacheinander in die gleichen Hefezellen transformiert und die Interaktion über Wachstumstests verschiedener Verdünnungen auf Selektivmedium (-L-/W-/H) mit und ohne 30 μ M (S)-ABA überprüft.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten von Park et al. (2009) stellte sich eine Übereinstimmung AHG3 betreffend heraus, als einzige Abweichung interagierte dort RCAR10 auch ohne ABA. Für die Klasse III der RCARs war die Anwesenheit von ABA zur Interaktion eine Voraussetzung, wie auch hier gezeigt. Für HAB1 (hier nicht getestet), zeigten Park et al. (2009) und Santiago et al. (2009) für die Klassen I und II eine ABA-unabhängige Wechselwirkung zwischen der Phosphatase und den RCAR-Proteinen, die Klasse III wechselwirkt auch hier nur über (S)-ABA mit der Phosphatase. HAI1 zeigte nach den Ergebnissen des Wachstumstests keine Interaktion mit RCAR-Proteinen, jedoch fehlen Daten, die zum Vergleich herangezogen werden könnten, es bleibt zu untersuchen, wie diese Phosphatase im *in vitro*-Assay mit RCAR-Proteinen reagiert. Obwohl für RCAR7 aufgrund von Aminosäure-Unterschieden bei Motiven, die zur ABA-Bindung und PP2C-Interaktion beitragen, eine von den anderen RCAR-Proteinen abweichende Sekundärstruktur vermutet wird, zeigte es im verwendeten Hefe-Testsystem keine starken Abweichungen zu anderen Proteinen der Klasse II, nur für HAI2 scheint keine Affinität zur Interaktion zu bestehen.

Wegen der im Vergleich zu anderen RCARs abweichenden Aminosäuresequenz in Bereichen, die zur ABA-Bindung beitragen (siehe Anhang 5.3; SGFPA statt SGLPA und NHRL statt D/EHRL), wurde der Effekt von RCAR7 auf die ABA-Signaltransduktion im Vergleich zu RCAR1 und RCAR3 im Protoplastensystem mit Hilfe transienter Expression untersucht. Das Protoplastensystem ist eine schnelle und sensitive Methode, um ABA-Signaltransduktionsmechanismen durch ABA-regulierte Reporter-konstrukte wie *pRD29B::LUC* zu untersuchen. Cotransfektionen des Reporter-konstrukts mit Effektorproteinen wie den RCARs oder bzw. und den PP2Cs unter der Kontrolle des 35S-Promotors in ABA-defiziente *aba2-1* Protoplasten wurden durchgeführt und ihr Einfluss auf die Steigerung der Luciferase-Reporterexpression mit und ohne exogene ABA analysiert. RCAR7 führte dabei, genau wie RCAR1 und RCAR3, zu einer verstärkten ABA-Antwort (Abb. 2.49 a). Die ektopische Expression von RCAR1, 3 und 7 führte ohne zusätzliche ABA zu einer Stimulierung der Luciferase-Expression um Faktoren von 20, 6 und 8. Die Zugabe von 10 μ M exogener ABA zu den RCAR-exprimierenden Protoplasten ergab eine Stimulation um Faktoren von 108, 93 und 88. Somit konnte gezeigt werden, dass RCAR7 die ABA-Signaltransduktion stimuliert, ebenso wie RCAR1 und RCAR3 (Ma et al., 2009; Szostkiewicz et al., 2010). Für RCAR1 und RCAR3 konnte bereits gezeigt werden, dass die zusätzliche Expression von negativen Regulatoren der ABA-Signaltransduktion, den Phosphatasen des Typs 2C wie ABI1 und ABI2, sowohl die RCAR- als auch die ABA-stimulierte Reporterexpression reduziert. PP2C-Expression in Protoplasten, die kein RCAR-Konstrukt enthielten, führte zu einer sehr effektiven Blockade der ABA-Antwort. ABI1 reduziert die RCAR1- und ABA-stimulierte LUC-Expression um einen Faktor von 1,8, die RCAR3- bzw. RCAR7-stimulierte Reporterexpression um Faktoren von 24 bzw. 31 (Abb. 2.49 b). ABI2 verringert die RCAR1- und ABA-stimulierte LUC-Expression um einen Faktor von 1,7, die RCAR3- bzw. RCAR7-stimulierte Reporterexpression sogar um Faktoren von 39 bzw. 40 (Abb. 2.49 c).

Die Ergebnisse des Y2H-Tests sowie der transienten Expression in Protoplasten zeigen eine Funktion von RCAR7 in der ABA-Signatransduktion ähnlich vor allem der von RCAR3 an. Ob und inwieweit sich die Aminosäure-Sequenzabweichungen von RCAR7 auf die Proteinstruktur und die Wechselwirkung mit ABA bzw. den PP2Cs auswirkt, könnte mit einer Strukturanalyse des Rezeptorkomplexes aus RCAR7, PP2C und Ligand abgeklärt werden.

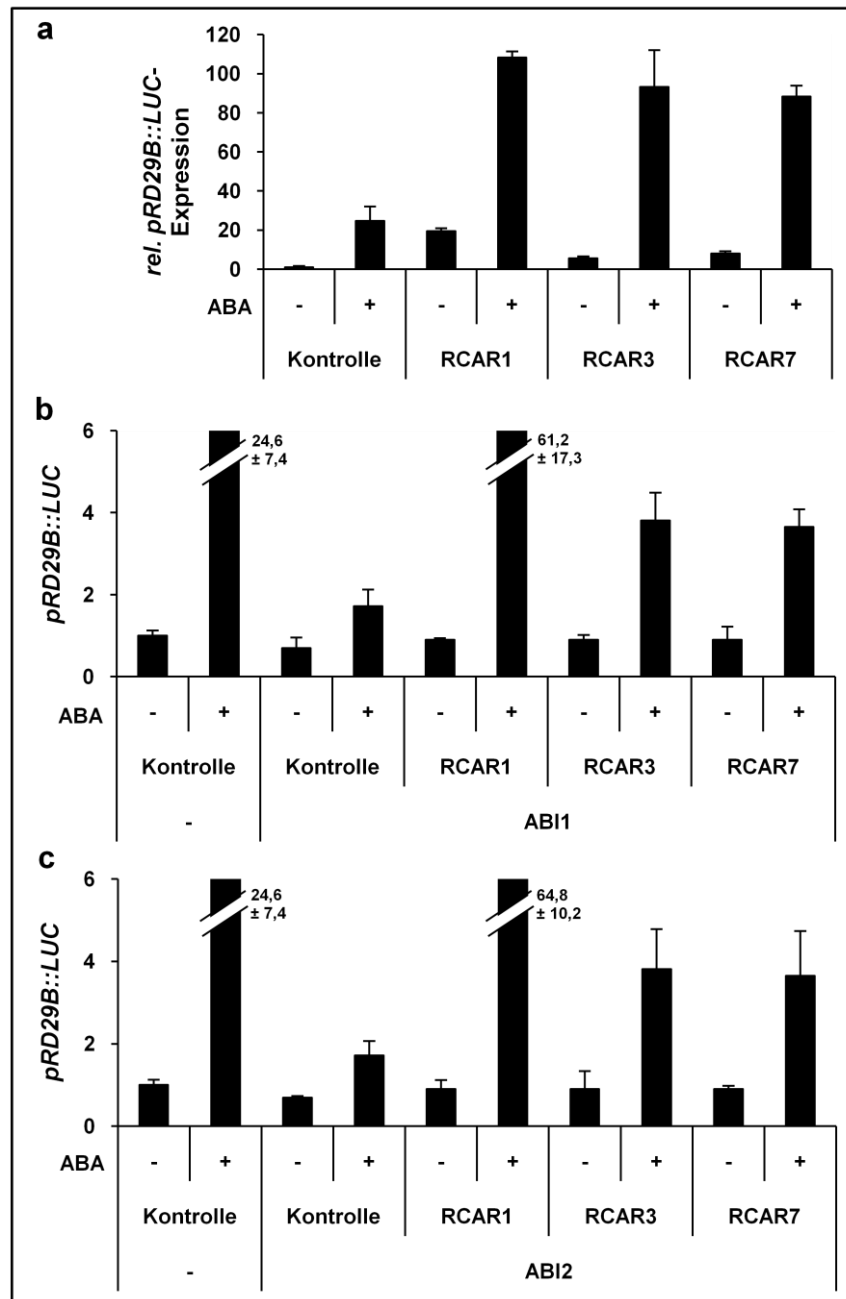


Abb. 2.49: Einfluss von RCARs und PP2Cs auf die ABA-Signaltransduktion in Arabidopsis-Protoplasten.

Die ABA-induzierte Steigerung der Reporterexpression von *pRD29B::LUC* wurde in ABA-defizienten *aba2-1* Protoplasten vermessen (als *relative light units*, normalisiert über *35S::GUS* (RLU/RFU) und bezogen auf den Kontrollwert ohne ABA und Effektoren mit Standardabweichung). (a) zeigt die Regulierung der Genexpression durch die Effektoren RCAR1, 3 und 7 in Ab- bzw. Anwesenheit von 10 μ M (S)-ABA (Zugabe 2,5 h nach Transfektion). Die RCAR- und ABA-stimulierte Reporterexpression wird bei gleichzeitiger Expression von ABI1 (b) und ABI2 (c) in Anwesenheit und Gegenwart von 10 μ M (S)-ABA inhibiert.

3. Diskussion

3.1. Funktionen der Abscisinsäure bei Salzstress

Ein hoher Salzgehalt im Boden wirkt sich allgemein negativ auf die darauf wachsenden Pflanzen aus, die Folgen von Salinität sind die Reduktion der Photosyntheserate, die Störung des Ionengleichgewichts (Verhältnis Kalium/Natrium) in den Zellen und der damit verbundene Nährstoffmangel, eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, sowie die Störung der Proteinbiosynthese (Hurkman & Tanaka, 1987; Locy et al., 1996; Miller et al., 2010; Shabala & Cuin, 2008; Zhang & Xing, 2008). Diese führen zu eingeschränktem Wachstum und Fruchtertrag. Neben einem schnellen osmotischen Effekt innerhalb von Minuten bis Stunden übt Salzstress über längere Zeit durch die gestörte Ionenhomöostase einen cytotoxischen Effekt auf die Pflanze aus.

3.1.1. Die ABA-Antwort auf osmotischen Stress

Durch hohe Salzkonzentrationen im Boden wird die Wasserverfügbarkeit für die darauf wachsenden Pflanzen stark reduziert, eine osmotische Wiederanpassung durch Erniedrigung des osmotischen Potentials in den Pflanzenzellen ist nötig, was durch die Wirkung von ABA erleichtert wird. ABA vermittelt das Schließen der Spaltöffnungen, wodurch der Wasserverbrauch durch eine verringerte Transpirationsrate reduziert wird (Chinnusamy et al., 2004; Christmann et al., 2006; Schroeder et al., 2001a). Osmotischer Stress, ausgelöst durch Trockenheit oder Salz, führt zu einer erhöhten Aktivierung der ABA-Biosynthese, sowie zu einer Freisetzung dieser aus ihrer Speicherform, einem ABA-Glucose-Konjugat, durch Aktivierung der β -Glucosidase AtBG1 (Christmann et al., 2005; Lee et al., 2006).

ABA-Antwort auf Salzstress

Die ABA-Aktion in der Antwort auf Salzstress wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht und mit der bei Trockenstress verglichen. Dazu wurden unterschiedliche ABA-Reportersysteme in transgenen Pflanzen benutzt, um salzinduzierte Änderungen in der ABA-Aktivität nichtinvasiv *in vivo* nachweisen zu können.

Promotoren von Genen mit ABA-induzierter Expression wurden Reportergenen wie der Luciferase, EGFP und der Glucuronidase vorgeschaltet. Neben dem Promotor von AtHB6, einem Zielgen der Phosphatase ABI1 (Christmann et al., 2005; Himmelbach et al., 2002), wurde der RD29B-/LTI65-Promotor (*Light and Temperature Induced 65*)

(Nordin et al., 1993; Uno et al., 2000) sowie der RD29A-Promotor verwendet (Ishitani et al., 1997; Narusaka et al., 2003), diese enthalten alle ABRE-Elemente, RD29A und B verfügen zusätzlich über DRE-Elemente.

Ein Test des Reportersystems zeigte die ABA-abhängige Aktivierung der Wildtyp-Pflanzen durch exogen zugeführte ABA (Abb. 2.1 und Abb. 2.2), bei der ABA-insensitiven Mutante *abi1-1* (Koornneef et al., 1984) wurde die Reporterexpression dagegen nicht angeschaltet. Während unter Normalbedingungen ohne Stress geringe Mengen an ABA im Ruhezentrum und den Columellazellen der Wurzeln sowie im Bereich der Leitgewebe und Stomata gefunden wurden (Christmann et al., 2005), zeigt sich bei Salzstress eine deutliche ABA-Akkumulation in den Kotyledonen und kaum in den Wurzeln, obwohl diese dem Stress ausgesetzt waren (Abb. 2.3).

Die Untersuchung des zeitlichen und räumlichen Musters der ABA-Aktion deckte einen Anstieg der ABA-abhängigen Reporteraktivität nach 2 h im Hypokotyl und den Kotyledonen bzw. nach 4 h im Leitgewebe auf, später konnte eine Verteilung der Aktivität im ganzen Blatt ausgemacht werden, mit Intensitätsmaxima in den Schließzellen (Abb. 2.4, 2.6 und 2.7). Die identifizierten Aktionsorte entsprechen im Wesentlichen den Biosyntheseorten von Abscisinsäure, nämlich den Schließzellen und dem Zellbereich, der die Leitelemente umgibt.

Osmotischer Stress führt zu einer vermehrten Umsetzung von Carotinoiden zu Xanthoxin, der Vorstufe von ABA (Qin & Zeevaart, 1999), die Schlüsselenzyme der ABA-Biosynthese wie NCED, ABA2 und AAO werden vor allem in den Zellen entlang des Leitsystems, in der Epidermis und den Schließzellen exprimiert (Cheng et al., 2002; Endo et al., 2008; Gonzalez-Guzman et al., 2002; Koiwai et al., 2004; Seo et al., 2000; Tan et al., 2003). Das beobachtete Muster der Salzstress-induzierten ABA-Wirkung entspricht genau dem von osmotischem Stress, wie von Christmann et al. (2005) beschrieben.

Ein hydraulisches Signal induziert die ABA-Biosynthese im Spross

Nach 24 h konnte ein 30- bis 60-facher Anstieg des ABA-Gehaltes im Spross sowohl über die Messung der Reporteraktivität als auch über massenspektrometrische Analysen festgestellt werden (Abb. 2.5 und 2.8), während sich an den Wurzelgehalten nichts änderte. Früher wurde davon ausgegangen, dass durch osmotischen Stress auf die Wurzel dort die ABA-Biosynthese angeschaltet wird und gebildete ABA dann in den Spross transportiert wird, um dort unter anderem den Stomataschluss zu induzieren und damit die Transpiration zu regulieren (Sauter et al., 2001; Wilkinson & Davies, 2002).

Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Daten für Trockenstress aus Christmann et al. (2005) und den hier ermittelten für Salzstress. In den Wurzeln neu gebildete ABA müsste schnell in den Spross transportiert werden, jedoch braucht sowohl die Biosynthese von ABA als auch der Transport chemischer Signale eine längere Zeit, bei hohen Bäumen sogar länger als einen Tag (Schulze & Hall, 1982). Es wurde zu keiner Zeit ein erhöhtes Reporterproteinlevel in den Wurzel-Leitgeweben festgestellt, welches zu einer so hohen Konzentration passen würde, wie sie im Spross bei der Antwort auf osmotischen Stress nachgewiesen wurde. Auch durch Spaltung der ABA-Glucoseester können diese Konzentrationen aufgrund der geringen Poolgrößen des Konjugats nicht erhalten werden (Priest et al., 2006).

Sehr viel wahrscheinlicher ist, dass der über die Wurzeln wahrgenommene osmotische Stress ein Langstreckensignal induziert, welches die ABA-Biosynthese im Spross vermittelt, Untersuchungen in Tomaten gaben darauf den ersten Hinweis (Holbrook et al., 2002). Tatsächlich konnte bei Propfungsversuchen mit Arabidopsis-Pflanzen die Generierung eines hydraulischen Signals und die Weiterleitung dessen zum Spross gezeigt werden (Christmann et al., 2007). Hierbei wurden Wildtyp-Sprosse auf eine ABA-defiziente *aba2*-Wurzelgrundlage gepfropft und die Stomataantwort unter Trockenstress untersucht. Obwohl der Wurzelteil kaum in der Lage war ABA zu bilden, rief osmotischer Stress eine mit dem Wildtyp vergleichbare Stomataantwort hervor, was bedeutet, dass nicht ABA das Langstreckensignal sein kann, sondern durch ein anderes Signal die ABA-Antwort im Spross aktiviert wurde. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieses Signal hydraulischer Natur ist (Christmann et al., 2007).

Wie der Mechanismus der Perzeption des osmotischen Signals in den Wurzelzellen abläuft, ist noch weitgehend ungeklärt, ebenso ist unbekannt, wie das hydraulische Langstreckensignal im Spross decodiert wird, um die ABA-Biosynthese auszulösen bzw. welche Komponenten dabei eine Rolle spielen. Eine Möglichkeit wäre die Stimulation spannungsaktivierter Sensoren bzw. mechanosensitiver Ionenkanäle durch das hydraulische Signal, welche nachfolgend die ABA-Antwort auslösen könnten (Kung, 2005; MacRobbie, 2006b; Netting, 2000; Sukharev & Anishkin, 2004).

3.1.2. Limitierte Aktivierung von ABA-Antworten durch Salzstress

Der rasch einsetzende osmotische Effekt von NaCl, der die Wasseraufnahme erschwert und sowohl die ABA-induzierte Signaltransduktion in die Wege leitet als auch ABA-unabhängige Genexpression zur Folge hat (Nakashima et al., 2000), geht einer ionischen Wirkung voraus, die vor allem in der Konkurrenzsituation zwischen Natrium- und Kaliumionen zum Tragen kommt. Diese erstreckt sich auf die Aufnahme

in die Pflanzenzelle durch Ionenkanäle und die Besetzung von Enzymbindestellen durch Natriumionen in der Zelle, was die Cytotoxizität von Natrium begründet. Kalium wirkt als Cofaktor vieler Enzyme und ist an diversen Regulationsprozessen sowie an der Proteinbiosynthese beteiligt, ein durch eine hohe Natriumionen-Aufnahme verändertes Kalium/Natrium-Ionenverhältnis führt also zu Störungen in all diesen Bereichen (Hosy et al., 2003; Lebaudy et al., 2007; Pardo et al., 2006; Shabala & Cuin, 2008; Zhu, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die ABA-abhängige Reporterantwort bei NaCl-Stress weniger stark induziert wird als bei Mannit-Stress gleichen osmotischen Potentials, die Reporterantwort war dort zweimal so stark (Abb. 2.8).

Mannit gelangt schon aufgrund seiner Größe im Gegensatz zu NaCl nur sehr schwer in die Pflanzenzelle, die Verbindung ist ungiftig für die Pflanzen und ruft einzig osmotischen Stress hervor, während NaCl, in die Pflanze aufgenommen, zusätzliche ionentoxische Effekte hervorruft. Die verringerte ABA-abhängige Reporteraktivierung kann sowohl auf eine weniger intensive ABA-Signaltransduktion als auch auf eine geringer induzierte ABA-Biosynthese bzw. Freisetzung aus Speicherformen zurückzuführen sein. Tatsächlich ist bei NaCl-Stress die ABA-Signaltransduktion gestört und auch die ABA-Biosynthese eingeschränkt (Abb. 2.9 und 2.13). Bei einem osmotischen Potential von ca. -0,9 MPa bzw. einer NaCl-Konzentration von bis zu 200 mM jedoch sollte die toxische Komponente nach nur 24 h Stress jedoch noch keinen großen Einfluss haben, bis zu 200 mM NaCl werden von Arabidopsis-Keimlingen bis zu 20 Tage lang toleriert, bevor diese ihr Wachstum ganz einstellen und absterben (Inan et al., 2004).

Ein ähnliches Ergebnis wie hier in dieser Arbeit gezeigt (Abb. 2.9 und 2.15) erhielten auch Pang et al. (2010), was den Zustand von Arabidopsis-Pflanzen nach 5 bzw. 6 Tagen bei 150 mM NaCl betrifft. Die Überlebensrate gestresster Pflanzen wurde durch die reduzierte Chlorophyllkonzentration kaum beeinträchtigt (Pang et al., 2010).

Abscisinsäure ermöglicht eine Anpassung der Pflanzen an starke Trockenheit bzw. osmotischen Stress, was durch ABA-unabhängige Mechanismen komplettiert wird (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Zhu, 2002). Tatsächlich ergab die Untersuchung des osmotischen ABA-unabhängigen Signalwegs (Abb. 2.10), sowie des NaCl-Effekts auf die Auxin-Signaltransduktion (Abb. 2.11) und die Untersuchung der Genexpression im Allgemeinen (Abb. 2.12) keinen signifikanten NaCl-abhängigen negativen Effekt. Bei sehr hohen Konzentrationen an NaCl und Mannit erfolgte eine vergleichbare Einschränkung dieser physiologischen Prozesse.

NaCl in moderaten Konzentrationen um die 150 mM wirkt somit in den ersten 24 h nicht grundsätzlich toxisch auf die Pflanze, jedoch wird die ABA-Signaltransduktion

stärker beeinträchtigt als durch Mannit und die ABA-Biosynthese limitiert angeschaltet. Letzterer Effekt reflektiert daher eventuell eine effektivere und schnellere osmotische Anpassung der Pflanze an Salzstress als es bei Mannit-Stress der Fall ist. Dadurch wäre weniger ABA nötig, um den durch osmotischen Stress herbeigeführten Wasserverlust über eine Verringerung der Transpiration auszugleichen.

3.1.3. Anpassung von *Arabidopsis thaliana* an Salzstress

Anpassungsmechanismen der Pflanze an hohe Salzkonzentrationen

Salzstress stört das Ionengleichgewicht und den osmotischen Status von Pflanzen, die NaCl-Toxizität liegt begründet in negativen Effekten auf den Wasserhaushalt der Pflanzen, einer Einschränkung der Photosynthese, erhöhter ROS-Bildung, Störung der Proteinsynthese und enzymatischer Aktivität, sowie in Schädigungen des Energie- und Lipidstoffwechsels (Parida & Das, 2005; Tester & Davenport, 2003). Toleranz wird hauptsächlich durch Minimierung des Natriumionen-Influx in die Pflanzenzelle, Maximierung des Natrium-Efflux aus der Zelle, sowie Kompartimentierung innerhalb der Zelle und osmotische Anpassung erreicht (Munns & Tester, 2008; Plett & Moller, 2010). Die Aufnahme von Na⁺ und die anschließende Verteilung in den Spross muss so gering wie möglich gehalten werden, da sich die Natriumtoxizität vor allem im Spross auswirkt.

Der Influx von Natrium erfolgt über die Plasmamembran, sowohl Ca²⁺-sensitive Aufnahmeprozesse über nichtspezifische Kationenkanäle (NSCCs) wie die CNGCs (*Cyclic Nucleotide-Gated Channels*) oder Glutamat-aktivierte Kanäle (GLRs), als auch Ca²⁺-insensitive Transportwege wie über HKT-Kanäle, z.B. TaHKT2;1 in Weizen, sind möglich (Demidchik et al., 2004; Huang et al., 2008; Leng et al., 2002). Durch eine angepasste Regulation dieser Kanäle wäre es möglich, die NaCl-Toleranz von Pflanzen zu verbessern. Auch die Kontrolle des Natriumtransports in den Spross der Pflanze spielt dabei eine wichtige Rolle, es wurde gezeigt, dass Na⁺ vor allem in seneszierenden Blättern, der Epidermis und Bündelscheidenzellen akkumuliert, dies mag eine Strategie der Pflanzen darstellen, photosynthetisch aktiveres Gewebe zu schützen (Karley et al., 2000).

Der Natrium-Efflux wird vor allem durch den SOS-Signalweg (*Salt Overly Sensitive*) bestimmt (siehe auch 1.2.2). Der Na⁺/H⁺-Antiporter SOS1 vermittelt den Natrium-Efflux aus dem Cytosol über die Plasmamembran in den Apoplasten bzw. das Substrat. *sos1* überakkumuliert Natriumionen in Spross und Wurzel, Überexpression von SOS1 führt zu erhöhter Salztoleranz (Shi et al., 2000; Shi et al., 2003). SOS1 wird über SOS2, eine SnRK3-Kinase, durch Phosphorylierung aktiviert, was eine Rekrutierung von

SOS2 an die Plasmamembran durch SOS3, ein myristoyliertes Calcium-bindendes Protein in der Wurzel bzw. ein SOS3-ähnliches Protein (CBL10) im Spross, voraussetzt (Lin et al., 2009; Qiu et al., 2002; Quan et al., 2007; Quintero et al., 2002).

Die Adaption in der Pflanzenzelle besteht vor allem aus der intrazellulären Kompartimentierung der Natriumionen und der Synthese osmoprotektiver Substanzen. Um die Natriumkonzentration im Cytosol möglichst gering zu halten, erfolgt eine Sequestrierung von Na^+ in der Vakuole. Dies wird von Na^+/H^+ -Antiportern im Tonoplast wie dem NHX-Antiporter umgesetzt, Überexpression von NHX1 führt zu erhöhter Salztoleranz (Apse et al., 1999; Blumwald et al., 2000; Yokoi et al., 2002). Der dazu nötige H^+ -Gradient wird durch H^+ -ATPasen und H^+ -Pyrophosphatasen wie AVP1 erreicht (Brini et al., 2007; Gaxiola et al., 2001). Die Synthese und Akkumulation osmoprotektiver hydrophiler Substanzen wie Glycinbetain, Prolin, Trehalose oder Polyolen (Mannit/Sorbit) führt im Cytosol dazu, dass Proteinen und Membranen mehr Wasser zur Verfügung steht und die osmotische Anpassung innerhalb der Zelle erleichtert wird, solche Verbindungen haben keinen negativen Einfluss auf metabolische Reaktionen (Hasegawa et al., 2000; Nuccio et al., 1999; Rhodes et al., 2002; Saneoka et al., 1995; Yoshida et al., 1997). Eine Übersicht über Komponenten, die bei der Aufnahme, Verteilung und der Abgabe von Natriumionen eine Rolle spielen, gibt Abbildung 3.1.

Eine Beteiligung von Abscisinsäure am SOS- und NHX-Signalweg wird diskutiert, die Hochregulation von AtNHX1 durch NaCl war beispielsweise bei ABA-defizienten Mutanten sowie *abi1-1* reduziert, nicht jedoch in *abi2-1* und *sos*-Mutanten, so dass eine teilweise Abhängigkeit der NHX1-Expression von ABA-Biosynthese und ABI1 möglich erscheint (Shi & Zhu, 2002; Yokoi et al., 2002). Für ABI2 wurde eine Interaktion mit der Proteinkinase SOS2 postuliert, jedoch konnte der Phänotyp einer salztoleranteren *abi1*-Mutante nicht reproduziert werden (Achard et al., 2006; Ohta et al., 2003).

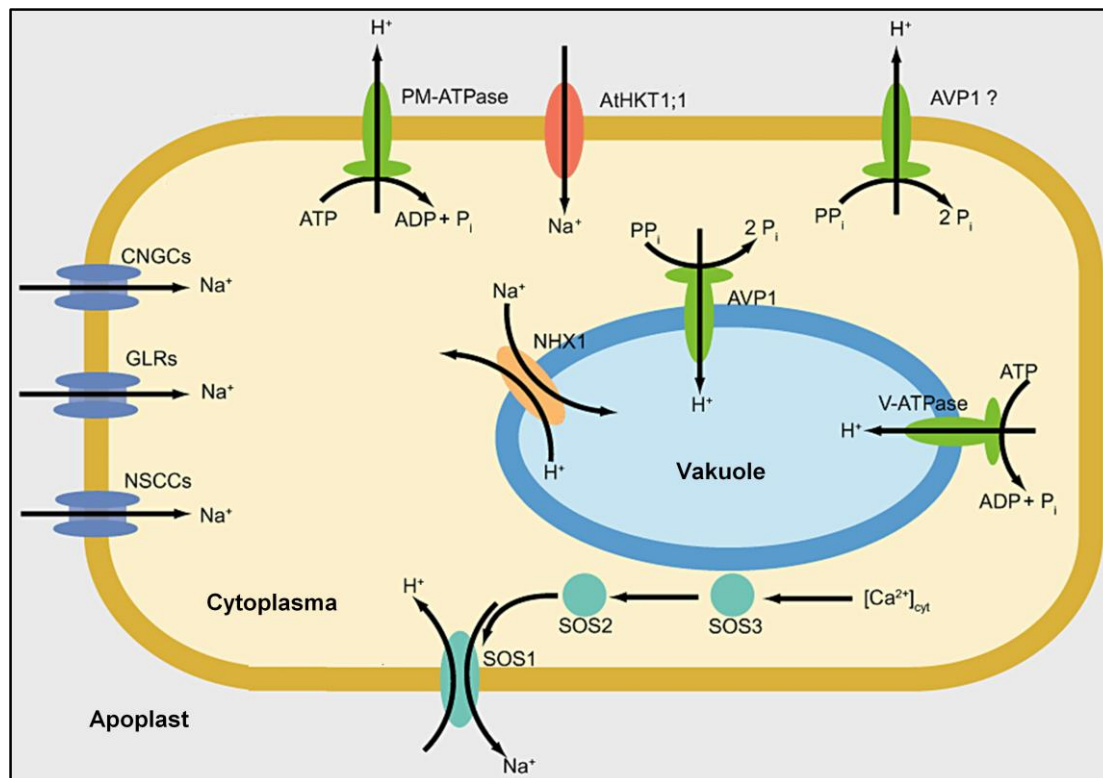


Abb. 3.1: An der Aufnahme, Verteilung und Abgabe von Natrium beteiligte Transporter, Kanäle und Pumpen (Plett et al., 2010).

Die diversen, beim Na^+ -Ausschluss aus dem Spross beteiligten Proteine sind in einer einzigen Zelle dargestellt, für Na^+ -Influx verantwortlich sind CNGC-, GLR-, NSCC-Kanäle und HKT-Transporter. Desweiteren ist der SOS-Signalweg vereinfacht dargestellt, der über den Na^+/H^+ -Antiporter zum Na^+ -Efflux führt und durch cytosolisches Ca^{2+} aktiviert wird. Die vakuoläre Speicherung von Na^+ wird durch den Na^+/H^+ -Antiporter NHX1 vermittelt, das dafür nötige elektrochemische Potential wird von der H^+ -Pyrophosphatase AVP1 und der vakuolären V-ATPase bereitgestellt.

Osmotische Anpassung während Salzstress

Zur Überprüfung einer eventuell effektiveren osmotischen Adaption der Pflanze bei Salzstress im Vergleich zu Mannit-Stress wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit (S. Oswald) die Dynamik der Stomataantwort untersucht. Die Kurzeffekte (0 bis 2 h) auf die Öffnung der Stomata durch den ausgelösten osmotischen Stress unterschieden sich nicht, sowohl bei NaCl als auch bei Mannit gleichen osmotischen Potentials betrug die Öffnungsweite nach 2 h nur noch ca. 10%. Betrachtete man dagegen die Spaltöffnungsweite nach 24 h Stress, so betrug die Stomataapertur bei 160 mM NaCl 15% der Kontrolle, die bei 282 mM Mannit gleichen osmotischen Potentials nur 2%. Bei weniger NaCl (80 mM) erreichte die Öffnungsweite sogar 75% der Kontrolle, bei Mannit nur 5%. Diese Ergebnisse zeigen eine teilweise Wiederöffnung der Stomata nach 24 h auf, wobei der Grad dieser abhängig von der Art der Stressbehandlung und bei NaCl-Stress höher ist. Dies steht in Einklang mit dem beobachteten reduzierten ABA-Gehalt nach 24 h im Vergleich zu Mannit-Stress (Abb. 2.13), da die Stomataöffnung streng vom Gehalt freier Abscisinsäure abhängig ist (Okamoto et al., 2009).

Der Stomataschluss kurz nach der Stressbehandlung und die nach 24 h beobachtbare Wiederöffnung könnten einen rapiden Turgorverlust am Beginn der Stressbehandlung bedeuten, der sich als Ergebnis einer effektiveren osmotischen Anpassung bei NaCl-Stress schneller wieder erholt als bei Mannit-Stress. Dies muss noch genauer untersucht werden. Desweiteren könnte es einen Zusammenhang zwischen dem beobachteten Effekt und der Aufnahme von Natrium- und Chloridionen bei Salzexposition durch die Wurzeln, Kompartimentierung der Natriumionen in der Vakuole und einer damit erleichterten osmotischen Adaption bzw. einer verbesserten Wasseraufnahme geben (Munns & Tester, 2008). Ein geringeres osmotisches Potential in Wurzelzellen bei Salzstress würde die Wasseraufnahme aus dem Substrat verbessern und die Wasserstatus-Erhaltung der Pflanze unterstützen (Apse et al., 1999). Eine bei moderatem Salzstress bessere Erhaltung bzw. effektivere Wiederherstellung des Wassergleichgewichtes in den Pflanzenzellen würde mit geringeren ABA-Konzentrationen und erweiterten Spaltöffnungen, wie hier beobachtet, einhergehen und könnte die Erklärung für die Unterschiede zwischen NaCl- und Mannit-Stress sein.

Rolle der Abscisinsäure bei der Vermittlung von Salztoleranz

Eine ABA-induzierte Veränderung in der Genexpression als Antwort auf diverse biotische und abiotische Stressbedingungen ist essentiell für das Überleben der Pflanzen (Adie et al., 2007; Fujita et al., 2006; Zhu, 2002). Eine limitierte Aktivierung der ABA-Antwort wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, müsste danach als Folge einer hohen Transpiration die Natrium-Akkumulation in oberirdischen Pflanzenteilen begünstigen und den Abwehrmechanismus der Pflanze schwächen. Wäre dies tatsächlich der Fall, müssten Mutanten mit Defekten in der ABA-Biosynthese oder in der ABA-Signaltransduktion wie *aba2-1* und *abi1-1* bzw. *abi2-1* stärker anfällig gegenüber Salzstress sein als der Wildtyp, sie können die wichtigste Anpassungsreaktion bei osmotischem Stress, den Stomataschluss, nicht umsetzen (Cheng et al., 2002; Gonzalez-Guzman et al., 2002; Koornneef et al., 1984). Dies konnte jedoch bei einem Vergleich der Überlebensrate und des Chlorophyllgehaltes nicht festgestellt werden (Abb. 2.15). Bei der Messung ABA-abhängiger Reporterinduktion konnte zudem kein Unterschied zwischen Mannit- und Salzstress festgestellt werden (Abb. 2.14).

Ein Vergleich mit Arbeiten anderer Gruppen zeigt, dass diese einen Unterschied der Mutanten zum Wildtyp fanden, während für *abi2-1* und *abi1-1* eine erhöhte Salztoleranz festgestellt wurde (Ohta et al., 2003), erhielten andere eine reduzierte Salztoleranz für *abi1-1* (Achard et al., 2006). Auch beim exakten Nachstellen der dort

beschriebenen Versuchsbedingungen konnte keines der Ergebnisse reproduziert werden. Ohta et al. beschrieben desweiteren eine Wechselwirkung zwischen der PP2C ABI2, die bei der ABA-Rezeption eine Rolle spielt, und SOS2, einer im SOS-Signalweg involvierten Kinase. Wie ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, wird die Phosphatase bei Anwesenheit von ABA durch Interaktion mit den ABA-bindenden RCAR-Proteinen inhibiert, so dass der SOS-Signalweg, ein Mechanismus, der Salztoleranz vermittelt, voll angeschaltet werden könnte (Halfter et al., 2000; Ohta et al., 2003; Shi et al., 2003). *abi2-1* bzw. *abi1-1* entzieht sich dagegen fast komplett der beschriebenen Inaktivierung durch die RCAR-Proteine (Ma et al., 2009), so dass die Phosphatase (*abi2-1* hat noch ca. 10% Restaktivität im Vergleich zu ABI2) unter Salzstress und damit erhöhten ABA-Gehalten SOS2 im Vergleich zur inaktivierten Wildtyp-Phosphatase weiterhin inhibieren kann. Dies würde für die ABA-insensitive Mutante eine weniger ausgeprägte Salztoleranz bedeuten, da der SOS-Signalweg weniger stark angeschaltet werden würde. Für *abi1-1* wurde eine im Vergleich zum Wildtyp leicht reduzierte Salztoleranz festgestellt (Achard et al., 2006).

Die im Rahmen dieser Arbeit produzierten Ergebnisse zeigen, dass die ABA-Biosynthese und die ABA-Signaltransduktion nicht ausschlaggebend für das Überleben der Pflanze während Salzstress sind, zumindest nicht bei hoher Luftfeuchtigkeit, wie sie bei den Versuchen an Keimlingen auf MS-Medium gegeben war. Vor allem bei schnell ablaufenden Prozessen wie dem Stomataschluss spielt Abscisinsäure jedoch eine große Rolle. Unter natürlichen Bedingungen würde die Anpassung von *Arabidopsis thaliana* an den Salzstress zu einer Verbesserung der Wasserstatus-Erhaltung, jedoch eventuell auch zu Schäden durch die Natrium-Akkumulation in den Vakuolen der Blattzellen führen.

Halophyten wie *Thellungiella halophila*, die mit bis zu 95% Sequenzidentität sehr nah zu *Arabidopsis thaliana* verwandt ist, weisen eine höhere Stomatadichte auf, unter Normalbedingungen sind diese nicht so weit geöffnet wie die von *Arabidopsis*, schließen unter Salzstress jedoch stärker. *Thellungiella* besitzt im Vergleich zu *Arabidopsis* in ihren Sukkulenten-ähnlichen Blättern eine zweite Palisadenmesophyll-Zellschicht und in der Wurzel eine zusätzliche Endodermis- und Cortex-Zelllage. Im Cytoplasma wird weniger Na^+ und Cl^- akkumuliert, während hohe Gehalte an Prolin, der osmoprotektiven Aminosäure, vorliegen. Außerdem zeigt *Thellungiella* einen effizienteren Wasserhaushalt bei Salzstress (Inan et al., 2004; Pang et al., 2010).

Suche nach Komponenten der osmotischen Signalweiterleitung

Wie die Perzeption von NaCl abläuft, ist noch weitgehend ungeklärt, extrazelluläre Membranrezeptoren wurden noch nicht gefunden. Liu et al. (2007) stellten den

membranassoziierten AtbZIP17-Transkriptionsfaktor als einen möglichen Salzsensoren, dieser wird unter Salzstress von der Serinprotease AtS1P gespalten und dabei von der ER-Membran abgelöst. Das N-terminale Fragment wird in den Nukleus transportiert und aktiviert dort Salzstress-responsive Gene (Liu et al., 2008; Liu et al., 2007; Tajima et al., 2008). Desweiteren wird für SOS1 eine Beteiligung am Sensormechanismus diskutiert, da das Protein ein relativ langes cytosolisches Ende aufweist, neben Membranproteinen kommen intrazellulär außerdem diverse cytosolische Natrium-sensitive Enzyme in Frage (Zhu, 2003). An der Perzeption des osmotischen Signals sind eventuell spannungsaktivierte Kanäle oder transmembrane Proteinkinasen beteiligt (Urao et al., 1999).

Die Perzeption und Weiterleitung des osmotischen Signals an der Wurzel sowie der Mechanismus der Decodierung des hydraulischen Signals im Spross, die zur Abscisinsäure-Biosynthese führt, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher unter Benutzung einer RNAi-Bibliothek in transgenen Pflanzen nach Komponenten der osmotischen Signalweiterleitung sowie dem Rezeptor für Abscisinsäure gesucht. Der Einsatz der Infrarotthermographie zeigte sich dabei als gute Hochdurchsatztechnik, so war es möglich ca. 140000 Pflanzen in relativ kurzer Zeit auf Mutanten in der osmotischen Signalweiterleitung bzw. der ABA-Signaltransduktion oder ABA-Biosynthese zu screenen. Durch die Benutzung einer hochauflösenden Kamera konnten Temperaturunterschiede der Blattoberflächen im Vergleich zum Wildtyp erfasst werden, welche auf eine Störung der Stomataantwort bei osmotischem Stress zurückgehen. Wird das osmotische Signal an gestressten Wurzeln nicht wahrgenommen bzw. nicht in den Spross weitergeleitet oder ist die ABA-Biosynthese gestört, so wird keine ABA als Antwort auf den Trockenstress gebildet. Es kann also kein Schließen der Spaltöffnungen erfolgen, die Transpirationsrate wird nicht reduziert und die Blattoberfläche ist dadurch im Vergleich zum Wildtyp, der die Transpiration und somit die Kühlung bei osmotischem Stress einschränkt, um ein bis zwei °C kühler. Eine ausführliche Diskussion dieses Ansatzes fand bereits unter Punkt 2.2.2 statt, so dass hier nur kurz das Ergebnis zusammengefasst werden soll. Beim Screen konnte ein durchaus vielversprechender Kandidat, das FtsH4-Gen bzw. die FtsH-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*, identifiziert werden.

Die FtsH-Familie besteht aus insgesamt 12 Mitgliedern (Garcia-Lorenzo et al., 2006; Sokolenko et al., 2002), aufgrund der Expressionsinduktion durch Trockenheit und Hitze ist es nicht unwahrscheinlich, dass diese Proteine bei der Reaktion auf osmotischen Stress eine Rolle spielen. Für diverse Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Oenococcus oeni* oder der *Synechocystis*-Spezies wurde

bereits gezeigt, dass die Expression von FtsH-Proteasen bei Erhöhung der Temperatur oder des osmotischen Drucks bzw. auch bei Salzstress induziert wird. Die jeweiligen Proteine sind in der Stressantwort und Anpassung der Zellen an Stress involviert (Bourdineaud et al., 2003; Deurling et al., 1997; Fischer et al., 2002; Stirnberg et al., 2007). FtsH11, welches die höchste Homologie zu FtsH4 aufweist, wurde bereits als Vermittler in der Thermotoleranz von *Arabidopsis* beschrieben (Chen et al., 2006). Eine Beteiligung der FtsH-Genfamilie an der Anpassung von Pflanzen an abiotischen Stress wie Trockenheit oder Salinität erscheint wahrscheinlich und sollte in Zukunft genauer untersucht werden.

Während der Suche nach Komponenten des osmotischen bzw. ABA-Signalwegs über RNAi und Infrarotthermographie wurde der cytosolische Abscisinsäure-Rezeptor RCAR in einem Ansatz anderer Art in der Arbeitsgruppe identifiziert (Ma et al., 2009). Einige Aspekte der Wirkung von RCAR-Proteinen auf die negativen Regulatoren des ABA-Signalwegs, die PP2Cs der Subgruppe A, sowie der Wirkmechanismus wurden im Anschluss im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Diese Ergebnisse sollen im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

3.2. Der ABA-Rezeptorkomplex

3.2.1. Funktion der RCAR-Proteine in der ABA-Signaltransduktion

Abscisinsäure steuert zahlreiche Prozesse in Pflanzen was die pflanzliche Entwicklung sowie die Adaptation an abiotische und biotische Stressbedingungen betrifft. Schlüsselkomponenten in der ABA-Signaltransduktion sind RCAR-Proteine, die ABA binden und als Rezeptoren fungieren (Ma et al., 2009; Park et al., 2009), sowie Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatasen des Typs 2C Klasse A, welche als negative Regulatoren der ABA-Signalkaskade gelten. Zwei dominante Mutationen, *abi1-1* und *abi2-1*, zeigen ABA-Insensitivität (Allen et al., 1999; Koornneef et al., 1984; Leung et al., 1997). Der Aminosäureaustausch in der katalytischen Domäne der Phosphatasen ABI1 und ABI2 führt hier zu einer reduzierten Phosphataseaktivität von ca. 10% der ursprünglichen (Leube et al., 1998; Rodriguez et al., 1998a). Die global stark reduzierte ABA-Sensitivität lässt vermuten, dass ABI1 und ABI2 eine zentrale Rolle am Anfang der ABA-Signaltransduktion einnehmen. Proteinkinasen wie SnRK2s, CIPKs und CPKs, die Interaktionspartner der Phosphatasen sind, wirken zumeist als positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktion (Sokolovski et al., 2005). So sind Pflanzen, in denen drei verschiedene SnRK2s abgeschaltet wurden, extrem ABA-insensitiv (Fujii & Zhu, 2009; Fujita et al., 2009). Durch Phosphorylierung aktivieren sie Transkriptionsfaktoren, welche ABA-responsive Genexpression vermitteln. Ausnahmen von diesem Schema der negativen Regulation durch Phosphatasen und der positiven Regulation durch Kinasen stellen z.B. die in Schließzellen exprimierte PP2A RCN1, welche als generell positive Vermittlerin früher ABA-Signale gilt (Kwak et al., 2002), oder die Kinase CIPK3 dar, welche ABA-Antworten während der Keimung und ABA- bzw. Stress-induzierte Genexpression in Arabidopsis reguliert (Kim et al., 2003).

Interaktion der RCAR-Proteine mit PP2Cs der Subgruppe A

Die RCAR-Proteine wurden auf der Suche nach Interaktionspartnern von PP2Cs entdeckt, RCAR1 und RCAR3 interagierten im *Yeast Two-Hybrid* Screen bei Abwesenheit von ABA mit ABI2 (Ma et al., 2009; Yang, 2003), und RCAR3, 8 und 9 mit HAB1 (Santiago et al., 2009b). Die Interaktion mit 12 der 14 RCAR-Proteine wurde für HAB1 und AHG3 gezeigt (Park et al., 2009). Die RCAR-Proteinfamilie kann in drei Subklassen eingeteilt werden (siehe Abb. 1.9), wobei manche aus den Subgruppen II und III nur in Anwesenheit von ABA mit PP2Cs interagieren (Park et al., 2009).

RCARs weisen eine hohe Sequenzidentität von ca. 75% zu Pappel- und Weinreben-Homologen sowie zum Birkenpollenallergen Bet v 1a auf und gehören der Bet v 1-Superfamilie bzw. der START-Superfamilie in Pflanzen an (Radauer et al., 2008). Für FsPP2C1 aus der Rotbuche *Fagus sylvatica* konnte ebenfalls im Y2H-System eine Interaktion mit RCAR-Proteinen gezeigt werden (Saavedra et al., 2010).

Die Interaktion von RCAR-Proteinen und PP2Cs wurde *in vivo* in Pflanzen durch MS-Analysen von ABI1-Komplexen bestätigt (Nishimura et al., 2009b). Die Bindung von Abscisinsäure durch RCAR-Proteine wurde über Isothermale Titrationskalorimetrie nachgewiesen (Ma et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche RCAR-Proteine außer RCAR8 auf ihre Interaktionsfähigkeit mit fünf verschiedenen PP2Cs der Subgruppe A in einem *Yeast Two-Hybrid* System überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass es Unterschiede in den drei Klassen der RCAR-Proteine gibt, was die ABA-Abhängigkeit der Interaktion betrifft (Tabelle 3.7.2). Während die Klasse I-Proteine RCAR1 bis 4 und einige RCARs aus der Klasse II auch bei Abwesenheit von ABA eine starke Interaktion mit den PP2Cs zeigten, benötigten RCAR9 und 10 (Klasse II) zum Teil die Anwesenheit von ABA. Die meisten RCAR-Proteine der Klassen I und II sind also in der Lage, auch ohne ABA mit den PP2Cs zu interagieren. Keines der Klasse III-Proteine konnte dagegen ohne ABA mit den PP2Cs interagieren. Diese Beobachtungen sind konsistent mit den Ergebnissen für HAB1 von Park et al. (2009) und Santiago et al. (2009). Für weitere Phosphatasen 2C aus anderen Subgruppen konnte keine ABA-abhängige oder ABA-unabhängige Interaktion festgestellt werden, was bedeutet, dass nur mit den als negative Regulatoren in der ABA-Signaltransduktion bekannten Phosphatasen eine physikalische Wechselwirkung besteht. Bei *in vitro*-Untersuchungen zur Interaktion zwischen RCAR-Proteinen und der Phosphatase ABI2 (Abb. 2.29) wurde außerdem bestätigt, dass außer Abscisinsäure keine anderen bekannten Phytohormone als Bindungspartner von RCAR-Proteinen in Frage kommen und also auch keinen entsprechenden Einfluss auf die Aktivität der PP2Cs der Gruppe A nehmen können.

RCARs als negative Regulatoren von PP2Cs bei ABA-Anwesenheit

RCARs als Rezeptoren von ABA interagieren also mit PP2Cs der Subgruppe A. Überexpression von ABI1 und ABI2 in Protoplasten führt zu einer Inhibierung ABA-abhängiger Reporterantworten (Hoffmann, 2002), im Gegensatz dazu erhöht die Überexpression von RCAR-Proteinen im selben System die Reporterantwort (Ma et al., 2009). RCAR-überexprimierende transgene Pflanzen weisen ABA-Hypersensitivität mit erhöhter Samendormanz und verbesserter Trockenstress-Resistenz auf (Ma et al., 2009; Saavedra et al., 2010; Santiago et al., 2009b), was im Gegensatz zur

Überexpression von PP2Cs steht. Werden beide Proteine in der selben Pflanze überexprimiert, führt dies zu einer Aufhebung der PP2C-Wirkung. Einzelne *Knock out*-Mutationen führen in der Pflanze zu keinem abweichenden Phänotyp, durch gleichzeitiges Abschalten von vier RCAR-Genen erhält man jedoch ABA-insensitive Pflanzen (Nishimura et al., 2009b), was für einen Redundanz-Effekt in der RCAR-Familie spricht, welcher hier im Y2H-System ebenfalls bestätigt werden konnte. Insgesamt kann also die Funktion von RCAR-Proteinen in der ABA-Signaltransduktion als die von positiven Regulatoren beschrieben werden, die eine negative Wirkung auf die Funktionalität der PP2Cs ausüben.

Der Effekt von RCAR-Proteinen auf die PP2Cs kann *in vitro* durch Beobachtung der enzymatischen Phosphataseaktivität dieser untersucht werden. Während durch bloße Zugabe von ABA die Phosphataseaktivität von ABI2 kaum beeinträchtigt wird (Leube et al., 1998; Ma et al., 2009), führt die gleichzeitige Anwesenheit von RCAR-Proteinen zu einer drastischen Reduktion der enzymatischen Aktivität, was für ABI1 und ABI2 mit RCAR1 und RCAR3 bereits gezeigt werden konnte (Ma et al., 2009; Szostkiewicz et al., 2010). In dieser Arbeit wurde zusätzlich zu dieser negativen Wirkung von RCAR1 und 3 der Effekt von RCAR11 und 12 auf ABI1 und ABI2 sowie AHG3 und HAI2 untersucht (siehe Punkt 2.3.2.1/2). Auch für diese RCAR/PP2C-Kombinationen konnte eine ABA-abhängige Inhibierung der Phosphatasen auf weniger als 5% Restaktivität durch die RCAR-Proteine gezeigt werden, außerdem wurde ersichtlich, dass verschiedene Kombinationen unterschiedliche ABA-Selektivität und Sensitivität aufwiesen, was im Einklang mit den oben erwähnten Interaktionsergebnissen in Hefe steht.

Funktionieren RCARs und PP2Cs als Corezeptoren?

Es stellt sich nun die Frage, ob die RCAR-Proteine, für die im Gegensatz zu den PP2Cs die Bindung von ABA nachgewiesen wurde, allein eine Rezeptorfunktion haben, oder ob die PP2Cs, welche durch Interaktion mit RCARs und ABA inaktiviert werden und somit den Weg für die nachfolgende ABA-Signalkaskade über Kinasen und Transkriptionsfaktoren freigeben, ebenfalls eine Rezeptorkomponente darstellen. Vergleicht man die Dissoziationskonstanten aus ITC-Messungen, so kann die Affinität von RCAR1 zur ABA-Bindung durch Zugabe von ABI2 um das Zehnfache erhöht werden: einer K_d von 660 nM und einer freigesetzten Energie ΔG von 8 kcal/Mol ABA bei der ABA-Bindung durch RCAR1 stehen eine K_d von 64 nM und eine ΔG von 240 kcal/Mol bei ABI2-Anwesenheit gegenüber (Korte, 2009; Ma et al., 2009). Ähnliches wurde von Santiago et al. (2009) für die Bindung von ABA durch RCAR8 bei Anwesenheit von HAB1 berichtet ($K_d = 1,1 \mu\text{M}$ ohne und 38 nM mit PP2C).

Dies bedeutet, dass die Phosphatase eine hochaffine Bindung von ABA an RCAR-Proteine gewährleistet, die ABA-Bindung wird eventuell durch Veränderung der RCAR-Struktur durch die Phosphatase stabilisiert. Durch Interaktionsstudien (siehe Tab. 2.3, sowie Park et al. (2009) und Santiago et al. (2009)) und ITC-Experimente (Korte, 2009) konnte gezeigt werden, dass RCARs und PP2Cs auch ohne ABA wechselwirken können, vor allem im *in vitro*-Assay zur Bestimmung der Phosphataseaktivität wird aber auch deutlich, dass dies ohne wesentlichen Einfluss auf die Phosphataseaktivität bleibt und dass ABA eine PP2C-RCAR-Interaktionsstabilisierung vermittelt. Eine solche Liganden-induzierte Rezeptorkomplex-Stabilisierung wurde z.B. ebenfalls für Brassinosteroide und ihren Rezeptor BRI1 sowie dessen Interaktionspartner BAK1 beobachtet (Wang et al., 2008).

Die Inhibition der Phosphatase bleibt nur bei sehr hohen Konzentrationen an ABA stabil (Ma et al., 2009), im Rahmen dieser Arbeit konnte in Dialyseversuchen gezeigt werden (Ergebnisse nicht abgebildet), dass die ABA-Bindung durch RCAR11 und ABI2 einem reversiblen Mechanismus unterliegt, nach Reduktion der ABA-Konzentration durch Dialyse einer Reaktionsmischung von ABI2, RCAR11 und (S)-ABA war die Phosphataseaktivität und damit eine erneute Regulierbarkeit durch ABA zum Großteil wiederhergestellt. Dies lässt darauf schließen, dass in der Pflanze unter Stressbedingungen und damit einer hohen nanomolaren bis mikromolaren Konzentration an ABA in den Zellen die ABA-Signaltransduktion durch eine Stabilisierung der PP2C-RCAR-Interaktion und damit durch Inhibierung der PP2Cs, beispielsweise durch sterische Hinderung des aktiven Zentrums durch ABA, ablaufen kann. Die ABA-Signaltransduktion wird jedoch später bei Nachlassen des Stresses und Absinken des endogenen ABA-Spiegels durch Freisetzung der PP2C aus dem RCAR-ABA-PP2C-Komplex wieder eingeschränkt, da dann Anpassungsreaktionen nicht mehr nötig sind. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass sowohl die RCAR-Proteine als auch die Phosphatasen des Typs 2C als Corezeptor-Komponenten in der ABA-Perzeption wirken.

Einfluss der RCAR-ABA-PP2C-Komplexes auf die ABA-Signaltransduktion

Lokalisationsstudien zeigen eine Colokalisation von PP2Cs und RCARs sowohl im Cytosol als auch im Nukleus an (Ma et al., 2009; Saavedra et al., 2010), was für eine cytosolische Perzeption von ABA, wie bereits vorgeschlagen (Levchenko et al., 2005), spricht, sowie für eine Kontrolle der ABA-Signaltransduktion im Nukleus (Moes et al., 2008). Bei Abwesenheit von ABA hält die Phosphatase positive Regulatoren wie SnRK2s durch Dephosphorylation in einem inaktiven Zustand, bei ABA-Anwesenheit wird die Phosphatase jedoch durch RCAR und ABA inhibiert und die Aktivierung von

Kinasen durch Autophosphorylierung sowie Phosphorylierungen von weiteren, bei der Signaltransduktion beteiligten Faktoren, kann ablaufen. Bei einer Quadrupel-RCAR *Knock out*-Mutante konnte eine deutlich eingeschränkte Aktivität von SnRK2s festgestellt werden (Park et al., 2009). Neben der Regulation der ROS-Produktion (Kwak et al., 2003; Sirichandra et al., 2009) führen SnRK2s wie OST1 zur Aktivierung von Anionenefflux-Kanälen in der Plasmamembran (SLAC1), welche über Depolarisation dieser zum Schließen der Spaltöffnungen und zur Reduktion der Transpiration beitragen, was eine ABA-vermittelte Anpassungsreaktion der Pflanze an z.B. Trockenstress darstellt (Geiger et al., 2010; Lee et al., 2009).

Im Nukleus finden Phosphorylierungen von Transkriptionsfaktoren wie ABFs/AREBs statt. SnRK2s wie OST1 aktivieren im Nukleus direkt ABF2 (Fujii & Zhu, 2009) oder auch ABI5 (bZIP-Typ) (Finkelstein et al., 2005). Weitere Beispiele für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Interaktionspartner von PP2Cs sind die von ABF4 durch CPK32 (Choi et al., 2005) und die von ABF1 bzw. ABF4 durch CPK4 bzw. CPK11 (Zhu et al., 2007). Neben SnRK2s und CPKs gelten auch SnRK3s wie die Salztoleranz-vermittelnde Kinase SOS2 (Ohta et al., 2003) oder andere Proteine wie der Fibrillin-Vorläufer, der zur Photosystem II-Protektion beiträgt (Yang et al., 2006), als Interaktionspartner von PP2Cs. Sie spielen eine Rolle bei weniger klassischen ABA-Antworten. Transkriptionsfaktoren wie ABI4 (AP2-Typ) regulieren die ABA-Signaltransduktion positiv, z.B. kann ABI3 (B3-Typ) durch Bindung an ABI5 dessen Wirkung steigern (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). AtHB6 dagegen, wechselwirkend mit ABI1, unterdrückt ABA-Antworten (Himmelbach et al., 2002). Die Bindung von AREBs an ABREs führt nachfolgend zu einer Expressionsaktivierung ABA-abhängiger Gene (siehe Abb. 3.2; (Klingler et al., 2010)). Eine *in vitro* Rekonstitution des minimalen ABA-Signaltransduktionsweges in Protoplasten mit den Hauptkomponenten RCARs, der PP2C ABI1 und SnRK2.6/OST1 sowie ABF2 wurde bei Fujii et al. vorgestellt und bestätigt dieses Modell der ABA-Rezeption und Signalweiterleitung (Fujii et al., 2009).

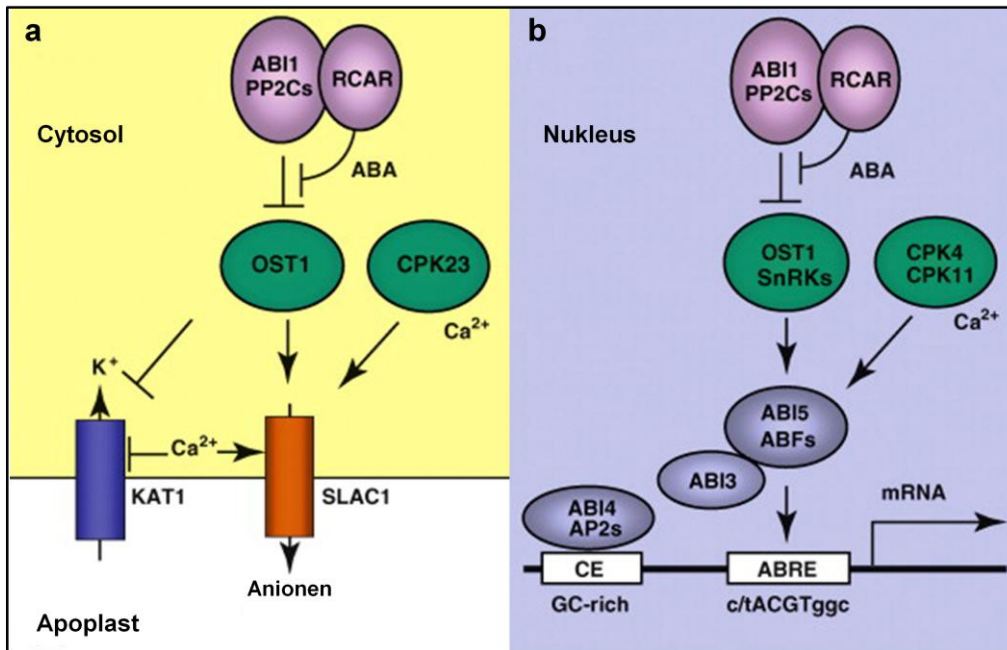


Abb. 3.2: Vereinfachtes Modell der ABA-Signaltransduktion (Raghavendra et al., 2010).

Der ABA-Rezeptor besteht aus dem heteromeren Komplex von PP2Cs wie ABI1 und ABA-bindenden RCAR-Proteinen. Der Rezeptorkomplex (violett) kontrolliert die ABA-Signaltransduktion und ist sowohl im Cytosol (a) als auch im Nucleus (b) vertreten. Die Phosphataseaktivität der PP2Cs inhibiert die Aktion der Proteinkinase (grün) OST1 sowie verwandter SnRKs, eventuell auch die von Ca^{2+} -abhängigen CPKs. In Gegenwart von ABA ist die PP2C-Aktivität geblockt, die Proteinkinasen werden nicht weiter inhibiert und können ihre Ziele wie die Ionenkanäle SLAC1 und KAT1 in Schließzellen phosphorylieren und damit aktivieren (a). Im Nucleus stellen Transkriptionsfaktoren wie ABI5 und verwandte ABFs (blau) Ziele der Kinasen dar, im phosphorylierten Zustand binden sie an ABA-responsive *cis*-Elemente (ABREs) und bewirken die ABA-abhängige Transkription. ABI3 bindet an ABI5 und verstärkt seine Aktion, ABI4 und verwandte Transkriptionsfaktoren des Typs AP2 binden an *GC-rich coupling elements* (CEs) und sind auf diese Weise an der Regulation der ABA-induzierten Genexpression beteiligt.

3.2.2. Unterschiede in ABA-Selektivität und Sensitivität von Rezeptorkomplexen

Abscisinsäure ist ein zentraler Regulator abiotischer Stressresistenz, wechselnde äußere Umwelteinflüsse wie Salz, Kälte, Hitze oder Trockenheit führen zu erhöhten Abscisinsäuregehalten in den Pflanzen, was sich in schnellen und langsamen adaptiven physiologischen Antworten wie dem Spaltenschluss oder einer veränderten Genexpression auswirkt. Die Endkonzentration an ABA schwankt dabei dynamisch je nach Stärke und Art des Stresses sowie dem Entwicklungsstadium der Pflanze zwischen nano- und mikromolaren Bereichen. Die Perzeption von ABA durch RCAR-Proteine und Phosphatasen 2C wurde bereits ausführlich beschrieben, der RCAR-PP2C-Komplex gewährt eine vielfach höhere Affinität zur ABA-Bindung durch RCAR. Der Ligand ABA stabilisiert die Interaktion zwischen PP2Cs und RCARs und löst so

eine Inhibierung der enzymatischen Phosphataseaktivität aus, die zu einer Aktivierung von diversen *downstream* wirkenden Komponenten der ABA-Signaltransduktion führt. Beide Proteinfamilien bestehen aus mehreren Mitgliedern, es gibt 14 RCAR-Proteine und 9 PP2Cs der Subgruppe A in *Arabidopsis thaliana*. 6 der 9 Phosphatasen wirken nachgewiesenermaßen als negative Regulatoren in der ABA-Signaltransduktion (Gosti et al., 1999; Kuhn et al., 2006; Leonhardt et al., 2004; Merlot et al., 2001; Nishimura et al., 2007; Yoshida et al., 2006b).

In der vorliegenden Arbeit sowie bei Santiago et al. (2009) konnte gezeigt werden, dass alle RCARs bei Anwesenheit von ABA mit sechs der fraglichen PP2Cs (ABI1, ABI2, AHG3, HAI2, HAI3, HAB1) interagieren können. Es sind somit mindestens 84 und maximal 126 Möglichkeiten an verschiedenen Kombinationen von RCARs mit PP2Cs möglich. Im *Yeast Two-Hybrid* Versuch wurde jedoch auch deutlich, dass es durchaus Unterschiede in ABA-Abhängigkeit und Stärke der Interaktion gibt (Tab. 2.3), je nachdem welche Phosphatase mit welchem RCAR-Protein kombiniert wird. So könnten diese vielen möglichen Kombinationen verschiedene Eigenschaften, was ihre Stereoselektivität für (S)-ABA sowie ihre Sensitivität für die ABA-Perzeption betrifft, aufweisen. Desweiteren ist es möglich, dass *in vivo* je nach Entwicklungsstadium oder Gewebe der Pflanze, sowie als Antwort auf unterschiedliche Stresssituationen manche RCARs und PP2Cs bevorzugt exprimiert werden, andere dagegen weniger. Die Kombination passender PP2Cs und RCARs zu heteromeren Rezeptorkomplexen könnte für die Pflanze einen Mechanismus für die Feinregulierung der ABA-Perzeption und ABA-Signaltransduktion darstellen.

Unterschiede in Expression, Stereoselektivität und Sensitivität

Betrachtet man die differentielle Expression von Phosphatasen und RCAR-Proteinen (siehe 2.3.2.2; (Szostkiewicz et al., 2010)), so werden folgende Expressionsmuster deutlich: Viele RCARs werden während der gesamten Entwicklung exprimiert, während die Expression vieler Phosphatasen erst relativ spät hochreguliert wird. Abscisinsäurebehandlung sowie mit einer verstärkten ABA-Biosynthese verbundene Stressbedingungen verschieben die Transkriptlevel der Corezeptoren. PP2Cs werden dabei im Allgemeinen hochreguliert, während manche RCARs durch ABA-Behandlung herunterreguliert werden. Bei Trockenheit werden einige RCARs hoch-, manche wiederum herabreguliert, bei anderen ändert sich das Expressionslevel kaum. Diese Unterschiede deuten neben der hohen Anzahl an möglichen Komplexpartnern darauf hin, dass eine differentielle Regulation der ABA-Rezeption besteht.

In dieser Arbeit wurden verschiedene RCAR-Proteine der Klassen I und III auf ihre Stereoselektivität für (S)-ABA untersucht. RCAR1 weist bei der Wechselwirkung mit ABI2 als einziges der untersuchten Proteine eine fast absolute Stereospezifität für (S)-ABA auf, während RCAR3 dem Rezeptorkomplex eine weniger eindeutige Stereoselektivität verleiht. (R)- und *trans*-ABA führen hier jedoch mit einer zehnfach geringeren Sensitivität zu einer PP2C-Inhibierung (Abb. 2.31). RCAR11 und RCAR12 aus der Klasse III der Proteinfamilie sind in der Lage, sowohl mit der (S)- als auch mit der (R)-Form von ABA eine Reduktion der ABI2-Aktivität herbeizuführen, jedoch kaum mit der *trans*-Form. Dabei ist RCAR12 bei gleichen Konzentrationsbedingungen insgesamt weniger gut in der Lage, die Phosphatase-Aktivität zu inhibieren als RCAR11, was eine geringere Sensitivität für die PP2C-Interaktion bedeutet (Abb. 2.31). So werden auch im *in vitro*-Assay wie zuvor im Y2H-System Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen der RCAR-Proteinfamilie deutlich.

Im Y2H-Interaktionsscreen (Tab. 2.3) zeigte HAI2 beispielsweise nur mit den Klasse I-RCARs eine ABA-unabhängige Interaktion. Während RCAR-Proteine der Klassen I und II auch ohne ABA mit PP2Cs interagieren können, ist bei den RCARs der Klasse III die Anwesenheit von ABA eine Voraussetzung für die Interaktion. Vergleicht man dazu die Dissoziationskonstanten für die Bindung von ABA an RCAR, so zeigen RCAR1 und RCAR3 der Klasse I mit 0,66 bzw. 0,97 μM eine relativ hohe ABA-Affinität (Ma et al., 2009; Szostkiewicz et al., 2010), RCAR12 und RCAR14 aus der Klasse III dagegen mit 52 bzw. 59 μM eine geringe (Miyazono et al., 2009; Yin et al., 2009), RCAR8 aus der Klasse II liegt mit einem K_d -Wert von 1,1 μM dazwischen (Santiago et al., 2009b). Das würde bedeuten, dass Klasse III-Proteine eine geringere Affinität zu ABA sowie zu PP2Cs haben und die Sensitivität der ABA-vermittelten PP2C-Inhibierung gering ist. Die Wirkung von RCAR11 bei ABA-Anwesenheit auf ABI1, AHG3 und HAI2 wurde mit der auf ABI2 verglichen (Abb. 2.30), *in vitro* war eine verminderte Sensitivität für die ABA-abhängige Inhibierung bei Komplexen mit HAI2 und AHG3 zu beobachten.

Somit modulieren beide Rezeptorkomplex-Komponenten die ABA-Selektivität und die Sensitivität ABA-vermittelter PP2C-Inaktivierung.

Inwieweit auch das molare Verhältnis von RCAR zu PP2C einen Effekt ausübt, wurde bei einem direkten Vergleich von Komplexen aus RCAR1/RCAR3 und ABI1/ABI2 in dieser Arbeit getestet (siehe Abb. 2.32, veröffentlicht in Szostkiewicz et al. (2010)). Hier zeigen die ABA-Konzentrationen, die bei unterschiedlichen PP2C:RCAR-Verhältnissen zu einer halbmaximalen PP2C-Inhibierung führen, die Sensitivität für eine Interaktion an. Die Regulation der ABI1-Aktivität durch RCAR1 und 3 geschieht demnach doppelt so sensitiv als es für ABI2 der Fall ist. Die Effizienz einer ABA-vermittelten Inhibition ist

für ABI1 höher. RCAR3 zeigt im Vergleich zu RCAR1 eine höhere Affinität für die (ABA-unabhängige) PP2C-Interaktion. Die IC_{50} -Werte bei einem molaren Verhältnis von 1:2 betragen für ABI1-RCAR3 23 nM und für ABI2-RCAR1 das Vierfache, nämlich 95 nM.

Bei steigenden RCAR-Konzentrationen und einem damit fallenden molaren Verhältnis bewegt sich das Gleichgewicht in Richtung Komplexbildung und die Formation eines Corezeptor-Komplexes wird begünstigt, die Inhibierung der Phosphatase benötigt weniger ABA. Die fallenden IC_{50} -Werte bedeuten eine ABA-sensitivere Regulation der Phosphataseaktivität.

Modell zur Feinregulierung ABA-abhängiger Stressantworten

In einer realen abiotischen Stresssituation steigt in Pflanzen wie oben beschrieben das Transkriptlevel der Phosphatasen an, während das der RCARs entweder geringer wird oder gleich bleibt, das molare Verhältnis PP2C:RCAR wird also höher. Laut der hier gezeigten *in vitro*-Daten wird dann für einen vergleichbaren Inhibierungsgrad der Phosphataseaktivität mehr ABA benötigt, die Sensitivität der Interaktion und ABA-Antwort sinkt. Die Konzentration von ABA steigt gleichzeitig aber unter Stressbedingungen an, so dass die zur Reduktion der enzymatischen Phosphataseaktivität benötigte höhere Konzentration in den Zellen vorhanden ist.

Die Veränderung des relativen PP2C:RCAR-Verhältnisses beeinflusst die Sensitivität der PP2C-Regulation beträchtlich. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass in der Pflanze bei Stress, welcher zu vermehrter ABA-Biosynthese und einer angepassten Änderung der Transkriptmengen von PP2Cs und RCARs führt, durch Kombination geeigneter PP2Cs und RCARs zu einem ABA-Rezeptorkomplex gewebespezifisch die ABA-Antwort beeinflusst wird. Trifft dieses postulierte Modell auch auf die vielen anderen bisher nicht getesteten Kombinationen zu, so wäre es in Zukunft möglich, durch Modifizierung einzelner Komponenten die ABA-Sensitivität von Pflanzen zu verändern und eine Feinregulierung der Stressantwort bei hoher Salinität oder Trockenheit zu erreichen.

3.2.3. Mechanismus der ABA-Bindung durch die Rezeptorkomplexe

Bei der ABA-Perzeption interagieren die ABA-bindenden RCAR-Proteine mit Phosphatasen 2C der Subgruppe A und inhibieren diese dabei in einer ABA-abhängigen Art und Weise. Infolge der blockierten Phosphataseaktivität der negativen Regulatoren der ABA-Signaltransduktion kann diese nachfolgend stattfinden und zu ABA-vermittelten Adaptionen der Pflanze an bestimmte Stressbedingungen führen. Wie genau der Mechanismus der ABA-Bindung und der Interaktion mit PP2Cs sowie der *in vitro* und *in vivo* beobachteten ABA-abhängigen Phosphataseinhibierung abläuft, war zunächst nicht bekannt.

RCAR-Proteine sind strukturell eng verwandt mit Proteinen der Bet v 1-Superfamilie, die Überlagerung der RCAR1-Sequenz über die bekannte Struktur von Bet v 1a lässt vermuten, dass die Struktur und damit eventuell auch der Mechanismus der Hormonbindung ähnlich dem von Bet v 1 ist, welches unter anderem Cytokinine und Brassinosteroide binden kann (Koistinen et al., 2005; Ma et al., 2009; Markovic-Housley et al., 2003). Eine zentrale Eigenschaft der Bet v 1 *fold*-Superfamilie ist die aus sieben β -Faltblattstrukturen und zwei α -Helices bestehende Struktur, welche eine längere C-terminale α -Helix umfasst und ein sogenanntes *helix-grip fold*-Strukturmotiv formt. Dieses Motiv stellt eine hydrophobe Bindetasche dar, in die hydrophobe Liganden wie Lipide oder Phytohormone binden können (Iyer et al., 2001; Radauer et al., 2008).

Die Strukturvorhersage für RCAR-Proteine weist auf der anderen Seite aber auch Ähnlichkeiten zur Struktur von Immunophilinen auf. Zu dieser Proteinfamilie gehören neben Cyclophilinen, die auch in Pflanzen vorkommen, die FK506-bindenden Proteine (FKBPs) und die Parvuline. In Arabidopsis codieren insgesamt 29 Gene für Cyclophiline (Romano et al., 2004), die Struktur der Proteine besteht aus acht β -Faltblättern und zwei übergreifenden α -Helices (Galat, 2003), eine β - und eine α -Struktur bilden eine hydrophobe Tasche, in die immunosuppressive Verbindungen wie FK506 oder im Fall der Cyclophiline Cyclosporin A binden können (Weiwad et al., 2006). Eine erhöhte Cyclophilinexpression wird durch auf die Pflanzen wirkenden Stress wie Salz oder durch Pathogeninfektionen hervorgerufen (Coaker et al., 2005; Kumari et al., 2009; Meiri & Breiman, 2009). Immunophilin-Proteine besitzen PPIase-Aktivität und können zur Proteinfaltung beitragen. Während die meisten Peptidbindungen in der *trans*-Konformation vorliegen, gibt es auch ca. 6%, die die *cis*-Form aufweisen, PPIasen katalysieren die *cis/trans*-Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung (Kang et al., 2008).

An die zu den pflanzlichen Cyclophilinen verwandten humanen FKB-Proteine binden makrocyclische Substanzen wie FK506 oder Rapamycin (Ho et al., 1996). Der Komplex FKBP-FK506 interagiert mit Calcineurin, einer Calcium- und Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase des Typs 2B. Die dadurch bedingte Inhibierung von Dephosphorylierungsreaktionen am Transkriptionsfaktors NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) wirkt sich in einer Unterdrückung der T-Zellen-Aktivierung aus, wodurch der Körper transplantierte Organe nicht mehr abstößt (Clipstone et al., 1994; Di Padova, 1994). Den Mechanismus dahinter stellt eine physikalische Behinderung des Substratzugangs zum aktiven Zentrum von Calcineurin (katalytische Untereinheit CnA) durch Interaktion des FKBP-FK506-Komplexes mit der regulatorischen CnB-Untereinheit dar (Griffith et al., 1995; Kissinger et al., 1995). Aufgrund der Strukturvorhersage für RCARs und deren Ähnlichkeit zu Immunophilinen sowie der Interaktion von Immunophilin-FK506/Cyclosporin-Komplexen mit einer Phosphatase des Typs 2B, könnte der Mechanismus der RCAR-vermittelten PP2C-Inhibierung in Pflanzen ähnlich ablaufen. Daher wurden während dieser Arbeit einige Vortests zu einer möglichen PPlase-Aktivität der RCAR-Proteine unternommen (Daten nicht gezeigt), jedoch bestätigte sich diese Vermutung vorerst nicht.

Der Mechanismus der ABA-vermittelten PP2C-Inaktivierung durch RCARs sollte daher durch Kristallisation von RCAR-Proteinen in allen bedeutsamen Zuständen, also ohne und mit dem gebundenen Liganden ABA sowie mit einer PP2C, aufgedeckt werden. Über eine anschließende Röntgenstrukturanalyse sollte die genaue Struktur und durch Bindung bzw. Interaktion entstehende Konformationsänderungen ermittelt werden, um so den Mechanismus der Bindung von (S)-ABA an die RCAR-Proteine, damit verbundene Strukturveränderungen im RCAR-Protein, sowie die Interaktion von RCAR- und PP2C-Proteinen, die Stabilisierung der ABA-RCAR-Bindung durch PP2Cs und den Ablauf der PP2C-Inhibierung durch RCARs und ABA nachvollziehen zu können. Dadurch wird die Beantwortung aufgetretener Fragen, was beispielsweise die Reihenfolge der Bindung von ABA und der Phosphatase an RCAR betrifft, möglich, und die Corezeptor-These kann überprüft werden.

Nach einer aufwendigen Verbesserung der Proteinexpression in *E. coli* und mehreren erfolglosen Versuchen mit RCAR1, RCAR8 und ABI2 gelang es schließlich, das Protein RCAR11 aus der Klasse III mit seinem Liganden (S)-ABA zu kristallisieren und erste Röntgenstrukturanalysen durchzuführen (Abb. 2.43). Zeitgleich mit diesem Erfolg wurden jedoch bereits die ersten Strukturen von RCAR11 veröffentlicht (Nishimura et al., 2009a; Santiago et al., 2009a). Es folgte die Aufklärung des RCAR-ABA-PP2C-Komplexes, ebenfalls mit RCARs der Klasse III (Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009; Yin et al., 2009).

ABA-Bindung durch RCAR-Proteine

Die RCAR-Proteine weisen die Bet v 1-Faltung auf, sieben antiparallele β -Faltblattstrukturen formen eine zentrale hydrophobe Kavität, diese wird durch eine lange α -Helix am C-terminalen Ende komplettiert. Zwei kürzere Helices schließen die untere Seite der Bindetasche ab (*helix-grip fold*-Motiv). Die RCARs liegen in An- und Abwesenheit von ABA als Homodimere vor (Melcher et al., 2009; Nishimura et al., 2009a; Santiago et al., 2009a; Yin et al., 2009). Der Ligand (S)-ABA wird bei der Bindung in der hydrophoben Tasche „vergraben“, was durch diverse hydrophobe und polare Wechselwirkungen stabilisiert wird. Die wenigen polaren Interaktionen kommen durch Wassermoleküle zustande, sowie über die Carbonyl- und Hydroxylgruppe von ABA, eine Ionenpaarbindung besteht zwischen der ABA-Carboxylgruppe und der Aminogruppe eines Lysins. Aminosäurereste, die an der Interaktion mit (S)-ABA beteiligt sind, sind im Anhang bei einem RCAR-Sequenzabgleich markiert (5.3.) Am Eingang zur hydrophoben Bindetasche befinden sich zwei Schleifen (β 3- β 4 und β 5- β 6), welche als *gate* (konservierte Sequenz SGLPA) und *latch* (Sequenz HRL) bzw. *proline cap* und *leucine lock* bezeichnet werden (siehe Abb. 3.3, Anhang 5.3.; (Hubbard et al., 2010)). Bei der Bindung von ABA verändert sich die Konformation des RCAR-Moleküls dahingehend, dass die beiden Schleifen sich wie Tor und Riegel einander annähern und so das gebundene ABA-Molekül bedecken, *cap* legt sich dabei über ABA während *lock* die Position von *cap* festigt. Dadurch formen die Schleifen gleichzeitig eine hydrophobe Oberfläche (β 3- β 4) nach außen, welche als Interaktionsregion für PP2Cs fungiert (ebenfalls im Anhang 5.3. dargestellt). Die geschlossene RCAR-Konformation wird durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitenketten und der Cyclohexanon-Ringstruktur von ABA stabilisiert (Abb. 3.3).

Während bei RCAR11 nur eines der zwei Homodimer-Moleküle ABA bindet (Nishimura et al., 2009a; Santiago et al., 2009a), binden bei RCAR14 beide Moleküle ABA (Melcher et al., 2009). Die Dimerisierungsregion liegt bei Schleifen zwischen α 4 und β 2 sowie zwischen β 3 und β 4 (*cap*) und beim N-terminalen Part der letzten α -Helix (Vergleich mit Abb. 2.44). Die Dimerisierung kann kein Kristallisationseffekt sein, da sie auch in Lösung und *in planta* festgestellt wurde (Melcher et al., 2009; Nishimura et al., 2009a). Durch die ABA-Bindung ändert sich die Orientierung der zwei Moleküle zueinander, van der Waals- und Wasserstoffbrücken-Bindungen werden weniger und der Dimerzustand geschwächt, was eine Interaktion der einzelnen RCAR-Moleküle mit PP2Cs begünstigt.

Die Stereospezifität der (*S*)-ABA-Bindung wird durch hydrophobe RCAR-Reste vermittelt. Das natürlich nicht vorkommende, aber dennoch biologisch aktive (*R*)-Enantiomer führt bei einigen RCAR-PP2C-Komplexen ebenfalls zu einer Reduktion der Phosphataseaktivität (Abb. 2.31). Es konnte für RCAR11 gezeigt werden, dass der Chiralitätsunterschied zwischen *S*(+)- und *R*(-)-Enantiomer, der sich auf die Position der Mono- und Dimethylgruppe des Rings auswirkt, durch eine Drehung des fast symmetrischen ABA-Moleküls um 180° in der Bindetasche ausgeglichen wird (Nishimura et al., 2009a), was die strukturelle Basis für die Bioaktivität von (*R*)-ABA darstellt.

Der ABA-Rezeptorkomplex RCAR-ABA-PP2C

Wie beschrieben formen die beiden Schleifen *cap* und *lock* bei der ABA-Bindung gleichzeitig eine hydrophobe Interaktionsfläche nach außen, wo die PP2C andockt. Der *cap*-Bereich interagiert dabei mit Stellen des aktiven Zentrums der PP2C, was die Strukturaufklärung von RCAR14-ABA-HAB1 und RCAR12-ABA-ABI1 zeigte (Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009; Yin et al., 2009). Dadurch wird die Fähigkeit der Phosphatase, Substrat zu binden und zu dephosphorylieren geblockt, der Zugang für das Substrat ist behindert, was die reduzierte enzymatische Aktivität im *in vitro*-Assay erklärt, wenn RCAR und ABA anwesend sind. Aminosäurereste des aktiven Zentrums sowie an der Interaktion mit RCARs beteiligte Aminosäuren sind im Anhang 5.3. markiert.

Die Struktur der Phosphatasen weist zwei β -Faltblattbereiche, die von 5 α -Helices umrandet werden, sowie eine weitere hervorstehende kleine Domäne auf. Der RCAR-Bereich sitzt wie ein Pfropf auf dem Zugang zum katalytischen Zentrum der Phosphatase, ein konservierter PP2C-Tryptophanrest aus der hervorstehenden Unterstruktur passt genau in die Lücke zwischen *cap* und *lock*, hält diese geschlossen und bildet zusätzlich über den Indolring eine Wasserstoffbrückenbindung mit der ABA-Ketongruppe aus.

Die Konformation von ABA-gebundenem RCAR ändert sich durch die Bindung an PP2Cs kaum. Mutationen in den RCAR-Schleifen stören die ABA-Bindung und blockieren die Interaktion mit der Phosphatase, Mutationen im katalytischen Zentrum der Phosphatase wie bei *abi1* führen ebenso zu einem Verlust der RCAR-Interaktion.

Durch die Interaktion von ABA mit dem Tryptophanrest der PP2C kann die ABA-abhängige Inhibierung dieser durch RCAR-Proteine erklärt, sowie das Corezeptor-Modell bestätigt werden (siehe Anhang 5.3.). Die PP2C-Bindung stabilisiert die ABA-Bindung an RCAR, indem es die geschlossene RCAR-Konformation stärkt, was die zehnfach höhere Bindungsaffinität aus den ITC-Experimenten erklärt (Ma et al., 2009).

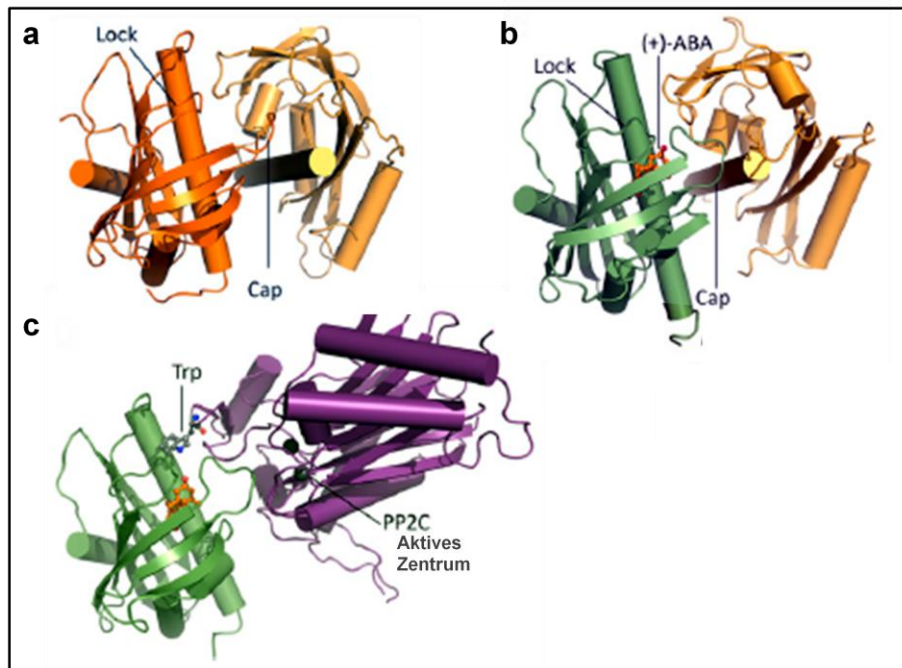


Abb. 3.3: Modell der ABA-Bindung durch RCARs und Interaktion mit PP2Cs (Hubbard et al., 2010).

(a) Die Struktur von RCAR14 als Homodimer ohne ABA (orange), sowie (b) in Gegenwart von (S)-ABA als asymmetrisches Dimer mit einem ABA (rot)-bindenden Molekül in geschlossener Form (grün) und ein Molekül ohne ABA in der offenen Form (orange) ist dargestellt. (c) zeigt den RCAR14-HAB1-Komplex mit dem Trp-Rest der PP2C (violett), der zwischen *cap* und *lock* liegt und mit ABA wechselwirkt. RCAR-*cap* steht in Kontakt mit dem aktiven Zentrum der Phosphatase, das ein als Kugel dargestelltes Mg^{2+} -Ion enthält, und führt so zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität.

Die kristallisierten Versionen der Phosphatasen waren beide N-terminal stark verkürzt (Abb. 2.45), ein möglicher Einfluss des für unterschiedliche Phosphatasen variierenden flexiblen N-Terminus auf die Interaktion mit RCARs konnte so strukturell nicht untersucht werden. Ergebnisse aus dieser Arbeit mit verkürzten ABI2-Konstrukten zeigten hier jedoch eine leicht erhöhte Effizienz der ABA-vermittelten PP2C-Inhibition an (Abb. 2.28 b). Da es uns aufgrund der Flexibilität des N-Terminus nicht gelungen ist, die Phosphatase zu kristallisieren, bleibt die Funktion dessen ungeklärt. Möglicherweise wird die Interaktion mancher Phosphatasen mit den RCAR-Proteinen, wie im Y2H-System für HAI-Phosphatasen beobachtet (Tab. 2.3), durch bestimmte N-Termini negativ beeinflusst, so dass manche Kombinationen von Corezeptoren für die Pflanzenzelle konzentrationsabhängig günstiger erscheinen und häufiger auftreten.

Andere Modelle der Phytohormonbindung

Die hydrophobe ABA-Bindestelle der RCAR-Proteine sowie der *gate-latch-lock*-Mechanismus der ABA-Bindung in *Arabidopsis thaliana* weisen gewisse Ähnlichkeiten zur Perzeption von Gibberellinen durch GID1A bzw. GID1 (*Gibberellin Insensitive Dwarf 1*) in *Arabidopsis* und Reis auf (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008).

Hier wird die Gibberellinsäure ähnlich wie ABA im Inneren einer hydrophoben Bindetasche „vergraben“, eine N-terminale Extension des GID-Rezeptorproteins fungiert als „Deckel“ und schließt die Gibberellinverbindung durch eine entsprechende Bewegung ein. Dadurch wird wie beim Umklappen der *cap*-Schleife bei RCAR die äußere Oberfläche des Rezeptors dementsprechend verändert, dass eine Interaktion mit dem negativen Regulator des Gibberellin-Signalwegs, dem DELLA-Protein GAI, möglich wird (siehe Abb. 3.4 a) (Murase et al., 2008; Peng et al., 1997). Durch nachfolgende Degradation der DELLA-Proteine stimuliert Gibberellin das Pflanzenwachstum (Hartweck, 2008).

Im Gegensatz dazu wirkt Auxin als „molekularer Kleber“ zwischen seinem Rezeptor TIR1 (*Transport Inhibitor Response 1*) (Dharmasiri et al., 2005) und den Repressorproteinen Aux/IAA (Tan et al., 2007). Das F-box Protein TIR1, das zusammen mit Skp1/ASK und Cullin eine E3 Ubiquitin-Ligase der SCF-Klasse formt, macht die Zielproteine (Aux/IAAs) durch die Ubiquitin-Modifikation anfällig für den Abbau durch das 26S-Proteasom. Die Interaktion zwischen TIR1 und Aux/IAAs wird durch die Bindung von Auxin in die von *Leucine-rich repeats* geformte Bindetasche von TIR1 gefördert. Auxin bindet an den Boden der Tasche und erhöht so die Kontaktfläche für Aux/IAAs. Diese binden oberhalb des Auxin-Moleküls an TIR1 und schließen dieses ein (siehe Abb. 3.4 b) (Kepinski, 2007; Tan et al., 2007). Der nachfolgende Abbau der Aux/IAA-Repressoren führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, den ARFs (*Auxin Response Factors*), welche die Expression Auxin-responsiver Gene regulieren (Gray et al., 2001).

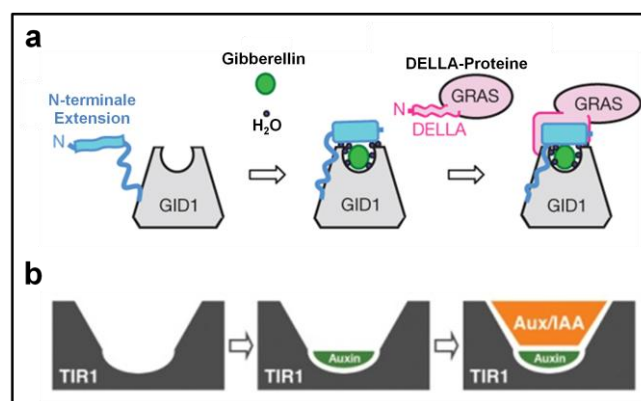


Abb. 3.4: Perzeptionsmechanismus von Gibberellin und Auxin.

(a) Gibberellin wirkt als „allosterischer Induktor“, der die GID1-DELLA-Interaktion erleichtert. Die Bindung von Gibberellin induziert eine Konformationsänderung am N-terminalen Ende des Rezeptors GID1, welches als Schalter funktioniert und DELLA-Bindung ermöglicht. Dies wiederum führt zu einer Konformationsänderung am DELLA-Protein, das neben der DELLA-Domäne am N-Terminus noch eine GRAS-Domäne (GAI, RGA, SCR) enthält (Murase et al., 2008). (b) Auxin dagegen wirkt als „molekularer Kleber“, um TIR1-Substrat-Interaktionen zu stärken. Dabei bindet Auxin an dieselbe Tasche, an die auch AUX/IAA-Proteine andocken. Ohne signifikante Konformationsänderungen an seinem Rezeptor TIR1 herbeizuführen, steigert Auxin die Affinität der beiden Proteine, indem es gleichzeitig mit der Proteinoberfläche beider in der Bindetasche von TIR1 interagiert (Tan et al., 2007).

Die Rezeptor-Bindestelle für das jeweilige Phytohormon liegt meist so, dass eine Interaktion mit einem assoziierenden negativen Regulator der Hormon-Signaltransduktion durch die Hormon-Perzeption begünstigt wird. Nachfolgend findet eine Inaktivierung des auf die Signaltransduktion negativ wirkenden Proteins statt, entweder durch Degradation über Ubiquitinierung und Proteolyse durch das 26S-Proteasom, wie es sich außer bei Auxin auch bei Jasmonaten, Gibberellinen sowie beim Ethylen-Signalweg findet (siehe Abb. 3.5) (Chini et al., 2009; Santner & Estelle, 2009; Santner & Estelle, 2010), oder durch sterisch bedingte Inaktivierung der Enzymaktivität bei der ABA-Perzeption. Die molekulare Wirkung der Abscisinsäure an ihrem Rezeptor sowie die nachgeschalteten Prozesse unterscheiden sich bei diesem Inaktivierungsmechanismus also von dem anderer Phytohormone. PP2Cs halten bei Abwesenheit von ABA positive Regulatoren der Signaltransduktion wie SnRK2s inaktiv, bei ABA-Anwesenheit werden sie selber durch die RCAR-Rezeptorproteine inhibiert und der Weg für die weitere Signaltransduktion wird freigegeben.

Dennoch wird auch die ABA-Sensitivität teilweise durch das 26S-Proteasom reguliert, einige Komponenten der ABA-Signaltransduktion durchlaufen Polyubiquitinierungsprozesse und eine anschließende Proteolyse, z.B. die Transkriptionsfaktoren ABI3 und ABI5 (Liu & Stone, 2010; Miura et al., 2009; Stone et al., 2006; Zhang et al., 2005).

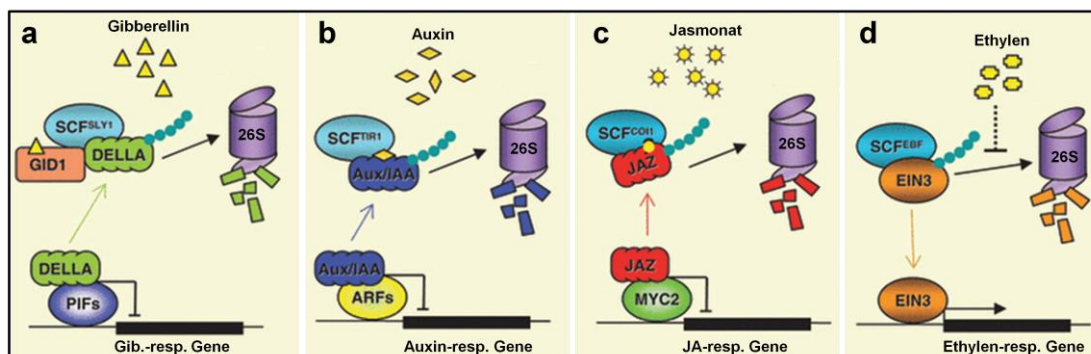


Abb. 3.5: Proteasomale Degradation als Strategie in der Phytohormon-Signaltransduktion (Chini et al., 2009).

(a) Bei basalen Gibberellin-Gehalten blocken DELLA-Repressoren PIFs, Phytochrom-interagierende Faktoren, sowie weitere Transkriptionsfaktoren. Bei der Hormon-Perzeption vermittelt *GID1* die Erkennung und die 26S-proteasomale Degradation der DELLA-Proteine durch *SCF-SLY1*, dadurch werden PIFs aktiviert und weitere Gibberellin-Antworten ermöglicht. (b) Auf die gleiche Art und Weise inhibieren Aux/IAA-Proteine die ARF-Transkriptionsmodulatoren in Abwesenheit von Auxin. Steigende Auxin-Gehalte helfen der *SCF-TIR1*-vermittelten Degradation der Aux/IAs, welche wiederum die ARF-Transkriptionsfaktoren und nachfolgende Auxin-Antworten freigeben. (c) Uninduziert reprimieren JAZ-Proteine MYC2 und andere Transkriptionsfaktoren. Bei der Jasmonat-Perzeption werden die JAZ-Repressorproteine über *SCF-CO1* einer proteasomalen Degradation zugeführt, dabei MYC2 freigesetzt und Jasmonat-Antworten induziert. (d) Der Ethylen-Signalweg unterscheidet sich dadurch von den anderen, dass bei Abwesenheit des Hormons der Transkriptionsaktivator EIN3 konstitutiv in einer *SCF-EBF1/2*-abhängigen Art und Weise degradiert wird. Bei Ethylen-Perzeption wird EIN3 stabilisiert und aktiviert anschließend Ethylen-Antworten.

3.2.4. Die Bet v 1-Superfamilie in Pflanzen

Die Abscisinsäure-bindenden RCAR-Proteine gehören der großen Bet v 1-Superfamilie in Pflanzen an, deren Mitglieder alle eine ähnliche Struktur aufweisen, die aus antiparallelen β -Faltblattstrukturen besteht, welche eine C-terminale α -Helix umwinden und so eine hydrophobe Bindetasche bilden (Bet v 1 *fold*, *helix-grip fold*-Motiv) (Iyer et al., 2001; Radauer et al., 2008).

Die Bet v 1-Superfamilie besteht aus *Pathogenesis-Related proteins 10* (PR-10), denen Pollenallergene wie Bet v 1 oder bedeutende Nahrungsmittelallergene wie Fra a 1 aus der Erdbeerfrucht oder Pru av 1 aus der Kirschfrucht angehören, sowie desweiteren aus Norcochlorinsynthasen (NCS), z.B. in Schlafmohn oder Gelber Wiesenraute vorkommend, Cytokinin-bindenden Proteinen (CSBPs) in Gelber Lupine und Mungbohne, und *Major Latex/Ripening Related Proteins* (MLPs/RRPs) in Arabidopsis, Schlafmohn oder Gurke (Radauer & Breiteneder, 2007). Die PR-10 Proteine werden bei der Antwort der Pflanze auf Pathogenattacken oder abiotischen Stress wie Trockenheit, UV-Strahlung, Salz oder Kälte exprimiert (Jain et al., 2006; Liu et al., 2005; Swoboda et al., 1995).

Strukturaufklärungen ergaben, dass Bet v 1-Proteine in der Lage sind, diverse Liganden zu binden. Die Funktion dieser Proteine scheint mit der Bindung und dem Metabolismus bzw. dem Transport von sperrigen hydrophoben Liganden wie Lipiden, Hormonen oder Antibiotika verbunden zu sein, weisen die Proteine doch auch eine gewisse Ähnlichkeit zur START-Domäne des humanen MLN64-Proteins auf. Das verfügt zusätzlich über eine N-terminale α -Verlängerung sowie über weitere β -Strukturen und ist am Cholesterin-Transport von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran beteiligt, wo dieses als Substrat für steroidogene Enzyme gebraucht wird (Lavigne et al., 2010; Miller, 2007; Tsujishita & Hurley, 2000).

Während (S)-Norcochlorinsynthasen Dopamin (Ilari et al., 2009) oder Hyp-1 die Anthrachinonverbindung Emodin (Michalska et al., 2009) als Liganden binden und enzymatisch umsetzen (Bais et al., 2003; Berkner et al., 2008), werden auch Phytosteroide gebunden, wie z.B. Homocastasteron von Pru av 1 (Neudecker et al., 2001). Das Protein PR-10c aus Birke bindet Flavonoidglycoside wie Hyperosid oder Rutin, sowie Kinetin (Koistinen et al., 2005). Ebenso wurden für Bet v 1 diverse Liganden wie Pflanzensteroid, Cytokinine, Flavonoide und Fettsäuren bestätigt (Mattila & Renkonen, 2009; Mogensen et al., 2002). Die hydrophobe Bindetasche besteht nämlich aus einer Y-förmigen Kavität mit unterschiedlichen Bindestellen, wodurch die Bet v 1 *fold*-Proteine in der Lage sind, ein breites Spektrum an Liganden zu binden.

Die Form macht es ebenso möglich, mehrere Ligandenmoleküle zur selben Zeit zu binden, so dass die vermutete Funktion als Reservoir- bzw. Transportprotein sehr wahrscheinlich ist. Je zwei Liganden Desoxycholat, strukturell eng mit den Brassinosteroiden verwandt, binden an ein Bet v 1I-Molekül (Markovic-Housley et al., 2003), drei von vier VrCSBP-Proteinen binden ein zweites Zeatin-Molekül, welches zu der Gruppe der Cytokinin-Hormone gehört (Pasternak et al., 2006). Interessanterweise bindet VrCSBP nicht nur Cytokinine, sondern auch Gibberelline, hier wurde ein neuer Bindemechanismus entdeckt, bei dem eine durch den Liganden induzierte Dimerisierung die Bindekapazität der Proteine erhöht (Zawadzki et al., 2010). Desweiteren bindet das PR-10 Protein LIPR10.2B aus *Lupinus luteus* drei Moleküle *trans*-Zeatin in einer großen Bindetasche (Fernandes et al., 2008), sowie vier Moleküle N,N'-Diphenylharnstoff, eine synthetische Cytokinin-Verbindung, und agiert so als Reservoir für das Phytohormon in einer wässrigen Zellumgebung (Fernandes et al., 2009).

Beim Test darauf, ob auch RCAR-Proteine (RCAR11) andere Hormonverbindungen als Abscisinsäure binden können und dies einen Einfluss auf die PP2C-Interaktion (ABI2) hat, konnten unter Jasmonaten, Auxinen, Cytokinin und Brassinosteroiden, sowie einigen anderen Verbindungen keine RCAR-Liganden entdeckt werden. Auch ein zusätzlicher positiver oder negativer Effekt der getesteten Substanzen auf die ABA-vermittelte PP2C-Inhibierung durch RCAR-Proteine, was eventuell die Bindung eines zweiten Liganden an die RCAR-Bindetasche, oder eine Konkurrenz mit ABA um die Bindestelle bedeuten würde, konnte ausgeschlossen werden (Abb. 2.29). Ähnliche Ergebnisse für RCARs und HAB1 erhielten auch Santiago et al. (2009), sowie Park et al. (2009) im Y2H-System. Im Vergleich zu RCAR-Proteinen weist die Struktur der oben erwähnten Proteine, welche mehrere Liganden gleichzeitig binden können, eine ca. 8-fach größere hydrophobe Bindetasche auf (Fernandes et al., 2008; Gajhede et al., 1996; Melcher et al., 2009), was die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erklärt, dass keine Verbindung einen zusätzlichen oder inhibierenden Effekt auf die ABA-Bindung hat. Es kann dennoch sein, dass RCAR-Proteine noch spezifisch andere Verbindungen als ABA binden können, welche aber nicht mit ABA um eine Bindestelle konkurrieren, sondern an anderen Stellen z.B. weiter außen an der hydrophoben Bindetasche binden und nicht im Zusammenhang mit der blockierenden Wirkung auf die Phosphataseaktivität stehen. Dies kann im Assay zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Phosphatasen 2C nicht erkannt werden, Bindungsstudien etwa mittels ITC mit diversen potentiellen Liganden, z.B. aus Pflanzenzellextrakt, wären nötig.

Viele Proteine aus der Bet v 1-Superfamilie spielen also eine Rolle bei der Bindung diverser Liganden und wirken vermutlich als Reservoir oder Transporter von Lipiden oder Hormonen, andere wie die Norcoclaurinsynthasen oder Hyp-1 sind an der enzymatischen Umsetzung ihrer phenolischen Liganden während der Alkaloid-Biosynthese beteiligt (Bais et al., 2003; Berkner et al., 2008; Ilari et al., 2009; Michalska et al., 2009).

Die Funktion Bet v 1-homologer allergener Proteine aus der Erdbeerfrucht (*Fragaria x ananassa*) wird in der Flavonoid-Biosynthese vermutet (Munoz et al., 2010). Die drei Isoformen Fra a 1, 2 und 3 werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, Fra a 1 vor allem in Wurzeln, Fra a 3 vor allem in Blüten, Fra a 2 dagegen wird in reifen roten Früchten sehr stark exprimiert. Bei der transienten RNAi-vermittelten Abschaltung der Fra-Gene, welche weiße Stellen in der roten Erdbeerfrucht induziert, kommt es neben einem Absinken der Fra-Konzentration auch zu einer verringerten Expression von an der Anthocyan-Biosynthese beteiligten Enzymen wie der Phenylalanin-Ammoniumlyase oder der Chalkonsynthase (Weisshaar & Jenkins, 1998). Der Hauptfarbstoff der roten Erdbeerfrucht, Pelargonidin-3-O-glucosid, wird kaum mehr gebildet. Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle der Fra-Proteine in der Flavonoid-Biosynthese, aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Bet v 1-Proteinen könnten die Fra-Proteine als Transportproteine für Biosynthese-Intermediate fungieren oder beim Transport von Anthocyanen in die Vakuole beteiligt sein (Munoz et al., 2010).

Die Funktion vieler Bet v 1-Proteine in der Pflanze ist neben der vermuteten als Lipid-/Hormon-Reservoir bzw. -Transporter noch unklar. Nachdem RCAR-Proteine genau wie die Erdbeer-Allergene Fra a 1, 2 und 3 der Bet v 1-Superfamilie angehören und zumindest für die RCARs gezeigt wurde, dass ihre Struktur ähnlich zu der von Bet v 1 ist, könnte es sein, dass Bet v 1 oder andere Proteine dieser großen Familie ebenso fähig sind, mit Phosphatasen des Typs 2C über passende Kontaktflächen zu wechselwirken. Ein Sequenzabgleich zwischen RCAR-Proteinen, Bet v 1 und Fra-Proteinen ist im Anhang 5.3. abgebildet. Es wurde daher geprüft, ob die Anwesenheit von Bet v 1 und Fra-Proteinen einen Effekt auf die Phosphataseaktivität verschiedener PP2Cs der Subgruppe A ausübt, was jedoch nicht der Fall war (Abb. 2.33 und 2.36). Auch die Anwesenheit von Abscisinsäure beeinflusst die PP2C-Aktivität in Gegenwart von Bet v 1 oder Fra a 1-3 nicht.

Bet v 1 und seine Homologen binden verschiedenste Liganden wie Steroide oder Cytokinine, aber auch in Gegenwart solcher Liganden änderte sich der Einfluss von Bet v 1 auf die enzymatische Aktivität der Phosphatasen nicht (Abb. 2.35), so dass davon ausgegangen muss, dass die Proteinstruktur von Bet v 1 keine Kontaktfläche zur Interaktion mit PP2Cs aus *Arabidopsis* aufweist und auch die Bindung passender

Liganden keine Konformationsänderung dahingehend auslöst, dass eine zur Interaktion geeignete Kontaktfläche generiert würde, die die Phosphataseaktivität beeinflusst. Es wurden unterschiedliche Bindestellen für die diversen Liganden von Bet v 1 und verwandten Proteinen postuliert (Koistinen et al., 2005; Mogensen et al., 2002), was sich eventuell auch in unterschiedlichen Bindemechanismen auswirkt, welche nicht unbedingt dem der RCAR-Proteine entsprechen.

Für die drei Fra-Proteine wurden zudem noch einige Phenolsäurederivate getestet, die bei der Flavonoid-Biosynthese in der Erdbeerfrucht eine Rolle spielen (Abb. 2.38). Auch hier wurde keine Interaktion mit Arabidopsis-Phosphatasen beobachtet, die eine signifikante Aktivitätsänderung dieser zur Folge hätte. Dazu passen Ergebnisse aus einem Y2H-Screen mit Bet v 1 und Fra-Proteinen, wo ebenfalls keine Interaktion mit den Phosphatasen ABI1 und ABI2 beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es bleibt daher zu klären, ob und welche Proteine *in vivo* als Interaktionspartner für Bet v 1 und Fra a 1-3 in Frage kommen, bzw. welche Verbindungen oder Intermediate aus der Flavonoid-Biosynthese von Fra-Proteinen gebunden werden können, um die genaue Funktion dieser Proteine in Pflanzen verstehen zu können.

Der in dieser Arbeit untersuchte Mechanismus der hormonabhängigen Inaktivierung negativer Regulatoren des durch verschiedenste Stressbedingungen angeschalteten ABA-Signaltransduktionswegs, der PP2Cs der Klasse A, durch die als Hormonrezeptoren fungierenden RCAR-Proteine scheint zunächst spezifisch nur für die Gruppe der RCAR-Proteine zu gelten.

Funktion der MLP-Proteine aus Arabidopsis thaliana

Betrachtet man die Bet v 1-Familie von *Arabidopsis thaliana*, so fällt auf, dass neben der RCAR-Familie mit 14 Mitgliedern und einigen bisher nicht weiter klassifizierten vor allem Proteine der MLP-Familie sowie der MLP-related-Gruppe zur nächsten RCAR-Verwandtschaft zählen (Abb. 2.46). MLP-Proteine wurden zunächst im Latexsaft von *Papaver somniferum* (Nessler et al., 1990) identifiziert. Über die Funktion dieser Proteine in Pflanzen ist jedoch noch wenig bekannt, neben einer vermuteten Beteiligung an der Frucht- und Blütenentwicklung scheint es einen Zusammenhang mit Gravitropismus und den dabei wirkenden Phytohormonen der Auxingruppe sowie mit Brassinosteroiden und Cytokinin zu geben, da die Expression zweier Proteine der Familie, MLP28 und MLP43, durch Gravitationsstimulus hochreguliert wird (Kimbrough et al., 2004; Li et al., 2005). Außerdem werden einige der MLP/MLP-related-Proteine durch ABA und ABA-induzierende Stressbedingungen herunterreguliert, genau wie manche der RCAR-Proteine.

Der MLP-Promotor in Baumwolle enthält potentielle *cis*-Elemente für die Antwort auf Salzstress, eine erhöhte MLP-Expression wurde bei hohen NaCl-Gehalten sehr rasch induziert. Transgene Arabidopsis-Pflanzen, welche GhMLP exprimieren, weisen eine signifikant höhere Salztoleranz auf. Zusätzlich war der Flavonoid-Gehalt zweifach erhöht, so dass auch eine Rolle in der Einstellung des Flavonidgehaltes für GhMLP in Frage kommt. Es wird vermutet, dass das MLP-Protein durch die Bindung und den Transport von Liganden bei der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt ist (Chen & Dai, 2009). Sun et al. (2008) berichteten für das Ginseng-MLP151 ein erhöhtes Transkriptlevel nach Stressbehandlung mit Licht und Mannit, während durch Dunkelheit, H₂O₂ und Salicylsäure die Expression herunterreguliert wurde (Sun et al., 2008).

Die kürzlich aufgeklärte Struktur der Proteine At1g24000.1 und At1g70830.1 (MLP28) weist zwar die Bet v 1-typische Faltung auf, jedoch mit signifikanten Unterschieden zum Protein Bet v 1. Zum Beispiel sind beim MLP-Protein die Substrukturen $\alpha 4$ und $\beta 2$ (siehe Abb. 2.44 (a) zum Vergleich) durch eine lange flexible Schleife ersetzt, beide Proteine sind kompakter als andere Bet v 1-Proteine und weisen eine kleinere hydrophobe Kavität auf, wie es auch für die RCAR-Proteine der Fall ist (siehe Abb. 3.6). Für At1g24000 konnte ähnlich wie für die RCAR-Proteine ein Dimerzustand beobachtet werden, *in vitro* wurde die Bindung von Progesteron, das ein repräsentatives Hormon mit hoher struktureller Ähnlichkeit zum pflanzlichen Brassinolid darstellt, gezeigt (Lytle et al., 2009).

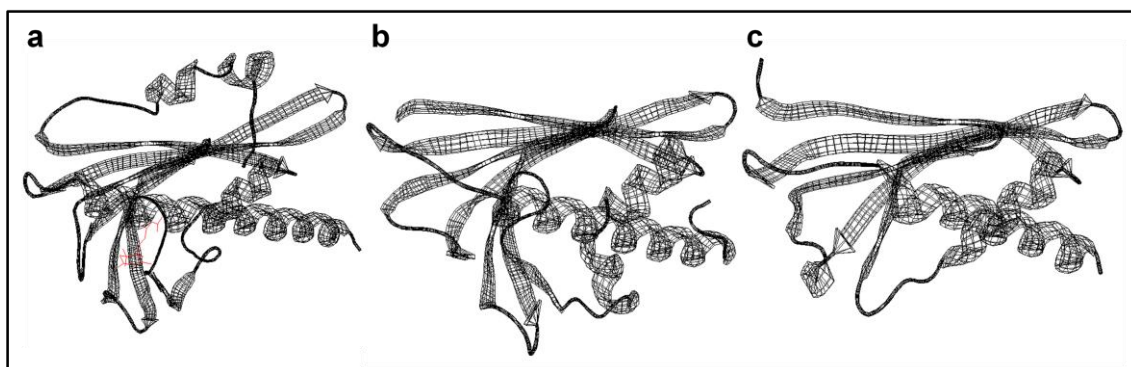


Abb. 3.6: Vergleich der Proteinstrukturen von RCAR11, Bet v 1 und At1g24000.

(a) Struktur von RCAR11 mit dem Liganden (S)-ABA (rot angedeutet) in der hydrophoben Bindetasche (Datei in der RSCB-Datenbank: 3K3K). (b) zum Vergleich die Struktur von Bet v 1 (1BV1) und (c) von At1g24000 aus der MLP-Familie (2Q3Q), beide ohne Liganden, in derselben Orientierung wie RCAR11. Die Strukturen wurden mit der Swiss-PdbViewer-Software 4.0.1 bearbeitet.

Die PP2C-Familie in Arabidopsis thaliana

Proteinphosphatasen sind im Allgemeinen dafür bekannt, im Zusammenwirken mit Proteinkinasen die Proteinphosphoregulation zu modulieren. Tyrosin-Phosphatasen werden von Serin/Threonin-Phosphatasen unterschieden (Cohen, 1989), welche wiederum in die Gruppen PP1 und PP2 eingeteilt sind. Letztere unterscheiden sich in ihrer Metallionen-Abhängigkeit: Während die Proteinphosphatasen 2A keine Anforderungen stellen, brauchen PP2Bs Ca^{2+} und PP2Cs Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} für eine enzymatische Aktivität. Die über 80 Mitglieder der PP2C-Familie in *Arabidopsis thaliana* werden in 10 bzw. 13 Subgruppen eingeteilt (Abb. 2.47) (Schweighofer et al., 2004; Xue et al., 2008).

Die Funktion der meisten PP2Cs ist bisher nicht bekannt, die in der vorliegenden Arbeit behandelte Subgruppe A mit neun Phosphatasen ist primär an der Vermittlung von Stresstoleranz beteiligt, die Phosphatasen wirken als negative Regulatoren im ABA-Signaltransduktionsweg und werden von den RCAR-Proteinen in Gegenwart von ABA inhibiert, so dass Phosphorylierungsreaktionen der Kinasen (SnRK2s, CPKs oder CIPKs) ablaufen können. Das Expressionsmuster der Subgruppe D dagegen lässt einen positiven Einfluss auf ABA-induzierte Signalwege vermuten, z.B. gilt die PP2C2 aus *Fagus sylvatica*, eng verwandt mit At3g51370, als positiver Regulator der ABA-Signaltransduktion (Reyes et al., 2006). Andere Phosphatasen 2C wiederum regulieren MAPK-Signalkaskaden, in Hefe wird beispielsweise der *High-Osmolarity Glycerol* (HOG) MAPK-Signalweg durch sie negativ beeinflusst (Warmka et al., 2001). Arabidopsis-PP2Cs der Gruppe B wie AP2C1 (At2g30020) inaktivieren MAPKs wie MPK4 und MPK6 während der Signaltransduktion bei Verwundung und regulieren gleichzeitig die Konzentration der Stresshormone Ethylen und Jasmonsäure (Schweighofer et al., 2007). PP2C5 (At2g40180) dagegen wird als positiver Regulator von Keimung, Stomataapertur und ABA-induzierter Genexpression angesehen, sie wechselwirkt mit MPK3, 4 und 6 (Brock et al., 2010). Die PP2C PIA1 (At2g20630) aus der Subgruppe E1 wirkt auch bei der Antwort auf biotischen Stress wie *Pseudomonas syringae*-Infektion, die Expression der Phosphatase wird durch den bakteriellen Effektor AvrRpm1 induziert (Widjaja et al., 2010). Mitglieder der Subgruppe C wie POLTERGEIST und PLL1 nehmen eine Rolle in der Pflanzenentwicklung ein, sie sind Phospholipid-stimulierte Stammzellenfaktoren in der Meristementwicklung (Gagne et al., 2008; Gagne & Clark, 2010).

Besteht ein allgemeines Zusammenwirken von PP2C-Proteinen mit Bet v 1-Proteinen?

Das breite funktionelle Spektrum von PP2Cs diverser Untergruppen mit der Beteiligung an Stress-induzierten Phytohormon-Signalwegen, sowie die Strukturähnlichkeit der MLP-Proteine zu den RCARs sind beides Anzeichen dafür, dass neben der Interaktion RCAR-PP2C A auch andere Bet v 1-Proteine aus Arabidopsis mit PP2Cs der Subgruppe A oder anderer Subgruppen interagieren und so diverse Pflanzenantworten auf biotischen oder abiotischen Stress regulieren. Der Antwort auf die Frage, ob andere Proteine der Arabidopsis-Bet v 1-Familie ebenfalls Interaktionspartner von PP2Cs darstellen und eventuell gar einen von ABA oder anderen Phytohormonen abhängigen Effekt auf die Phosphatasen ausüben, wurde in dieser Arbeit über einen *Yeast Two-Hybrid* Interaktionsscreen nachgegangen. Es konnte jedoch weder zwischen Mitgliedern der MLP- bzw. der MLP-*related*-Familie und den PP2Cs der Subgruppe A noch zwischen RCARs oder MLPs mit PP2Cs anderer Subgruppen außer A eine Verbindung festgestellt werden (siehe 2.3.4.1; Sequenzabgleich RCARs und verwendete MLPs im Anhang 5.3.). Auch bei Zugabe von Phytohormonen aller Art sowie einem Extrakt aus Pflanzenzellen, der zusätzliche Pflanzenstoffe wie Lipide beinhaltet, konnte keine Interaktion beobachtet werden. Für die Aufklärung der MLP-Funktion müssten potentielle Protein-Interaktionspartner bzw. Liganden z.B. im Hefesystem mit Hilfe einer Bibliothek oder durch Coimmunopräzipitationsstudien bzw. über Bindungsstudien identifiziert werden, um so eine stressinduzierte oder hormonabhängige Funktion bzw. eine Rolle in der Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe aufdecken zu können.

Die Aufklärung des Mechanismus der Abscisinsäure-Perzeption ist insofern von großer Bedeutung, da Abscisinsäure diverse Anpassungsreaktionen der Pflanzen an biotische und abiotische Stressbedingungen vermittelt. Das Wissen um den Ablauf der Bindung von Abscisinsäure an RCAR-Proteine sowie die Regulation der PP2C-Inaktivierung können dazu verwendet werden, Pflanzen stresstoleranter zu machen. Die Strukturaufklärung aller relevanter Zustände - RCAR-Protein ohne Ligand, RCAR mit Abscisinsäure, sowie RCAR mit Abscisinsäure in Interaktion mit einer PP2C - liefert einen detaillierten Mechanismus der Perzeption des Phytohormons in *Arabidopsis thaliana* und stellt damit eine gute Basis dar, synthetische Abscisinsäure-Agonisten zu entwerfen, um durch Anwendung dieser Substanzen Feldfrüchte vor Stress aller Arten zu schützen. Der Einsatz von ABA-ähnlichen Molekülen, die ebenfalls als RCAR-Liganden wirken und dieselbe Konformationsänderung induzieren, jedoch günstiger zu produzieren sind als ABA, kann sich bei einem hohen Salzgehalt im Boden oder im

Vorfeld einer Trockenperiode lohnen, da die Pflanze bei angeschaltetem ABA-Signalweg den Wasserverbrauch einschränkt. Die Identifizierung neuer Liganden für MLP-Proteine in Arabidopsis sowie die Aufklärung von MLP-abhängigen Prozessen könnte eine ähnliche Funktion wie die der RCAR-Proteine aufdecken, die beispielsweise auch bei der Vermittlung von Stresstoleranz eine Rolle spielen könnte. Desweiteren wäre interessant, die Perzeption des osmotischen Signals in den Wurzeln näher zu untersuchen, um osmotische und NaCl-Sensoren zu finden, die vielleicht bei Halophyten durch angepasste Regulation der Verbesserung der Toleranz gegenüber Trockenheit und Salinität dienen.

4. Material und Methoden

4.1. Physiologische Methoden

4.1.1. Pflanzenmaterial und Anzucht

Die Versuche dieser Arbeit wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col) oder *Landsberg erecta* (Ler) und Transgenen durchgeführt. Die Anzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Conviron, Kanada) unter Langtagbedingungen (16h Licht - $100 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22°C , 65% Luftfeuchtigkeit; 8h Dunkelheit bei 17°C , 75% Luftfeuchtigkeit) bzw. im Gewächshaus in einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ T). Die Generationszeit lag bei 6 bis 8 Wochen.

4.1.2. Samensterilisation und Sterilkultur

Für die Sterilkultur von Keimlingen wurden die Samen nach Oberflächensterilisation auf MS-Medium (MS 0,5x oder 1x Saccharose) ausgebracht, die Platten für 2 Tage bei 4°C unter Licht gelagert, um noch vorhandene Dormanz zu brechen, und anschließend im Zellkulturraum unter Dauerlicht ($60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bei $22\text{-}23^\circ\text{C}$ 4 bis 5 Tage bis zur Verwendung angezogen.

Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Samen

Jeweils ca. 20 μl trockene Samen wurden mit 1 ml 80% EtOH (v/v) / 0,1% Triton X-100 (v/v) versetzt und 20 min bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgte eine weitere zweiminütige Sterilisation mit 3% (v/v) Natriumhypochlorit (NaOCl)-Lösung. Nach 5-maligem Waschen mit je 1 ml sterilem mQ-Wasser wurden die Samen auf MS-Platten ausgebracht.

MS-Medium (0,5x Saccharose) (Murashige & Skoog, 1962)

2,5 ml/l 400x Mikrosalz-Lösung
100 ml/l 10x Makrosalz-Lösung
5,0 g/l Saccharose
1,0 g/l MES
mit 5 M KOH auf pH 5,8 eingestellt
10,0 g/l Agar
autoklavieren

400x Mikrosalze

0,01 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
0,01 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
11,2 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
1,2 g/l H_3BO_3
0,3 g/l KI
14,6 g/l Na_2EDTA
0,1 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
0,8 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
Lagerung bei -20°C

10x Makrosalze

3,3 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
1,7 g/l KH_2PO_4
19,0 g/l KNO_3
3,7 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
4,0 g/l $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
16,5 g/l NH_4NO_3
Lagerung autoklaviert

Je nach Versuch wurden entsprechende Mengen an NaCl oder Mannit zur Herstellung des Stress-MS-Mediums vor dem Autoklavieren zugesetzt. Bei Versuchen mit Abscisinsäure wurde nach dem Autoklavieren im auf ca. 60°C abgekühlten MS-Medium eine Konzentration von $30 \mu\text{M}$ ABA eingestellt. Alle Platten wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Bei den meisten Versuchen wurden vor dem Ausbringen der Samen bzw. dem Umsetzen der Keimlinge unter sterilen Bedingungen Stege aus dem Agar ausgestochen. Die Keimlinge wurden für Anzucht und Versuchsdauer auf den Platten so am Rand der Stege positioniert, dass nur die Wurzel, nicht aber die Keimblätter Kontakt zum Medium hatten. Auf diese Weise wirkten die gewählten Versuchsbedingungen wie etwa NaCl-Stress spezifisch auf die Wurzeln ein.

Stammlösung 2-cis-4-trans-(+)Abscisinsäure (ABA): 10 mM ABA (Lomon Bio Technology, China, <http://www.lomonbio.com>) in 10 mM MES in Wasser (pH 7,0)

4.1.3. Salzstress und osmotischer Stress an Keimlingen

Zur Durchführung der Salzstress-Experimente wurden wie oben beschrieben hergestellte Stress-MS-Platten verwendet, auf welche die steril angezogenen Keimlinge nach 5 Tagen mit feinen Federstahlpinzetten umgesetzt wurden. Mit Parafilm, sterilem Teflon-Band oder aus dem Agar gestochenen Stegen wurde sichergestellt, dass außer der Wurzel keine weiteren Pflanzenteile in Kontakt zum Stressmedium kamen. Die Inkubation der umgesetzten Keimlinge erfolgte in senkrecht stehenden Platten für die jeweils angegebene Dauer im Zellkulturraum. Die Messung des genauen osmotischen Potentials ψ des Agarmediums der Stress-MS-Platten erfolgte mit einem Voltmeter/Psychrometer (HR-33T DewPoint Microvoltmeter, WESCOR, Logan, Utah USA).

4.1.4. Bestimmung der Reporteraktivität

4.1.4.1. Luciferase-Aktivität (*In vivo-Imaging*)

Nach Stressbehandlung und damit nach Aktivierung des Reportersystems durch Abscisinsäure bzw. Salz- und Trockenstress wurden die Keimlinge zur Messung der Luciferase (LUC)-Aktivität mit dem Substrat D-Luciferin besprüht und die Lichtemission der Keimlinge mit einem CCD-Kamerasystem (Hamamatsu 1394 ORCAII-ERG; <http://jp.hamamatsu.com>) detektiert. Dabei wurden jeweils 16 Pixel zu einem Pixel zusammengefasst (4x4 *binning*). Die Auswertung erfolgte mit den Programmen SimplePCI (Version 5.0.0.1503, Compix Inc., Imaging Systems, USA)/Microsoft Excel/WinSTAT®. Zuerst wurde eine Belichtungszeit von 5 min eingehalten, in welchen Restsignale von Chlorophyllfluoreszenz bzw. -phosphoreszenz abklingen, für die Messung 10 min. Die LUC-Aktivität wurde für Sprosse und Wurzeln getrennt bestimmt, indem entsprechende Messflächen nach Abzug des Hintergrundrauschens für die jeweilige Lumineszenzaufnahme definiert wurden.

D-Luciferin-Lösung

56 mg D-Luciferin, vorliegend als freie Säure (M= 280,32 g/mol) in 100 ml 2 mM KOH gelöst

80 ml mQ-Wasser

20 ml 100 mM MES-Puffer pH 7,0

200 µl 10% (w/v) Tween-80

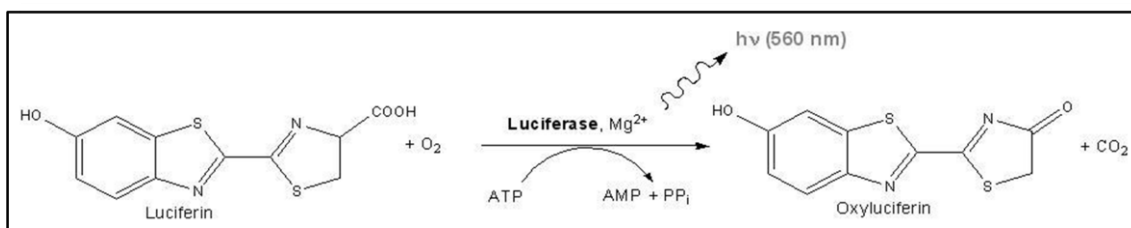


Abb. 4.1: Reaktionsschema der Luciferin-Umsetzung.

4.1.4.2. Enzymatische GUS-Bestimmung

Die enzymatische quantitative Bestimmung der β -Glucuronidase (GUS) erfolgte in Proteinextrakten aus Keimlingen (Breyne et al., 1993).

Herstellen eines Proteinextraktes aus Keimlingen

Pflanzenmaterial von vorher gestressten (siehe 4.1.3) 10 bis 15 Keimlingen pro Probe der Arabidopsis-Reporterlinien *pRD29B::GUS* bzw. *DR5::GUS* wurde ganz oder

getrennt nach Wurzeln und Sprossen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. 60 bis 80 mg des Materials wurden mit je 80 μl des Extraktionspuffers versetzt und gründlich gemörser. Die Suspension wurde für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der klare Überstand bis zur Weiterverwendung maximal 4 h auf Eis gelagert.

Extraktionspuffer

50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH=7,0)
10 mM β -Mercaptoethanol
10 mM Na_2EDTA
0,1 % Triton X-100 (v/v)

Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts im Überstand erfolgte mit dem Bradford-Reagenz von Bio-Rad, München (Bio-Rad Protein Assay). Die Eichgeraden wurden mit BSA-Konzentrationen von 0 bis 10 μg aufgenommen (verdünnt mit Extraktionspuffer), zu der Proteinlösung (Gesamtvolumen 10 μl) wurden jeweils 200 μl des 1:5 verdünnten Farbreagenzes pipettiert, nach 5 min Inkubation dann die Absorption bei 595 nm im Mikroplattenleser Synergy2 (Biotek) gemessen. Von den Proben wurde jeweils eine 1:5 verdünnte Lösung eingesetzt.

Messung der GUS-Aktivität

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität in den Proteinextrakten wurden jeweils 2 μg Protein in 240 μl Extraktionspuffer vorgelegt und bei 37°C 10 min lang inkubiert. Nach Zugabe von 10 μl MUG-Reagenz (4 mM 4-Methylumbelliferon- β -D-Glucuronid (MUG) in Extraktionspuffer) wurde die bei der Spaltungsreaktion entstehende Fluoreszenz (als mRFU/min, *relative fluorescence units*) bei 37°C in einer Kinetik über 15 min (Filter: Anregung 360 nm, Emission 460 nm) vermessen.

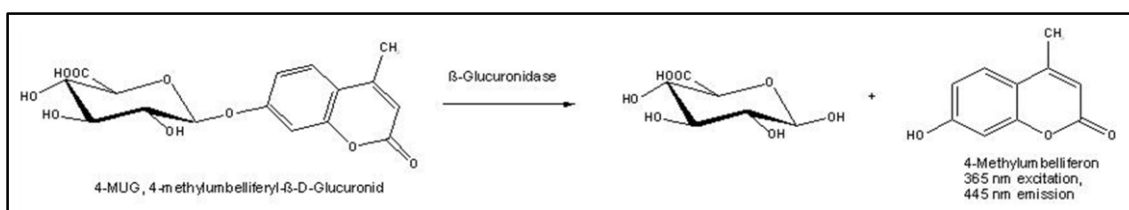


Abb. 4.2: GUS-Reaktionsschema mit Substrat MUG.

4.1.5. Klonierung der Reporterkonstrukte *pAtHB6::EGFP* und *pRD29B::EGFP*

Die Klonierung der pSK Ascl-Reporterkonstrukte zur transienten Expression in Protoplasten erfolgte über PCR und Restriktion aus bereits vorhandenen Konstrukten. Für die Klonierung von *pAtHB6::EGFP* wurde ein BamHI-EGFP-SacI-Fragment über PCR amplifiziert. Als Ausgangs-DNA diente pEVS-NL (Ehrhardt Labor, Carnegie Institution for Science, deepgreen.stanford.edu), folgende Oligonukleotide wurden als Primer benutzt: 5'-tac ttg gat cca tgg tga gca agg gcg ag-3' und 5'-aca gag agc tct tac ttg tac agc tcg tc-3'. Die BamHI- und SacI-Erkennungssequenz wurde in das Reporterfragment eingebracht, welches dann nach Ausschneiden des LUC-Reportergens mit dem HB6-Promotor des pSK Ascl-Konstrukts *pAtHB6::LUC* (Himmelbach et al., 2002) fusioniert wurde. Der HB6-Promotor wurde nachfolgend durch den RD29B-Promotor aus *pRD29B::GUS* (Christmann et al., 2005) über SacII and BamHI ersetzt, um das pSK Ascl *pRD29B::EGFP*-Konstrukt zu erhalten. Zur Klonierung in den binären Vektor pBI121 Ascl zur nachfolgenden Agrobakterienvermittelten stabilen Transformation in Arabidopsis-Pflanzen wurde die gesamte *pAtHB6::EGFP*- bzw. *pRD29B::EGFP*-Kassette aus den pSK Ascl-Plasmiden mit Ascl herausgeschnitten und in den pBI121 Ascl-Vektor eingefügt. Nach Überprüfung der Leserichtung und Sequenzierung wurden pBI121 Ascl *pAtHB6::EGFP* und pBI121 Ascl *pRD29B::EGFP* in Agrobakterien zur Transformation eingesetzt.

4.1.6. Transiente Expression in Protoplasten

Als System zur Untersuchung ABA-induzierter bzw. osmotisch induzierter Genexpression wurde die transiente Expression in Protoplasten gewählt. Im Folgenden werden die Verfahren zur Protoplasten-Herstellung und Transfektion dargestellt.

Herstellung der Enzymlösung für die Protoplastierung

Die Herstellung der Enzymlösung erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook & Russell, 2001). Für 1 l wurde zunächst eine Stammlösung von 500 ml hergestellt, bestehend aus 2% Cellulase, 0,5% Macerozym und 10 mM MES-KOH (pH 5,6) mit 0,5 mM PMSF. PMSF wird hier benutzt, um die Protease-Aktivität in der Enzymlösung einzuschränken. Die Lösung wird zweimal 40 min bis 1 h gegen 1,5 l 10 mM MES-KOH (pH 5,6) dialysiert. Die für die Dialyse benötigten Cellulose-Schläuche wurden nach Standardprotokoll (Sambrook and Russell, 2001) vorbereitet und bei 4°C

gelagert. Anschließend wurden Mannit und CaCl_2 zugesetzt und die Lösung bei 55°C für 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von BSA und Einstellen des pH-Werts auf 5,6 wurde die fertige Lösung sterilfiltriert ($0,22\ \mu\text{m}$), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Enzymlösung

1 % Cellulase Onozuka R-10 (w/v; #216001, Yakult, Tokyo, Japan)
0,25 % Macerozym R-10 (w/v; #202039, Yakult, Tokyo, Japan)
400 mM Mannit
8 mM CaCl_2
1 % BSA (w/v)
5 mM MES-KOH (pH=5,6)

Protoplastierung

Die Präparation der Protoplasten aus Blattmaterial der jeweiligen 3 bis 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen erfolgte nach modifizierten Protokollen (Abel & Theologis, 1998; Hoffmann, 2002; Korte, 2009; Moes, 2006; Sheen, 2001). 20 bis 30 Blätter entsprechend einem Frischgewicht von 2 bis 3 g wurden abgeschnitten und in eine Petrischale mit 20 ml Enzymlösung überführt. Der Verdau des Pflanzenmaterials erfolgte bei RT für ca. 4 h auf einem Kippschüttler. Bei allen folgenden Prozessen ist darauf zu achten, möglichst vorsichtig mit den Protoplasten zu verfahren.

Die Protoplastensuspension wurde anschließend zur Abtrennung unverdauter Blattreste durch ein Nylonnetz ($150\ \mu\text{m}$) filtriert, einmal mit 8 ml WIMK gewaschen, anschließend bei $60\ \text{xg}$ 2 min lang zentrifugiert, und das Protoplasten-Pellet ein weiteres Mal in 4 ml WIMK resuspendiert, anschließend wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in MaMg resuspendiert und ein Teil zur Überprüfung der Zellkonzentration mit FDA angefärbt (Nunberg, 1993). Fluoresceindiacetat dient zum Nachweis bzw. der Kontrolle der Vitalität lebender Zellen. Die Acetatgruppen werden durch zelluläre Esterasen abgespalten, was in Fluoreszenz in Zellen mit intakten Membranen resultiert. $2\ \mu\text{l}$ FDA-Lösung wurden dazu zu einer $100\ \mu\text{l}$ einer 1:10-Verdünnung der Protoplastenlösung gegeben und mit Hilfe eines Hematocytometers die Anzahl fluoreszierender Protoplasten pro Volumeneinheit mit einem Zeiss Axioskop HBO 50 und einem FITC-Filtersatz (480 nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 nm Emissionsfilter) ermittelt. 1 Protoplast pro Quadrat (=0,25 nl) entsprach als Richtwert 4×10^6 Protoplasten pro ml. Um bei einer späteren Transfektion eine Konzentration von 1×10^5 Protoplasten pro ml zu erreichen, wurde die Protoplastensuspension mit MaMg auf eine Konzentration von 1×10^6 eingestellt. Um eine höhere Transformationsrate zu erhalten, wurde die Protoplastenlösung für mindestens 30 min bei 4°C aufbewahrt.

MaMg

400 mM Mannit
15 mM MgCl₂
5 mM MES-KOH (pH 5,6 bis 5,8)
autoklaviert, Lagerung bei -20°C

WIMK

0,5 M Mannit
5 mM MES-Tris (pH 5,8 bis 6,0)
autoklaviert, Lagerung bei -20°C

FDA-Lösung 1 mg/ml in Aceton

Transfektion von Protoplasten

Um eine erhöhte Transfektionsrate bzw. DNA-Aufnahme in die Protoplasten zu erreichen, wurde Polyethylenglycol 4000 verwendet. In einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die zu transfizierende DNA (ca. 4 µg des Reporterkonstrukts *pRD29B::LUC*, 6 µg 35S::*GUS* und 2 µg Effektor-Plasmid) in gleichem Volumen 0,5 M Mannit vorgelegt, dazu 100 µl Protoplasten-Suspension in MaMg der Konzentration 1x10⁶ Protoplasten pro ml gegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 37°C warmer PEG-Lösung (Volumen 1:1) und nochmaligem Mischen wurden 750 µl WIMK zugegeben und die Mischung bei 200 rpm 3 min lang bei RT zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 100 µl WIMK resuspendiert, ein zweites Mal gewaschen und in 200 µl WIMK resuspendiert. Je nach Versuch wurde nach Splitten des Ansatzes und Effektorexpression (2 bis 3 h) ABA oder Puffer zugegeben und über Nacht (12 bis 16 h) bei 22 bis 23°C und Schütteln mit 30-50 rpm bis zur weiteren Verwendung inkubiert. Bei mikroskopischen Analysen fluoreszierender Proteine wurden die Protoplasten im Dunkeln inkubiert.

PEG-Lösung

200 mM CaCl₂
40 % PEG 4000
0,5 % MES-KOH (w/v; pH=5,8)
sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

ABA-Stammlösung

10 mM 2-*cis*-4-*trans*(+)-Abscisinsäure
(Lomon Bio Technology, China)
in 10 mM MES (pH 7,0 bis 7,5)
Verdünnung mit WIMK

Messung der GUS-Aktivität

Die GUS-Aktivität wurde nach Versetzen von 75 µl Protoplastenlösung mit demselben Volumen an 2x MUG-Lösung (0,4 mM in CCLR) fluorimetrisch bestimmt (Jefferson et al., 1987; Luehrsen et al., 1992). Die bei der Spaltung von MUG durch β-Glucuronidase entstehende Fluoreszenz (als mRFU/s, *relative fluorescence units*) wurde bei 22°C in einer Kinetik über 8 min (Filter: Anregung 360 nm, Emission 465 nm) vermessen (HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader, Perkin Elmer).

CCLR-Lysepuffer

25 mM Tris-Phosphatpuffer (pH 7,8)
2 mM DTT
2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraacetat (DCTA)
10% Glycerin (v/v)
Lagerung bei -20 °C,
bei Bedarf Zugabe von 1% Triton X-100 (v/v)

Messung der Photinus pyralis Luciferase-Aktivität

Um die LUC-Aktivität im Protoplastenextrakt zu bestimmen, wurde die Methode nach Luehrsen et al. (1992) angewandt, wobei die Lichtemission durch die Anwesenheit von Coenzym A im Puffer über einen längeren Zeitraum stabil bleibt, ohne wie bei Substratpuffern ohne Coenzym A nur von kurzer Dauer (0,3 s) zu sein.

Die Luciferase-Aktivität wurde im *flash'n glow* Luminometer, Berthold in *light units* (LU) gemessen, wobei 50 µl der Lösung aus der vorhergehenden GUS-Bestimmung verwendet und je 100 µl LAR-Substratpuffer zugeführt wurden. Die Hintergrundstrahlung wurde direkt nach Injektion des Substratpuffers über 10 s gemessen, das infolge der Luciferase-Luciferin-Reaktion emittierte Licht über 20 s. Die Werte der relativen Reporterexpression ergeben sich aus LU pro s (LUC) / mRFU (GUS).

LAR

20 mM Tricine-NaOH (pH 7,8)
1,1 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
2,7 mM MgSO_4
0,1 mM Na_2EDTA
33,3 mM DTT
0,27 mM Coenzym A
0,53 mM ATP
0,47 mM D-Luciferin
(Stammlösung: 1 mM in 10 mM MES (pH 7,0) mit 0,01% Tween 80)

4.1.7. Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Agrobakterien-vermittelte stabile Transformation von Arabidopsis-Pflanzen erfolgte unter Verwendung des Agrobakterienstammes C58 pGV3101 (Van Larebeke et al., 1974). Als Ti-Plasmid diente pMP90 mit bakteriellen Resistenzmarkern gegen Rifampicin und Gentamycin (Ferrando et al., 2000; Koncz & Schell, 1986). Die Transformation von gerade noch nicht blühenden Arabidopsis-Pflanzen (Ökotyp Columbia) erfolgte nach der *Floral Dip*-Methode (Bechtold, 1993; Clough & Bent, 1972

1998). Die Agrobakterienstämme, welche das zu transformierende Plasmid mit Kanamycin-Resistenz trugen, wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (siehe Punkt 4.3.1) angezogen (ca. 400 ml pro 3 zu transformierenden Pflanzen), bei 4000 rpm 15 min bei 4°C abzentrifugiert, und das Bakterienpellet in 400 ml einer 5% Saccharose-Lösung mit 500 µl/l Silwet L-77 resuspendiert. Die Pflanzen wurden mit möglichst allen Infloreszenzen kopfüber für 3 Sekunden in diese Lösung getaucht und noch nass mit Klarsichtfolie abgedeckt, welche nach einer Nacht entfernt werden muss. Nach ausreichendem Gießen wurden die Pflanzen weiter in Phytokammern gezogen. Die Prozedur wurde zweimal nach je drei bis vier Tagen wiederholt. Positive Transformanten wurden in der nächsten Generation T1 bei einem Screen auf Kanamycin-MS-Platten isoliert und später entsprechend auf Homozygotie der Reportergene untersucht, um zwei bis drei unabhängige transgene Linien pro Konstrukt zu erhalten.

4.1.8. Mikroskopische Verfahren

Inverse Mikroskopie (In vivo imaging)

Zur Lumineszenz-Detektion auf der zellulären Ebene wurde ein inverses Mikroskop des Typs Axiovert 200 (Carl Zeiss; www.zeiss.com) verwendet, ausgestattet mit Fluor-Objektiven und verbunden mit der CCD-Kamera über ein 0,63x Objektiv. Die Keimlinge wurden in Luciferin-Lösung in kleine Kammern (50 x 20 x 2 mm) mit Deckgläsern oben und unten gelegt. Für Aufnahmen von Spaltöffnungsapparaten mit 40-facher Vergrößerung wurden die Keimblätter auf einen Objektträger mit einer dünnen Schicht medizinischen Adhäsiv-Sprays transferiert, wo erst alle Zellschichten bis auf die Epidermis entfernt wurden und dann Luciferin-Lösung aufgetropft wurde. Die Belichtungszeit bei mikroskopischen Lumineszenz-Aufnahmen betrug 20 bis 30 min.

Untersuchungen am Epifluoreszenz-Mikroskop

Zum Test der pSK-Konstrukte wurden die EGFP-Proteine transient in Arabidopsis-Protoplasten exprimiert. Die Untersuchung der ÜN inkubierten Protoplasten am Axioskop HBO 50 (Zeiss) erfolgte in der Zählkammer oder auf Objektträgern unter Nutzung eines FITC-Filtersatzes, der für GFP 480 (40) nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 (50) nm Emissionsfilter enthielt.

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

Nachweis der Reporteraktivität in Transgenen über Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde das inverse konfokale Mikroskop Fluoview FV1000 (Olympus; www.olympus.com) verwendet. Bei der inversen Mikroskopie kam der Argonlaser mit $\lambda = 488 \text{ nm}$ für das EGFP-Signal zum Einsatz. Die Vergrößerung erfolgte mit dem 40x PLABO-Objektiv (numerische Apertur 0,9 - Wasserimmersion, Working distance 0,16 mm). Die Aufnahmen wurden mit bis zu zweifacher elektronischer Vergrößerung gemacht, die Bilder mit der Fluoview FV1000 Software bearbeitet.

4.1.9. Bestimmung der Spaltöffnungsweite

Die Spaltöffnungsweite (Apertur) wurde auf der Grundlage von mikroskopischen Aufnahmen der Epidermis zu untersuchender Pflanzen ermittelt. Dazu wurde das Verhältnis Breite zu Länge der Öffnung zwischen den Schließzellen bestimmt.

4.1.10. Bestimmung von Chlorophyllgehalten

Die Bestimmung der Chlorophyllgehalte gestresster Keimlinge (siehe 4.1.3) erfolgte nach Extraktion der Pflanzenfarbstoffe mit Methanol. Dazu wurden in flüssigem Stickstoff gefrorene und bei -80°C gelagerte Keimlinge (10 bis 20 Stück pro Probe) nach Gewichtsbestimmung gründlich gemörsert und je 1 ml Methanol zugegeben. Nach 5 min auf Eis und Vortexen der Probe wurde bei 14000 rpm 4 min lang bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand nach Verdünnung mit Methanol zur Bestimmung am Photometer eingesetzt. Gemessen wurde jede Probe bei 700 nm (Trübungskontrolle, Soll $<0,01$, entsprechend zu verdünnen), 665 nm, 662 nm und 470 nm.

Die Berechnung der Gehalte erfolgte nach folgenden empirisch ermittelten Formeln:

$$\text{Chlorophyll a } [\mu\text{g/ml}] = 16,72 * E_{665} - 9,16 * E_{652}$$

$$\text{Chlorophyll b } [\mu\text{g/ml}] = 34,09 * E_{652} - 15,28 * E_{665}$$

$$\text{Gesamtcarotinoide } [\mu\text{g/ml}] = (1000 * E_{470} - 1,63 * \text{Chlorophyll a} - 104,96 * \text{Chlorophyll b}) / 221$$

4.1.11. ABA-Extraktion und Bestimmung der Gehalte über HPLC-MS/MS

Die Bestimmung der ABA-Gehalte erfolgte nach der Extraktion aus Keimlingen mit Methanol (Muller et al., 2002) über HPLC-MS/MS-Analyse am Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, Schweden, durch Prof. Dr. T. Moritz.

Extraktion der Abscisinsäure

Von *pAtHB6::LUC*-Keimlingen wurden nach der Stressbehandlung (24 h) und Entfernen der Samenschale die Wurzeln unter dem Binokular-Mikroskop mit einer Rasierklinge von den Sprossen abgetrennt (pro Probe 120 Wurzeln bzw. 60 Sprosse), in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Pro Ansatz wurde 1 ml Methanol (HPLC-Qualität), versetzt mit 10 pMol internem Standard [²H₆]-ABA, zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 50°C wurde 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert, dann bei 13000 rpm 4 min lang zentrifugiert und der Überstand bis zur Trockne über Vakuumzentrifugation im Dunkeln eingedampft. Bis zur weiteren Aufreinigung und Analyse wurde der eingedampfte Extrakt bei -80°C gelagert.

4.1.12. Aufreinigung eines Pflanzenextraktes aus Arabidopsis-Zellkultur

Zellsuspensionskulturen von Arabidopsis-Linien (*Ler*) wurden 7 Tage unter Dauerlicht (60 µE x m⁻² x s⁻¹) bei 22-23°C und 100 rpm in LS-Medium angezogen. Nach der Ernte über Vakuumfiltration wurde das Pellet bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Nach langsamem Auftauen ÜN bei 4°C wurden 200 g des Pellets in 100 ml bidestilliertem Wasser (pH 3,0 eingestellt mit 0,25% Ameisensäure) unter Rühren bei 4°C für 2h resuspendiert. Nach Filtration durch Stoff wurde der Extrakt bei 8000 xg für 15 min bei 4°C zentrifugiert und dieser Überstand zusätzlich über Vakuumfiltration geklärt. Je 100 ml des Extraktes wurden auf eine C₁₈-Bakerbond SPE-Säule geladen, welche vorher mit 6 ml Methanol equilibriert wurde. Die beladene Säule wurde mit 6 ml 0,25% Ameisensäure gewaschen, die Elution erfolgte mit 6 ml Methanol, welches über Vakuumzentrifugation wieder entfernt wurde. Der eingedampfte Extrakt wurde in 2 ml bidest. Wasser aufgenommen und nach pH-Einstellung von ca. 6,0 in SD-Platten zum Hefescreen eingesetzt (siehe 2.6.5.1).

LS-Medium (Linsmaier & Skoog, 1965)

supplementiert mit 3% (w/v) Saccharose, 0,5 mg/l Naphthalinessigsäure und 0,1 mg/l Kinetin (Sigma), pH 6,0.

4.2. Infrarotthermographie bei Pflanzen

4.2.1. Bestehende RNAi-Bibliothek

Für die Suche nach Arabidopsis-Mutanten, die eine veränderte Stomatareaktion auf Trockenstress bzw. osmotischen Stress zeigen, wurde eine T₂-Population von mit *inverted repeats* stabil transformierten Pflanzen verwendet. Zur Herstellung der *inverted repeats* wurde genomische Arabidopsis-DNA fragmentiert und diese bis zu 0,75 kb langen Fragmente in *hairpin*-Konstrukte umligiert. Eine vergleichbare Vorgehensweise zur Konstruktion einer RNAi-Bibliothek ist in Shirane et al. dargestellt (Shirane et al., 2004). Daraus wurden über PCR dimere *inverted repeats* amplifiziert und über BamHI in die Ascl-Kassette eines pSK Ascl-Vektors hinter den 35S-Promotor kloniert. Diese Ascl-Kassette wurde in den binären Vektor pBI Ascl mit Kanamycin-Resistenz überführt und so die Bibliothek erstellt (nach M. Meinhard, C. Heidersberger und E. Grill, unveröffentlicht; siehe Abb. 4.3). Die pBI-Konstrukte wurden anschließend in Agrobakterien eingebracht (siehe 4.3.3) und über die *Floral Dip*-Methode in Arabidopsis-Pflanzen transformiert (siehe Punkt 4.1.7).

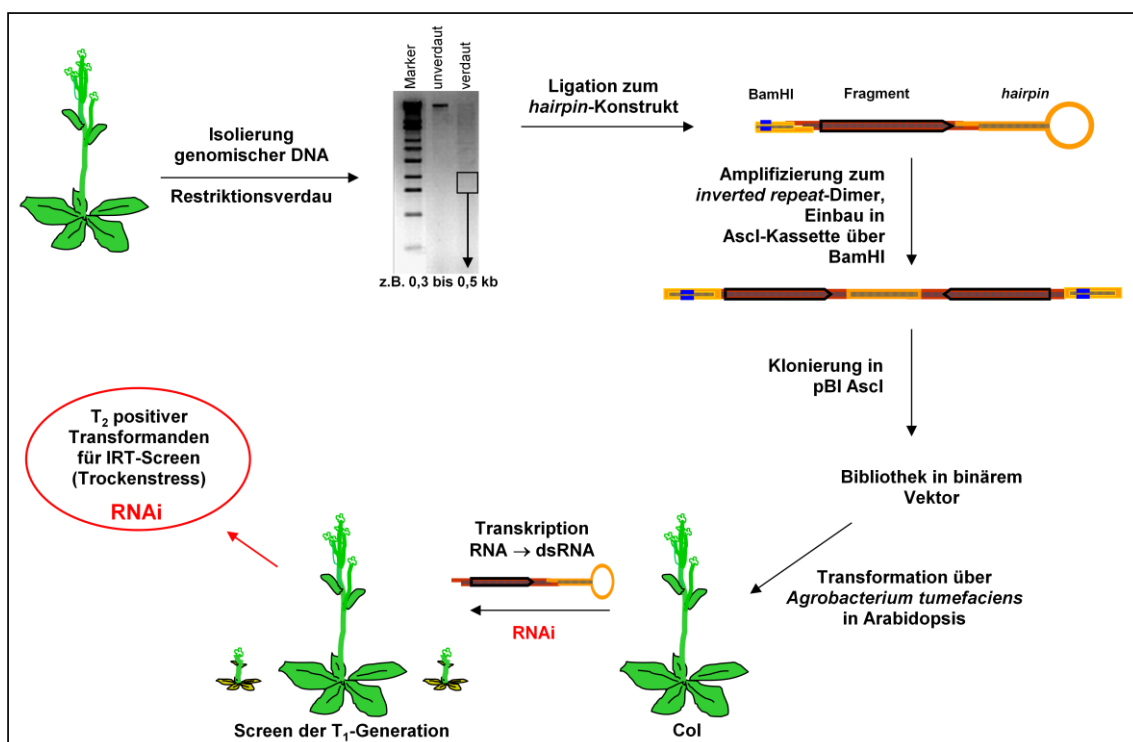


Abb. 4.3: Übersicht über das Prinzip der RNAi-Bibliothek in *Arabidopsis thaliana*.

Dargestellt ist das Konstruktionsprinzip der zur Verfügung gestellten RNAi-Bibliothek. Aus genomischer *random*-Sau3AI-verdauter DNA wurden unter Einfügen einer BamHI-Schnittstelle *hairpin*-Konstrukte aus den DNA-Fragmenten erstellt und diese später, als *inverted repeats* im pSK Ascl mit 35S-Promotor und Nos-Terminator vorliegend, über Ascl in den binären pBI Ascl-Vektor (siehe Abb. 2.21) kloniert.

4.2.2. Infrarotthermographie

Die Infrarotthermographie erfolgte an Pflanzen (Generation T₂ der in 4.2.1 beschriebenen Bibliothek), die 8 bis 10 Tage gut gewässert (Ψ der Erde bei ca. -0,3 MPa) kultiviert wurden. Diese wurden dann entweder Mannit-Stress von -0,6 MPa für bis zu 9 h ausgesetzt (bei 3 h betrug das osmotische Potential Ψ der Erde -0,45 MPa), oder Trockenstress für 2 bis 3 Tage bis das osmotische Potential der Erde Ψ -0,6 MPa betrug. Nach dem Stress wurden die Kontrollen (*abi1-1*, *Ler*, *aba2-1*, *Col*) sowie die RNAi-Pflanzen mit Hilfe der VarioCAM® head HiRes 384 von JENOPTIK Laser, Optik, Systeme GmbH/InfraTec GmbH, Dresden gescreent. Die Messung erfolgte mit der Software IRBIS® remote, die Auswertung mit Irbis® 2-2. Der Emissionsgrad ϵ für die Blattoberfläche von Arabidopsis-Pflanzen wurde empirisch durch Vergleich der tatsächlichen Temperatur mit der über IRT gemessenen ermittelt, er beträgt 0,98.

Technische Gerätedaten

Spektralbereich (LWIR): 7,5 bis 14 μm

Temperaturaufösung bei 30°C: < 0,08 K

Aufnahmeverfahren, Bildformat: *Focal Plane Array*, 384 x 288 (Matrixanordnung von Detektorelementen ohne mechanische Ablenkeinheiten)

(*Resolution Enhancement* 768 x 576)

Detektor: ungekühltes Mikrobolometer ($\Delta T \rightarrow \Delta R \rightarrow$ elektrisches Signal)

Normalobjektiv: 1,0/25 mm (30 x 23)° aus Germanium, 8-fach digitaler Zoom

Zu Kontrollzwecken wurden im Vorfeld (Stomataöffnung) bzw. bei der Infrarotthermographie bereits beschriebene ABA-hypersensitive bzw. ABA-insensitive Arabidopsis-Mutanten verwendet (siehe Tab. 3.1).

<i>Mutation/ Transgene</i>	<i>Charakterisierung</i>
<i>abi1-1</i>	Ökotyp <i>Ler</i> , ABA-insensitiv; ABI1 ist eine PP2C aus der Subgruppe A, ABA-induzierte Prozesse wie Schließen der Spaltöffnungen bleiben aus, der Phänotyp ist durch exogene ABA nicht aufzuheben.
<i>abi2-1</i>	Ökotyp <i>Ler</i> , ABA-insensitiv; ABI2 ist ebenfalls eine PP2C aus Subgruppe A und verhält sich hinsichtlich ABA-induzierter Prozesse ähnlich wie <i>abi1-1</i> .
<i>aba2-1</i>	Ökotyp <i>Col</i> , ABA-defizient; ABA2 katalysiert die Umwandlung von Xanthoxin zu Abscisinaldehyd in der ABA-Biosynthese, der ABA-Gehalt beträgt daher in der Mutante nur ca. 20% des Gehalts vom Wildtyp, bei Stress steigt er nur um einen Faktor von 2 an, der Phänotyp lässt sich durch exogene ABA aufheben.
<i>IDA::LUC</i>	IDA ist die Abkürzung für folgende Kreuzung: <i>abi1-1</i> (insensitiv) x <i>aba2-1</i> (defizient) x pRD29A::LUC; der RD29A-Promoter mit nur einem ABRE und vier DREs wird neben ABA vor allem durch Trockenstress und Kälte induziert und ist dem Luciferase-Reportergen vorgeschaltet; diese Kreuzung kann zur Untersuchung der ABA-unabhängigen DRE-Signalwegaktivierung bei osmotischem Stress verwendet werden, da in diesen Pflanzen aufgrund der Defizienz und Insensitivität die ABA-Aktivierung des Promotors ausfällt.

Mutation	Charakterisierung
<i>sos1-1</i>	Ökotyp Col <i>gl1-1</i> , hypersensitiv auf Salz; SOS1 ist ein H ⁺ /Na ⁺ -Antiporter im Plasmalemma, der Natriumionen aus der Zelle schleust, er wird durch den SOS2-SOS3-Komplex aktiviert, bei der Mutante ist der Na ⁺ -Efflux gestört; die <i>sos1-1</i> Mutante wurde aus mutagenisierten rezessiven <i>gl1-1</i> Spontanmutanten isoliert, GL1 ist ein an der Trichomausbildung beteiligter MYB-Transkriptionsfaktor.
<i>abh1-1</i>	Ökotyp RLD, ABA-hypersensitiv; ABH1 ist ein mRNA-CAP bindendes Protein (siehe 1.1.2.2)
<i>gca2-1</i>	Ökotyp Ler, die <i>gca2-1</i> Mutation (<i>growth control exerted by ABA</i>) ist eine rezessive Mutation in der 5'-UTR des Gens At4g04740 (CPK23), die ABA-Insensitivität bei Wurzelwachstum, Stomataregulation und Keimung hervorruft. Die CPK23-Transkriptmenge ist zweifach im Vergleich zum WT.
<i>gca2-2</i>	Ökotyp Ler, die <i>gca2-2</i> Mutation ist eine T-DNA-Insertion im 1. Exon des oben beschriebenen Gens; die Pflanzen zeigen ABA-Hypersensitivität, was Keimung und Stomataschluss betrifft, vollständiges CPK23-Transkript wird in der Mutante nicht gebildet.

Tab. 3.1: Auflistung verwendeter, zum Teil in der Literatur beschriebener Mutanten.

Über die IRT isolierte Mutanten wurden amplifiziert, außerdem wurde nach DNA-Isolation ermittelt, welche Fragmente genomischer DNA über den pBI121 *Ascl*-Vektor eingebracht wurden. Über PCR erhaltene Fragmente wurden sequenziert und über BLAST-Suche die betreffenden Gene ermittelt. Verwendete Primer, die an eingebrachte Sequenzen zwischen *right border* und *left border* des pBI binden bzw. die *NptII* (Kanamycin-Resistenz) amplifizieren sollten, sind im Anhang 5.1. aufgeführt.

4.2.3. Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Genomische Pflanzen-DNA wurde über die CTAB-Methode isoliert (Rogers & Bendich, 1994). Um die Zellwände aufzubrechen und das Pflanzenmaterial (Blätter bzw. Keimlinge) zu homogenisieren, wurde dieses zunächst in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Anschließend wurden 300 µl auf 65°C vorgewärmtes 2x CTAB zugegeben und gut gemischt. Nach Inkubation bei 65°C für 1 h und anschließendem Abkühlen wurden 300 µl Chloroform zur Entfernung von Proteinen und Chlorophyllen aus der CTAB-Phase zugegeben, gevortext und 5 min lang abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 300 µl Isopropanol (-20°C) zugegeben. Nach der 10-minütigen Fällung des CTAB-DNA-Komplexes wurde bei 14000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet bei RT für 30 min getrocknet und in 50 µl 0,1x TE mit 0,05% RNase aufgenommen, 15 min bei 37°C suspendiert und nach weiteren 15 min bei 65°C zur PCR eingesetzt.

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. *Escherichia coli*-Stämme und ihre Kultivierung

Stamm	Genotyp	Resistenz	#	Quelle
DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	-	62	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Tetracyclin	120	Stratagene (Heidelberg)
M15 pREP4	<i>abgeleitet aus K12-Stamm, NalS strS rifS thi- lac- ara- gal+ mtl- F- recA+ uvr+ lon+ [pREP4 KanR],</i>	Kanamycin	3343	Qiagen (Hilden)
BL21 (DE3)	<i>F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal λ(DE3),</i>	-	2968	Novagen (Merck, Darmstadt)
Rosetta (DE3) pLysS	<i>F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE (CamR)</i>	Chloramphenicol	2470	Novagen (Merck, Darmstadt)
Rosetta-gami B(DE3)pLysS	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (CamR, KanR, TetR)</i>	Chloramphenicol Kanamycin Tetracyclin	2468	Novagen (Merck, Darmstadt)
ArcticExpress RIL	<i>F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr] [argU ileY leuW Strr]</i>	Gentamycin	2471	Stratagene (Heidelberg)

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten jeweils bei 37°C. Zur Selektion auf Transformanten wurden dem Nährmedium entsprechende Antibiotika zugesetzt:

Antibiotikum	Konzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	50-100 (bzw. 180)	100, in sterilem H ₂ O
Chloramphenicol	34	68, in 100% Ethanol
Gentamycin	25	25, in sterilem H ₂ O
Kanamycin	25-50	50, in sterilem H ₂ O
Rifampicin	25	25, in 100% Ethanol
Tetracyclin	25	50, in sterilem H ₂ O

LB-Medium (Luria-Bertani)

5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l Pepton
 10 g/l NaCl
 15 g/l Agar (nur Festmedium)
 pH 7,0 (NaOH); autoklavieren, Antibiotika-Zugabe nach Abkühlen auf ca. 60°C

4.3.2. Herstellung chemisch und elektro-kompetenter Zellen

Chemisch kompetente Zellen

Eine 250 ml-Kultur von *Escherichia coli*-Zellen wurde in Medium A bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis (10 min) wurden die Zellen 15 min bei 4000 rpm (2500 xg) und 4°C abzentrifugiert und in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. Nach einer zweiten Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert und in 10 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 0,7 ml DMSO zugesetzt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Medium A

20 g/l Pepton
5 g/l Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

TB-Medium

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

Elektro-kompetente Agrobakterien-Zellen

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen erfolgte bei 28°C in LB-Medium mit Rifampicin. Eine 500 ml-ÜN-Kultur des Stammes pGV3101 wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 zuerst auf Eis abgekühlt, dann 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 ml eiskaltem mQ-Wasser gewaschen und erneut 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurde das Pellet in 20 ml 10% (v/v) Glycerin (steril) resuspendiert und erneut bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 3 ml Glycerin aufgenommen und als Aliquots von 250 µl nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

4.3.3. Transformation kompetenter Mikroorganismen mit Plasmid-DNA

Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten E. coli-Zellen

Vor der Transformation wurden die bei -80°C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut, zu 10 µl des Transformationsansatzes (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA in mQ-H₂O bzw. bei Cotransformation Plasmid-DNA-Gemisch) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42°C im Wasserbad, danach wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 400 µl LB-Medium zugegeben. Nach einer

Inkubation von 1,5 h unter Schütteln bei 37°C wurden die transformierten Zellen auf LB-Platten, die entsprechende Antibiotika enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Transformation elektrokompenter Mikroorganismen über Elektroporation

Zur Elektroporation wurden ca. 200 ng DNA in 4 µl Wasser oder salzarmen Puffern in der Elektroporationsküvette vorgelegt und auf Eis gekühlt. Von der auf Eis aufgetauten elektrokompenten Agrobaktériensuspension wurden 40 µl zur DNA zugegeben und der ganze Ansatz gemischt. Bei einem Abstand der Küvettenelektroden von 0,2 cm wurden folgende Elektroporationsparameter eingestellt: V = 2,0 kV, C = 25 µFD, R = 700 Ω, t = 17,5 ms. Nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, gemischt und in einem Reaktionsgefäß 2 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurde auf LB-Platten mit entsprechender Selektion ausplattiert und diese bei 30°C für 2 bis 3 Tage inkubiert.

4.3.4. Methoden der DNA-Isolation

Plasmid-Minipräparation aus E. coli durch alkalische Lyse

Zur Isolierung von Plasmid-DNA über alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) wurde jeweils von einer Einzelkolonie eine 5 ml-ÜN-Kultur in flüssigem LB angezogen und davon 4 ml für 5 min bei 4000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl GTE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer wurde bei RT 5 min lysiert und danach zur Neutralisation und Fällung von genomischer DNA und Proteinen 250 µl 3 M Kaliumacetat, pH 4,8, zugegeben. Nach Zentrifugation für 15 min bei 16000 xg und 4°C wurde der Überstand mit demselben Volumen vorgekühltem Isopropanol versetzt und für 20 min bei -20°C die Plasmid-DNA gefällt. Anschließend wurde 15 min lang bei 16000 xg und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach weiterer Zentrifugation für 5 min bei RT getrocknet. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 30-50 µl sterilem mQ-Wasser oder 0,1x TE-Puffer mit 25 µg/ml RNase.

GTE-Puffer

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

0,1 x TE-Puffer

1 mM Tris-HCl (pH 8,0)
0,1 mM EDTA

Lyse-Puffer

0,2 M NaOH
1 % SDS

Neutralisationspuffer

3 M Kaliumacetat (pH 4,8 bis 5,2)

Plasmid-Midipräparation aus E. coli mit Hilfe von Kit-Systemen

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA für Klonierung, Transformation, Transfektion und Sequenzierung wurde die DNA aus einer 100 ml-ÜN-Kultur von Zellen mit dem JetStar[®]-MIDI Kit (GENOMED, Löhne) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA-Konzentration wurde über ein Agarosegel bestimmt.

4.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Anhand unterschiedlicher PCR-Techniken können DNA-Fragmente mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* exponentiell vermehrt werden. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zum Klonieren erfolgte unter Verwendung von Polymerasen mit Korrekturlesefunktion (*proof reading*) (VentR[®]-DNA-Polymerase, High Fidelity, NEB), um die Anzahl fehlerhaft eingebauter Nukleotide möglichst gering zu halten. Eventuell nachfolgende Restriktionsspaltungen wurden im Anschluss an eine DNA-Aufreinigung über Gelextraktion durchgeführt (siehe Punkt 4.3.6). PCRs zur Überprüfung von Transformanden-DNA wurden mit der GoTaq[®]-Polymerase (Promega) durchgeführt. Ein typischer PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Komponente	Endkonzentration	Volumen [μ l]
DNA- <i>template</i>	1 - 20 ng	1
Puffer (enthält 25 mM MgCl ₂): 10x ThermoPol für VentR [®] -Polymerase 5x GoTaq [®] Green für GoTaq [®] -Polymerase	1x (2,5 mM MgCl ₂)	2 4
dNTP-Mix (10 mM)	1 mM	2
Primer forward (100 μ M)	1 μ M	0,2
Primer reverse (100 μ M)	1 μ M	0,2
Polymerase: VentR [®] (2 U/ μ l) GoTaq [®] (5 U/ μ l)	0,5 U	0,25 0,1
mQ-H ₂ O	Auffüllen auf 20 μ l	

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

<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Vorgang</i>	<i>Zyklusanzahl</i>
2 min	95 °C	Initialdenaturierung	1
1 min	95 °C	Denaturierung	30-35***
1,5 min*	50-65°C	Primer- <i>Annealing</i>	
2 min**	72 °C	Elongation	
7 min	72 °C	finale Elongation	1

* Die Annealingtemperatur für einen Primer lässt sich aufgrund seines GC-Gehaltes (Anteil der organischen Basen Guanin und Cytosin in Prozent) und seiner Länge in Basenpaaren (PL) näherungsweise durch folgende Formel berechnen: $T_m = 64,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC}\% - 650 / \text{Länge des Primers}$

** Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des Amplifikats: es gilt ca. 1 min / kb

*** Primer-abhängige Variation

4.3.6. Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung

Die Analyse der PCR- oder Restriktionsprodukte bzw. isolierter Plasmid-DNA erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Molekülgröße wurde bei einer Agarose-Konzentration von 0,8 - 1,0% (w/v) in 1x TAE als Elektrophorese-Puffer erreicht. Für die Visualisierung der DNA unter UV-Licht ($\lambda=302 \text{ nm}$) wurde den Gelen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V und 400 mA in der Gelkammer. Als Größenstandards diente entweder mit HindIII verdaute λ -DNA oder verschiedene DNA-Marker (siehe unten). Vor dem Probenauftrag wurden die DNA-Proben mit Gelladepuffer (Endkonzentration 1x, MBI Fermentas) versetzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 5 μl Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml zugesetzt und das Gel gegossen.

EtBr-Stammlösung

10 g/l Ethidiumbromid in mQ-H₂O

Gelladepuffer 6x

0,09 % Bromphenolblau (w/v)
0,09 % Xylene Cyanol FF (w/v)
60 mM EDTA

50x TAE

2 M TrisBase
5,71 % (v/v) Essigsäure
50 mM EDTA (pH 8,0)

Größenstandards (MBI Fermentas)

1 kb DNA-Ladder
100 bp Ladder
100 bp Ladder PLUS

DNA-Konzentrationsbestimmung mittels λ -DNA

Um die Konzentration von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurde der λ -HindIII-Marker verwendet. Durch den Intensitätsvergleich der Markerbanden mit den Probenbanden wurde die Menge der jeweiligen DNA auf dem Gel bestimmt. Durch Einbeziehen des Volumens an pipettierter DNA ergab sich die Konzentration der zu bestimmenden Probe.

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

Aufreinigung von DNA über Gelextraktion

Damit nachfolgende Reaktionen wie Ligationen und Sequenzierungen möglichst nicht durch Verunreinigungen gestört wurden, wurden PCR-Produkte sowie restriktionsverdauten Fragmente über Gelextraktion gereinigt. Hierfür wurde nach der Agarose-Gelelektrophorese die DNA mittels Skalpell unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 316$ nm) aus dem Gel geschnitten und die DNA mit Hilfe eines Gelextraktionskits (Peqlab Gel Extraktions Kit, Peqlab®) aus dem Gel isoliert. Die Elution der gelextrahierten DNA von der Reinigungssäule erfolgte entweder mit mQ-Wasser oder low EDTA-TE-Puffer (10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5).

4.3.7. Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für das Schneiden von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen von New England BioLabs (NEB) oder MBI Fermentas in den vom Hersteller vorgeschlagenen Puffern (1x Endkonzentration) verwendet. Zum Verdau von Vektoren zur Klonierung wurden 0,1 - 0,5 μ g DNA eingesetzt, zur Überprüfung von einligierten Fragmenten 0,5 - 1,0 μ g. Beim Verdau von PCR-Amplifikaten wurde der gesamte, vorher über Gelextraktion gereinigte PCR-Ansatz verwendet. Jeder Ansatz enthielt 2U Restriktionsenzym pro μ g Plasmid-DNA. Bei Doppelverdau ÜN wurde ein Puffer gewählt, der für beide Enzyme mindestens 50% Enzymaktivität gewährleistete, dementsprechend wurde dann die doppelte Menge Enzym verwendet. Die Inkubation erfolgte nach Angaben des Herstellers für die jeweiligen Enzyme 3h bis ÜN bei 37°C. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde über Agarosegele geprüft (siehe 2.3.7).

Dephosphorylierung verdauter DNA

Um die Religation linearisierter DNA-Fragmente einzuschränken, wurden die entsprechenden komplementären Enden dephosphoryliert. Ein typischer Ansatz enthielt 1-2 µg linearisierte DNA, 1-2 U Alkalische Phosphatase (AP, alkaline phosphatase, NEB) sowie 1x Puffer in einem Gesamtvolumen von 15 µl. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37°C für bis zu 30 min, anschließend wurde das Enzym 20 min lang bei 65°C hitzeinaktiviert.

4.3.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisiertem Vektor wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:5 eingesetzt, je nach Fragmentlänge. Die Ligation erfolgte in einem Ansatz mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) in dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer in einem Volumen von 10 µl. Der Ansatz wurde 1 h bei 22°C inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 2.3.3).

4.3.9. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von durch Restriktionsverdau bzw. über PCR als positiv geprüfter Plasmid-DNA aus Transformanden erfolgte über Eurofins MWG Operon, Ebersberg (50-100 ng/µl, Primerkonzentration 2 µM) oder GATC Biotech, Konstanz (30-100 ng/µl, Primerkonzentration 10 µM). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über das Alignment-Tool der VectorNTI-Software (VectorNTI Advance™ 9.1.0, Invitrogen).

4.3.10. Klonierungsstrategien

Im Folgenden werden die wichtigsten im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und etablierten Klonierungsstrategien kurz dargestellt (mit Ausnahme der EGFP-Konstrukte unter Punkt 2.1.5 und der MLP-*Yeast Two-Hybrid* Konstrukte unter Punkt 4.6.2), eine genaue Auflistung der verwendeten Primer, Ausgangskonstrukte und klonierter Konstrukte findet sich im Anhang 5.1. und 5.2.

Ausgehend vom Qiagen-Expressionssystem pQE-30 (His-*tag* N-terminal) bzw. pQE-70 (His-*tag* C-terminal) in M15 [pREP4] bzw. XL1-blue Zellen (Induktion mit IPTG) wurden die codierenden Sequenzen der Proteinphosphatase 2C ABI2, verschiedener RCARs (RCAR1, RCAR3, RCAR7, RCAR11) sowie von RCAR-Homologen aus Birke und

Erdbeere (Bet v 1a, Fra a 1-3) in etliche andere Expressionsvektoren kloniert und dabei zum Teil verkürzt, um eine gesteigerte Ausbeute und Reinheit der Expression zu erreichen, damit sämtliche biochemischen Analysen sowie die Kristallisation möglich wurden. Die Transformation erfolgte zuerst in DH5 α -Zellen, nach dem Transformanden-Screen und der Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA in entsprechende Expressionsstämme transformiert und in die Stammsammlung des Labors integriert (Lagerung einer ÜN-Kultur im 1:1-Gemisch mit 87% (v/v) Glycerin bei -80°C).

Klonierung in pRSET A His6 TEV7-Vektoren (#2182)

Dieser Vektor wurde von Prof. Dr. M. Groll, Lehrstuhl für Biochemie, TU München zur Verfügung gestellt; Vorteil des pRSET-TEV-Vektors ist die eingebaute Schnittstelle für die TEV-Protease zur Entfernung des N-terminalen His-tags vor der Kristallisation.

Konstrukte	Ausgangs-plasmid	Primer #	Schnittstellen PCR- Produkt	Verdau	Expression-stamm
ABI2 Volllänge dN1 ABI2 dN2 ABI2 dN3 ABI2	pQE-70 ABI2 (#2023)	rev: 761 for: 762 763 764 765	BgIII, EcoRI	BamHI, EcoRI	BL21 (DE3) (#2968), M15 [pREP4] (#3343)
RCAR1 Volllänge dN RCAR1	pQE-30 RCAR1 (#1168)	rev: 758 for: 759 760	BgIII, EcoRI	BamHI, EcoRI	BL21 (DE3), M15 [pREP4]

Klonierung in pTYB2-Vektor (#2275) zur Expression mit N- und C-terminalen Markierungen

Der Vorteil des Impact™-CN-Systems (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) von NEB ist die Fusion des Zielproteins, das bereits ein N-terminales His-tag trägt, an ein C-terminales Intein-tag, welches sich bei der Aufreinigung, durch DTT-induziert, selbst abspaltet und auf der Chitin-Säule verbleibt. Nach der ersten Aufreinigung über Chitin-Beads wäre also eine zweite über Ni-TED-Säulen möglich, was zu einem viel reineren Endprodukt führen würde.

Konstrukte	Ausgangs-plasmid	Primer #	Schnittstellen PCR- Produkt	Verdau	Expressions-stamm
ABI2 Volllänge	pRSET ABI2 (#2248)	766, 769	NdeI, XmaI	NdeI, XmaI	XL1-blue (#120)
RCAR1 Volllänge	pRSET RCAR1 (#2246)	766, 770	NdeI, XmaI	NdeI, XmaI	M15 [pREP4]

Klonierung in pET-Vektoren, C-terminale His-Markierung

pET-21a(+) mit Amp-Resistenz (#2467) und pET-24a(+) mit Kan-Resistenz (#2700).

Konstrukte	Ausgangs-plasmid	Primer #	Schnittstellen PCR- Produkt	Vektor/ Verdau	Expressions-stamm
ABI2 mit His6 Vollänge	pQE-70 ABI2	771, 772	NdeI, XhoI	pET-21a(+) NdeI, XhoI	Rosetta-gami B(DE3)pLysS (#2468)
ABI2 mit His6 dN0 dC ABI2 dN1 dC ABI2 dN2 dC ABI2	pQE-70 ABI2	rev: 796 for: 793 794 795	NdeI, XhoI	pET-21a(+) NdeI, XhoI	Rosetta (DE3) pLysS (#2470), BL21 (DE3), XL1-blue
Coexpression aller mit pET-24a(+) RCAR11 / RCAR3 / Betv1				Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3)	
Expression von dN1 dC und dN2 dC ABI2				Arctic RIL (#2471)	
ABI2 ohne His6 Vollänge	pQE-70 ABI2	771, 785	NdeI, XhoI	pET-21a(+) NdeI, XhoI	Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3)
Coexpression mit pET-24a(+) RCAR11				Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3)	
RCAR1 Vollänge	pQE-30 RCAR1	773, 774	NdeI, NotI	pET-21a(+) NdeI, NotI	Rosetta-gami B(DE3)pLysS
RCAR11 Vollänge	pQE-70 RCAR11 (#2258)	775, 776	NdeI, XhoI	pET-21a(+) NdeI, XhoI	Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3), M15 {pREP4}
RCAR11 Vollänge mit His6 ohne His6	pQE-70 RCAR11	775, 776 775, 784	NdeI, XhoI	pET-24a(+) NdeI, XhoI	Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3), Arctic RIL
Coexpression beider mit pET21a(+)- und pQE-70 ABI2-Versionen				Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3), Arctic RIL	
RCAR11 Ohne His6 dN1 dC RCAR11 dN2 dC RCAR11	pQE-70 RCAR11	789, 790 788, 790	NdeI, XhoI	pET-24a(+) NdeI, XhoI	Rosetta (DE3) pLysS (#2470), BL21 (DE3), XL1-blue
Coexpression mit pET21a(+) ABI2-Versionen				Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3), Arctic RIL	
RCAR3 ohne His6	pQE-30 RCAR3 (#1136)	791, 792	NdeI, XhoI	pET-24a(+) NdeI, XhoI	Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3), XL1-blue
Coexpression mit pET21a(+) ABI2-Versionen				Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3)	
Bet v 1a ohne His6	pQE-70 Bet v 1a (#2692)	786, 787	NdeI, XhoI	pET-24a(+) NdeI, XhoI	Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3)
Coexpression mit pET21a(+) ABI2-Versionen				Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3)	

Material und Methoden

Klonierung in pQE-30 mit TEV-Schnittstelle (#2702)

Vektor ebenfalls zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Groll, Lehrstuhl für Biochemie, TU München.

Konstrukte	Ausgangs-plasmid	Primer #	Schnittstellen PCR- Produkt	Vektor/ Verdau	Expressions-stamm
RCAR11 Volllänge dN1 dC dN2 dC	pQE-70 RCAR11	782, 783 777, 779 778, 779	BamHI, PstI	pQE-30 His6-TEV BamHI, PstI	Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3), M15 [pREP4]

Klonierung in pQE-70 und pQE-30

Zum einen wurden die Klonierungen bzw. Transformationen als Kontrolle und zum Vergleich der Expression durchgeführt (ABI2 und RCARs), zum anderen für eine Expression der Fra a1-3 Proteine im etablierten Qiagen-System.

Konstrukte	Ausgangs-plasmid	Primer #	Schnittstellen PCR- Produkt	Vektor/ Verdau	Expressions-stamm
RCAR11 Volllänge dN2 dC	pQE-70 RCAR11	782, 783 778, 779	BamHI, PstI	pQE-30 BamHI, PstI	Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3), M15 [pREP4]
RCAR7	genomische DNA, Col	821, 822	SphI, BglII	pQE-70 SphI, BglII	M15 [pREP4]
Fra a1	cDNA aus <i>Fragaria x ananassa*</i>	540, 541	SphI, BamHI	pQE-70 SphI, BamHI	M15 [pREP4]
Fra a2		544, 545	SphI, SphI	pQE-70 SphI, SphI	
Fra a3		548, 549	SphI, BamHI	pQE-70 SphI, BamHI	

*Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Schwab, Lehrstuhl für Biotechnologie der Naturstoffe, TU München.

Zur Kontrolle wurden die leeren Vektoren pQE-30, pQE-30 His6 TEV, pQE-70, pET-21a(+) und pET-24a(+) ohne Insert in sämtliche passende Zellen transformiert und später exprimiert.

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Proteinexpression

Die Expression der Proteine erfolgte nach Animpfen einer 400 ml-Hauptkultur mit 10 ml einer ÜN-Vorkultur aus bis zu 200 Einzelkolonien, das LB-Medium wurde jeweils mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Hauptkultur wurde bei 200 rpm und 37°C geschüttelt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 wurde IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid) bis auf eine Endkonzentration von 0,75 mM zugegeben. Je nach Protein bzw. Expressionssystem wurde 2 h, 4 h, 6 h oder ÜN bei 37°C oder 18°C exprimiert. Für die Coexpression von Phosphatase ABI2 und RCAR bzw. Bet v 1a wurde zusätzlich noch 0,5 bis 1,0 mM S(+)-ABA zum Medium gegeben, um eine Stabilisierung des RCAR-PP2C-Komplexes zu erreichen und damit eine PP2C-Inaktivierung, da die Phosphatase sich einzeln nur schwer und in geringsten Mengen exprimieren ließ. Die 400 ml-Hauptkulturen wurden nach der Expressionszeit schnell auf 4°C abgekühlt, um den Metabolismus der Bakterien und Proteaseaktion zu reduzieren, und bei 4000 rpm 20 min lang bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden entweder frisch zur Lyse eingesetzt oder bei -20°C ÜN gelagert.

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurden Faktoren wie Temperatur, Expressionsstamm, Medium-Zusammensetzung, IPTG-Konzentration und Dauer der Expression verändert. Es wurden jeweils Rohextrakte bzw. Pellets von 1 ml-Hauptkultur vor und nach Lyse mit Lysozym über SDS-PAGE untersucht (siehe 2.4.3).

IPTG-Lösung

Stammlösung 1 M in mQ-Wasser

S(+)-ABA

Stammlösung 1 M in 100% Ethanol

4.4.2. Aufreinigung und Dialyse

Um für die Durchführung biochemischer Methoden möglichst aktives Protein zu erhalten, war es nötig, die Proteine zuerst löslich zu exprimieren, so dass eine native Aufreinigung möglich war. Bei einer denaturierenden Aufarbeitung müsste vor den Analysen das Protein rückgefaltet werden, was sich für eine anschließende Kristallisation als störend auswirken könnte.

Zell-Lyse

Für den Zellaufschluss wurde pro g Zellfrischgewicht 1 ml Lysepuffer verwendet, die sedimentierten Zellen wurden darin auf Eis resuspendiert und Lysozym auf eine

Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Nach einer Lyse von 30 min wurden die Zellen per Ultraschall 6 x 10 s (5 Zyklen) aufgeschlossen und anschließend 30 min bei 30000 xg und 4°C zentrifugiert, das erhaltene klare Lysat wurde weiter zur Aufreinigung verwendet.

Aufreinigung über Ni-TED

Zur Aufreinigung der rekombinanten 6x Histidin-markierten Proteine wurden gepackte Protino® Ni-TED 2000 Säulen der Firma Macherey-Nagel verwendet, die Aufreinigung beruht auf dem Prinzip der Immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Proteinbindung an der mit Ni²⁺-geladenen Silica-Säule basiert auf der Interaktion zwischen Histidinen der His-Markierung und den immobilisierten Ni²⁺-Ionen über den Metall-Chelat-Bildner TED (Triscarboxymethylethylendiamin). TED besetzt fünf der sechs Koordinationsstellen, eine ist damit frei für Proteinbindung über Stickstoffatome der Histidine.

Die Säulen wurden vor dem Laden der Lysate mit 4 ml Equilibrierungspuffer behandelt, nach dem Laden des Lysats wurde mit 8 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend das gereinigte Protein mit 1,5 bis 3 ml Elutionspuffer eluiert. Bei Aufreinigung von Coexpressionen wurde zur Stabilisierung des Komplexes zu sämtlichen Puffern 10 µM S(+)-ABA zugegeben. Teilweise wurden dem Waschpuffer schon steigende Konzentrationen (5-250 mM) an Imidazol zugesetzt, um eine bessere Verdrängung unspezifischer Begleitproteine zu gewährleisten und damit ein reineres rekombinantes Protein zu erhalten.

Dialyse

Die Dialyse erfolgte in speziellen Dialysekammern (am Lehrstuhl hergestellt) mit Membranen von 14 kD cut-off (VISKING® dialysis tubing 36/32, Durchmesser 27 mm, Serva) unter Rühren der Lösung bei 4°C ÜN, der Puffer wurde dreimal gewechselt. Zur Vorbereitung wurden die Dialyseschläuche in 1 mM EDTA und 5 mM Tris/HCl bei pH 8,0 20 min in der Mikrowelle bei 540 W erhitzt. Die Lagerung erfolgte in der gleichen Lösung bei 4°C. Für spezielle Experimente wie Kristallisation wurden andere Dialysepuffer verwendet, welche noch explizit beschrieben werden.

Lyse- / Equilibrierungspuffer

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
5 mM Imidazol
pH 8,0 (NaOH)

Lysozym-Stammlösung

10 mg/ml
in mQ-H₂O

Waschpuffer

50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 pH 8,0 (NaOH)

Elutionspuffer

50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 250 mM Imidazol
 pH 8,0 (NaOH)

Dialysepuffer

0,1 M Tris/HCl
 0,1 M NaCl
 2 mM DTT
 pH 7,9 (NaOH)

4.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts wurde die Methode der diskontinuierlichen, denaturierenden Elektrophorese nach Laemmli (1970) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in Elektrophorese-Einheiten (Mini-Protean II, Bio-Rad) mit einem 15%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel durchgeführt. Vor dem Probenauftrag auf das polymerisierte Gel wurde Laemmli-Ladepuffer zur Probe gegeben und für 5 min bei 95°C erhitzt. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 200 V und 60 mA. Für die native, nicht denaturierende Gelelektrophorese ohne SDS und DTT in Gel und Probe (Proben nicht erhitzt) wurde ein Laufpuffer ohne SDS verwendet, alles andere erfolgte wie oben beschrieben.

<i>Stammlösungen</i>	<i>15% Trenngel</i>	<i>4% Sammelgel</i>
Acrylamidlösung	40 ml	10,4 ml
mQ-H ₂ O	18,4 ml	61,3 ml
Trenngelpuffer	20 ml	-
Sammelgelpuffer	-	6,8 ml
10% SDS (w/v)	0,8 ml	0,8 ml
Gele		
Stammlösungen	7,95 ml	3,98 ml
TEMED	4 µl	4 µl
APS	40 µl	20 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	8 ml (2 Gele)	4 ml (2 Gele)

Material und Methoden

Acrylamidlösung

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

Trenngelbuffer

2 M Tris/HCl (pH 8,8)

Sammelgelbuffer

1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)

TEMED - Vernetzer

Unverdünntes Tetramethylethylendiamin

APS-Lösung - Radikalbildner

10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)

Elektrodenlaufpuffer (1x)

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS (w/v)

5x Laemmli-Probenpuffer

0,3 M Tris/HCl, pH 6,8
10 % SDS (w/v)
30 % Glycerol (v/v)
0,1 % Bromphenolblau (w/v)
100 mM DTT

Verwendete Größenstandards (MBI Fermentas)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus

4.4.4. Silber- und Coomassie-Färbung

Silberfärbung (Blum, 1987)

Die Gele wurden zuerst 60 min in Fixierlösung zur Proteinbandenfixierung geschüttelt, danach wurde dreimal 20 min lang mit 50% Ethanol (v/v) gewaschen. Zur Vorbehandlung für 1 min dient eine Natriumthiosulfat-Lösung, welche dreimal für jeweils 20 s wieder ausgewaschen wird. Danach erfolgt die eigentliche Färbung mit Silbernitrat für 20 min unter Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit dH₂O für jeweils 20 s wird mit Entwicklerlösung entwickelt, und zwar so lang, bis die Färbung der Proteinbanden deutlich zu sehen ist (5 bis 20 min), die Farbreaktion wird mit Entfärbelösung abgestoppt, bis die CO₂-Entwicklung abgeklungen ist. Lagerung der Gele in Entfärbelösung ist möglich.

Fixierlösung

50 % Methanol (v/v)
12 % Essigsäure (v/v)
0,5 ml/l Formaldehyd (37%)

Vorbehandlung

0,2 g/l Na₂S₂O₃ x 5 H₂O

Färbelösung

2 g/l AgNO₃

Entwickler

60 g/l Na₂CO₃
4 mg/l Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
0,5 ml/l Formaldehyd (37%)

Entfärbelösung

35 % Methanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

Coomassie-Färbung (Fairbanks et al., 1971)

Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese in die Färbelösung gegeben und 1 min lang bei 400 W in der Mikrowelle behandelt. Danach wurden die Gele 5 min unter Schütteln inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend durch Entfärbelösung ersetzt und wieder 1 min bei 400W in der Mikrowelle erhitzt, nach 10- bis 30-minütigem Schütteln mit Papier (zur Aufnahme des Farbstoffs) war der Hintergrund entfärbt und die mit Coomassie angefärbten Proteinbanden deutlich zu erkennen. Die Gellagerung ist in dH₂O möglich.

Färbelösung

25 % Isopropanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)
0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v)

Entfärbelösung

10 % Essigsäure (v/v)

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung im Vergleich mit definierten BSA-Konzentrationen als Standard auf dem Gel (Ramagli & Rodriguez, 1985), oder über Bradford-Assay (Bio-Rad DC-Protein-Assay) nach den Angaben des Herstellers, die Eichgeraden wurden mit BSA erstellt.

Für die Kristallisation wurde die Proteinkonzentration über die OD₂₈₀ bzw. mit einem NanoPhotometer (NanoDrop Version 7122 V1.4) bestimmt und eingestellt.

4.4.5. Western Blot

Für den *Western Blot* wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman, Schleicher&Schuell, Protran, Deutschland) über das SemiDry Blotverfahren (SemiDry Transfer Cell, Bio-Rad) transferiert. Die Membran und sechs Lagen Filterpapier (Whatman®) wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in Transferpuffer gelegt. Auf die Blotapparatur (Anode) wurden luftblasenfrei zuerst drei Lagen Filterpapier, die Membran, das Gel und abschließend wieder drei Lagen Filterpapier gelegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 25 V und 200 mA.

Elektrotransferpuffer

25 mM Tris/HCl
192 mM Glycin
20 % Methanol (v/v)
pH 8,3

4.4.6. Immunologischer Nachweis und Antikörper

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C in der Blockierungslösung inkubiert. So wurden unspezifische Bindestellen des primären Antikörpers auf der Membran abgesättigt. Anschließend wurde dreimal je 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde dann für 1 h bei RT unter Schütteln mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit 1x TBST wurde die Membran für 1 h im sekundären Antikörper geschwenkt, bevor sie abschließend dreimal 15 min mit 1x TBST gewaschen wurde.

Die Detektion beruht auf einer durch ein Antikörper-Enzym-Konjugat katalysierten Chemilumineszenzreaktion und erfolgte mit dem Pierce Super Signal West Femto Kit nach den Angaben des Herstellers Perbio Science Deutschland GmbH (Peroxid-Puffer:Luminol/Enhancer Solution 1:1). Dabei wird das Luminol von der Meerrettichperoxidase (HRP), welche als Antikörper-Enzym-Konjugat vorliegt, in seine oxidierte Form umgesetzt. Die dabei entstehende Chemilumineszenz kann mit Hilfe einer CCD-Kamera (*Charged-Coupled Device*, ORCAII ERG, Hamamatsu Photonics, <http://jp.hamamatsu.com>) nach 2 bis 10 min Inkubation im Dunkeln detektiert werden, wodurch die spezifischen Proteinbanden sichtbar werden, Bearbeitung erfolgte mit der SimplePCI Imaging Software (Version 5.0.0.1503, Compix Inc., Imaging Systems, USA).

10 x TBS

1,5 M NaCl
0,2 M Tris/HCl pH 7,5

TBST

1 x TBS
0,05 % Tween 20 (w/v)

Blockierungslösung

3 % Milchpulver in 1xTBST (w/v), gefiltert

Verwendete Antikörper

Art	Hersteller	Verdünnung in 1x TBS
Primäre Antikörper		
Rabbit anti-RCAR	Eurogentec	1:5000
Rabbit anti-His	Eurogentec	1:2000
Rabbit anti-Chitin	NEB	1:5000
Mouse anti- α -GFP	Santa Cruz	1:1000
Sekundäre Antikörper		
Goat anti-Rabbit, HRP Konjugat	Pierce	1:10000
Goat anti-Mouse, HRP Konjugat	Pierce	1:10000

4.4.7. Phosphatase-Aktivitätsassay

Prinzip

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität sämtlicher PP2Cs sowie die Regulation dieser (Inhibierung, Stimulierung) durch eine mögliche Interaktion mit RCAR-Proteinen und S(+)-ABA erfolgte über die Messung von freigesetztem fluoreszierendem 4-Methylumbelliferon. Durch die Phosphatase wird das Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) dephosphoryliert, die Menge des dabei freigesetzten Methylumbelliferons kann dann in einem Mikroplattenleser (Synergy 2, Biotek) gemessen werden. Dabei erfolgt die Anregung des Fluorophors 4-Methylumbelliferon bei einer Wellenlänge von 360 nm. Das emittierte Licht wird bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen, wobei die Intensität des Signals proportional zur Stoffmenge des entstehenden Fluorophors ist. Die enzymatische Reaktion wird im Plattenleser für 10 min gemessen, die Intensität des emittierten Lichtes wird in RFU (*Relative Fluorescence Unit*) angegeben. Die RFUs werden dann automatisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung dieser Geraden entspricht der Phosphataseaktivität und wird in mRFU/min angegeben. Durch den Einsatz eines Phosphatase-Standards ohne RCAR und ohne S(+)-ABA mit maximaler Aktivität lassen sich die Phosphataseaktivitäten relativ zueinander vergleichen.

Durchführung

Für den Assay wurde zuerst eine Präinkubation angesetzt, welche die Phosphatase enthielt und wahlweise Interaktionspartner. Diese wurde 20 min lang bei 35°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Substrat pipettiert, dabei aber Mn^{2+} erst 5 min vor Zugabe des Substrats zur Präinkubation zugemischt, das Substrat dann noch 5

Material und Methoden

min bei 35°C inkubiert. Präinkubation und 2x Substrat wurden in eine 96er Mikrotiterplatte zur Fluoreszenzbestimmung pipettiert (jeweils 45 µl + 45 µl) und vorsichtig gemischt, die Proben wurden dann sofort im auf 30°C vorgeheizten Plattenleser vermessen.

Stammlösungen

1 M MnCl₂ x 4 H₂O
1 M Tris/HCl pH 7,9
5 M NaCl
0,1 M Methylumbelliferyl-Phosphat (MUP)
1 M DTT
5 mM S(+)-ABA

8 x Puffer für die Präinkubation

1 ml Tris/HCl
0,2 ml NaCl
50 µl DTT

Präinkubation (pro 100 µl)

12,5 µl 8 x Puffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 4 mM DTT im Ansatz)
1,5 µl MnCl₂ (20 mM frisch hergestellt; 0,3 mM im Ansatz)
mQ-Wasser auf 100 µl
RCAR / Bet v 1a / Fra a1-3
Phosphatase PP2C (meist 500 ng)

2 x Substrat

0,1 M Tris/HCl pH 7,9
0,1 M NaCl
0,3 mM MnCl₂
5 mM MUP
-/+ S(+)-ABA

4.4.8. Massenspektrometrie: MALDI-TOF nach *In Gel-Digestion*

Die massenspektrometrischen Analysen wurden am Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik, Prof. Dr. B. Küster, TU München, durchgeführt.

Prinzip

Bei der *Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization* (MALDI) werden die Proteine auf einem Probenhalter in Kristalle von UV-absorbierenden sauren Molekülen (Matrix) eingebaut. Diese übertragen dabei Protonen auf die Proteine und laden sie so positiv auf. Der eigentliche Ionisierungsprozess erfolgt im Hochvakuum des

196

Massenspektrometers durch UV-Laser-Puls, der die Matrix-Proteine und damit auch die Proteinionen freisetzt. Vor Eintritt in den Flugzeitanalysator TOF (*Time of Flight*) werden die Ionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt, als interne Standards zur Kalibrierung des TOF werden Peptide des Trypsin-Selbstverdaus benutzt.

In Gel - Digestion

Zur Vorbereitung auf die *In Gel-Digestion* und anschließende MALDI-TOF-Analyse wurde eine SDS-PAGE unter veränderten Bedingungen im Vergleich zu den oben beschriebenen (siehe 2.4.3) durchgeführt. Das verwendete System war NuPAGE von Invitrogen mit folgenden Komponenten:

Gele

4-12 % Bis-Tris Gradientengel

Laufpuffer

1x MOPS mit 500 µl/l Antioxidans

Probenpuffer

4x LDS, verdünnt 1:1 mit 20 mM DTT;
verdünnt 1:2:0,5 (Probenpuffer : Probe : 5 mM Jodacetamid zur Alkylierung)

Colloidal Coomassie-Färbung

Fixierung 1 h bei RT - 2% Essigsäure in 40% Methanol
Färbung 2 h RT bzw. ÜN bei 4°C - 16% Colloidal Coomassie G250 in 20% Methanol
Entfärbung - 5% Essigsäure in 25% Methanol
Waschen - 2 x 1 h mit 25% Methanol, 1 x 1 h mit Wasser
Aufbewahrung bei 4°C in Wasser

In Gel - Digestion

- Vorbereitung der 96er Mikrotiterplatten

Von den Polypropylen-Platten (konisch, Nunc; Polystyren würde zum Verlust der Peptide führen) wurde zuerst der Boden durchbohrt (0,4 mm), dann die Platten mit folgenden Lösungen (jeweils 100 µl pro Kavität) gewaschen und nach jedem Waschschrift per Zentrifugation (Eppendorf Typ 5810) geleert.

0,1 % Ameisensäure

100 % Ethanol

0,1 % Ameisensäure

100 % Ethanol

HPLC-H₂O (Merck)

- Ausschneiden der SDS-PAGE-Banden

Da unter Keratin-freien Bedingungen gearbeitet werden muss, um die MS-Messung nicht zu beeinträchtigen, wurde zuerst der Raum mit Spülmittel, bidestilliertem Wasser und Ethanol gereinigt und das Ausschneiden der Banden hinter einer Keratin-Abschirmung (Neolab) durchgeführt. Die einzelnen Banden wurden mit einem Skalpell

Material und Methoden

ausgeschnitten und jeweils in eine schon mit 100 µl 50% Ethanol in 5 mM TEAB (Triethylammoniumbicarbonat) gefüllte Kavität gegeben.

- Verdau mit (*) oder ohne Reduktion und Alkylierung (wenn diese vorher bereits im Rahmen der SDS-PAGE durchgeführt wurden, Beschreibung siehe oben)

Schritt	Volumen [µl]	Puffer	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1. Entfärbung	100	50% 5 mM TEAB / 50% Ethanol	120	55
2. Entfärbung	100	50% 5 mM TEAB / 50% Ethanol	60	55
3. Dehydrierung	100	100% Ethanol	10	RT
4. Reduktion*	100	10 mM DTT in 5 mM TEAB	45	55
5. Alkylierung*	100	55 mM Iodacetamid in 5 mM TEAB	30	RT
6. Waschen	100	5 mM TEAB	20	RT
7. Dehydrierung	100	100% Ethanol	10	RT
8. Dehydrierung	100	100% Ethanol	10	RT
9. Zugabe von Trypsin bzw. V8 Protease auf Eis [§]	25	10 ng/µl in 5 mM TEAB	15	4
10. Entfernen der restlichen Protease [§]				
11. Zugabe des Verdau-Puffers	30	5 mM TEAB		
12. Aufsetzen auf die Sammelplatte [#]			4 h/ÜN	37
13. Ansäuerung	5	5% Ameisensäure	0	RT
14. Extraktion [#]	20	1% Ameisensäure	30	RT
15. Extraktion	20	1% Ameisensäure	30	RT
16. Extraktion	20	60% Acetonitril / 40% Ameisensäure 0,1%	30	RT
17. Trocknung [§]	30	100% Acetonitril	15	RT
18. Trocknung	20	100% Acetonitril	15	RT

Nach jedem Schritt, außer mit [§] markierten, wurde 1 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Proben für die MALDI-TOF-MS wurden nach den Schritten genommen, die mit [#] markiert sind. Der Verdau erfolgte mit Trypsin (Promega, V5111) oder Endoproteinase Glu-C (V8 Protease, Roche #11420399).

- Weitere Aufarbeitung für die MS-Analyse

Nach Abfüllen der Proben in *LoBind*-Eppendorf-Gefäße wurde das Acetonitril ca. 15 min in einer Vakuumzentrifuge (UNIVAPO 150 ECH) entfernt, die Proben danach für einige Stunden bei RT in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert (Lagerung bei -20 °C).

Vorbereitung der Matrix für MALDI-TOF-MS

Eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxymethylsäure in Aceton wurde auf die Probenfelder der Aluminiumplatte (MTP 384 massive target T #26755, Bruker Daltonics) gegeben, so dass ein dünner Film entstand. Darauf wurde dann je 1 μ l Probenlösung gegeben. Nach Eintrocknen der Lösung wurde 1 μ l 0,1% Trifluoressigsäure zugegeben, um die Probe durch folgendes Abschütteln dieser zu entsalzen. Danach konnte die Platte direkt zur MALDI-TOF-MS-Analyse (*autoflex*TM, Bruker Daltonics) eingesetzt werden.

4.5. Proteinkristallisation

4.5.1. Kristallisationsbedingungen und Mikroskopie

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung zur Kristallisation bestand in der Proteinexpression wie oben beschrieben, in der Aufreinigung der Proteine, entweder über Ni-TED-Affinitätschromatographie (RCAR11 und ABI2) oder FPLC, sowie der Umpufferung bzw. Entsalzung.

Aufreinigung von RCAR1 und ABI2 über Äkta Prime plus-FPLC

Nach Aufschluss des Proteinpellets aus 9 l Kultur mit Puffer A, Ultraschall und anschließender Zentrifugation wurde das Protein auf eine HisTrap HP-Säule (GE Healthcare/Amersham Biosciences, 5 ml, #175248-01) geladen. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 30 ml Länge (10 ml Fraktionierung) ausgehend von 100% Puffer A und 0% Puffer B zu 0% Puffer A und 100% Puffer B.

Die über SDS-PAGE identifizierten proteinhaltigen Fraktionen wurden mit einer 10 mM Tris/HCl-Lösung (pH 8,0) über eine HiPrep 26/10 *Desalting*-Säule (GE Healthcare, #175087-01) entsalzt. Über Gelfiltration über eine Sephadex 75-Säule kann das Protein bei Bedarf nochmal aufgereinigt werden. Die Konzentrationseinstellung erfolgte mit Hilfe des NanoDrop-Photometers.

Puffer A

0,1 M Tris-HCl
0,5 M NaCl
20 mM Imidazol
pH 8,0

Puffer B

0,1 M Tris-HCl
0,5 M NaCl
0,5 M Imidazol
pH 8,0

Bei RCAR8 und RCAR11 war nach Aufreinigung über Ni-TED-Säulen und anschließender Dialyse gegen den Dialysepuffer (siehe 2.4.2) zur Kristallisation ebenfalls eine Entsalzung und Aufkonzentrierung der Proben nötig, welche über Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices, Ultracel 10000 oder 30000 MWCO (Millipore) durchgeführt wurden.

Kristallisationspuffer

10 mM Tris-HCl
40 mM NaCl
2 mM DTT
pH 7,9

Kristallisationsansatz

Die RCAR-Proteine (im Kristallisationspuffer) wurden jeweils einzeln oder zusammen mit der PP2C ABI2 versucht zu kristallisieren. RCAR1 und ABI2 einzeln sowie zusammen je mit und ohne S(+)-ABA ergaben in sämtlichen Screens keine Kristalle. Da davon ausgegangen wurde, dass nicht nur die Aminosäuresequenz beider Vollängen-Versionen nicht optimal für eine Kristallisation waren, sondern eventuell wegen eher geringer Expression auch die Proteinlösung noch zu unrein war, wurden neue Versuche mit RCAR8 und RCAR11 gemacht, welche beide sehr gut im pQE-System exprimiert werden und zusätzlich die Aufreinigung über Ni-TED eine höchst reine Ausbeute ergibt. Da sich auch RCAR8 nicht kristallisieren ließ, wurden sämtliche weiteren Versuche und Screens mit RCAR11 durchgeführt:

RCAR11 (10-25 mg/ml im Gesamtansatz, ausgehend von 40 mg/ml)
+/- ABI2 (10-25 mg/ml im Gesamtansatz)
+/- 0,75-2,5 mM S(+)-ABA
+/- 1,5 mM MUS (Methylumbelliferylsulfat) als Phosphatase-Inhibitor
2-5 mM DTT

Verwendete Screen-Systeme

Der Primärscreen wurde auf speziellen 96er Mikrotiterplatten mit jeweils einer Mischung aus Probenansatz und Screen-Lösung 1:1 oder 1:2 (0,1 µl) durchgeführt, welche mit dem Roboter Phoenix (Dunnlab) pipettiert wurden. Die Primärscreen-Platten wurden jeweils bei 4°C und bei 20°C inkubiert und die Platten auf mögliche Kristallbildung anfangs täglich, später zweimal wöchentlich, untersucht. Die für den Primärscreen verwendeten Lösungen waren folgende Refill-Hit Solutions von Qiagen:

Nr.	Suite-Name	Kurzbeschreibung	Qiagen-#
1	pHClear Suite (I)	Präzipitanten von pH 4,0 bis 9,0 Salze: NaCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ Polymere: PEG6000 Organische Verbindungen: MPD	1054309
2	pHClear II Suite	Präzipitanten von pH 4,0 bis 9,0 Salze: Na-/K-Phosphat, Na-Malonat Polymere: PEG6000 Organische Verbindungen: Isopropanol	1054308
3	Classics Suite (I)	Spektrum an Kristallisationsreagenzien nach Jancarik und Kim, 1991	1054292
4	Classics II Suite	Neutralisierte organische Säuren Hohe Salzkonzentration in Verbindung mit niedrigen Polymerkonzentrationen	1054290
5	JCSG+ Suite	Spektrum an Reagenzien nach Page, 2003 und Newman, 2005 (Joint Center for Structural Genomics)	1054299
8	PEGs Suite (I)	PEG200-20000, pH 4,6 / 6,5 / 7,5 / 8,5 PEG3350 mit niedrig konzentrierten Salzen	1054309
9	PEGs II Suite	Verschiedene PEGs mit Salzen und unterschiedlichem pH	1054306

Die Feinscreens wurden aufgrund der Ergebnisse des Primärscreens ausgewählt und die Zusammensetzung, was pH-Wert, PEG-, Salzkonzentrationen usw. betrifft, leicht verändert, um größere Kristalle zu erhalten bzw. Kristalle mit idealer Ordnung. Dementsprechend wurden die Lösungen für 96er Platten mit dem Pipettierroboter MLSTARLet 2980 (Hamilton) vorgemischt bzw. für die *Hanging Drop*-Methode in 300 µl-Ansätzen in die Reservoirs der 24er Platten pipettiert. Die Lösungen in den 96er Platten wurden dann wieder mit dem Phoenix-Roboter mit den Proteinlösungen gemischt, für die *Hanging Drops* wurden 1-2 µl Proteinlösung mit 2-3 µl Reservoirlösung auf die Abdeckplatten pipettiert und diese umgekehrt auf die Vertiefungen gelegt, so dass der Tropfen hängt und die Umgebung über die Reservoirlösung gesättigt ist. Den *Hanging Drop*-Ansätzen wurden wahlweise Detergenzien oder Additive (Hampton Research) zugesetzt.

Bei der *Seeding*-Methode wurden ebenfalls leicht veränderte Bedingungen gewählt und diese mit Kristallen angeimpft, wobei ältere Kristalle in einer Öse einfach durch die neue Lösung gezogen wurden. Dadurch sollte ebenfalls eine bessere Anordnung der Moleküle im Kristallgitter erreicht werden.

Die Inkubation der Platten erfolgte bei 20°C, in Ausnahmefällen auch bei 4°C, auch hier wurde anfangs täglich, später zweimal wöchentlich, untersucht, ob sich Kristalle gebildet hatten.

Material und Methoden

Name	Kurzbeschreibung	#
Additive-Screen	Enthält u.a. (multivalente) Salze, Linker, Dissoziierer, Polyamine, Cofaktoren, organische Lösungsmittel	HR2-428
Detergenz-Screen 1	Enthält z.B. verschiedene β -D-(thio-)glucoside	HR2-410
Detergenz-Screen 2	Enthält u.a. unterschiedliche Anapoe@s	HR2-411
Detergenz-Screen 3	Enthält z.B. verschiedene β -D-maltoside	HR2-412

Mikroskopie

Die Durchsicht der Platten erfolgte mit Hilfe von Binokular-Mikroskopen bei 4°C oder 20°C mit Vergrößerungen von bis 6,3x, einige Kristalle waren bereits nach einem Tag zu sehen, andere erst nach einigen Wochen.

Zu unterscheiden waren richtige Kristalle, die im Anfangsstadium noch recht klein waren, von Präzipitat. Die Kristalle wurden zusätzlich mit Hilfe eines Polarisationsfilters auf Beugung polarisierten Lichts untersucht.

4.5.2. Röntgenstrukturanalyse

Verwendete Kryopuffer

Zum Messen der Röntgenstrahlbeugung bzw. der Raumgruppenbestimmung mit Bruker AXS Type F0 135, Model SL 144105 wurde auf die Kristalle zuerst Kryopuffer gegeben, um diese besser vor Austrocknung bzw. Zerstörung durch Stickstoff zu schützen, dann wurden die Kristalle montiert und unter Stickstoffstrom (100 K, Oxford Cryo Systems) vermessen.

Beispiele für verwendete Kryopuffer

(Zusammensetzung abhängig von jeweiliger Screen-Lösung)

0,15 M CaCl ₂	0,2 M MgCl ₂
0,1 M Tris pH 8,6	0,1 M BisTris pH 6,5
25 % PEG 200	25 % PEG 200

Die Vermessung wurde mit dem Gerät Bruker AXS (CuK α , rotierende Anode) am Lehrstuhl für Biochemie (Prof. Dr. M. Groll) durchgeführt.

4.6. Yeast Two-Hybrid Interaktionsscreen

Die Entwicklung des *Yeast Two-Hybrid* Systems (Fields & Song, 1989) basiert auf der Entdeckung des Aufbaus eukaryotischer Transkriptionsfaktoren (Sadowski et al., 1988), viele (z.B. Gal4 aus Hefe) besitzen zwei räumlich und funktionell voneinander unabhängige Domänen. Eine davon ist die DNA-Bindedomäne (BD), welche an spezifische DNA-Sequenzen am Promotor bindet, *upstream activation sequences* (UAS) genannt. Die andere Domäne ist die Aktivierungsdomäne (AD), welche den RNA-Polymerasell-Komplex zur Transkription der UAS veranlasst (Hope & Struhl, 1986; Keegan et al., 1986; Ma & Ptashne, 1987). Für die Transkription sind beide Domänen essentiell, für die Funktionalität des Transkriptionsfaktors müssen beide aber nicht notwendigerweise kovalent miteinander verknüpft sein (Ma & Ptashne, 1988), was im *Yeast Two-Hybrid* System genutzt wird. Hierbei wird die Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors als Fusionsprotein mit dem zu untersuchenden Protein A in der Hefezelle exprimiert, die Aktivierungsdomäne als Fusionsprotein mit dem potentiellen Interaktionspartner von A, Protein B. Erst Interaktion von A mit B und damit Wiederherstellung der Funktionalität des Transkriptionsfaktors führt zur Transkription geeigneter Reportergene (z.B. das *lacZ*-Gen aus *E. coli* oder Aminosäure-Biosynthesegene wie His3 aus Hefe).

4.6.1. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm AH109) erfolgte bei 30°C im Vollmedium (YP-Medium) bzw. im Minimalmedium (S-Medium) mit Glucose als Kohlenstoff-Quelle. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte auf dem Schüttler bei 200 rpm, Transformanten wurden auf Minimalmedium mit der entsprechenden Dropout-Lösung selektioniert.

Stamm	Genotyp	Quelle
AH109	<i>MATa, trp1-109, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i>	(James et al., 1996) Matchmaker Clontech

YPD-Medium

10 g/l Hefeextrakt
 20 g/l Pepton
 15 g/l Agar für festes Medium
 pH 6,5
 autoklavieren; Zugabe von 2% Glucose (sterilfiltriert)

SD-Medium

100 ml/l 10x Makrosalze
1 ml/l 1000x Mikrosalze
15 g/l Agar für festes Medium
pH 5,8
autoklavieren
Zugabe von 2% Glucose und
100 ml/l 10x *Dropout*-Lösung
(beides steril)

10x Makrosalze für SD-Medium

10 g/l KH_2PO_4
10,24 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
1 g/l NaCl
1 g/l CaCl_2
50 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
autoklavieren

1000x Mikrosalze für SD-Medium

2 mg/l Biotin
400 mg/l Ca-Pantothensäure
20 mg/l Folsäure
2 g/l myc-Inositol
400 mg/l Nicotinsäure
200 mg/l p-Aminobenzoesäure
400 mg/l Pyridoxin-HCl
200 mg/l Riboflavin
400 mg/l Thiamin-HCl
500 mg/l Borsäure
40 mg/l Cu_2SO_4
100 mg/l KI
200 mg/l FeCl_3
400 mg/l MnSO_4
200 mg/l Na-Molybdat
400 mg/l ZnSO_4
sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

10x *Dropout*-Lösung

200 mg/l L-Adenin-Hemisulfat
200 mg/l L-Arginin-HCl
300 mg/l L-Isoleucin
300 mg/l L-Lysin-HCl
200 mg/l L-Methionin
500 mg/l L-Phenylalanin
200 mg/l L-Threonin
200 mg/l L-Tyrosin
200 mg/l L-Uracil
1500 mg/l L-Valin
200 mg/l L-Histidin-HCl x H_2O
1000 mg/l L-Leucin
200 mg/l L-Tryptophan

Je nach Selektion wurden entsprechende Aminosäuren L-Histidin, L-Leucin oder L-Tryptophan der *Dropout*-Lösung nicht zugesetzt.

4.6.2. Verwendete Plasmide und Klonierung von MLPs

Für den *Yeast Two-Hybrid* Screen wurde das auf GAL4 basierende System Matchmaker der Firma Clontech (www.clontech.com) verwendet (Chien et al., 1991), mit der AD im Vektor pGAD424 (-Leu) und der BD im Vektor pBridge (-Trp, meist im *Three-Hybrid* System verwendet). Reportergene sind hier His3 und *lacZ* (β -Galactosidase), sowie ADE2 (AH109).

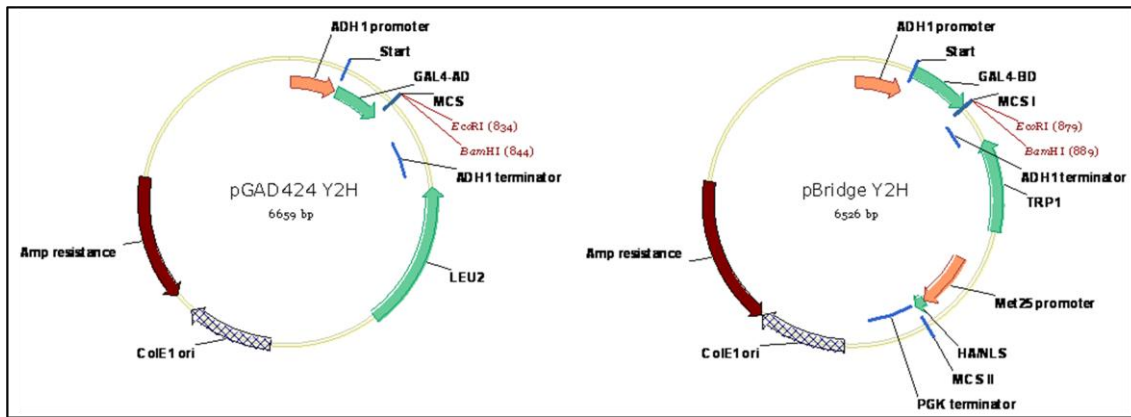


Abb. 4.4: Die im *Yeast Two-Hybrid* verwendeten Plasmide pGAD424 und pBridge.

Die Klonierung der MLPs erfolgte aus der cDNA (ABRC, Arabidopsis Biological Resource Center, The Ohio State University; <http://abrc.osu.edu>). Über PCR wurden zuerst die Schnittstellen zugefügt (BamHI und EcoRI) und dann in die Vektoren pGAD424 und pBridge ligiert. Zur Proteinexpression in *E. coli* M15 [pREP4] wurde mit SphI und BglII bzw. BamHI in den Vektor pQE-70 kloniert.

Locus	# ABRC	Name	Primer Y2H #	Primer pQE #
At1g14950	U21376	Nähe zu MLP 329 (A)	797, 798	809, 810
At1g23120	U61154	MLP related (B)	799, 800	811, 812
At1g24020	U13643	MLP 423 (C)	801, 802	813, 814
At1g35310	U20592	MLP 168 (D)	803, 804	815, 816
At1g70830	U11943	MLP 28 (E)	805, 806	817, 818
At4g23670	U12646	MLP related (F)	807, 808	819, 820

4.6.3. Transformation von DNA in Hefezellen

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll der „High efficiency LiAc transformation“ (Gietz & Woods, 2002; Gietz & Woods, 2006). Für die Einzeltransformation wurden die Hefestämme zuerst 3 Tage auf SD-Platten mit entsprechender Dropout-Lösung bei 30°C angezogen, dann eine 1 ml-ÜN-Kultur in YPD-Medium in eine 30 ml-ÜN-Kultur überimpft, davon dann wiederum 15 ml in eine 200 ml-Kultur überimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach der Ernte der Zellen in sterilen Zentrifugenbechern bei 100 xg für 5 min bei 4°C wurde das Pellet mit eiskaltem sterilem mQ-Wasser gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in 100 mM Lithiumacetat aufgenommen, in Eppendorf-

Reaktionsgefäße überführt und bei 2500 rpm erneut für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 100 mM Lithiumacetat aufgenommen, wobei eine Zellzahl von ca. 2×10^9 pro ml eingestellt wurde. Diese Zellsuspension wurde dann in 50 μ l-Aliquots aufgeteilt, erneut für 15 Sekunden bei 2500 rpm zentrifugiert, das restliche LiAc abgenommen und in der Zwischenzeit die *carrier*-DNA für 5 min bei 95°C aufgeköcht und auf Eis abgekühlt.

Beim Transformationsansatz (360 μ l) wurden folgende Komponenten zum Zellpellet gegeben:

240 μ l 50% PEG 4000 (w/v)
36 μ l 1 M Lithiumacetat
10 μ l Einzelstrang-DNA (*carrier*-DNA, Konzentration 10 μ g/ml)
x μ l zu transformierende Plasmid-DNA (500 ng)
74 - x μ l mQ-Wasser

Das Zellpellet wurde resuspendiert, die Zellen bei 42°C 40 min lang im Wasserbad inkubiert, danach abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 μ l mQ-Wasser aufgenommen und auf entsprechende Selektionsplatten (SD-Medium) ausplattiert.

Herstellung der carrier-DNA

Die DNA aus Lachssperma (Sigma) wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 1x TE (pH=7,5) unter Rühren ca. 1 h bei RT gelöst. Anschließend wurde die DNA für zweimal 30 s bei 100% Leistung ultraschallbehandelt, bevor sie mit Phenol (pH 8,0, TE gesättigt), mit Phenol:Chloroform (1:1) und sechsmal mit Chloroform extrahiert wurde. Durch Zugabe von 0,1x Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH = 6,0) und Zugabe von 2,5x Volumen Ethanol (100%, eisgekühlt) wurde die DNA gefällt. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet und im Ausgangsvolumen 1x TE für 20 min in kochendem Wasser denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die *carrier*-DNA wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

4.6.4. Präparation von DNA aus Hefezellen

Für die Präparation von DNA aus Hefe wurden die Zellen einer 4 ml-ÜN-Kultur für 5 min bei 3500 xg geerntet und mit 1 ml mQ gewaschen. Das Pellet wurde in 500 μ l Lysepuffer aufgenommen und mit drei Spatelspitzen Glasperlen kräftig gevortext und anschließend auf Eis inkubiert, bis die Glasperlen sich abgesetzt hatten. Der Überstand wurde mit 275 μ l 7 M Ammoniumacetat (pH 7,0) versetzt, bei 65°C 5 min und danach 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l Chloroform, gründlichem

Mischen und einer Zentrifugation für 2 min bei 13000 xg wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml Isopropanol und Inkubation für 5 min gefällt, dann 10 min bei 13000 xg und 4°C zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde es getrocknet und in 50 µl mQ-Wasser aufgenommen. Wegen hoher Salzkonzentrationen und eventuell vorhandener DNasen wurden PCR-Reaktionen unverzüglich angesetzt.

Lysepuffer

100 mM Tris/HCl pH= 8,0

50 mM EDTA

1 % SDS

4.6.5. Bestimmung positiver Interaktion

4.6.5.1. Selektion und Test des Wachstumsphänotyps

Die Selektion auf positive Transformanden erfolgte zunächst über Selektivmedium (SD) mit *Dropout*-Lösungen ohne entsprechende Aminosäuren (-Leu für pGAD-Konstrukte und -Trp für pBridge-Konstrukte bzw. beide bei zweifach nacheinander transformierten Hefezelle -Leu/-Trp). Zur gleichzeitigen Überprüfung auf positive Interaktion schon bei diesem Schritt wurde ein Teil der frisch transformierten Zellen auf SD-Platten mit -Leu/-Trp/-His zur Überprüfung der Histidin-Auxotrophie ausplattiert und gleich lang für drei Tage bei 30°C inkubiert.

Zum Test positiver Transformanden auf Interaktion der beiden eingebrachten Proteine wurde außer dem -His-Test gleich nach der Transformation ein zweiter Test auf -His-Resistenz mit Verdünnungen der in Selektivmedium (-Leu/-Trp) angezogenen Zellen in Wasser durchgeführt. Bei einer OD₆₀₀ von 1 liegen 2×10^7 Zellen vor, die auf 200 Zellen pro Platte verdünnt wurden.

Außerdem wurden mit denselben Kulturen Tüpfeltests durchgeführt, hier wurden Verdünnungen bis zu 15 Kolonien pro Tropfen hergestellt und auf Platten gebracht, die entweder -Leu/-Trp zur Kontrolle, -Leu/-Trp/-His, -Leu/-Trp/-His mit 30 µM S(+)-ABA, Hormonmischungen oder Pflanzenextrakt aus Arabidopsis enthielten, um die Interaktion von RCARs bzw. MLPs mit PP2Cs, die eventuell zur Interaktion die Anwesenheit eines Liganden benötigen, zu stabilisieren. Es wurden jeweils Positivkontrollen bekannter Interaktionspartner (z.B. RCAR1 und ABI2) und Negativkontrollen (mit Leervektoren) mitgeführt.

4.6.5.2. β -Galactosidase-Assay

Für den β -Galactosidase-Assay zur Überprüfung positiver Interaktion zweier Proteine im *Yeast Two-Hybrid* Screen wurde aus einer 2 ml-ÜN-Kultur in Selektionsmedium 1 ml davon in 4 ml YPD-Medium überimpft und bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 (genau notiert) wachsen gelassen. 1 ml dieser Kultur wurde abzentrifugiert (10000 xg, 30 Sekunden), der Überstand entfernt und 500 μ l Z-Puffer zugegeben. Nach Vortexen und erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 μ l Z-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Das Einfrieren/Auftauen wurde zum Zweck des Zellaufschlusses viermal wiederholt. Zu den Proben wurde 700 μ l Z-Puffer mit 270 μ l β -Mercaptoethanol pro 100 ml gegeben und ab Zugabe von 160 μ l ONPG (frisch hergestellt, 4 mg/ml ONPG (o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid) in Z-Puffer pH 7,0) die Zeit t gestoppt, bis bei einer Inkubation im 30°C warmen Wasserbad die Positivkontrollen und positive Transformanden gelb gefärbt waren. Sofort wurden dann 400 μ l 1 M Na_2CO_3 -Lösung zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Nach Zentrifugation bei 10000 xg für 10 min wurde der Überstand zur Bestimmung der OD bei 420 nm verwendet.

Zur Berechnung der β -Galactosidase-Einheiten:

1 Unit β -Galactosidase hydrolysiert 1 μ Mol ONPG zu o-Nitrophenol und D-Galactose pro Minute pro Zelle.

β -Galactosidase Einheiten = $1000 \cdot OD_{420} / (t \cdot V \cdot OD_{600})$, hier mit Verdünnungsfaktor $V = 1$

4.7. Chemikalien und Geräte

4.7.1. Chemikalien / Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden - soweit nicht anders angegeben - von den Firmen Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Fluka / Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) oder New England Biolabs (Frankfurt) verwendet.

4.7.2. Vektoren, Plasmide, Oligonukleotide und Restriktionsenzyme

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und neu klonierten Plasmide sowie die entsprechenden transformierten *E. coli*-Stämme sind im Anhang 5.1. und 5.2. samt numerischer Zuordnung in der Stammsammlung zu finden.

Alle verwendeten Oligonukleotide stammten von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg. Die in lyophilisierter Form gelieferten Oligonukleotide wurden in mQ-H₂O aufgenommen und 5 min bei 65°C erhitzt, so dass eine Konzentration von 100 pmol/μl erreicht wurde. Die Lagerung der gelösten Oligonukleotide erfolgte bei -20°C. Eine Liste aller verwendeten Oligonukleotide samt ihrer Zuordnung in der Primerliste des Labors findet sich im Anhang 5.1. Restriktionsenzyme stammten von MBI Fermentas, www.fermentas.com, oder New England Biolabs® GmbH, Frankfurt.

4.7.3. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Modell</i>	<i>Hersteller</i>
Blotapparatur	Trans-Blot <i>semi dry</i>	Bio-Rad
CCD-Kamera	ORCAII ERG	Hamamatsu Photonics
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Gelelektrophorese-Netzteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Inkubatoren	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshake	Gerhardt
Kippschüttler	RotoShake Genie	Scientific Industries
Luminometer	<i>flash'n glow</i>	Berthold
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
	HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader	Perkin Elmer
Mikroskope	Stemi SV11	Zeiss
	HBO 50 Axioskop	Zeiss
	Axiovert 200	Zeiss
	Fluoview FV1000	Olympus
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
NanoDrop-Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
Pipettierroboter	MicroLabSTARLet 2980	Hamilton
	Phoenix	Dunnlab

Material und Methoden

SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	Peqlab
	Mini Protean 3 System	Bio-Rad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Ultraschall	Sonopuls HD2070	Bandelin
UV-Fotosystem	P91D	Mitsubishi
UV-Gerät	Reprostar 3	Camag
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vakuumzentrifuge	Vacuum Concentrator	Bachofer
	UNIVAPO 150 ECH	Univapo
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
X-Ray Gerät	Bruker AXS Type F0 135 Model SL 144105	Bruker
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5810	Eppendorf AG
	Typ 5415C	Eppendorf AG
	Typ 5415R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG
	Universal 16	Hettich
	Minifuge GL	Heraeus Christ

4.8. *In silico*-Analyse

Ermittlung von Arabidopsis-DNA-Sequenzen:

www.arabidopsis.org

Vorhersage eines Restriktionsverdau:

rna.lundberg.gu.se/cutter2

Homologiesuche sowie Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen:

www.ncbi.nlm.nih.gov (BLAST)

www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi

multalin.toulouse.inra.fr/multalin

Übersetzung einer Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz:

www.expasy.ch/tools/dna.html

Berechnung von Aminosäureanteilen sowie Proteineigenschaften:

www.expasy.org/tools/protparam.html

Vorhersagen über Proteinstrukturen / Veröffentlichte Proteinstrukturen:

searchlauncher.bcm.tmc.edu

www.predictprotein.org

www.rcsb.org

GOR4

JalView - Jpred3

Massenspektrometrie:

www.matrixscience.com/search_form_select.html

Statistische Tests:

www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm

5. Anhang

5.1. Oligonukleotide und Ausgangsplasmide

Tabelle der Primer zur Identifizierung von RNAi-Fragmenten (4.2.3.)

Name	Sequenz	Verwendung	Primer #
Pro 1 for	5'-cgt aaa gca cta aat cgg-3'	Amplifizierung eingebrachter Fragmente genomischer DNA	848
Ter 1 rev	5'-aac gat cgg gga aat tcg-3'		849
35s for	5'-acg tca aag ggc gaa aaa ccg t-3'		850
Ter 1 ext	5'-gcc aaa tgt ttg aac gat cgg g-3'		851
Act_for	5'-tgg gat gac atg gag aag at-3'	Actin-Amplifizierung zum Test der isolierten CTAB-DNA	108
Act_rev	5'-ata cca atc ata gat ggc tgg-3'		109
pBI for	5'-gct atg acc atg att acg cc-3'	Bindesequenzen in der Umgebung der Ascl-Schnittstellen des pBI Ascl-Vektors	854
pBI rev	5'-ggg aga gtg ttg gaa ttc cc-3'		855
pBI Ins F2	5'-ggg cct ctt cgc tat tac gcc ag-3'	Amplifizierung von pBI-Insertionen zwischen LB und RB	169
pBI Ins R2	5'-cca ggc ttt aca ctt tat gct tcc-3'		170
Npt2_for	5'-gga tct cct gtc atc t-3'	Amplifizierung eines Stücks des NptII-Gens, das Kanamycin-Resistenz vermittelt	171
Npt2_rev	5'-gat cat cct gat cga c-3'		172
T3 for	5'-aat taa ccc tca cta aag gg-3'	Bindesequenzen befinden sich im pSK-Ausgangsvektor (außerhalb der Ascl-Schnittstellen)	856
T7 rev	5'-gta ata cga ctc act ata ggg c-3'		857

Tabelle der Primer zu den unter Punkt 4.3.10. beschriebenen Klonierungen.

Name	Sequenz	Verwendung	Primer #
ABR9 rev	5'-aaa aag aat tct cac tga gta atg tcc tg -3'	Klonierung aus pQE-Plasmid in pRSET-Vektor	758
ABR9 BglII fl fw	5'-aaa aaa gat cta tga tgg acg gcg ttg-3'		759
ABR9 BglII dN fw	5'-aaa aaa gat ctg aaa acc agt gta cc-3'		760
ABI2 EcoRI rev	5'-aaa aag aat tct caa ttc aag gat ttg c-3'		761
ABI2 BglII fl fw	5'-aaa aaa gat cta tgg acg aag ttt ctc c-3'		762
ABI2 BglII dN1 f	5'-aaa aaa gat ctc acg ccg gac tta gag g-3'		763
ABI2 BglII dN2 f	5'-aaa aaa gat cta tga atc aga gtg ag-3'		764
ABI2 BglII dN3 f	5'-aaa aaa gat ctg gtc gag tca cta atg g-3'		765

Name	Sequenz	Verwendung	Primer #
for ndel	5'-aaa aac ata tgc ggg gca gcc atc acc atc acc atc acg att acg at-3'	Klonierung aus pRSET-Plasmid in pTYB2-Vektor	766
nde for 03-1	5'-gat ata cat atg cgg ggc tcc cat cac cat c-3'		767
nde for 03-2	5'-gat ata cat atg tcg tac tac cat cac-3'		768
ABI2 rev Xma	5'-gca tag ggc cca ttc aag gat ttg ctc ttg-3'		769
ABR9 rev Xma	5'-gca tag ggc ccc tga gta atg tcc tga g-3'		770
for NdeI ABI2	5'-gga aac ata tgg agg aag ttt ctc c-3'	Klonierung aus pQE-Plasmid in pET-Vektor	771
rev XhoI ABI2	5'-gga aac tcg aga ttc aag gat ttg c-3'		772
for NdeI ABR9	5'-gga aac ata tgg acg gcg ttg aag-3'		773
rev NotI ABR9	5'-gaa agc ggc cgc ctg agt aat gt-3'		774
NdeI-RCAR11	5'-gca tcc ata tgc ctt cgg ag-3'		775
RCAR11-XhoI	5'-gca tcc tcg agc gtc acc tg-3'		776
RCAR11 dN1dC f	5'-gcg tcg gat ccc taa aaa act c-3'	Klonierung aus pQE-Plasmid in pQE-30-His6-TEV-Vektor	777
RCAR11 dN2 lang	5'-gca tcg gat ccg gaa gct gtt cat cac -3'		778
RCAR11 dC r	5'-gca tcc tgc agt caa gcc ata g-3'		779
RCAR11 fl f	5'-gta tcg gat ccc ctt cgg ag-3'		780
RCAR11 fl r	5'-gca tcc tgc agt cac gtc ac-3'		781
RCAR11 fl for pQ	5'-gca tcg gat ccc ctt cgg agt taa cac c-3'		782
RCAR11 fl rev pQ	5'-gca tcc tgc agt cac gtc acc tga gaa c-3'		783
RCAR11-XhoI-His	5'-gca tcc tcg agt cac gtc acc tg-3'		Klonierung aus pQE-Plasmid in pET-Vektor
rev XhoI ABI2-His	5'-ggc cac tcg agt caa ttc aag gat ttg c-3'	785	
Bvl-His NdeI for	5'-gcg ccc ata tgg gtg ttt tca att ac-3'	786	
Bvl-His XhoI rev	5'-gca tcc tcg agt cag ttg tag gca ct-3'	787	
RCAR11d2 for 1	5'-gca tcc ata tgg gaa gct gtt cat cac-3'	Klonierung aus pQE-Plasmid in pET-Vektor	788
RCAR11d1 for 2	5'-gcg ccc ata tgc taa aaa act caa tcg-3'		789
RCAR11 dc rev 3	5'-gca tcc tcg agt caa gcc ata gct tca g-3'		790
RCAR3 for 4	5'-gca tcc ata tgg aag cta acg gga ttg-3'		791
RCAR3 rev 5	5'-gca tcc tcg agt cag act ctc gat tct g-3'		792
ABI2dN0 for 6	5'-gca tcc ata tgg acg aag ttt ctc c-3'		793
ABI2 dN1 for 7	5'-gcg ccc ata tga tca ata caa gac-3'		794
ABI2 dN2 for 8	5'-gca gcc ata tga atc aga gtg ag-3'		795
ABI2 dC rev 9	5'-gca tcc tcg aga tca acc act ac-3'		796

Anhang

Name	Sequenz	Verwendung	Primer #
U21376 forY	5'-cga tcg aat tcg cga cgt cag gta c-3'	Klonierung aus cDNA in pGAD424 und pBridge für Y2H-Screen	797
U21376 revY	5'-cga tcg gat cct taa gcc ttg ctc-3'		798
U61154 forY	5'-cga tcg aat tcg ctg gtg tcc aga c-3'		799
U61154 revY	5'-cga tcg gat cct cat gat tca gac-3'		800
U13643 forY	5'-cga tcg aat tcg ggt tga gtg gtg-3'		801
U13643 revY	5'-cga tcg gat cct tag gca cta gtt tg-3'		802
U20592 forY	5'-cga tcg aat tcg tag agg cag agg-3'		803
U20592 revY	5'-cga tcg gat ccc taa ccc tca gac-3'		804
U11943 forY	5'-cga tcg aat tcg ccg acg tag caa c-3'		805
U11943 revY	5'-cga tcg gat ccc tat tcc tcg gcc-3'		806
U12646 forY	5'-cga tcg aat tcg cga cat cgg gaa c-3'		807
U12646 revY	5'-cga tcg gat cct taa gct ttg ttg acg-3'		808
U21376 forpQE	5'-gat cgc atg ctg gcg acg tca ggt ac-3'	Klonierung aus cDNA in pQE-70	809
U21376 revpQE	5'-cga tca gat cta gcc ttg ctt cgg-3'		810
U61154 forpQE	5'-gat cgc atg ctg gct ggt gtc cag ac-3'		811
U61154 revpQE	5'-cga tcg gat cct gat tca gac aac-3'		812
U13643 forpQE	5'-gat cgc atg ctg ggg ttg agt ggt g-3'		813
U13643 revpQE	5'-cga tca gat ctg gca cta gtt tgc-3'		814
U20592 forpQE	5'-gat cgc atg ctg gta gag gca gag g-3'		815
U20592 revpQE	5'-ggc cag atc tac cct cag aca ata g-3'		816
U11943 forpQE	5'-gat cgc atg ctg gcc gac gta gca ac-3'		817
U11943 revpQE	5'-gct cag atc ttt cct cgg cca aaa g-3'		818
U12646 forpQE	5'-gat cgc atg ctg gcg aca tcg gga ac-3'		819
U12646 revpQE	5'-cgc tca gat cta gct ttg ttg acg-3'		820
R7 pSK f	5'-gat cgg atc ctg atg gaa agt tc -3'	Klonierung in pSK 35S	958
R7 pSK r	5'-gcc cga gct ctt act tca tca tt -3'		959
Fraa1_SphI_f	5'-gat cgc atg ctg atg ggt gtt tac act tat gaa aac gag-3'	Klonierung Fra a1-3 in pQE-70	540
Fraa1_BamHI_r	5'-gat cgg atc cgt tgt att cgc tgg ggt ggt cct tga g-3'		541
Fraa2_SphI_f	5'-gat cgc atg ctg atg ggt gtg ttc act tat gaa acc gag-3'		544
pqe fraa2 neu	5'-gat cgc atg caa cag tat tca tta gga ttg gcc aag ag-3'		545
Fraa3_SphI_f	5'-gat cgc atg ctg atg ggt gtg ttc aca tac gaa tcc gag-3'		548
Fraa3_BamHI_r	5'-gat cgg atc cgt tgt att cct cag gat ggg cca aga gg-3'		549

Tabelle aller zur Klonierung verwendeten Ausgangsplasmide

#	Plasmid	Stamm	Resistenz
2182	pRSET A His6 TEV	XL1-blue	Amp180
2275	pTYB2	XL1-blue	Amp
1119	pQE-30	DH5 α	Amp
2702	pQE-30 His6 TEV	DH5 α	Amp
2098	pQE-70	DH5 α	Amp
2467	pET-21a(+)	DH5 α	Amp
2700	pET-24a(+)	DH5 α	Kan
425	pSK Ascl	DH5 α	Amp
427	pBI121 Ascl	DH5 α	Kan
1864	pGAD424	DH5 α	Amp
3218	pBridge	DH5 α	Amp

Tabelle der zur Protoplastentransfektion verwendeten Konstrukte

#	Plasmid	Stamm	Resistenz
883	pSK 35S::GUS	DH5 α	Amp
3041	pSK pRD29B::LUC	DH5 α	Amp
878	pSK pRAB18::LUC	DH5 α	Amp
663	pSK 35S::EGFP	DH5 α	Amp
1355	pSK pAtHB6::EGFP	DH5 α	Amp
1407	pSK pRD29B::EGFP	DH5 α	Amp
1289	pBI221 35S::RCAR1	DH5 α	Amp
1287	pBI221 35S::RCAR3	DH5 α	Amp
3963	pBI221 35S::RCAR7 Klonierung aus pQE-70 RCAR7	DH5 α	Amp
1102	pBI221 35S::ABI1	DH5 α	Amp
1110	pBI221 35S::ABI2	DH5 α	Amp

5.2. Konstrukte zur Proteinexpression

Tabelle zu unter Punkt 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen klonierten Konstrukten und exprimierten Proteinen im Zuge der Optimierung von RCARs und ABI2.

Neben den Protein-/Konstruktbezeichnungen ist die Art des Expressionsstammes, die Nummer in der Stammsammlung (#), Stärke der Expression („/“ keine, „-“ sehr wenig bis „+++“ sehr stark) angegeben, sowie die Expressionsbedingungen (nach Induktion mit 0,75 mM IPTG). Bei Coexpressionen wurde immer 0,5 bis 1 mM (S)-ABA im Medium verwendet.

#	Stamm	Konstrukt	Expr.	Bedingungen
1136	XL1-blue	pQE-30 ABR7 (RCAR3)	+	4h, 37°C
1168	XL1-blue	pQE-30 ABR9 (RCAR1)	+	4h, 37°C
2023	M15 [pREP4]	pQE-70 ABI2	+	2h, 37°C
2158	M15 [pREP4]	pQE-70 ABI1	+	2h, 37°C
2246	BL21 (DE3)	pRSET A His6 TEV_ABR9fl (AS 1-187)	/	/
2247	BL21 (DE3)	pRSET A His6 TEV_ABR9deltaN (AS 31-187)	/	/

Anhang

#	Stamm	Konstrukt	Expr.	Bedingungen
2248	BL21 (DE3)	pRSET A His6 TEV_ABI2fl (AS 1-423)	/	/
2249	BL21 (DE3)	pRSET A His6 TEV_ABI2deltaN1 (AS 19-423)	/	/
2250	BL21 (DE3)	pRSET A His6 TEV_ABI2deltaN2 (AS 88-423)	/	/
2251	BL21 (DE3)	pRSET A His6 TEV_ABI2deltaN3 (AS 146-423)	/	/
2252	M15 [pREP4]	pRSET A His6 TEV_ABR9fl	/	/
2253	M15 [pREP4]	pRSET A His6 TEV_ABR9deltaN	/	/
2254	M15 [pREP4]	pRSET A His6 TEV_ABI2fl	/	/
2255	M15 [pREP4]	pRSET A His6 TEV_ABI2deltaN1	/	/
2256	M15 [pREP4]	pRSET A His6 TEV_ABI2deltaN2	/	/
2257	M15 [pREP4]	pRSET A His6 TEV_ABI2deltaN3	/	/
2258	M15 [pREP4]	pQE-70 RCAR11	+++	4h, 37°C
2261	M15 pREP4	pQE-70 RCAR8	+++	4h, 37°C
2442	M15 [pREP4]	pTYB2 His6 TEV_ABR9 fl	/	/
2443	M15 [pREP4]	pTYB2 His6 TEV_ABR9 fl	/	/
2444	XL1-blue	pTYB2 His6 TEV_ABI2 fl	/	/
2445	XL1-blue	pTYB2 His6 TEV_ABI2 fl	/	/
2666	Rosetta-gami	pET-21a(+) ABR9	-	/
2667	Rosetta-gami	pET-21a(+) ABR9	-	/
2668	Rosetta-gami	pET-21a(+) ABI2	-	/
2669	Rosetta-gami	pET-21a(+) ABI2	-	/
2694	M15 [pREP4]	pQE-70 Bet v1	++	ÜN, 37°C
2703	Rosetta pLysS	pQE-70 RCAR11	++	4h, 37°C
2704	BL21 (DE3)	pQE-70 RCAR11	++	4h, 37°C
2705	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11	+	4h, 37°C
2706	BL21 (DE3)	pET-24a(+) RCAR11	+	4h, 37°C
2707	Rosetta pLysS	pET-21a(+) RCAR11	-	/
2708	BL21 (DE3)	pET-21a(+) RCAR11	+	4h, 37°C
2709	M15 [pREP4]	pET-21a(+) RCAR11	/	/
2710	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2	-	/
2711	BL21 (DE3)	pET-21a(+) ABI2	-	/
2712	M15 [pREP4]	pET-21a(+) ABI2	/	/
2713	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 und pET-24a(+) RCAR11	+++	2h, 37°C
2714	BL21 (DE3)	pET-21a(+) ABI2 und pET-24a(+) RCAR11	+++	2h, 37°C
2733	M15 [pREP4]	pQE-30 RCAR11	+++	4h, 37°C
2734	BL21(DE3)	pQE-30 RCAR11	++	4h, 37°C
2735	Rosetta pLysS	pQE-30 RCAR11	+++	4h, 37°C
2736	M15 [pREP4]	pQE-30 His6 TEV RCAR11 (AS 1-191)	-	/
2737	BL21(DE3)	pQE-30 His6 TEV RCAR11	/	/
2738	Rosetta pLysS	pQE-30 His6 TEV RCAR11	/	/
2739	M15 [pREP4]	pQE-30 His6 TEV RCAR11 dN1 dC (AS 13-179)	+	4h, 37°C
2740	BL21(DE3)	pQE-30 His6 TEV RCAR11 dN1 dC	/	/
2741	Rosetta pLysS	pQE-30 His6 TEV RCAR11 dN1 dC	/	/
2742	M15 [pREP4]	pQE-30 His6 TEV RCAR11 dN2 dC (AS 28-179)	-	/
2743	BL21(DE3)	pQE-30 His6 TEV RCAR11 dN2 dC	/	/
2744	Rosetta pLysS	pQE-30 His6 TEV RCAR11 dN2 dC	/	/
2759	M15 [pREP4]	pQE-70 ABI2	++	2h, 37°C
2760	BL21(DE3)	pQE-70 ABI2	+	2h, 37°C

#	Stamm	Konstrukt	Expr.	Bedingungen
2761	Rosetta pLysS	pQE-70 ABI2	+	2h, 37°C
2762	BL21(DE3)	pQE-70 ABI2 und pET-24a(+) RCAR11	-	/
2763	Rosetta pLysS	pQE-70 ABI2 und pET-24a(+) RCAR11	+	2h, 37°C
2772	Rosetta pLysS	pET-21a(+) RCAR2	-	/
2773	Rosetta pLysS	pET-21a(+) RCAR12	+	4h, 37°C
2803	BL21 (DE3)	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR11 ohneHis6	++	2h, 37°C
2804	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR11 ohneHis6	++	2h, 37°C
2805	BL21 (DE3)	pET-21a(+) ABI2 ohne His6 + pET-24a(+) RCAR11	+	2h, 37°C
2806	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 ohne His6 + pET-24a(+) RCAR11	+	2h, 37°C
2807	BL21 (DE3)	pQE-30 TEV RCAR11 dN2 dC	/	/
2808	BL21 (DE3)	pQE-30 TEV RCAR11 dN2 dC	/	/
2809	BL21 (DE3)	pQE-30 RCAR11 dN2 dC	/	/
2810	BL21 (DE3)	pQE-30 TEV RCAR11	/	/
2811	Rosetta pLysS	pQE-30 TEV RCAR11 dN2 dC	/	/
2812	Rosetta pLysS	pQE-30 TEV RCAR11	/	/
2813	Rosetta pLysS	pQE-30 RCAR11 dN2 dC	/	/
2814	M15 [pREP4]	pQE-30 TEV RCAR11 dN2 dC	+	6h, 37°C
2815	M15 [pREP4]	pQE-30 TEV RCAR11	-	/
2816	M15 [pREP4]	pQE-30 RCAR11 dN2 dC	-	/
2871	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) Bet v I ohne His	++	4h, 37°C
2872	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) Bet v I ohne His	++	4h, 37°C
2873	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 ohne His	+	4h, 37°C
2874	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 ohne His	+	4h, 37°C
2875	BL21(DE3)	pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	4h, 37°C
2876	Rosetta pLysS	pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	4h, 37°C
2877	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 ohne His	-	/
2878	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 ohne His	-	/
2914	XL1-blue	pET-24a(+) RCAR3 ohne His	+	3h, 37°C
2915	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR3 ohne His	-	/
2916	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR3 ohne His	+	5h, 37°C
2917	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR3 ohne H	-	/
2918	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR3 ohne H	+	5h, 37°C
2919	XL1-blue	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His	+	3h, 37°C
2920	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His	+	3h, 37°C
2921	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His	+	3h, 37°C
2922	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His	+	4h, 37°C
2923	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His	+	4h, 37°C
2924	XL1-blue	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His	+	4h, 37°C
2925	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His	+	4h, 37°C
2926	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His	+	4h, 37°C
2927	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His	+	4h, 37°C

Anhang

#	Stamm	Konstrukt	Expr.	Bedingungen
2928	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 + pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His	+	4h, 37°C
2929	XL1-blue	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC (AS 1-411)	-	/
2930	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2931	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2932	XL1-blue	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC (AS 52-411)	+	2h, 37°C
2933	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	2h, 37°C
2934	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	3h, 37°C
2935	XL1-blue	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC (AS 89-411)	+	2h, 37°C
2936	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	+	4h, 37°C
2937	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	++	2h, 37°C
2938	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2939	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2940	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2941	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2942	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR3 ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2943	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR3 ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN0 dC	-	/
2944	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	4h, 37°C
2945	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	4h, 37°C
2946	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	3h, 37°C
2947	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	3h, 37°C
2948	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR3 ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	6h, 37°C
2949	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR3 ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	+	5h, 37°C
2950	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	+	3h, 37°C
2951	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	++	5h, 37°C
2952	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	+	3h, 37°C
2953	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	++	2h, 37°C
2954	BL21(DE3)	pET-24a(+) RCAR3 ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	+	3h, 37°C
2955	Rosetta pLysS	pET-24a(+) RCAR3 ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC	+	4h, 37°C
2956	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC + pET-24a(+) RCAR11	-	/
2957	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC + pET-24a(+) RCAR11	-	/

#	Stamm	Konstrukt	Expr.	Bedingungen
2958	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) RCAR11	-	/
2959	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) RCAR11	+	6h, 37°C
2960	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) RCAR11	+	3h, 37°C
2961	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) RCAR11	+	3h, 37°C
2962	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC + pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	4h, 37°C
2963	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC + pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	3h, 37°C
2964	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	5h, 37°C
2965	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	4h, 37°C
2966	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	5h, 37°C
2967	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) Bet v1 ohne His	+	4h, 37°C
3032	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His	-	/
3033	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His	+	3h, 37°C
3034	BL21(DE3)	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His	+	4h, 37°C
3035	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN0 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His	-	/
3036	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His	-	/
3037	Rosetta pLysS	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His	+	2h, 37°C
3038	M15 [pREP4]	pQE-70 Fra a1	++	4h, 37°C
3039	M15 [pREP4]	pQE-70 Fra a2	+	3h, 37°C
3040	M15 [pREP4]	pQE-70 Fra a3	++	4h, 37°C
3089	Arctic RIL	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC	n.g.	/
3090	Arctic RIL	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC		/
3091	Arctic RIL	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His		/
3092	Arctic RIL	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) RCAR11 ohne His		/
3093	Arctic RIL	pET-21a(+) ABI2 dN1 dC + pET-24a(+) RCAR11		/
3094	Arctic RIL	pET-21a(+) ABI2 dN2 dC + pET-24a(+) RCAR11		/
3095	Arctic RIL	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC		/
3096	Arctic RIL	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN1 dC		/
3097	Arctic RIL	pET-24a(+) RCAR11 dN1 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC		/
3098	Arctic RIL	pET-24a(+) RCAR11 dN2 dC ohne His + pET-21a(+) ABI2 dN2 dC		/

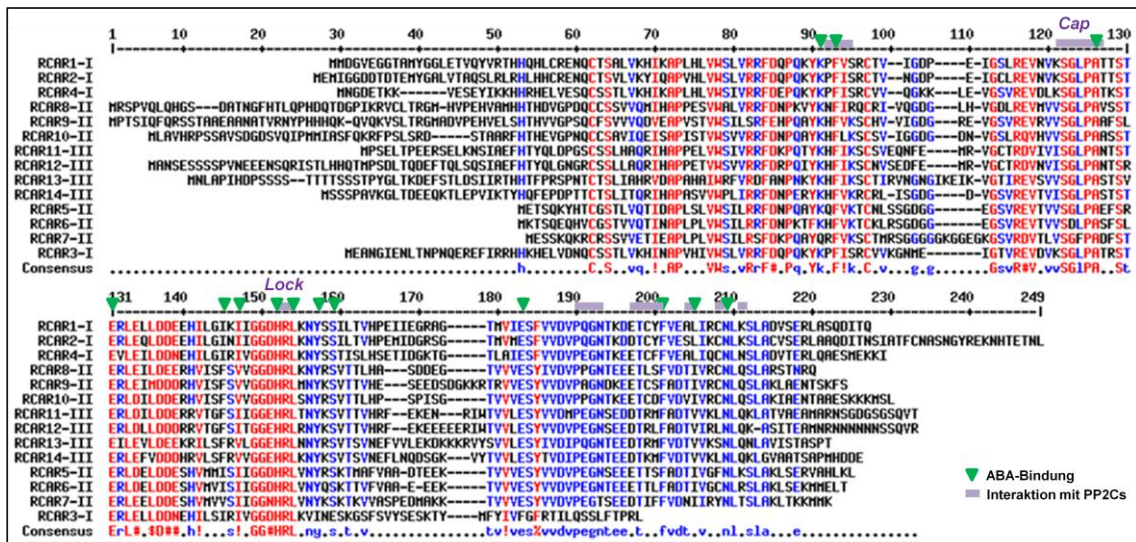
#	Stamm	Konstrukt	Expr.	Bedingungen
2745	M15 pREP4	pQE-30 ev		angepasst an jeweilige Protein-Expression
2746	BL21(DE3)	pQE-30 ev		
2747	Rosetta pLYS	pQE-30 ev		
2748	M15 pREP4	pQE-30 His6 TEV ev		
2749	BL21(DE3)	pQE-30 His6 TEV ev		
2750	Rosetta pLYS	pQE-30 His6 TEV ev		
2751	M15 pREP4	pQE-70 ev		
2752	BL21(DE3)	pQE-70 ev		
2753	Rosetta pLYS	pQE-70 ev		
2754	M15 pREP4	pET-21a(+) ev		
2755	BL21(DE3)	pET-21a(+) ev		
2756	Rosetta pLYS	pET-21a(+) ev		
2757	BL21(DE3)	pET-24a(+) ev		
2758	Rosetta pLYS	pET-24a(+) ev		
3933	M15 pREP4	pQE-70 RCAR7	+	3h, 37°C

5.3. Proteinsequenzen

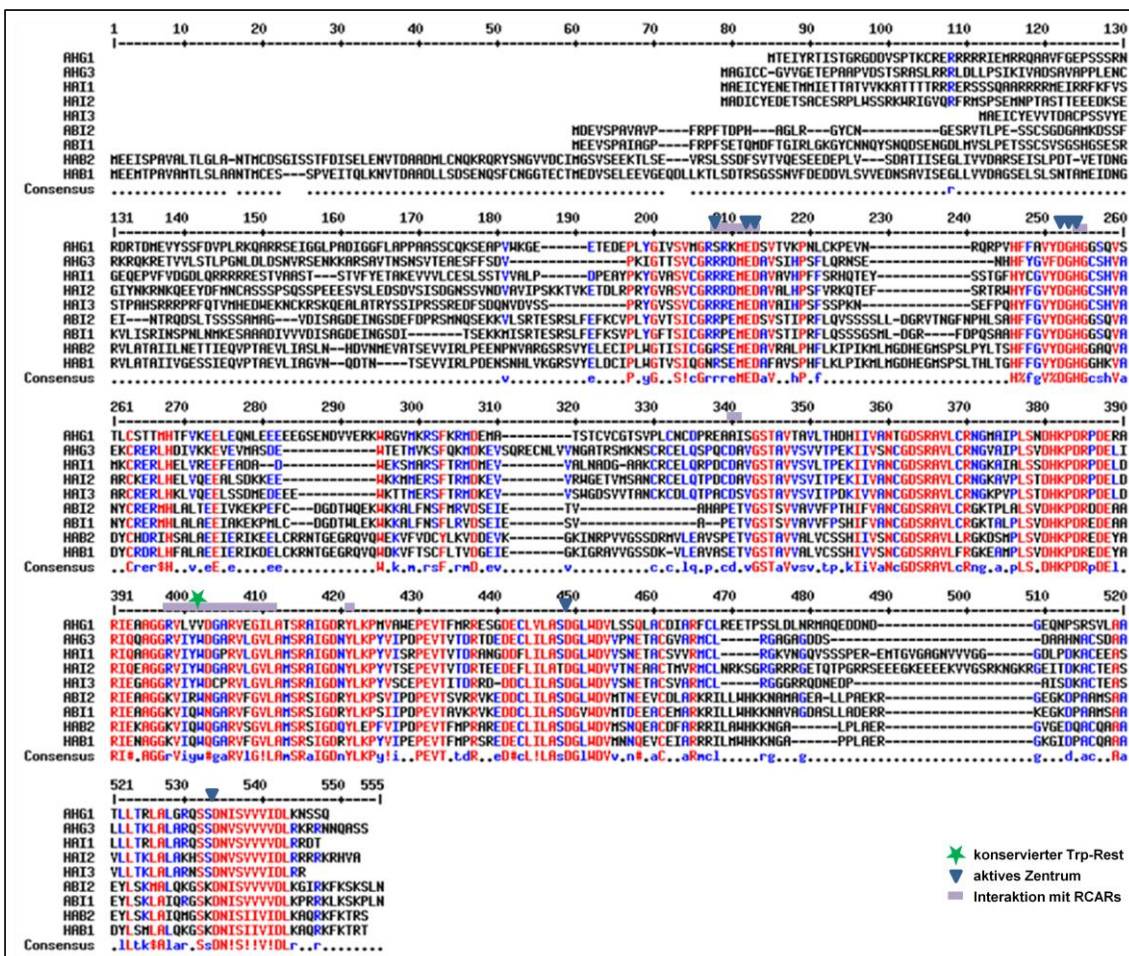
Aminosäuresequenzen verwendeter Proteine

Sequenzabgleiche mit Consensus-Sequenz (MultAlin-Programm); Bereiche hoher Homologie sind rot, Bereiche mit geringer Homologie blau gekennzeichnet.

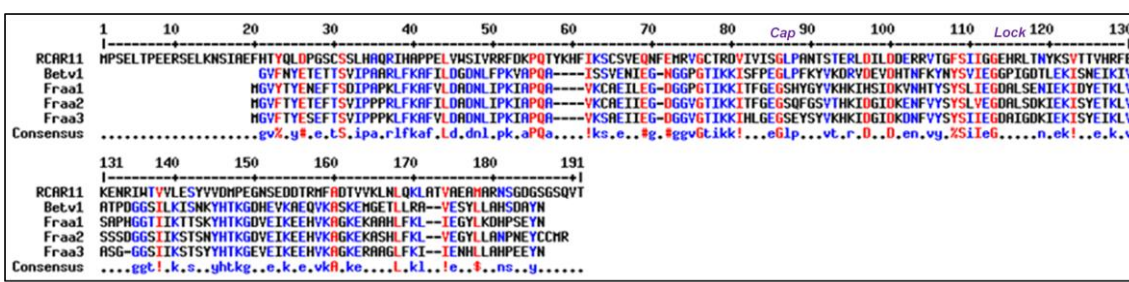
RCARs



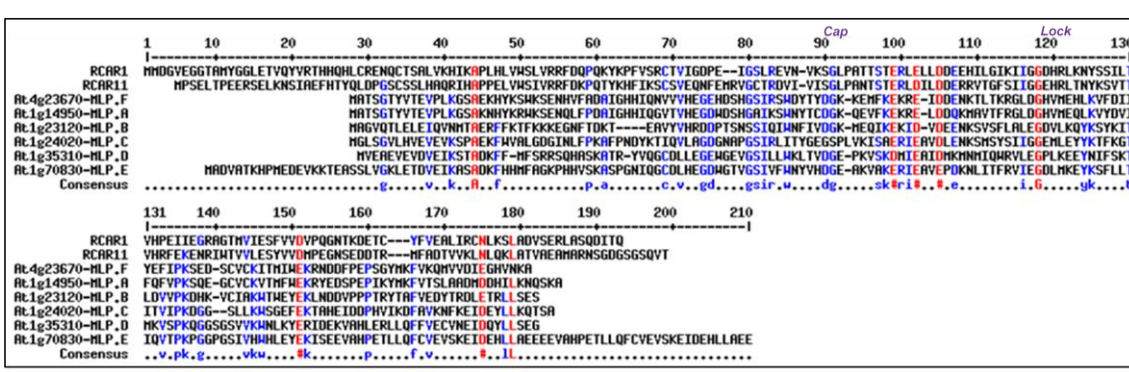
PP2Cs der Subgruppe A



RCAR11, Bet v 1, Fra a 1-3



RCARs und MLPs



6. Literatur

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15, 63-78.
- Abel, S., & Theologis, A. (1998). Transient gene expression in protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol* 82, 209-217.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., & Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311, 91-94.
- Acharya, B., & Assmann, S. (2009). Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology* 69, 451-462.
- Addicott, F.T., Lyon, J.L., Ohkuma, K., Thiessen, W.E., Carns, H.R., Smith, O.E., Cornforth, J.W., Milborrow, B.V., Ryback, G., & Wareing, P.F. (1968). Abscisic Acid: A New Name for Abscisin II (Dormin). *Science* 159, 1493-.
- Adie, B.A., Perez-Perez, J., Perez-Perez, M.M., Godoy, M., Sanchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A., & Solano, R. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 1665-1681.
- Allen, G.J., Kuchitsu, K., Chu, S.P., Murata, Y., & Schroeder, J.I. (1999). Arabidopsis *abi1-1* and *abi2-1* Phosphatase Mutations Reduce Abscisic Acid-Induced Cytoplasmic Calcium Rises in Guard Cells. *Plant Cell* 11, 1785-1798.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Schumacher, K., Shimazaki, C.T., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., Tsien, R.Y., Harper, J.F., et al. (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis *det3* mutant. *Science* 289, 2338-2342.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., & Schroeder, J.I. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053-1057.
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., & Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 3460-3479.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* 285, 1256-1258.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A., & Chan, R.L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* 12, 419-426.
- Armstrong, F., Leung, J., Grabov, A., Brearley, J., Giraudat, J., & Blatt, M.R. (1995). Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant Arabidopsis gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9520-9524.
- Bais, H.P., Vepachedu, R., Lawrence, C.B., Stermitz, F.R., & Vivanco, J.M. (2003). Molecular and biochemical characterization of an enzyme responsible for the formation of hypericin in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *J Biol Chem* 278, 32413-32422.
- Barrero, J.M., Piqueras, P., Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., Rodriguez, P.L., Ponce, M.R., & Micol, J.L. (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of Arabidopsis thaliana highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* 56, 2071-2083.
- Bassaganya-Riera, J., Skoneczka, J., Kingston, D.G., Krishnan, A., Misyak, S.A., Guri, A.J., Pereira, A., Carter, A.B., Minorsky, P., Tumarkin, R., et al. (2010). Mechanisms of action and medicinal applications of abscisic Acid. *Curr Med Chem* 17, 467-478.
- Batistic, O., & Kudla, J. (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* 219, 915-924.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Bäurle, I., & Dean, C. (2006). The timing of development transitions in plants. *Cell* 125, 655-664.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., & Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12, 1103-1115.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sciences* 316, 1194-1199.

- Bergmann, D.C., & Sack, F.D.** (2007). Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* 58, 163-181.
- Berkner, H., Schweimer, K., Matecko, I., & Rosch, P.** (2008). Conformation, catalytic site, and enzymatic mechanism of the PR10 allergen-related enzyme norcochlorogenic acid synthase. *Biochem J* 413, 281-290.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., & Hannon, G.J.** (2001a). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bernstein, E., Denli, A.M., & Hannon, G.J.** (2001b). The rest is silence. *Rna* 7, 1509-1521.
- Bertauche, N., Leung, J., & Giraudat, J.** (1996). Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 241, 193-200.
- Birnboim, H.C., & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., & Apse, M.P.** (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* 1465, 140-151.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., & Lauriere, C.** (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279, 41758-41766.
- Bourdineaud, J.P., Nehme, B., Tesse, S., & Lonvaud-Funel, A.** (2003). The ftsH gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl Environ Microbiol* 69, 2512-2520.
- Brault, M., Amiar, Z., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Zhang, Z., Cornel, D., Dellis, O., Knight, H., Bouteau, F., & Rona, J.P.** (2004). Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. *Plant Physiol* 135, 231-243.
- Breyne, P., De Loose, M., Dedonder, A., Van Montagu, M., & Depicker, A.** (1993). Quantitative Kinetic Analysis of β -Glucuronidase Activities Using a Computer-Directed Microtiter Plate Reader. *Plant Molecular Biology Reporter* 11, 21-31.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., & Neill, S.J.** (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* 45, 113-122.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A., & Masmoudi, K.** (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNHx1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J Exp Bot* 58, 301-308.
- Brocard-Gifford, I., Lynch, T.J., Garcia, M.E., Malhotra, B., & Finkelstein, R.R.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* 16, 406-421.
- Brock, A.K., Willmann, R., Kolb, D., Grefen, L., Lajunen, H.M., Bethke, G., Lee, J., Nurnberger, T., & Gust, A.A.** (2010). The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. *Plant Physiol* 153, 1098-1111.
- Brummell, D.A., Balint-Kurti, P.J., Harpster, M.H., Palys, J.M., Oeller, P.W., & Gutterson, N.** (2003). Inverted repeat of a heterologous 3'-untranslated region for high-efficiency, high-throughput gene silencing. *Plant J* 33, 793-800.
- Bruzzo, S., Moreschi, I., Usai, C., Guida, L., Damonte, G., Salis, A., Scarfi, S., Millo, E., De Flora, A., & Zocchi, E.** (2007). Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5759-5764.
- Chen, J., Burke, J.J., Velten, J., & Xin, Z.** (2006). FtsH11 protease plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant J* 48, 73-84.
- Chen, J.Y., & Dai, X.F.** (2009). Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 231, 861-873.
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., et al.** (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14, 2723-2743.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., & Luan, S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J* 52, 223-239.

- Cherel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H., & Thibaud, J.B.** (2002). Physical and functional interaction of the Arabidopsis K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* 14, 1133-1146.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., & Fields, S.** (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9578-9582.
- Chini, A., Boter, M., & Solano, R.** (2009). Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *Febs J* 276, 4682-4692.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., & Zhu, J.K.** (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55, 225-236.
- Choi, H.I., Park, H.J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.Y., Seo, H.H., Kim, Y.W., Hwang, I., & Kim, S.Y.** (2005). Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol* 139, 1750-1761.
- Chory, J., & Wu, D.** (2001). Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiol* 125, 77-80.
- Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E., & Müller, A.** (2005). Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol* 137, 209-219.
- Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A., Yang, Y., Tang, Y., & Grill, E.** (2006). Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)* 8, 314-325.
- Christmann, A., Weiler, E.W., Steudle, E., & Grill, E.** (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* 52, 167-174.
- Christmann, A., & Grill, E.** (2009). Are GTGs ABA's biggest fans? *Cell* 136, 21-23.
- Clipstone, N.A., Fiorentino, D.F., & Crabtree, G.R.** (1994). Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J Biol Chem* 269, 26431-26437.
- Clough, S.J., & Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Coaker, G., Falick, A., & Staskawicz, B.** (2005). Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* 308, 548-550.
- Cohen, P.** (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58, 453-508.
- Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S., & McCourt, P.** (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Science* 273, 1239-1241.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., & Barford, D.** (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *Embo J* 15, 6798-6809.
- Davenport, R.J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., & Tester, M.** (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 30, 497-507.
- De Smet, I., Zhang, H., Inze, D., & Beeckman, T.** (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci* 11, 434-439.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bogre, L., & Grant, M.** (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo J* 26, 1434-1443.
- Demidchik, V., Davenport, R.J., & Tester, M.** (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53, 67-107.
- Demidchik, V., Essah, P.A., & Tester, M.** (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of Arabidopsis root cells. *Planta* 219, 167-175.
- Deuring, E., Mogk, A., Richter, C., Purucker, M., & Schumann, W.** (1997). The ftsH gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. *Mol Microbiol* 23, 921-933.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441-445.
- Di Padova, F.E.** (1994). Pharmacology of CsA and FK-506. *Persp Drug Discov Design* 2, 49-56.
- Dietrich, P., Sanders, D., & Hedrich, R.** (2001). The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *J Exp Bot* 52, 1959-1967.
- Dietz, K.J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D., & Hartung, W.** (2000). Extracellular beta-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J Exp Bot* 51, 937-944.

- Douchkov, D., Nowara, D., Zierold, U., & Schweizer, P.** (2005). A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 755-761.
- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A., & Waterhouse, P.M.** (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol* 147, 456-468.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F.** (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci* 61, 1401-1426.
- Endo, A., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Nambara, E.** (2008). Vascular system is a node of systemic stress responses: Competence of the cell to synthesize abscisic acid and its responsiveness to external cues. *Plant Signal Behav* 3, 1138-1140.
- Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., & Knight, M.R.** (2005). ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response. *Plant J* 41, 615-626.
- Fairbanks, G., Steck, T.L., & Wallach, D.F.** (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Fan, L.M., Zhao, Z., & Assmann, S.M.** (2004). Guard cells: a dynamic signaling model. *Curr Opin Plant Biol* 7, 537-546.
- Fernandes, H., Pasternak, O., Bujacz, G., Bujacz, A., Sikorski, M.M., & Jaskolski, M.** (2008). *Lupinus luteus* pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. *J Mol Biol* 378, 1040-1051.
- Fernandes, H., Bujacz, A., Bujacz, G., Jelen, F., Jasinski, M., Kachlicki, P., Otlewski, J., Sikorski, M.M., & Jaskolski, M.** (2009). Cytokinin-induced structural adaptability of a *Lupinus luteus* PR-10 protein. *Febs J* 276, 1596-1609.
- Fernandez, A.I., Viron, N., Alhagdow, M., Karimi, M., Jones, M., Amsellem, Z., Sicard, A., Czerednik, A., Angenent, G., Grierson, D., et al.** (2009). Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol* 151, 1729-1740.
- Ferrando, A., Farras, R., Jasik, J., Schell, J., & Koncz, C.** (2000). Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *The Plant Journal* 22, 553-560.
- Fields, S., & Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Finkelstein, R., Gampala, S.S., Lynch, T.J., Thomas, T.L., & Rock, C.D.** (2005). Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. *Plant Mol Biol* 59, 253-267.
- Finkelstein, R.R.** (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* 5, 765-771.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., & Rock, C.D.** (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 Suppl, S15-45.
- Finkelstein, R.R.** (2006). Studies of abscisic acid perception finally flower. *Plant Cell* 18, 786-791.
- Fischer, B., Rummel, G., Aldridge, P., & Jenal, U.** (2002). The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 44, 461-478.
- Franz, S., Ehlert, B., Liese, A., Kurth, J., Cazale, A.C., & Romeis, T.** (2010). Calcium-Dependent Protein Kinase CPK21 Functions in Abiotic Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*.
- Fricke, W.** (2004). Rapid and tissue-specific accumulation of solutes in the growth zone of barley leaves in response to salinity. *Planta* 219, 515-525.
- Fu, D., Uauy, C., Distelfeld, A., Blechl, A., Epstein, L., Chen, X., Sela, H., Fahima, T., & Dubcovsky, J.** (2009). A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323, 1357-1360.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., et al.** (2007). *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* 19, 1617-1634.
- Fujii, H., Verslues, P.E., & Zhu, J.K.** (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 485-494.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., & Zhu, J.K.** (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462, 660-664.

- Fujii, H., & Zhu, J.K. (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8380-8385.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9, 436-442.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., et al. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 50, 2123-2132.
- Fukano, H., Hayatsu, N., Goto, R., & Suzuki, Y. (2006). A technique to enzymatically construct libraries which express short hairpin RNA of arbitrary stem length. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 543-550.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Gaedeke, N., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Forestier, C., Muller, A., Ansoerge, M., Becker, D., Mamnun, Y., Kuchler, K., Schulz, B., et al. (2001). The Arabidopsis thaliana ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *Embo J* 20, 1875-1887.
- Gagne, J.M., Song, S.K., & Clark, S.E. (2008). POLTERGEIST and PLL1 are required for stem cell function with potential roles in cell asymmetry and auxin signaling. *Commun Integr Biol* 1, 53-55.
- Gagne, J.M., & Clark, S.E. (2010). The Arabidopsis stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *Plant Cell* 22, 729-743.
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F., Ipsen, H., Larsen, J., Joost van Neerven, R., Schou, C., Lowenstein, H., & Spangfort, M. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* 3, 1040 - 1045.
- Galat, A. (2003). Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem* 3, 1315-1347.
- Gao, Y., Zeng, Q., Guo, J., Cheng, J., Ellis, B.E., & Chen, J.-G. (2007). Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis. *The Plant Journal* 52, 1001-1013.
- Garcia-Lorenzo, M., Sjodin, A., Jansson, S., & Funk, C. (2006). Protease gene families in Populus and Arabidopsis. *BMC Plant Biol* 6, 30.
- Gaussorgues (1994). Infrared Thermography.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., & Fink, G.R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11444-11449.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., et al. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21425-21430.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., et al. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8023-8028.
- Gibala, M., Kicia, M., Sakamoto, W., Gola, E.M., Kubrakiewicz, J., Smakowska, E., & Janska, H. (2009). The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod. *Plant J* 59, 685-699.
- Gietz, R.D., & Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Gietz, R.D., & Woods, R.A. (2006). Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* 313, 107-120.
- Gomez-Cadenas, A., Verhey, S.D., Holappa, L.D., Shen, Q., Ho, T.H., & Walker-Simmons, M.K. (1999). An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1767-1772.
- Gonzalez-Guzman, M., Apostolova, N., Belles, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., Serrano, R., & Rodriguez, P.L. (2002). The short-chain alcohol

- dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14, 1833-1846.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A., Vartanian, N., & Giraudat, J.** (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11, 1897-1910.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271-276.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K., & Navia, M.A.** (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82, 507-522.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.P., Gong, D., Halfter, U., & Zhu, J.K.** (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Dev Cell* 3, 233-244.
- Halfter, U., Ishitani, M., & Zhu, J.K.** (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3735-3740.
- Hamilton, D.W., Hills, A., Kohler, B., & Blatt, M.R.** (2000). Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4967-4972.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G.J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., & Hannon, G.J.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150.
- Hartweck, L.M.** (2008). Gibberellin signaling. *Planta* 229, 1-13.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., & Bohnert, H.J.** (2000). Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51, 463-499.
- Hashimoto, Y., Ino, T., Kramer, P.J., Naylor, A.W., & Strain, B.R.** (1984). Dynamic analysis of water stress of sunflower leaves by means of a thermal image processing system. *Plant Physiol* 76, 266-269.
- Hattori, T., Totsuka, M., Hobo, T., Kagaya, Y., & Yamamoto-Toyoda, A.** (2002). Experimentally Determined Sequence Requirement of ACGT-Containing Abscisic Acid Response Element. *Plant Cell Physiol* 43, 136-140.
- Hayashi, S., Gresshoff, P.M., & Kinkema, M.** (2008). Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 843-853.
- Himmelbach, A., Iten, M., & Grill, E.** (1998). Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 1439-1444.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B., & Grill, E.** (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *Embo J* 21, 3029-3038.
- Hirai, N., Yoshida, R., Todoroki, Y., & Ohigashi, H.** (2000). Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 1448-1458.
- Ho, S., Clipstone, N., Timmermann, L., Northrop, J., Graef, I., Fiorentino, D., Nourse, J., & Crabtree, G.R.** (1996). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 80, S40-45.
- Hoffmann, T.** (2002). Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem (München, Technische Universität).
- Hoffmann, T., Kalinowski, G., & Schwab, W.** (2006). RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J* 48, 818-826.
- Holbrook, N.M., Shashidhar, V.R., James, R.A., & Munns, R.** (2002). Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *J Exp Bot* 53, 1503-1514.
- Hope, I.A., & Struhl, K.** (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46, 885-894.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., et al.** (2003). The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5549-5554.

- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.P., Hanafey, M.K., Tingey, S.V., & Chua, N.H. (2002). Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci* 115, 4891-4900.
- Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., & Munns, R. (2008). Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *J Exp Bot* 59, 927-937.
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D., & Schroeder, J.I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* 24, 1695-1708.
- Hugouvieux, V., Kwak, J.M., & Schroeder, J.I. (2001). An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* 106, 477-487.
- Hurkman, W.J., & Tanaka, C.K. (1987). The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol* 83, 517-524.
- Ilari, A., Franceschini, S., Bonamore, A., Arengi, F., Botta, B., Macone, A., Pasquo, A., Bellucci, L., & Boffi, A. (2009). Structural basis of enzymatic (S)-norcochlorogenic acid biosynthesis. *J Biol Chem* 284, 897-904.
- Inan, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T.M., Goodwin, S.M., Zhu, J., *et al.* (2004). Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol* 135, 1718-1737.
- Ingle, R.A., Schmidt, U.G., Farrant, J.M., Thomson, J.A., & Mundree, S.G. (2007). Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Plant Cell Environ* 30, 435-446.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhu, J.K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* 9, 1935-1949.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W., & Zhu, J.K. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12, 1667-1678.
- Israelsson, M., Siegel, R.S., Young, J., Hashimoto, M., Iba, K., & Schroeder, J.I. (2006). Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Curr Opin Plant Biol* 9, 654-663.
- Iten, M., Hoffmann, T., & Grill, E. (1999). Receptors and signalling components of plant hormones. *J Recept Signal Transduct Res* 19, 41-58.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., & Aravind, L. (2001). Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins* 43, 134-144.
- Jadhav, A.S., Taylor, D.C., Giblin, M., Ferrie, A.M.R., Ambrose, S.J., Ross, A.R.S., Nelson, K.M., Irina Zaharia, L., Sharma, N., Anderson, M., *et al.* (2008). Hormonal regulation of oil accumulation in *Brassica* seeds: Metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'- and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of *B. napus*. *Phytochemistry* 69, 2678-2688.
- Jain, S., Srivastava, S., Sarin, N.B., & Kav, N.N. (2006). Proteomics reveals elevated levels of PR 10 proteins in saline-tolerant peanut (*Arachis hypogaea*) calli. *Plant Physiol Biochem* 44, 253-259.
- James, P., Halladay, J., & Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R., Sritubtim, S., *et al.* (2009). MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20520-20525.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., & Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* 6, 3901-3907.
- Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D., & Walker-Simmons, M.K. (2002). The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* 130, 837-846.
- Johnston, C.A., Temple, B.R., Chen, J.G., Gao, Y., Moriyama, E.N., Jones, A.M., Siderovski, D.P., & Willard, F.S. (2007). Comment on "A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid". *Science* 318, 914; author reply 914.
- Jones, H.G., Stoll, M., Santos, T., de Sousa, C., Chaves, M.M., & Grant, O.M. (2002). Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *J Exp Bot* 53, 2249-2260.

- Kaliff, M., Staal, J., Myrenas, M., & Dixelius, C.** (2007). ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 335-345.
- Kang, C.B., Hong, Y., Dhe-Paganon, S., & Yoon, H.S.** (2008). FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals* 16, 318-325.
- Karley, A.J., Leigh, R.A., & Sanders, D.** (2000). Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends Plant Sci* 5, 465-470.
- Kato, Y., Miura, E., Ido, K., Ifuku, K., & Sakamoto, W.** (2009). The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. *Plant Physiol* 151, 1790-1801.
- Keegan, L., Gill, G., & Ptashne, M.** (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-704.
- Kepinski, S.** (2007). The anatomy of auxin perception. *Bioessays* 29, 953-956.
- Kim, K.-N., Cheong, Y.H., Grant, J.J., Pandey, G.K., & Luan, S.** (2003). CIPK3, a Calcium Sensor-Associated Protein Kinase That Regulates Abscisic Acid and Cold Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 411-423.
- Kim, T.H., Bohmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J.I.** (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61, 561-591.
- Kimbrough, J.M., Salinas-Mondragon, R., Boss, W.F., Brown, C.S., & Sederoff, H.W.** (2004). The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Physiol* 136, 2790-2805.
- Kissinger, C.R., Parge, H.E., Knighton, D.R., Lewis, C.T., Pelletier, L.A., Tempczyk, A., Kalish, V.J., Tucker, K.D., Showalter, R.E., Moomaw, E.W., et al.** (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378, 641-644.
- Klein, M., Perfus-Barbeoch, L., Frelet, A., Gaeddeke, N., Reinhardt, D., Mueller-Roeber, B., Martinoia, E., & Forestier, C.** (2003). The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *Plant J* 33, 119-129.
- Klingler, J.P., Batelli, G., & Zhu, J.K.** (2010). ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot*.
- Klusener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V., & Schroeder, J.I.** (2002). Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiol* 130, 2152-2163.
- Knight, H., Trewavas, A.J., & Knight, M.R.** (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12, 1067-1078.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., & Yoshioka, H.** (2007). Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19, 1065-1080.
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., & Hattori, T.** (2005). Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J* 44, 939-949.
- Koistinen, K.M., Soininen, P., Venalainen, T.A., Hayrinen, J., Laatikainen, R., Perakyla, M., Tervahauta, A.I., & Karenlampi, S.O.** (2005). Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry* 66, 2524-2533.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., & Koshiba, T.** (2004). Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134, 1697-1707.
- Koncz, C., & Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* 204, 383-396.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C., & Karssen, C.M.** (1982). The isolation of abscisic acid deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 61, 385-393.
- Koornneef, M., Reuling, G., & Karssen, C.M.** (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 61, 377-383.
- Korte, A.** (2009). Identifizierung und Charakterisierung des Abscisinsäure-Responsregulators GCA2 in *Arabidopsis thaliana* (München, Technische Universität).
- Kranner, I., Kastberger, G., Hartbauer, M., & Pritchard, H.W.** (2010). Noninvasive diagnosis of seed viability using infrared thermography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3912-3917.

- Kuhn, J.M., Boisson-Dernier, A., Dizon, M.B., Maktabi, M.H., & Schroeder, J.I. (2006). The Protein Phosphatase AtPP2CA Negatively Regulates Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis, and Effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol* 140, 127-139.
- Kuhn, J.M., Breton, G., & Schroeder, J.I. (2007). mRNA metabolism of flowering-time regulators in wild-type Arabidopsis revealed by a nuclear cap binding protein mutant, *abh1*. *Plant J* 50, 1049-1062.
- Kumari, S., Singh, P., Singla-Pareek, S.L., & Pareek, A. (2009). Heterologous expression of a salinity and developmentally regulated rice cyclophilin gene (*OsCyp2*) in *E. coli* and *S. cerevisiae* confers tolerance towards multiple abiotic stresses. *Mol Biotechnol* 42, 195-204.
- Kung, C. (2005). A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436, 647-654.
- Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., & Schroeder, J.I. (2001). Dominant negative guard cell K⁺ channel mutants reduce inward-rectifying K⁺ currents and light-induced stomatal opening in Arabidopsis. *Plant Physiol* 127, 473-485.
- Kwak, J.M., Moon, J.H., Murata, Y., Kuchitsu, K., Leonhardt, N., DeLong, A., & Schroeder, J.I. (2002). Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 2849-2861.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D., & Schroeder, J.I. (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *Embo J* 22, 2623-2633.
- Lavigne, P., Najmanivich, R., & Lehoux, J.G. (2010). Mammalian StAR-related lipid transfer (START) domains with specificity for cholesterol: structural conservation and mechanism of reversible binding. *Subcell Biochem* 51, 425-437.
- Lebaudy, A., Very, A.A., & Sentenac, H. (2007). K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett* 581, 2357-2366.
- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., & Lee, I.J. (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126, 1109-1120.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., & Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21419-21424.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Hua, B.G., Fromm, H., & Berkowitz, G.A. (2002). Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol* 128, 400-410.
- Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., & Schroeder, J.I. (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16, 596-615.
- Leube, M.P., Grill, E., & Amrhein, N. (1998). ABI1 of Arabidopsis is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Lett* 424, 100-104.
- Leung, J., Merlot, S., & Giraudat, J. (1997). The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (*ABI2*) and *ABI1* Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. *Plant Cell* 9, 759-771.
- Leung, J., & Giraudat, J. (1998). Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 199-222.
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., & Hedrich, R. (2005). Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4203-4208.
- Li, J., Wang, X.Q., Watson, M.B., & Assmann, S.M. (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287, 300-303.
- Li, L., Xu, J., Xu, Z.H., & Xue, H.W. (2005). Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in Brassica and Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2738-2753.
- Li, M., Hong, Y., & Wang, X. (2009). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta* 1791, 927-935.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., & Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400, 271-274.
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K.S., Pardo, J.M., & Guo, Y. (2009). Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by

- SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 1607-1619.
- Linsmaier, E.M., & Skoog, F.** (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 18, 100-127.
- Liscombe, D.K., MacLeod, B.P., Loukanina, N., Nandi, O.I., & Facchini, P.J.** (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* 66, 2501-2520.
- Liu, H., & Stone, S.L.** (2010). Abscisic Acid Increases Arabidopsis ABI5 Transcription Factor Levels by Promoting KEG E3 Ligase Self-Ubiquitination and Proteasomal Degradation. *Plant Cell*.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S., & Zhu, J.K.** (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3730-3734.
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K., Piggott, N., & Zamani, A.** (2005). Molecular cloning of a pathogen/wound-inducible PR10 promoter from *Pinus monticola* and characterization in transgenic Arabidopsis plants. *Planta* 221, 159-169.
- Liu, J.X., Srivastava, R., & Howell, S.H.** (2008). Stress-induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 31, 1735-1743.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.H., & Ma, L.** (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315, 1712-1716.
- Liu, Z.B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G., & Guilfoyle, T.J.** (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* 6, 645-657.
- Locy, R.D., Chang, C.C., Nielsen, B.L., & Singh, N.K.** (1996). Photosynthesis in Salt-Adapted Heterotrophic Tobacco Cells and Regenerated Plants. *Plant Physiol* 110, 321-328.
- Lopez-Molina, L., & Chua, N.H.** (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 41, 541-547.
- Lu, C., & Fedoroff, N.** (2000). A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* 12, 2351-2366.
- Luan, S.** (2003). Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54, 63-92.
- Luehrsen, K.R., de Wet, J.R., & Walbot, V.** (1992). Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol* 216, 397-414.
- Lytle, B.L., Song, J., de la Cruz, N.B., Peterson, F.C., Johnson, K.A., Bingman, C.A., Phillips, G.N., Jr., & Volkman, B.F.** (2009). Structures of two Arabidopsis thaliana major latex proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins* 76, 237-243.
- Ma, J., & Ptashne, M.** (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* 48, 847-853.
- Ma, J., & Ptashne, M.** (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55, 443-446.
- Ma, S.Y., & Wu, W.H.** (2007). AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. *Plant Mol Biol* 65, 511-518.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064-1068.
- MacRobbie, E.A.** (2006a). Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1135-1140.
- MacRobbie, E.A.** (2006b). Control of volume and turgor in stomatal guard cells. *J Membr Biol* 210, 131-142.
- Markovic-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O., & Breiteneder, H.** (2003). Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 325, 123-133.
- Martin, M.L., & Busconi, L.** (2001). A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiol* 125, 1442-1449.
- Mattila, K., & Renkonen, R.** (2009). Modelling of Bet v 1 binding to lipids. *Scand J Immunol* 70, 116-124.
- McGinnis, K., Chandler, V., Cone, K., Kaeppler, H., Kaeppler, S., Kerschen, A., Pikaard, C., Richards, E., Sidorenko, L., Smith, T., et al.** (2005). Transgene-induced RNA interference as a tool for plant functional genomics. *Methods Enzymol* 392, 1-24.

- Meinhard, M., Rodriguez, P.L., & Grill, E.** (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* 214, 775-782.
- Meiri, D., & Breiman, A.** (2009). Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs. *Plant J* 59, 387-399.
- Melcher, K., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park, S.Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., et al.** (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462, 602-608.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-980.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., et al.** (2008). A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J* 55, 979-988.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., & Giraudat, J.** (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* 25, 295-303.
- Merlot, S., Mustilli, A.C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A., & Giraudat, J.** (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *Plant J* 30, 601-609.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Muller, A., et al.** (2007). Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *Embo J* 26, 3216-3226.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., & Matzke, A.J.** (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* 19, 5194-5201.
- Meyer, K., Leube, M.P., & Grill, E.** (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Science* 264, 1452-1455.
- Michalska, K., Fernandes, H., Sikorski, M., & Jaskolski, M.** (2009). Crystal structure of Hyp-1, a St. John's wort protein implicated in the biosynthesis of hypericin. *J Struct Biol* 169, 161-171.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33, 453-467.
- Miller, W.L.** (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771, 663-676.
- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J., & Wang, X.** (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in Arabidopsis. *Science* 312, 264-266.
- Miura, K., Lee, J., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Miura, T., & Hasegawa, P.M.** (2009). Sumoylation of ABI5 by the Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5418-5423.
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., et al.** (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462, 609-614.
- Moes, D.** (2006). Signaltransduktion des Phytohormons Abscisinsäure: Rolle der nukleären Lokalisation der Proteinphosphatase ABI1 (München, Technische Universität).
- Moes, D., Himmelbach, A., Korte, A., Haberer, G., & Grill, E.** (2008). Nuclear localization of the mutant protein phosphatase abi1 is required for insensitivity towards ABA responses in Arabidopsis. *Plant J* 54, 806-819.
- Mogensen, J.E., Wimmer, R., Larsen, J.N., Spangfort, M.D., & Otzen, D.E.** (2002). The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J Biol Chem* 277, 23684-23692.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriach, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., et al.** (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* 4, e327.
- Muller, A., Duchting, P., & Weiler, E.W.** (2002). A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to Arabidopsis thaliana. *Planta* 216, 44-56.
- Muller, A.H., & Hansson, M.** (2009). The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol* 150, 157-166.

- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25, 239-250.
- Munns, R., & Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59, 651-681.
- Munoz, C., Hoffmann, T., Escobar, N.M., Ludemann, F., Botella, M.A., Valpuesta, V., & Schwab, W.** (2010). The strawberry fruit fruit as a allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Mol Plant* 3, 113-124.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P., & Hakoshima, T.** (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*. *Nature* 456, 459-463.
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Murata, Y., Pei, Z.M., Mori, I.C., & Schroeder, J.** (2001). Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13, 2513-2523.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., & Giraudat, J.** (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14, 3089-3099.
- Nakamura, S., Lynch, T.J., & Finkelstein, R.R.** (2001). Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant J* 26, 627-635.
- Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol* 42, 657-665.
- Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol* 149, 88-95.
- Nakatsuka, T., Mishiba, K., Kubota, A., Abe, Y., Yamamura, S., Nakamura, N., Tanaka, Y., & Nishihara, M.** (2009). Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *J Plant Physiol* 167, 231-237.
- Nambara, E., Suzuki, M., Abrams, S., McCarty, D.R., Kamiya, Y., & McCourt, P.** (2002). A screen for genes that function in abscisic acid signaling in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 161, 1247-1255.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56, 165-185.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J* 34, 137-148.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., & Iba, K.** (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452, 483-486.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., & Wilson, I.** (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* 59, 165-176.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., & Chory, J.** (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467-475.
- Nessler, C.L., Allen, R.D., & Galewsky, S.** (1985). Identification and characterization of latex-specific proteins in opium poppy. *Plant Physiol* 79, 499-504.
- Nessler, C.L., Kurz, W.G., & Pelcher, L.E.** (1990). Isolation and analysis of the major latex protein genes of opium poppy. *Plant Mol Biol* 15, 951-953.
- Netting, A.G.** (2000). pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. *J Exp Bot* 51, 147-158.
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H., & Rosch, P.** (2001). Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J Biol Chem* 276, 22756-22763.
- Ng, C.K., Carr, K., McAinsh, M.R., Powell, B., & Hetherington, A.M.** (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410, 596-599.
- Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K., & Hirayama, T.** (2005). Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis. *Plant J* 44, 972-984.

- Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K., & Hirayama, T.** (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J* 50, 935-949.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R., Schroeder, J.I., & Getzoff, E.D.** (2009a). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326, 1373-1379.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., et al.** (2009b). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J* 61, 290-299.
- Nixon, P.J., Barker, M., Boehm, M., de Vries, R., & Komenda, J.** (2005). FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J Exp Bot* 56, 357-363.
- Nordin, K., Vahala, T., & Palva, E.T.** (1993). Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* 21, 641-653.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., & Marion-Poll, A.** (2007). The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* 50, 810-824.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., & Hanson, A.D.** (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol* 2, 128-134.
- Nunberg, A.N., Thomas, T.L.** (1993). Transient Analysis of Gene Expression in Plant Cells. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* CRC Press, Boca Raton. Glick, B., Thompson, 147-154.
- Oerke, E.C., Steiner, U., Dehne, H.W., & Lindenthal, M.** (2006). Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J Exp Bot* 57, 2121-2132.
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T., & Smith, O.E.** (1963). Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* 142, 1592-1593.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., & Zhu, J.K.** (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11771-11776.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshihara, T., & Nambara, E.** (2006). CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* 141, 97-107.
- Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S.R., Kamiya, Y., Seki, M., & Nambara, E.** (2009). High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 149, 825-834.
- Osborne, D.J., Jackson, M.B., & Milborrow, B.V.** (1972). Physiological properties of abscission accelerator from senescent leaves. *Nat New Biol* 240, 98-101.
- Osmark, P., Boyle, B., & Brisson, N.** (1998). Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. *Plant Mol Biol* 38, 1243-1246.
- Pandey, S., & Assmann, S.M.** (2004). The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 16, 1616-1632.
- Pandey, S., Zhang, W., & Assmann, S.M.** (2007). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters Plant Transporters and Channels* 581, 2325-2336.
- Pandey, S., Nelson, D.C., & Assmann, S.M.** (2009). Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis. *Cell* 136, 136-148.
- Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y., & Yan, X.** (2010). Comparative proteomics of salt tolerance in Arabidopsis thaliana and Thellungiella halophila. *J Proteome Res* 9, 2584-2599.
- Papp, I., Mur, L.A., Dalmadi, A., Dulai, S., & Koncz, C.** (2004). A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 55, 679-686.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., & Quintero, F.J.** (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot* 57, 1181-1199.
- Pardo, J.M.** (2010). Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotechnol* 21, 185-196.
- Parida, A.K., & Das, A.B.** (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 60, 324-349.

- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., *et al.* (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068-1071.
- Pasternak, O., Bujacz, G.D., Fujimoto, Y., Hashimoto, Y., Jelen, F., Otlewski, J., Sikorski, M.M., & Jaskolski, M. (2006). Crystal structure of *Vigna radiata* cytokinin-specific binding protein in complex with zeatin. *Plant Cell* 18, 2622-2634.
- Pei, Z.M., Ghassemian, M., Kwak, C.M., McCourt, P., & Schroeder, J.I. (1998). Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* 282, 287-290.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., & Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731-734.
- Peiter, E., Maathuis, F.J., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., & Sanders, D. (2005). The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434, 404-408.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., & Harberd, N.P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11, 3194-3205.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.B., & Sentenac, H. (2001). Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J Biol Chem* 276, 3215-3221.
- Plett, D.C., & Moller, I.S. (2010). Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant Cell Environ* 33, 612-626.
- Priest, D.M., Ambrose, S.J., Vaistij, F.E., Elias, L., Higgins, G.S., Ross, A.R., Abrams, S.R., & Bowles, D.J. (2006). Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 46, 492-502.
- Qin, X., & Zeevaart, J.A. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15354-15361.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., & Zhu, J.K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8436-8441.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J.M., & Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *Plant Cell* 19, 1415-1431.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.K., & Pardo, J.M. (2002). Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9061-9066.
- Radauer, C., & Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 120, 518-525.
- Radauer, C., Lackner, P., & Breiteneder, H. (2008). The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology* 8, 286.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.*
- Ramagli, L.S., & Rodriguez, L.V. (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6, 559-563.
- Raskin, I., & Ladyman, J.A.R. (1988). Isolation and characterization of a barley mutant with abscisic-acid-insensitive stomata. *Planta* 173, 73-78.
- Razem, F.A., Luo, M., Liu, J.H., Abrams, S.R., & Hill, R.D. (2004). Purification and characterization of a barley aleurone abscisic acid-binding protein. *J Biol Chem* 279, 9922-9929.
- Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R., & Hill, R.D. (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439, 290-294.
- Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R., & Hill, R.D. (2008). Retraction. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 456, 824.
- Razem, F.A., & Hill, R.D. (2009). Binding assays for abscisic acid receptors. *Methods Mol Biol* 495, 89-99.
- Reyes, D., Rodriguez, D., Gonzalez-Garcia, M.P., Lorenzo, O., Nicolas, G., Garcia-Martinez, J.L., & Nicolas, C. (2006). Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in Arabidopsis shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 141, 1414-1424.

- Reyes, J.L., & Chua, N.H.** (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 49, 592-606.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., & Rich, P.J.** (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes. In *Salinity: Environment - Plants - Molecules*, A. Läuchli, and U. Lüttge, eds. (Boston, N.Y., Kluwer Academic), 181-204.
- Risk, J.M., Macknight, R.C., & Day, C.L.** (2008). FCA does not bind abscisic acid. *Nature* 456, E5-6.
- Risk, J.M., Day, C.L., & Macknight, R.C.** (2009). Reevaluation of Abscisic Acid-Binding Assays Shows That G-Protein-Coupled Receptor2 Does Not Bind Abscisic Acid. *Plant Physiol* 150, 6-11.
- Rodriguez-Navarro, A., & Rubio, F.** (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J Exp Bot* 57, 1149-1160.
- Rodriguez, P.L., Benning, G., & Grill, E.** (1998a). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Lett* 421, 185-190.
- Rodriguez, P.L., Leube, M.P., & Grill, E.** (1998b). Molecular cloning in Arabidopsis thaliana of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol* 38, 879-883.
- Roelfsema, M.R., & Hedrich, R.** (2010). Making sense out of Ca(2+) signals: their role in regulating stomatal movements. *Plant Cell Environ* 33, 305-321.
- Rogers, S., & Bendich, A.** (1994). Extraction of Total Cellular DNA from Plants, Algae and Fungi. In *Plant Molecular Biology Manual* (Dodrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Press).
- Rohde, A., Van Montagu, M., & Boerjan, W.** (1999). The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3* (*ABI3*) gene is expressed during vegetative quiescence processes in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* 22, 261-270.
- Romano, P.G., Horton, P., & Gray, J.E.** (2004). The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol* 134, 1268-1282.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Galle, A., Kim, T.H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I., & Rodriguez, P.L.** (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* 150, 1345-1355.
- Ruiz-Ferrer, V., & Voinnet, O.** (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol* 60, 485-510.
- Ryan, C.A., & Pearce, G.** (2003). Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 2, 14577-14580.
- Saavedra, X., Modrego, A., Rodriguez, D., Gonzalez-Garcia, M.P., Sanz, L., Nicolas, G., & Lorenzo, O.** (2010). The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant Physiol* 152, 133-150.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., & Ptashne, M.** (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M.P., Nicolas, C., Lorenzo, O., & Rodriguez, P.L.** (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* 37, 354-369.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R., & Rodriguez, P.L.** (2006). Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* 141, 1389-1399.
- Saez, A., Rodrigues, A., Santiago, J., Rubio, S., & Rodriguez, P.L.** (2008). HAB1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 2972-2988.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., & Mizutani, M.** (2004). Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol* 134, 1439-1449.
- Sakamoto, W., Tamura, T., Hanba-Tomita, Y., & Murata, M.** (2002). The VAR1 locus of Arabidopsis encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes Cells* 7, 769-780.
- Sakata, Y., Nakamura, I., Taji, T., Tanaka, S., & Quatrano, R.S.** (2010). Regulation of the ABA-responsive Em promoter by ABI3 in the moss *Physcomitrella patens*: Role of the ABA response element and the RY element. *Plant Signal Behav* 5.

- Samanani, N., Liscombe, D.K., & Facchini, P.J.** (2004). Molecular cloning and characterization of norcochlorogenic acid synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloisochlorogenic acid biosynthesis. *Plant J* 40, 302-313.
- Sambrook, J., & Russell, D.W.** (2001). Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press,).
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J.F.** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14 Suppl, S401-417.
- Saneoka, H., Nagasaka, C., Hahn, D.T., Yang, W.J., Premachandra, G.S., Joly, R.J., & Rhodes, D.** (1995). Salt Tolerance of Glycinebetaine-Deficient and -Containing Maize Lines. *Plant Physiol* 107, 631-638.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.Y., Jamin, M., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., & Marquez, J.A.** (2009a). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* 462, 665-668.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.Y., Marquez, J.A., Cutler, S.R., & Rodriguez, P.L.** (2009b). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* 60, 575-588.
- Santner, A., & Estelle, M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459, 1071-1078.
- Santner, A., & Estelle, M.** (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J* 61, 1029-1040.
- Sauter, A., Davies, W.J., & Hartung, W.** (2001). The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J Exp Bot* 52, 1991-1997.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., & Ray, A.** (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci* 7, 487-491.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.J., & Schroeder, J.I.** (1995). Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9535-9539.
- Schroeder, J.I., & Hagiwara, S.** (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9305-9309.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., & Waner, D.** (2001a). Guard Cell Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 627-658.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., & Allen, G.J.** (2001b). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410, 327-330.
- Schroeder, J.I., & Nambara, E.** (2006). A quick release mechanism for abscisic acid. *Cell* 126, 1023-1025.
- Schulze, E.-D., & Hall, A.E.** (1982). Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments (Berlin, Springer).
- Schuster, K.** (2000). Infrarotthermographie (Wiley-VCH).
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., & Weigel, D.** (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 1121-1133.
- Schwartz, S.H., Qin, X., & Zeevaert, J.A.** (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* 276, 25208-25211.
- Schweighofer, A., Hirt, H., & Meskiene, I.** (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* 9, 236-243.
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., Schwanninger, M., Kant, M., Schuurink, R., Mauch, F., et al.** (2007). The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2213-2224.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., et al.** (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31, 279-292.
- Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaert, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y., & Koshida, T.** (2000). The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12908-12913.
- Shabala, S., & Cuin, T.A.** (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant* 133, 651-669.

- Shang, Y., Yan, L., Liu, Z.Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., Wu, F.Q., Wang, X.F., Du, S.Y., Jiang, T., *et al.* (2010). The Mg-Chelatase H Subunit of Arabidopsis Antagonizes a Group of Transcription Repressors to Relieve ABA-Responsive Genes of Inhibition. *Plant Cell*.
- Sharp, R.E., & LeNoble, M.E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot* 53, 33-37.
- Sheen, J. (1996). Ca²⁺-Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants. *Science* 274, 1900-1902.
- Sheen, J. (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 975-980.
- Sheen, J. (2001). Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 127, 1466-1475.
- Shen, Q., Zhang, P., & Ho, T. (1996). Modular Nature of Abscisic Acid (ABA) Response Complexes: Composite Promoter Units That Are Necessary and Sufficient for ABA Induction of Gene Expression in Barley. *Plant Cell* 8, 1107-1119.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.L., Peng, C.C., Yu, X.C., Zhu, S.Y., *et al.* (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443, 823-826.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J.K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6896-6901.
- Shi, H., & Zhu, J.K. (2002). Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 50, 543-550.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J., & Zhu, J.K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat Biotechnol* 21, 81-85.
- Shibata, N., Kagiya, M., Nakagawa, M., Hirano, Y., & Hakoshima, T. (2010). Crystallization of the plant hormone receptors PYL9/RCAR1, PYL5/RCAR8 and PYR1/RCAR11 in the presence of (+)-abscisic acid. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66, 456-459.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., & Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456, 520-523.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* 7, 161-167.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3, 217-223.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6, 410-417.
- Shirane, D., Sugao, K., Namiki, S., Tanabe, M., Iino, M., & Hirose, K. (2004). Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nat Genet* 36, 190-196.
- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N., & Kooter, J.M. (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 11, 436-440.
- Sirichandra, C., Wasilewska, A., Vlad, F., Valon, C., & Leung, J. (2009). The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *J Exp Bot* 60, 1439-1463.
- Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A., & Prymakowska-Bosak, M. (2007). Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta* 227, 245-254.
- Sokolenko, A., Pojidaeva, E., Zinchenko, V., Panichkin, V., Glaser, V.M., Herrmann, R.G., & Shestakov, S.V. (2002). The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 and Arabidopsis thaliana chloroplasts. *Curr Genet* 41, 291-310.
- Sokolovski, S., Hills, A., Gay, R., Garcia-Mata, C., Lamattina, L., & Blatt, M.R. (2005). Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J* 43, 520-529.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Stirnberg, M., Fulda, S., Huckauf, J., Hagemann, M., Kramer, R., & Marin, K. (2007). A membrane-bound FtsH protease is involved in osmoregulation in Synechocystis sp. PCC 6803:

the compatible solute synthesizing enzyme GgpS is one of the targets for proteolysis. *Mol Microbiol* 63, 86-102.

Stone, S.L., Williams, L.A., Farmer, L.M., Vierstra, R.D., & Callis, J. (2006). KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 18, 3415-3428.

Sukharev, S., & Anishkin, A. (2004). Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? *Trends Neurosci* 27, 345-351.

Sun, H., Kim, M.K., Pulla, R.K., Kim, Y.J., & Yang, D.C. (2008). Isolation and expression analysis of a novel major latex-like protein (MLP151) gene from Panax ginseng. *Mol Biol Rep* 37, 2215-2222.

Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J.K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 12, 301-309.

Suzuki, M., Kao, C.Y., & McCarty, D.R. (1997). The Conserved B3 Domain of VIVIPAROUS1 Has a Cooperative DNA Binding Activity. *Plant Cell* 9, 799-807.

Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittenauer, E., Schmid, E., et al. (1995). Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J Biol Chem* 270, 2607-2613.

Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F.F., Christmann, A., & Grill, E. (2010). Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* 61, 25-35.

Tahtiharju, S., & Palva, T. (2001). Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 26, 461-470.

Tajima, H., Iwata, Y., Iwano, M., Takayama, S., & Koizumi, N. (2008). Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 242-247.

Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., & McCarty, D.R. (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* 35, 44-56.

Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., & Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 640-645.

Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot* 91, 503-527.

Travella, S., & Keller, B. (2009). Down-regulation of gene expression by RNA-induced gene silencing. *Methods Mol Biol* 478, 185-199.

Tsujishita, Y., & Hurley, J.H. (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat Struct Biol* 7, 408-414.

Ullah, H., Chen, J.G., Wang, S., & Jones, A.M. (2002). Role of a heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol* 129, 897-907.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963-1971.

Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17588-17593.

Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11632-11637.

Urantowka, A., Knorpp, C., Olczak, T., Kolodziejczak, M., & Janska, H. (2005). Plant mitochondria contain at least two i-AAA-like complexes. *Plant Mol Biol* 59, 239-252.

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., & Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11, 1743-1754.

Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.F., Nishimura, N., Chan, W.Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., et al. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452, 487-491.

- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., & Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170.
- van Loon, L.C., Rep, M., & Pieterse, C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44, 135-162.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J.K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45, 523-539.
- Wan, B., Lin, Y., & Mou, T. (2007). Expression of rice Ca(2+)-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Lett* 581, 1179-1189.
- Wang, H., Liang, X., Wan, Q., Wang, X., & Bi, Y. (2009). Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta* 230, 293-307.
- Wang, H., Liang, X., Huang, J., Zhang, D., Lu, H., Liu, Z., & Bi, Y. (2010). Involvement of Ethylene and Hydrogen Peroxide in Induction of Alternative Respiratory Pathway in Salt-treated *Arabidopsis* Callus. *Plant Cell Physiol*.
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M.B., Huber, S.C., & Clouse, S.D. (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell* 15, 220-235.
- Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D., & Ota, I. (2001). Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* 21, 51-60.
- Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., Frei dit Frey, N., & Leung, J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* 1, 198-217.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., & Sanger, H.L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76, 567-576.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., & Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- Waterhouse, P.M., & Helliwell, C.A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4, 29-38.
- Weisshaar, B., & Jenkins, G.I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* 1, 251-257.
- Weiwad, M., Edlich, F., Kilka, S., Erdmann, F., Jarczowski, F., Dorn, M., Moutty, M.C., & Fischer, G. (2006). Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. *Biochemistry* 45, 15776-15784.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., et al. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27, 581-590.
- Widjaja, I., Lassowskat, I., Bethke, G., Eschen-Lippold, L., Long, H.H., Naumann, K., Dangl, J.L., Scheel, D., & Lee, J. (2010). A protein phosphatase 2C, responsive to the bacterial effector AvrRpm1 but not to the AvrB effector, regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 61, 249-258.
- Wilkinson, S., & Davies, W.J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25, 195-210.
- Wu, F.Q., Xin, Q., Cao, Z., Liu, Z.Q., Du, S.Y., Mei, C., Zhao, C.X., Wang, X.F., Shang, Y., Jiang, T., et al. (2009). The magnesium-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 150, 1940-1954.
- Wu, Y., Sanchez, J.P., Lopez-Molina, L., Himmelbach, A., Grill, E., & Chua, N.H. (2003). The abi1-1 mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. *Plant J* 34, 307-315.
- Xie, X., Wang, Y., Williamson, L., Holroyd, G.H., Tagliavia, C., Murchie, E., Theobald, J., Knight, M.R., Davies, W.J., Leyser, H.M., et al. (2006). The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity. *Curr Biol* 16, 882-887.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., & Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2, E104.
- Xie, Z., & Qi, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta* 1779, 720-724.
- Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D., & Zhu, J.K. (2001a). Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 1, 771-781.

- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., & Zhu, J.K. (2001b). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13, 2063-2083.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Tanaka, Y., Stevenson, B., Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., & Zhu, J.K. (2002). Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10899-10904.
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehrling, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C., & Zhong, Y. (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* 9, 550.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci* 10, 88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57, 781-803.
- Yamamoto, H., Inomata, M., Tsuchiya, S., Nakamura, M., Uchiyama, T., & Oritani, T. (2000). Early biosynthetic pathway to abscisic acid in *Cercospora cruenta*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 2075-2082.
- Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoun, M., Komayama, K., Takenaka, D., Yamashita, A., Nijo, N., Inagawa, K., Morita, N., *et al.* (2008). Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth Res* 98, 589-608.
- Yang, Y. (2003). Signal transduction of abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*: Identification and characterisation of protein interaction partners of ABI2 (Munich, Technical University).
- Yang, Y., Sulpice, R., Himmelbach, A., Meinhard, M., Christmann, A., & Grill, E. (2006). Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6061-6066.
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J., & Yan, N. (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1230-1236.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., & Pardo, J.M. (2002). Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J* 30, 529-539.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol* 38, 1095-1102.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., & Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 43, 1473-1483.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., & Shinozaki, K. (2006a). The Regulatory Domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 Interacts with ABI1 and Integrates Abscisic Acid (ABA) and Osmotic Stress Signals Controlling Stomatal Closure in Arabidopsis. *J Biol Chem* 281, 5310-5318.
- Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., Shinozaki, K., & Hirayama, T. (2006b). ABA-Hypersensitive Germination3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among Arabidopsis Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* 140, 115-126.
- Yu, D., Fan, B., MacFarlane, S.A., & Chen, Z. (2003). Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 206-216.
- Yu, F., Liu, X., Alsheikh, M., Park, S., & Rodermel, S. (2008). Mutations in SUPPRESSOR OF VARIATION1, a factor required for normal chloroplast translation, suppress var2-mediated leaf variegation in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 1786-1804.
- Zalejski, C., Zhang, Z., Quettier, A.L., Maldiney, R., Bonnet, M., Brault, M., Demandre, C., Miginiac, E., Rona, J.P., Sotta, B., *et al.* (2005). Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in Arabidopsis thaliana suspension cells. *Plant J* 42, 145-152.
- Zawadzki, P., Ślósarek, G., Boryski, J., & Wojtaszek, P. (2010). A fluorescence correlation spectroscopy study of ligand interaction with cytokinin-specific binding protein from mung bean. *Biol Chem* 391, 43-53.
- Zelisko, A., Garcia-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S., & Funk, C. (2005). AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13699-13704.

- Zhang, L., & Xing, D.** (2008). Rapid determination of the damage to photosynthesis caused by salt and osmotic stresses using delayed fluorescence of chloroplasts. *Photochem Photobiol Sci* 7, 352-360.
- Zhang, S., Cai, Z., & Wang, X.** (2009). The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4543-4548.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., & Wang, X.** (2004). Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9508-9513.
- Zhang, X., Garreton, V., & Chua, N.H.** (2005). The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* 19, 1532-1543.
- Zhao, X.C., & Schaller, G.E.** (2004). Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 562, 189-192.
- Zhu, J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53, 247-273.
- Zhu, J.K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6, 441-445.
- Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., Shang, Y., Du, S.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., et al.** (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3019-3036.
- Zimmermann, P., Hennig, L., & Gruissem, W.** (2005). Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends Plant Sci* 10, 407-409.
- Zocchi, E., Carpaneto, A., Cerrano, C., Bavestrello, G., Giovine, M., Bruzzone, S., Guida, L., Franco, L., & Usai, C.** (2001). The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14859-14864.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Simone Demmel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	01.01.1983
Geburtsort	Landshut

Ausbildung

1989 - 1993	Grundschule Moosen
1993 - 2002	Gymnasium Dorfen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2002 - 2006	Studium der Lebensmittelchemie Technische Universität München Abschluss: 1. Staatsprüfung
seit November 2006	Promotion am Lehrstuhl für Botanik Technische Universität München (Wissenschaftliche Mitarbeiterin)

Publikationen

Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F.F., Christmann, A., and Grill, E. (2010). "Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity." *The Plant Journal* 61(1), 25-35.

Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Erwin Grill für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl für Botanik anzufertigen. Ihm sowie Herrn Dr. Alexander Christmann danke ich für die Überlassung und Betreuung spannender Projekte, die mir die Möglichkeiten der Molekularbiologie und Biochemie eröffneten. Herrn Prof. Dr. Grill danke ich für das stete Interesse an meiner Arbeit und seine trotz vollen Terminkalenders ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Wilfried Schwab möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Alexander Christmann für seine Unterstützung vom Anfang bis zum Ende meiner Promotion, ich konnte immer auf ihn zählen und lernte durch Gespräche und Diskussionen sowie bei der Arbeit im Labor sehr viel neues. Vielen Dank Alex, dass Du immer ein offenes Ohr für meine Fragen hattest und Dir viel Zeit für den Salzstress und auch die Korrektur meiner Arbeit genommen hast!

Esther Dolze danke ich für die gemeinsame Zeit während des Studiums und vor allem der Promotion, in der wir viele Hürden meisterten. Ungewiss bleibt, wie die letzten Jahre ohne Deine Unterstützung mit Rat und Tat, aufbauenden Worten, allerbesten Schmäckerln, schwarzem Humor und vielem mehr ausgegangen wären. Vielen Dank für alles, liebe Esther!

Bei meinen „Vorgängern“ Dr. Danièle Moes und Dr. Arthur Korte möchte ich mich für die gute Laune im Labor sowie für ihre Unterstützung aus der Ferne bedanken. Luxemburg kennenzulernen hat mir sehr viel Spaß gemacht, die genialen Chaostheorien des Arthür haben mich sogar zum Springen gebracht.

Allen Kollegen und Mitarbeitern am Lehrstuhl für Botanik, besonders in der ABA-Arbeitsgruppe, möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit danken:

Stefan Fuchs für das gelungene tiroler-bayrische Hefeprojekt („des mach ma gleischeid“), Christian Wellmann für ein bisschen mehr Schwarz und Michal Kepka für seine polnischen Lebensweisheiten, sowie Izabela Szostkiewicz.

Dank geht auch an Christoph Heidersberger, „mysterious [...] noted clone guru“ (www.artsbirthday.net), und Christian Kornbauer, Protein(be)kämpfer. Der Gietl-Gruppe vielen Dank für die Asylgewährung während des Schreibens.

Josef Reischenbeck danke ich für diverse Sonderanfertigungen und besonders für die normalisierenden Eis- bzw. Schokoladenpausen. Ein Dankeschön geht auch an Beate Seeliger, Johanna Berger und die Gärtner Caroline Klaus und Lisa Held.

Allen Kooperationspartnern danke ich für ihre Mühen, insbesondere gilt mein Dank dem Lehrstuhl für Biochemie an der TU München, Prof. Dr. Michael Groll nahm sich sehr viel Zeit für mein Projekt und ich wurde sehr herzlich aufgenommen. Vielen Dank hierfür auch an Dr. Melissa Poynor und Astrid König.

Meinen Eltern möchte ich für ihr großes Verständnis, den Zuspruch und die stetige Unterstützung während all der Jahre ganz besonders danken.