



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

**Charakterisierung der Abscisinsäure-Rezeptorkomplexe in
*Arabidopsis thaliana***

Stefanie Viola Tischer

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: Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Erwin Grill
2. Prof. Dr. Alfons Gierl
3. Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Die Dissertation wurde am 23.03.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.06.2016 angenommen.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Abscisinsäure	5
1.1.1. Biosynthese und Katabolismus von ABA.....	6
1.2. Kernkomponenten der ABA-Signaltransduktion	9
1.2.1. ABA-Rezeptoren	9
1.2.2. Proteinphosphatasen 2C der Gruppe A	12
1.2.3. Proteinkinasen.....	14
1.3. ABA-Rezeptorkomplex.....	15
1.3.1. ABA-Bindung an RCAR.....	15
1.3.2. Komplexbildung mit PP2C.....	17
1.3.3. ABA-Signaltransduktion.....	19
1.4. mini Singlet Oxygen Generator	21
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	24
2. Ergebnisse	26
2.1. Regulierung der ABA-Signaltransduktion durch ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten.....	26
2.1.1. RCAR-abhängige Regulierung der ABA-Signaltransduktion.....	26
2.1.2. Inhibierung der ABA-Antwort durch PP2Cs der Gruppe A.....	32
2.2. Kombinatorische Interaktionen zwischen ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten...	35

2.2.1.	RCAR- und ABA-abhängige Induktion der Genexpression	36
2.2.2.	Regulierung der ABA-Antwort durch ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten ...	40
2.3.	RCAR-abhängige Regulierung von AHG1	45
2.3.1.	Spezifität der RCAR-AHG1-Komplexbildung.....	47
2.3.2.	<i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Analysen der RCAR1/4 Varianten mit AHG1	49
2.4.	ABA-Rezeptorfunktion von RCAR7	54
2.4.1.	Regulierung der ABA-Signaltransduktion durch RCAR7 Expression	54
2.4.2.	RCAR7-abhängige Regulierung der PP2Cs.....	59
2.4.3.	Physiologische Relevanz von RCAR7	61
2.5.	Physiologische Charakterisierung der RCAR Familie	65
2.5.1.	Keimung.....	69
2.5.2.	Wurzelwachstum.....	72
2.5.3.	Stomata Regulierung.....	77
2.6.	Etablierung eine Reporter-gen-Konstruktes zur Lokalisierung der RCARs in <i>planta</i> ..	80
2.6.1.	Transiente Überprüfung in <i>A. thaliana</i> und <i>N. benthamiana</i>	81
2.6.2.	<i>In planta</i> Lokalisation von RCAR12.....	82
3.	Diskussion.....	86
3.1.	Kombinatorik der ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten.....	87
3.1.1.	Neu identifizierte PP2C-Regulierungen durch RCARs in Pflanzenzellen.....	89
3.1.2.	Funktionelle Differenzierung der ABA-Rezeptorkomplexe.....	90
3.1.3.	Limitierung der transienten Analyse in Protoplasten	94
3.2.	Spezifitäten in der RCAR-PP2C Kombinatorik.....	95
3.2.1.	RCAR-AHG1-Rezeptorkomplex.....	96
3.2.2.	RCAR7-PP2C-Rezeptorkomplexe.....	101
3.3.	Physiologische Funktion der ABA-Rezeptoren	104
3.3.1.	Inhibierung der Samenkeimung durch ektopische RCAR-Expression.....	106

3.3.2.	Redundante Regulierung des Wurzelwachstums	110
3.3.3.	RCAR-vermittelte Regulierung der Stomata-Apertur.....	113
4.	Material und Methoden	116
4.1.	Materialien	116
4.1.1.	Chemikalien	116
4.1.2.	Geräte.....	116
4.1.3.	Software	118
4.1.4.	Verwendete Organismen und ihre Kultivierung	119
4.1.5.	Verwendetes Pflanzenmaterial und ihre Kultivierung.....	123
4.1.6.	Enzyme und Oligonukleotide	124
4.1.7.	Plasmide und Vektoren	124
4.1.8.	Erstellung eines Reporter-gen fusionierten Vektor-Plasmids.....	125
4.1.9.	Generierung der Vektor-Plasmide für die RCAR Lokalisation.....	127
4.2.	Physiologische Methoden	128
4.2.1.	Oberflächensterilisation von Arabidopsis Samen	128
4.2.2.	Keimungsversuche	129
4.2.3.	Wurzelversuche.....	129
4.2.4.	Stomata-Versuche	130
4.2.5.	Floral Dip von <i>Arabidopsis thaliana</i>	130
4.2.6.	Tabakinfiltration	131
4.2.7.	Isolierung von Arabidopsis Protoplasten	132
4.2.8.	Transfektion von Protoplasten.....	134
4.2.9.	Messung der β -D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten.....	135
4.2.10.	Messung der Luciferase-Aktivität in Protoplasten.....	135
4.3.	Molekularbiologische Methoden	136

4.3.1.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> bzw. <i>A. tumefaciens</i> Zellen	136
4.3.2.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> bzw. <i>A. tumefaciens</i> Zellen	137
4.3.3.	Plasmid-Präparation	138
4.3.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	139
4.3.5.	Agarose-Gelelektrophorese	141
4.3.6.	Standardmethoden der Klonierung	142
4.3.7.	Zielgerichtete Mutagenese (SDM)	143
4.3.8.	DNA-Sequenzierung	145
4.3.9.	RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial.....	145
4.3.10.	cDNA-Synthese	146
4.3.11.	Quantitative Real-Time PCR (qReal-Time PCR)	146
4.3.12.	Transformation von Hefezellen.....	148
4.3.13.	Yeast-two-Hybrid (Y2H) Interaktionsanalyse	149
4.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	149
4.4.1.	Proteinexpression.....	149
4.4.2.	Proteinextraktion	150
4.4.3.	Proteinaufreinigung und Dialyse.....	150
4.4.4.	Säulenregeneration	151
4.4.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS).....	151
4.4.6.	Coomassie-Färbung.....	152
4.4.7.	Phosphatase-Aktivitätstest	153
4.5.	Mikroskopie Methoden	154
4.5.1.	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	154
5.	Anhang.....	155
6.	Literaturverzeichnis.....	187
	Lebenslauf	204

Danksagung 205

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 ABA-Biosynthese und -Akkumulierung.....	7
Abb. 1-2 ABA-Katabolismus über Hydroxylierung.	8
Abb. 1-3 Phylogenetischer Baum der RCAR-Familie in Arabidopsis.	10
Abb. 1-4 Vergleich der START Domain vom Birken Pollen Allergen BET V 1 und RCAR1.	11
Abb. 1-5 Phylogenetischer Baum der Gruppe A PP2Cs in Arabidopsis.....	12
Abb. 1-6 Wahrnehmung von ABA durch RCAR14.	16
Abb. 1-7 ABA-vermittelte Konformationsänderung im <i>Gate</i> und <i>Latch Loop</i>	17
Abb. 1-8 Interaktionsregionen zwischen ABA Rezeptorkomplex und PP2C.....	18
Abb. 1-9 ABA-Signalweg zur Regulierung der Stomata-Schließung und Genexpression.....	20
Abb. 1-10 MiniSOG Struktur und Wirkweise.....	22
Abb. 1-11 MiniSOG-Produkte im Vergleich zwischen CLSM und TEM.....	23
Abb. 2-1 RCAR- bzw. ABA-abhängige Induktion der Genexpression in Arabidopsis Protoplasten.....	28
Abb. 2-2 Regulierung der ABA-Antwort durch ektopische RCAR-Expression in Arabidopsis Protoplasten.....	30
Abb. 2-3 PP2C-vermittelte Inhibierung der ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten.....	33
Abb. 2-4 RCAR-PP2C-Interaktionen im Y2H.	36
Abb. 2-5 RCAR- bzw. ABA-abhängige Induktion der Genexpression in Arabidopsis Protoplasten.....	39
Abb. 2-6 Transiente Analyse aller 126 RCAR-PP2C-Kombinationen in Arabidopsis Protoplasten.....	41
Abb. 2-7 Normalisierung der RCAR-vermittelten PP2C-Regulation unter ABA-Exposition.	44
Abb. 2-8 RCAR-abhängige Regulierung von AHG1 in Arabidopsis Protoplasten.	46
Abb. 2-9 RCAR-Alignment und Kristallstruktur der RCAR-PP2C-Bindungsfläche.	47
Abb. 2-10 Strukturen der identifizieren Aminosäurereste.	48

Abb. 2-11 Y2H Interaktionsanalyse von AHG1 mit RCAR-Varianten.....	50
Abb. 2-12 <i>In vivo</i> Analyse aller RCAR-Varianten in Arabidopsis Protoplasten.....	51
Abb. 2-13 Inhibierung der Phosphataseaktivität durch RCAR-Varianten.....	53
Abb. 2-14 Regulierung der ABA-Signaltransduktion durch RCAR7-Expression in Arabidopsis Protoplasten.....	57
Abb. 2-15 RCAR7-abhängige Regulation der PP2C-inhibierten ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten.....	60
Abb. 2-16 RCAR7-abhängige Regulierung der ABA-Antwort in Arabidopsis.....	63
Abb. 2-17 Genexpression der RCARs in Arabidopsis.....	66
Abb. 2-18 Relative Genexpression der OE RCAR-Linien.....	68
Abb. 2-19 Relative Keimung der RCAR-Überexpressionslinien.....	70
Abb. 2-20 Relatives Wurzelwachstum der OE RCAR-Linien ohne ABA-Zugabe.....	73
Abb. 2-21 Relatives Wurzelwachstum der RCAR-Überexpressionslinien.....	76
Abb. 2-22 Oberflächentemperatur und vegetatives Wachstum der OE RCAR-Linien in Arabidopsis.....	79
Abb. 2-23 Intrazelluläre Lokalisation endogener RCARs in Arabidopsis Protoplasten und Tabakblättern.....	82
Abb. 2-24 Lokalisierung von RCAR12:eGFP in Arabidopsis Wurzel.....	83
Abb. 2-25 Lokalisierung von RCAR12:eGFP in Arabidopsis.....	84
Abb. 2-26 Zelluläre Lokalisation von RCAR12:eGFP in Arabidopsis.....	85
Abb. 3-1 RCAR-vermittelte Regulierung der PP2Cs unter ABA-Exposition.....	87
Abb. 3-2 RCAR-vermittelte Regulierung der PP2Cs mit endogenem ABA.....	88
Abb. 3-3 Erstmals bestätigte ABA-Rezeptorkomplexe in Arabidopsis.....	89
Abb. 3-4 Vergleich ternärer Komplex der GA- bzw. ABA-Signaltransduktion.....	92
Abb. 3-5 Vergleich Induktion der GA- bzw. ABA-Antwort.....	93
Abb. 3-6 Aminosäurerest-Vergleich von RCAR1 und RCAR4.....	96

Abb. 3-7 RCAR-HAB1-Kontaktfläche.....	99
Abb. 3-8 PP2C-Alignment und Tryptophan-Valin-Vergleich.	100
Abb. 3-9 Unterschiede in der RCAR-Kontaktfläche von HAB1 und HAB2.	102
Abb. 3-10 RCAR7 und HAB1 ^{S322P}	103
Abb. 3-11 Primärstruktur-Alignment der RCAR-Kontaktfläche.....	104
Abb. 3-12 Modell zur ABA-abhängigen Inhibierung der Samenkeimung.	109
Abb. 3-13 Modell zur Stimulierung des Wurzelwachstums.....	113
Abb. 4-1 Schematische Darstellung für die Klonierung von mCherry:miniSOG in pSK Ascl. .	126
Abb. 4-2 Schematische Darstellung zur Generierung von pSK Ascl eGFP:miniSOG und MCS.	127
Abb. 5-1 Alignment aller 14 RCAR.....	178
Abb. 5-2 Alignment aller 9 PP2Cs der Gruppe A.	180
Abb. 5-3 Relative Keimung und Wurzelwachstum verschiedener RCAR Knockout Linien. ...	181
Abb. 5-4 Regulierung der Stomata in RCAR7 OE- bzw. Knockoutlinien.....	182
Abb. 5-5 Relative Keimung aller generierten OE RCAR Linien.....	184
Abb. 5-6 Relatives Wurzelwachstum aller generierter OE RCAR Linien.	186

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Geräte	116
Tab. 2	<i>Escherichia coli</i> Stämme	119
Tab. 3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stämme.....	120
Tab. 4	Antibiotika und Konzentration im Nährmedium.....	121
Tab. 5	Hefestamm	121
Tab. 6	Allgemeiner Ansatz für Klonierungs- und Kolonie PCR	139
Tab. 7	Allgemeiner PCR – Ansatz zur Überprüfung transgener Pflanzen	140
Tab. 8	Thermocycler Einstellung für PCR mit Phusion DNA Polymerase	140
Tab. 9	Thermocycler Einstellung für PCR mit Pfu bzw. GoTaq [®] DNA Polymerase	141
Tab. 10	Thermocycler Einstellung für PCR mit KAPA3G Plant DNA Polymerase	141
Tab. 11	Allgemeiner PCR – Ansatz für SDM	144
Tab. 12	Thermocycler Einstellung für SDM PCR.....	145
Tab. 13	Allgemeiner PCR – Ansatz für qReal-Time PCR	147
Tab. 14	Thermocycler Einstellung für qReal-Time PCR	147
Tab. 15	Verwendete Oligonukleotid Primer	155
Tab. 16	Verwendete Plasmide für transiente Analyse in Protoplasten.....	159
Tab. 17	Verwendete Plasmide für Hefe Trafo.....	160
Tab. 18	Verwendete Plasmide für Phosphataseaktivitäts-Assay.....	161
Tab. 19	Verwendete Plasmide für stabile Transformation in <i>A. thaliana</i> bzw. Infiltration in <i>N. benthamiana</i>	161

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ABA	Abscisinsäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABF	ABRE Binding Factor
ABI	Abscisinsäure-Insensitiv
ABRE	ABA-Response Element
AHG	ABA-Hypersensitive Germination
AREB	ABA-Response Element Binding Protein
AS	Aminosäure
Bet v 1	Major birch pollen allergen of <i>Betula verrucosa</i> 1
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	Basic Leucin Zipper
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	codierende Sequenz
Col-0	Columbia Ökotyp 0
CPS	Counts Per Second
Ct	Cycle threshold
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FMN	Flavin-Mononukleotid
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
et al.	und andere

Abkürzungsverzeichnis

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
GA	Gibberellin
GE	Glukoseester-Konjugat
GUS	β -D-Glucuronidase
H	Histidin
HAB	Hypersensitive to ABA
HAI	Highly ABA-Induced
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
K _d	Dissoziationskonstante
L	Leucin
LAR	Luciferase Assay Reagent
LB	Luria-Bertani Nährmedium
LUC	Luciferase
LV	leere Vektorkontrolle
M	mol/ l
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-Morpholineethansulfonsäure
miniSOG	Mini Singlet Oxygen Generator
mQ	MiliQ
MS	Murashige & Skoog (Medium)
MUG	Methylumbelliferylglucuronid
MUP	Methylumbelliferylphosphat
N	Asparagin
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
OD	Optische Dichte
OST1	Open Stomata 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP2C	Protein Phosphatase Type 2C

PYL	PYR1-like
PYR	Pyrabactin Resistant
RCAR	Regulatory Component of ABA Receptor
Rd29B	Responsive to Desiccation 29B
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetic Dropout
SDM	Site Directed Mutagenesis
SLAC1	Slow Anion Channel 1
SnRK2	Sucrose non-fermenting Related Kinase 2
START	Star-related lipid transfer domain
TB	Terrific Broth (Medium)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TF	Transkriptionsfaktor
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UBI10	Ubiquitin10
ÜN	über Nacht
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid-System
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Zusammenfassung

Abscisinsäure (ABA) ist ein wichtiges Phytohormon und ein Hauptregulator zur Anpassung an biotischen und abiotischen Stress und wirkt zusätzlich als entwicklungspezifisches Signal. Die ABA-Antwort beinhaltet die Stomata-Regulierung, schützt das Photosystem vor stressbedingten Schäden und reguliert das Pflanzenwachstum über die Genexpression. Zu den Kernkomponenten der ABA-Signaltransduktion gehören die „Regulatory Component of ABA Receptors“ (RCARs) bzw. die „Pyrabactin resistant/PYR1-like proteins“ (PYR/PYL), die Gruppe A Proteinphosphatasen der Klasse 2C (PP2C) und die „Sucrose non-fermenting related protein kinases 2“ (SnRK2s). Das Arabidopsis Genom codiert 14 RCARs, die auf Basis ihrer Primärstruktur in drei Unterfamilien eingeteilt werden. In Arabidopsis gibt es neun PP2Cs, die zu den Mg^{2+} - und Mn^{2+} -abhängigen Serin-Threonin Proteinphosphatasen gehören. Durch direkte Inhibierung der SnRK2s wirken die PP2Cs als Negativregulatoren der ABA-Signaltransduktion. ABA bindet in die hydrophobe Höhle der RCARs und stabilisiert damit die Proteinkomplexbildung mit einer PP2C, woraus eine Inaktivierung der Phosphataseaktivität resultiert. Diese wiederum entlässt die SnRK2 aus der PP2C-vermittelten Inhibierung, wodurch die ABA-Antwort initiiert werden kann.

In dieser Studie wurde erstmals die ABA-Rezeptorfunktion für alle 14 RCAR Mitglieder *in vivo* und *in planta* bestätigt. Dabei wurde gezeigt, dass RCAR1, RCAR3, RCAR4, RCAR6, RCAR8 und RCAR9 die ABA-abhängige Genexpression bereits in nicht gestressten Zellen induzieren, während die restlichen RCARs die ABA-Antwort nur durch exogene ABA-Zugabe aktivieren. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die ektopische Expression der RCARs in einer ABA-hypersensitiven Keimung resultiert. Einzelne RCARs zeigen eine ABA-Hypersensitivität im Wurzelwachstum und in der Regulierung der Transpirationskühlung. Diese Befunde geben weitere Einblicke in potentielle Funktionen der ABA-Rezeptoren in der Signaltransduktion.

Um die ABA-Antwort zu aktivieren, muss der ternäre Komplex (RCAR-ABA-PP2C) gebildet werden. Transient in Protoplasten wurden 59 potentielle ABA-Rezeptor-Kombinationen bestätigt, die unter endogenem ABA-Gehalt die Signaltransduktion aktivieren. Durch ABA-Exposition wurden weitere 44 aktive RCAR-PP2C Kombinationen identifiziert, so dass in dieser Arbeit eine Gesamtzahl von 103 RCAR-PP2C Interaktionen in Protoplasten beschrieben wurden. Diese Proteinwechselwirkungen zeigen Substratspezifität wie auch Substratunspezifität seitens der RCARs als auch der PP2Cs. So wurde lediglich für RCAR1-3

eine Aktivierung der AHG1-inhibierte ABA-Antwort durch ABA-Zugabe ermittelt, nicht aber für RCAR4. Es wurde ein Aminosäurerest identifiziert, der essentiell für die RCAR-AHG1 Komplexformierung ist. Dieser ist spezifisch in der α 3-Helix von RCAR1 (Y160), RCAR2 (Y162) und RCAR3 (Y158) lokalisiert, nicht aber bei den anderen RCARs. Mit Hilfe verschiedener RCAR1/4-Varianten wurde die Notwendigkeit dieses Aminosäurerests für die RCAR-AHG1 Komplexbildung *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen. Zusätzlich resultiert die ektopische Expression von RCAR1 bis RCAR3 in einer ABA-hypersensitiven Keimung. Ein hohes Transkriptlevel von *AHG1* und diesen *RCARs* wurde während der Embryogenese und im Samen detektiert. Außerdem wurde eine Funktion von AHG1 in der Samenentwicklung und -keimung bereits beschrieben. Infolgedessen, könnte die RCAR-AHG1 Komplexe Funktionen in diesen Entwicklungsprozessen besitzen.

Im Zusammenhang dieser Studie wurde für RCAR7 erstmals eine eindeutige ABA-Rezeptorfunktion bestätigt. In Protoplasten ließ sich eine RCAR7-vermittelte Regulierung für HAB2, PP2CA und HAI2/3 in ABA-Abhängigkeit feststellen. Es wurden zwei HAB2-spezifische Aminosäurereste ermittelt, die an der Diskriminierung von HAB1 (S322, P391) durch RCAR7 beteiligt sein könnten. Des Weiteren führt die ektopische Expression von RCAR7 zur ABA-abhängigen Hypersensitivität in der Samenkeimung. Dass RCAR7 eine redundante Funktion mit RCAR9 in diesem Entwicklungsprozess besitzt, wurde mit dem ABA-insensitiven Phänotyp der *rcar7 x rcar9* Funktionsverlust-Mutante gezeigt, während die *rcar7* und *rcar9* Einzelmutanten keinen Effekt aufweisen.

Um eine genauere Vorstellung über die entwicklungspezifische Expression der RCARs in der Pflanze zu bekommen, wurde ein fusioniertes Reporter-gen-Konstrukt (eGFP:miniSOG) generiert. Diese Fusionsproteine, gekoppelt mit endogenem Promotor und RCAR, erlauben die Lokalisation aller RCARs zu untersuchen. In dieser Studie wurde endogenes RCAR12 erfolgreich im Wurzel- und Blattgewebe von *Arabidopsis* detektiert. Weiterhin ließ sich die Expression im Cytosol und Zellkern von RCAR12 in Wurzel-, Hypokotyl-, Epidermis- und Schließzellen nachweisen.

Summary

The plant phytohormone abscisic acid (ABA) is a key regulator of plant adaptation to biotic and abiotic stress and also functions as a developmental signal. ABA responses comprise stomatal closure and the regulation of plant growth by the control of adaptive gene expression. Components of the core ABA signaling pathway are the regulatory component of ABA receptors (RCAR) or Pyrabactin resistant/PYR1-like proteins (PYR/PYLs), protein phosphatases 2C (PP2Cs) of Clade A and Sucrose non-fermenting related protein kinases 2 (SnRK2s). The Arabidopsis genome encodes 14 RCARs (PYR/ PYLs), which can be divided into three subgroups according to their sequence homology. PP2Cs comprise a group with nine members in Arabidopsis which belong to the Mg^{2+} and Mn^{2+} dependent serine-threonine protein phosphatases. Through direct inhibition of SnRK2s PP2Cs negatively regulating the ABA signal. ABA binds directly to the hydrophobic cavity of the RCARs, which results in the formation of an RCAR-PP2C complex. Phosphatase activity is subsequently inactivated and SnRK2 is released from PP2C-mediated inhibition, resulting in the initiation of ABA responses.

For the first time, an ABA receptor function is demonstrated for all RCAR members via *in vivo* and *in planta* analyses. In this thesis it is shown that RCAR1, RCAR3, RCAR4, RCAR6, RCAR8 and RCAR9 activating ABA responsive gene expression in non-stressed cells, while remaining RCARs appear to be strictly ABA-dependent. In addition, hypersensitivity in seed germination is detected for all ectopically expressed RCARs in an ABA dependent manner, whereas ABA hypersensitive root growth and regulation of transpiration cooling is observed only for specific RCARs. These results are indicating insights to potentially function of ABA receptors during signal transduction.

The formation of a ternary complex (RCAR-ABA-PP2C) is required to induce ABA response. In protoplasts, 59 possible RCAR-PP2C combinations are capable for activating the ABA response in an ABA-independent and 44 additionally combinations in an ABA-dependent manner. Furthermore, specificity and non-specificity for RCARs and also PP2Cs is detected in this study. Only subgroup I RCARs, with the exception of RCAR4, seem to be capable for inducing the AHG1 mediated inhibition of ABA signaling in the presence of exogenous ABA. One amino acid residue was found that seems to be important for the formation of the RCAR-ABA-AHG1 complex. This residue is only specific in the α 3-helix of RCAR1 (Y160),

RCAR2 (Y162) and RCAR3 (Y158) but not for the remaining RCARs. With different RCAR1/4 variants, the importance of this residue for AHG1-RCAR complex formation is demonstrated via *in vivo* and *in vitro* analyses. In addition, ectopic expression of RCAR1-3 lead to an ABA hypersensitive germination and high transcription levels of *RCAR1-3* and *AHG1* could detect during embryogenesis and in seeds. Moreover, AHG1 is known to be involved in the regulation of these processes. These achievements provide the evidence for specific RCAR-AHG1 functions during embryogenesis and seed germination.

In addition, for the first time a bona fide receptor function for RCAR7 is shown. In protoplasts, RCAR7 mediated regulation of HAI2/2, PP2CA and HAB2 is activating the ABA responsive gene expression in an ABA dependent manner. Two HAB2 specific amino acid residues are identified that could be involve in discrimination HAB1 by RCAR7. Furthermore, ectopic expression of RCAR7 results in ABA hypersensitive germination. Redundant function of RCAR7 with RCAR9 in germination is confirmed by *rcar7 x rcar9* loss-of-function mutant results in ABA insensitive seed germination while single *rcar7* and *rcar9* Arabidopsis mutations reveal no changes.

To get a better understanding of development-specific RCAR expression in planta, a fused reporter gene construct is generated (eGFP::miniSOG). These fusion proteins linked with endogenous promotor and RCAR permit studying endogenous RCAR localization. In this study, RCAR12 localization was detectable in root and leaf tissue and furthermore, in the cytosol and nucleus of root, hypocotyl, epidermis and guard cells.

1. Einleitung

1.1. Abscisinsäure

Das Phytohormon Abscisinsäure, kurz ABA, wurde erstmals in den 1960er Jahren beschrieben. ABA wurde als Wachstumsinhibitor aus abgeworfenen Baumwollfrüchten und Ahornblättern isoliert und irrtümlich als Abscissin II (Ohkuma et al. 1963) bzw. Dormin (Wareing et al. 1964) bezeichnet. Erst später erfolgte die Umbenennung in Abscisinsäure (ABA) (Addicott et al. 1968), nachdem festgestellt wurde, dass es sich bei Abscissin II und Dormin um die gleiche chemische Substanz handelte (Cornforth et al. 1965). ABA ist allgegenwärtig und wird in allen höheren Pflanzen, in Moose und verschiedenen Algen, aber auch in manchen Phytopathogenen und interessanterweise sogar in menschlichen Granulozyten synthetisiert (Nambara and Marion-Poll 2005; Bruzzone et al. 2007). ABA erfüllt zahlreiche regulatorische Funktionen während der pflanzlichen Entwicklung und des Wachstums. Zu den ABA-regulierten Entwicklungsprozessen zählen die Samenreifung, die Aufrechterhaltung der Dormanz, die Keimung der Samen (Karssen et al. 1983; Parcy et al. 1994; Bewley 1997; Holdsworth et al. 1999) sowie die Elongation von Wurzel und Spross (Zeevaart and Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000; Barrero et al. 2005). Neben diesen entwicklungspezifischen Funktionen steuert ABA auch die Anpassung an biotische und abiotische Stressfaktoren, wie Pathogenbefall, Trockenheit, Kälte, Salinität oder zu hohe UV Strahlung (Christmann et al. 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006; Tossi et al. 2009; Huang et al. 2012; Adie et al. 2007). Die Anpassung erfolgt über die Regulierung des Pflanzenwachstums, das Schließen der Stomata, der Schutz der Photosynthese-Maschinerie durch eine weitreichende Regulierung der Genexpression (Skriver and Mundy 1990; Vartanian et al. 1994; Chandler and Robertson 1994; Busk and Pages 1998; Schroeder et al. 2001; Yang et al. 2006; Melotto et al. 2006; Melotto et al. 2008; Kim et al. 2010; Okamoto et al. 2010).

Während der Pflanzenentwicklung und des Wachstums wirkt ABA antagonistisch gegenüber anderen Phytohormonen wie aktives Jasmonat, Auxin und Gibberellin (Gehring et al. 1990; Anderson et al. 2004; Seo et al. 2006). So hat ABA einen förderlichen Einfluss auf die Dormanz und wirkt inhibierend auf die Keimung der Samen, wogegen Gibberellin (GA) die Samenkeimung und das Keimlingswachstum positiv beeinflusst (Bewley 1997; Holdsworth et al. 1999; Gubler et al. 2005; Seo et al. 2006; Yano et al. 2009; Yaish et al. 2010; Shu et al.

2013). Um die richtige Balance zwischen den antagonistisch wirkenden Phytohormonen herzustellen, müssen der Katabolismus und die Synthese der entsprechenden Hormone exakt reguliert werden.

1.1.1. Biosynthese und Katabolismus von ABA

Die Abscisinsäure ist ein monocyclisches Sesquiterpen mit dem systematischen Namen „3-Methyl-5-(1'-hydroxy-4'-oxo-2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexen-1'-yl)-cis-2,4-pentadiensäure“ und ist ein Derivat des Isopentenylidiphosphats (IPP), welches in den Chloroplasten über den Methylerythritolphosphatweg synthetisiert wird (Lichtenthaler 1999; Rodriguez-Concepcion and Boronat 2002; Eisenreich et al. 2004). Die Biosynthese von ABA findet in Plastiden und im Cytosol von Schließzellen und Leitgewebe statt (Nambara and Marion-Poll 2005; Christmann et al. 2005).

ABA wird aus der Spaltung von C-40 Carotinoiden synthetisiert, die dem Methylerythritolphosphatweg entstammen (Milborrow and Lee 1998; Hirai et al. 2000; Kasahara et al. 2004). Ausgehend von Zeaxanthin, dem im Biosyntheseweg ersten sauerstoffhaltigen Carotinoid, entsteht mittels Epoxidierung durch ZEP (Zeaxanthin Epoxidase) über Antheraxanthin das *trans*-Violaxanthin (Marin et al. 1996; Bouvier et al. 1996), (Abb. 1-1). Diese zwei Reaktionsschritte können durch VDE (Violaxanthin De-Epoxidase) rückgängig gemacht werden, um mehr Zeaxanthin als Schutz vor zu hoher Strahlungsintensität zu akkumulieren (Niyogi et al. 1998). *trans*-Violaxanthin wird anschließend in 9-*cis*-Violaxanthin oder über *trans*-Neoxanthin mit Hilfe von ABA4 zu 9-*cis*-Neoxanthin umgewandelt (North et al. 2007). Die *cis*-Isomere von Violaxanthin und Neoxanthin werden zu dem C-15 Produkt Xanthoxin und zu ein C-25 Metabolit durch die NCED (9-*cis*-Epoxy-carotinoid-Dioxygenase) gespalten (Schwartz et al. 2003). Im Anschluss daran wird Xanthoxin aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert, wo die letzten enzymatischen Umwandlungsschritte zu ABA erfolgen. Xanthoxin wird mit Hilfe von ABA2 in Abscisinaldehyd überführt und anschließend wird die Aldehyd-Gruppe zur Carboxylsäure oxidiert, sodass ABA entsteht (Schwartz et al. 1997; Gonzalez-Guzman et al. 2002). Dieser letzte enzymatische Schritt wird von der AAO3 (Abscisinaldehyd Oxidase 3) katalysiert, welche Molybdän als Kofaktor benötigt (Schwartz et al. 1997; Seo et al. 2000; Bittner et al. 2001; Xiong et al. 2001; Gonzalez-Guzman et al. 2002).

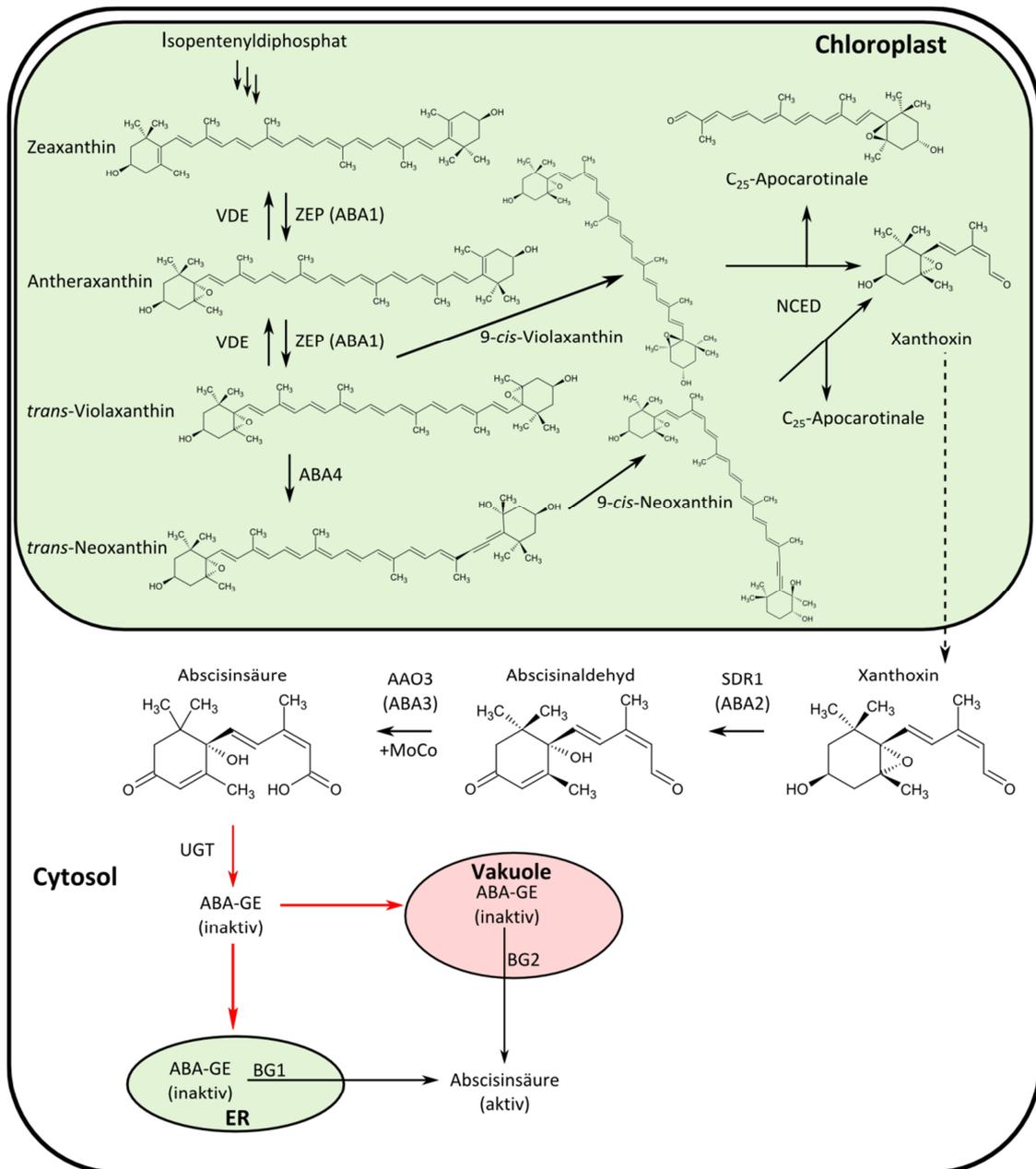


Abb. 1-1 ABA-Biosynthese und -Akkumulierung.

Die Synthese von ABA erfolgt über die oxidative Spaltung von C-40 Carotinoiden in Plastiden bzw. Chloroplasten. Durch enzymatisch katalysierte Reaktionen erfolgt die schrittweise Umwandlung von Zeaxanthin über Violaxanthin und Neoxanthin zu Xanthoxin. Anschließend wird diese ABA-Vorstufe ins Cytosol transportiert und durch zwei Redoxreaktionen letztendlich zu ABA umgewandelt. ABA kann u.a. durch Glukoseveresterung (ABA-GE) inaktiviert und in Vakuolen gespeichert werden. Der zweite Weg zur ABA-Akkumulierung erfolgt über die Abspaltung des Glukoserestes vom inaktiven ABA-GE mit Hilfe spezifischer β -Glucosidasen BG1 bzw. BG2 im ER sowie in der Vakuole. Diese Abbildung wurde erstellt nach Schwartz et al. (2003), Schroeder and Nambara (2006), North et al. (2007) und Arc et al. (2013).

ABA kann entweder über Hydroxylierung am C-7', C-8' oder C-9' Atom abgebaut werden (Abb. 1-2) oder als biologisch inaktives Glukoseester-Konjugat (ABA-GE) in Vakuolen und im Apoplast gespeichert werden (Krochko et al. 1998; Zhou et al. 2004; Kushiro et al. 2004).

Die Hydroxylierung am C-8' Atom durch die P450 Monooxygenase (CYP707A) wird hierbei als Hauptweg des Katabolismus angesehen (Krochko et al. 1998). Es wurden bisher vier *CYP707A* Gene identifiziert, die für 8'-Hydroxylasen codieren, aber in unterschiedlichen Entwicklungsstadien exprimiert werden (Kushiro et al. 2004). *CYP707A1* und *CYP707A3* sind für den Abbau der ABA während der mittleren Samenentwicklung und des Keimlingswachstums verantwortlich, während *CYP707A2* am Ende der Samenentwicklung exprimiert wird (Kushiro et al. 2004) und *CYP707A4* in den Samenschoten (Okamoto et al. 2006). Das durch die Hydroxylierung generierte 8'-OH ABA kann wiederum zur Phaseinsäure isomerisieren (Milborrow et al. 1988) und anschließend zu Dihydrophaseinsäure reduziert werden (Zeevaart and Creelman 1988). Diese ABA-Abbauprodukte weisen immer noch biologische Aktivität auf, sind allerdings deutlich weniger aktiv als ABA (Walton and Yi 1995; Kepka et al. 2011).

Neben dem Katabolismus durch Hydroxylierung kann ABA auch zu einem inaktiven Glukoseester (ABA-GE) durch die ABA-Glycosyltransferase (UGT) konjugiert und in Vakuolen, im Cytosol und im Apoplast akkumuliert werden (Bray and Zeevaart 1985; Dietz et al. 2000; Lim et al. 2005; Priest et al. 2006; Liu et al. 2015). Die Aktivierung des ABA-Glukoseesters zur ABA erfolgt durch eine enzymatische Spaltung durch die β -Glucosidase BG1 im endoplasmatischen Retikulum bzw. durch die BG2 in der Vakuole und dient als „Erste-Hilfe-Reaktion“ auf biotische oder abiotische Umweltfaktoren (Abb. 1-1), (Lee et al. 2006; Xu et al. 2012; Arc et al. 2013).

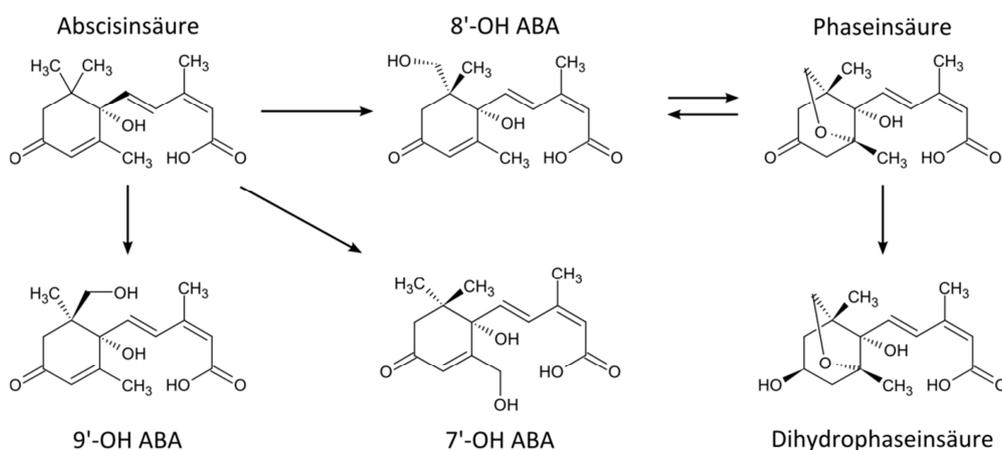


Abb. 1-2 ABA-Katabolismus über Hydroxylierung.

Abbau von ABA durch Hydroxylierung am C'7, C'8 und C'9 Atom mit anschließender Oxidation zu Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure. Diese Abbildung wurde erstellt nach Krochko et al. (1998), Kushiro et al. (2004) und Zhou et al. (2004).

1.2. Kernkomponenten der ABA-Signaltransduktion

Wie bereits erwähnt, ist ABA an der Anpassung an biotische und abiotische Stressfaktoren beteiligt ebenso wie an der Regulierung des Pflanzenwachstums und der Entwicklung (Christmann et al. 2006; Yang et al. 2006; Hirayama and Shinozaki 2007; Kim et al. 2010; Cutler et al. 2010). Im Fall von Dehydrierung bzw. Trockenheit kommt es zur Erhöhung des endogenen ABA-Gehalts durch die Spaltung von ABA-GE oder direkt über eine Neusynthese (Cutler and Krochko 1999; Wilkinson and Davies 2002; Jiang and Hartung 2008). ABA löst dann eine Signalkaskade aus, die wie erwähnt u.a. Einfluss auf die Genexpression und das Pflanzenwachstum beeinflussen, die Transpiration reduzieren und die Photosynthese-Maschinerie schützen kann (Busk and Pages 1998; Schroeder et al. 2001; Barrero et al. 2005; Yang et al. 2006; Kim et al. 2010).

Der ABA-Signalweg ist bereits in Moosen vorhanden und die Etablierung eines Kernsignalwegs schien u.a. eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung von Landpflanzen gewesen zu sein. Zu den konservierten Schlüsselkomponenten der ABA-Signaltransduktion zählen die RCARs/PYR/PYLs, die Gruppen A PP2Cs sowie die SnRK2s (Umezawa et al. 2010).

1.2.1. ABA-Rezeptoren

Im Jahr 2009 wurden erstmalig, nach langer Suche, die ABA-Rezeptoren von zwei Gruppen unabhängig voneinander identifiziert. Während der Überprüfung auf Pyrabactin-Resistenz (ein Wachstumsinhibitor) wurde ein ABA-bindendes Protein identifiziert, das als PYRABACTIN RESISTANT1 (PYR1) deklariert wurde (Park et al. 2009). Zeitgleich wurde nach Arabidopsis-Proteinen gesucht, die eine Interaktion mit der Proteinphosphatase ABI2 aufwiesen. Das hierbei entdeckte ABA-binde Protein ist als „Regulatory Component of ABA Receptor 1“, kurz RCAR1, bezeichnet worden (Ma et al. 2009). Anschließende Sequenzanalysen identifizierten 13 weitere verwandte Gene, die folglich als *RCAR2-14* bzw. *PYR-like1-13* (*PYL1-13*) benannt wurden. Der Einfachheit halber wird in dieser Arbeit die Bezeichnung RCAR verwendet. Die *RCARs* codieren für im Cytosol und Nukleus lokalisierte ABA-Rezeptorproteine die lediglich eine Größe von ca. 20 kDa aufweisen und auf Grund ihrer Primärstruktur in drei Unterfamilien aufgeteilt werden (Abb. 1-3), (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Für *RCAR1* bis *RCAR3* und *RCAR8* bis *RCAR14* wurde eine überlappende

Genexpression in verschiedenen Pflanzengeweben und in unterschiedlichen Entwicklungsstadien nachgewiesen (Schmid et al. 2005; Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007; Yang et al. 2008). Das höchste Expressionslevel wurde für *RCAR3* sowie für *RCAR10* bis *RCAR12* u.a. in der Wurzel, im Keimling, jungen Blättern und im gesamten Blütenstand detektiert (Gonzalez-Guzman et al. 2012).

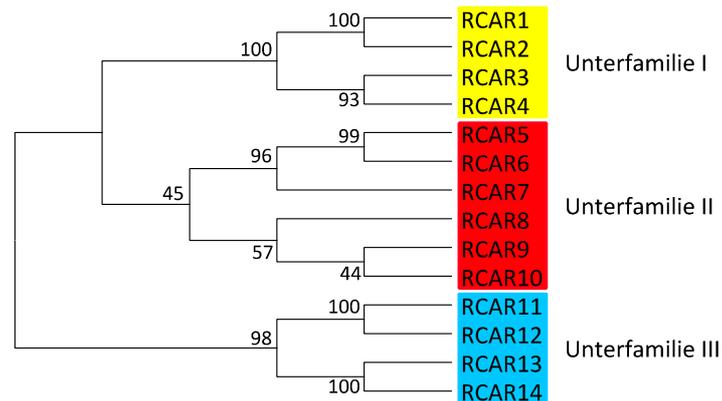


Abb. 1-3 Phylogenetischer Baum der RCAR-Familie in Arabidopsis.

Der phylogenetische Baum wurde nach der Neighbor-Joining Methode mit MEGA Version 6 erstellt. Als Distanzmethode wurde Bootstrapping angewendet mit 1000 Teildatensätzen. Die Werte geben eine quantitative Auskunft über die Ähnlichkeit zweier RCARs in Prozent an. Dieser phylogenetische Baum ist vergleichbar zu Ma et al. (2009) und Raghavendra et al. (2010).

Die RCARs gehören zur Familie der Bet v 1 Superfamilie (START Proteine) und weisen eine ähnliche Raumstruktur wie diese Proteine auf. Ihre Grundstruktur bildet eine sogenannte „Helix-Grip“ Struktur, die sich aus sieben β -Faltblättern und zwei flankierenden α -Helices zusammensetzt (Abb. 1-4). Die β -Faltblätter bilden zusammen eine antiparallele β -Faltblattstruktur, welches die hydrophobe Höhle zur Bindung des Liganden bildet. Diese Liganden-Höhle ist in allen START Proteinen hoch konserviert und dient zur Bindung von Hormonen und Lipiden (Iyer et al. 2001; Radauer et al. 2008; Melcher et al. 2009). Die RCARs unterscheiden sich von den restlichen START Proteinen allerdings durch eine zusätzliche α -Helix im N-Terminus (Abb. 1-4B), (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009).

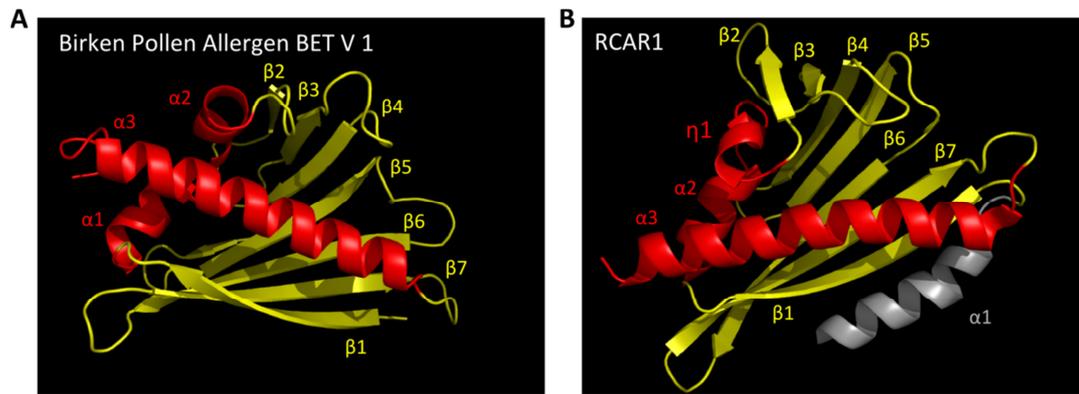


Abb. 1-4 Vergleich der START Domain vom Birken Pollen Allergen BET V 1 und RCAR1.

Dargestellt ist die Kernstruktur (START Domain) vom Birken Pollen Allergen BET V1 (A) im Vergleich zu RCAR1 (B). Die allgemeine START Domain besteht aus einem Helix-Grip Motif, welches sich aus sieben β -Strängen (gelb) zusammensetzt, die von drei α -Helices (rot) flankiert werden. Die sieben β -Stränge bilden zusammen die antiparallele β -Faltblattstruktur und formieren die hydrophobe Höhle zur Bindung des Liganden. Die Kernstruktur der RCARs unterscheidet sich von den restlichen START Proteinen durch eine zusätzliche α -Helix im N-Terminus (grau). Die hier dargestellten Strukturen wurden aus den Kristallstrukturen abgeleitet, welche von Iyer et al. (2001) bzw. Nakagawa et al. (2014) veröffentlicht wurden. Die nachträgliche Bearbeitung erfolgte mit PyMol, (PDB ID: 1BV1 und 3W9R).

Durch die ABA-Bindung an das RCAR kommt es zur Konformationsänderung zweier β -Faltblattschleifen ($\beta 3/\beta 4$ und $\beta 5/\beta 6$), wodurch eine geeignete Oberfläche geschaffen wird, die ein Andocken der PP2C an das RCAR ermöglicht. Durch die Bildung des ternären Komplexes (RCAR-ABA-PP2C) wird gleichzeitig die Phosphataseaktivität der PP2C inhibiert und die ABA-Antwort damit initiiert (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009). Es wurde nachgewiesen, dass alle 14 RCARs ABA binden können (Fujii et al. 2009; Fuchs et al. 2014), allerdings fällt die Affinität der einzelnen RCARs für ABA recht unterschiedlich aus (Dupeux et al. (2011b), Wunschel, unveröffentlichte Daten). Für die Unterfamilien I und II RCARs wurden Dissoziationskonstanten (K_d) von ca. $0,7 \mu\text{M}$ (RCAR1) (Ma et al. 2009), $1 \mu\text{M}$ (RCAR3) (Szostkiewicz et al. 2010) bzw. $1,1 \mu\text{M}$ (RCAR8) (Santiago et al. 2009b) für ABA festgestellt. Während für Mitglieder der Unterfamilie III RCARs deutlich höhere K_d Werte von $52 \mu\text{M}$ (RCAR12) (Miyazono et al. 2009) bzw. $59 \mu\text{M}$ (RCAR14) (Yin et al. 2009) für ABA detektiert wurden.

Auf den Mechanismus der ABA-Bindung an das RCAR sowie die Komplexbildung mit einer PP2C wird im Kapitel 1.4 „ABA-Rezeptor-Korezeptor Komplex“ genauer eingegangen.

1.2.2. Proteinphosphatasen 2C der Gruppe A

Die PP2Cs gehören zur Familie der Mg^{2+} - und Mn^{2+} -abhängigen Serin/Threonin Proteinphosphatasen (Leung et al. 1994; Meyer et al. 1994; Leung et al. 1997; Rodriguez et al. 1998a). Das Arabidopsis Genom codiert insgesamt 80 PP2Cs, die in zwölf Gruppen (A-J) aufgeteilt werden (Xue et al. 2008; Shi 2009; Fuchs et al. 2013). Die Gruppe A der PP2Cs besteht in Arabidopsis aus neun Mitgliedern (Abb. 1-5), die als Negativregulatoren, durch direkte Dephosphorylierung/Inhibierung der SnRK2s, an der ABA-Signaltransduktion beteiligt sind (Umezawa et al. 2009; Fuchs et al. 2013).

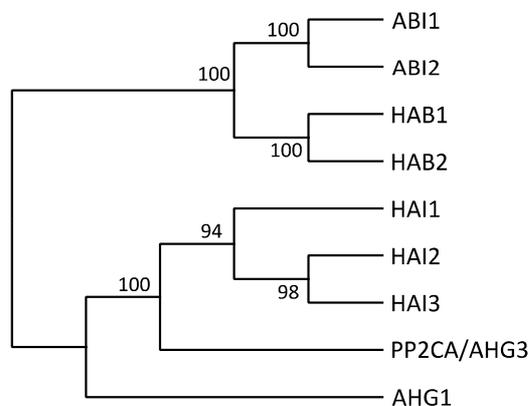


Abb. 1-5 Phylogenetischer Baum der Gruppe A PP2Cs in Arabidopsis.

Der phylogenetische Baum wurde nach der Neighbor-Joining Methode mit MEGA Version 6 erstellt. Als Distanzmethode wurde Bootstrapping angewendet mit 1000 Teildatensätzen. Die Werte geben eine quantitative Auskunft über die Ähnlichkeit zweier PP2Cs in Prozent an.

Die ersten zwei PP2C wurden mit Hilfe von Mutanten identifiziert, die einen ABA-insensitiven Phänotyp aufwiesen und sind dementsprechend als „*ABA insensitive 1* bzw. *2*“, kurz *ABI1* (Leung et al. 1994; Meyer et al. 1994) und *ABI2* (Leung et al. 1997; Rodriguez et al. 1998a), bezeichnet worden. In diesen Mutanten wurde jeweils ein dominantes Allel identifiziert, *abi1-1* und *abi2-1*, bei denen der gleiche Aminosäureaustausch in der katalytischen Domäne der Proteinphosphatase festgestellt wurde (Leung et al. 1994; Rodriguez et al. 1998a). Dieser Austausch resultiert in einer Beeinträchtigung der Phosphataseaktivität und führt letztendlich zu einem ABA-insensitiven Phänotyp in der Samenkeimung, im Wurzelwachstum sowie in der Regulierung der Stomata (Koornneef et al. 1984; Finkelstein and Somerville 1990; Leung et al. 1997). Lange war vermutet worden, dass die geringe Phosphataseaktivität die Ursache für den beobachteten Phänotyp ist (Bertauche

et al. 1996; Leung et al. 1997). Tatsächlich stellte sich später heraus, dass diese mutierten PP2Cs ineffiziente Komplexbildner mit RCARs sind, was wiederum in einer effizienten Inhibierung der SnRK2s und schließlich auch in der Blockierung der ABA-Antwort resultiert (Ma et al. 2009).

Neben ABI1 und ABI2 wurden weitere PP2Cs identifiziert, für die eine Funktion im ABA-Signalweg und/oder bei osmotischem Stress festgestellt wurde. Diese PP2Cs wurden meist über Funktionsverlust-Mutanten identifiziert, für die ein ABA-hypersensitiver Phänotyp während der Samenkeimung beobachtet wurde. Hierzu zählen *AHG1 (ABA Hypersensitive Germination 1)* (Nishimura et al. 2007), *PP2CA/AHG3 (ABA Hypersensitive Germination 3)* (Yoshida et al. 2006b), *HAB1 (Homology to ABI1)* (Rodriguez et al. 1998b) und *HAB2 (Homology to ABI2)* (Saez et al. 2004). Für *HAI1 (Highly ABA-Induced PP2C 1)*, *HAI2/HONSU (Highly ABA-Induced PP2C 2)* und *HAI3 (Highly ABA-Induced PP2C 3)* wurde anfänglich eine positive Funktion in der Samenkeimung und eine inhibitorische Regulation während der Keimlingsentwicklung postuliert (Fujita et al. 2009; Bhaskara et al. 2012; Lim et al. 2012). Kim et al. (2013) wiesen aber nach, dass eine Funktionsverlust-Mutante für *HAI2 (hon-1)* in einem ABA-hypersensitiven Phänotyp während der Samenkeimung resultiert, infolge einer stark ausgeprägten Dormanz. Mit Hilfe verschiedener transgener Arabidopsis-Linien, Funktionsverlust-Mutanten und Überexpressionen, wurde für alle neun PP2C spezifische wie auch redundante Funktionen während der Samenentwicklung, der Samenkeimung, des vegetativen Wachstums wie auch bei der Regulierung der Transpiration nachgewiesen (Gosti et al. 1999; Merlot et al. 2001; Saez et al. 2004; Nishimura et al. 2004; Kuhn et al. 2006; Saez et al. 2006; Nishimura et al. 2007; Rubio et al. 2009; Bhaskara et al. 2012; Lim et al. 2012; Antoni et al. 2012; Zhang et al. 2012a).

Die PP2Cs agieren als Torwächter der SnRK2s durch direkte Dephosphorylierung eines Serin-Restes im Aktivierungs-Loop der Kinase (S175 in SnRK2.6/OST1), sodass die SnRK2-Kinaseaktivität inhibiert und die Initiierung der ABA-Signaltransduktion blockiert wird (Umezawa et al. 2009; Xie et al. 2012; Vlad et al. 2009; Belin et al. 2006; Boudsocq et al. 2007). Die Ausbildung dieser Interaktion erfolgt über die katalytische Domäne der PP2C und die C-terminal gelegenen Domäne II der SnRK2 (Yoshida et al. 2006a; Xie et al. 2012), welche auch als ABA-Box bezeichnet wird (Soon et al. 2012). Interessant ist allerdings, dass die

Oberfläche dieser Domäne II ähnlich zur RCAR-Bindeoberfläche ist und beide Kontaktbereiche für die Komplexbildung mit der PP2C benötigt werden (Soon et al. 2012).

1.2.3. Proteinkinasen

Die Unterfamilie 2 der SNF1(sucrose-non-fermenting 1)-Related Kinases (SnRK2s) gehören zur CDPK (Calcium Dependent Protein Kinases)/SnRK Superfamilie (Hrabak et al. 2003), werden als Positivregulatoren der ABA-Signaltransduktion angesehen (Fujita et al. 2009) und agieren abwärts der PP2Cs in der ABA-Signaltransduktion (Yoshida et al. 2002; Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2006a). Das Arabidopsis Genom codiert insgesamt zehn *SnRK2s*: *SnRK2.1/SRK2G*, *SnRK2.2/SRK2D*, *SnRK2.3/SRK2I*, *SnRK2.4/SRK2A*, *SnRK2.5/SRK2H*, *SnRK2.6/SRK2E/OST1*, *SnRK2.7/SRK2F*, *SnRK2.8/SRK2C*, *SnRK2.9* und *SnRK2.10/SRK2B* (Hrabak et al. 2003). Der Einfachheit halber wird im weiteren Verlauf die Bezeichnung SnRK2.x verwendet.

Einzelne SnRK2s, genauer SnRK2.2/2.3/2.6(OST1)/2.7 und SnRK2.8, können durch exogener ABA-Zugabe transient in Arabidopsis Protoplasten die ABA-abhängige Genexpression aktivieren (Boudsocq et al. 2004; Boudsocq et al. 2007). Für SnRK2.2/2.3 und SnRK2.6/OST1 wurden *in planta* ABA-abhängige Funktionen in der Samenkeimung, im vegetativen Wachstum und bei der Regulierung der Stomata mit Hilfe von T-DNA Insertionslinien bzw. Funktionsverlust-Mutanten nachgewiesen (Mustilli et al. 2002; Fujii et al. 2007). Für multiple Knockout-Linien aus *SnRK2.2/2.3/2.6(ost1)* wurden schwerwiegende Defizite in der Samenentwicklung und der Verlust der Dormanz festgestellt. Die Schoten dieser Triple-Mutante beinhalten vivipare Samen, die bereits bei ausreichender Luftfeuchtigkeit in den Schoten keimten (Fujita et al. 2009; Nakashima et al. 2009). Für die zehnfach Knockout-Mutante von *SnRK2.1-10* wurden neben massiven Wachstumsdefiziten auch Defekte in der Regulation der Genexpression bei osmotischen Stress und in der ABA-Akkumulierung beobachtet (Fujii et al. 2011). Damit sind die SnRK2s das Ziel sowohl ABA-unabhängiger als auch ABA-abhängiger Signalwege (Yoshida et al. 2006a; Boudsocq et al. 2007; Fujita et al. 2009). Wobei SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6/OST1 bei osmotischen Stress durch ABA aktiviert werden und dann redundante Funktionen bei der Steuerung der Genexpression bzw. der Keimung übernehmen (Boudsocq et al. 2004; Fujii et al. 2007; Nakashima et al.

2009), während sich unter den übrigen sieben SnRK2s Vertreter befinden, die eine Rolle bei der Induktion der stressabhängigen ABA-Biosynthese spielen könnten (Fujii et al. 2011).

1.3. ABA-Rezeptorkomplex

1.3.1. ABA-Bindung an RCAR

Die ABA-Bindetasche wird durch die η 1- und α 3-Helix sowie die β 3- β 7 Faltblätter gebildet (Abb. 1-4B). Sie besteht aus mehreren Aminosäureresten, die in allen 14 RCARs konserviert sind (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009). ABA passt mit ihren funktionellen Gruppen, der Kohlenwasserstoffkette und dem Cyclohexan, in die hydrophobe Umgebung der Liganden-Höhle, sodass Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Ionenbindung ausgebildet werden können, um den Liganden in der RCAR-Höhle zu halten (Santiago et al. 2012). Im folgenden Abschnitt wird dieser Vorgang anhand der Kristallstruktur von RCAR14 genauer behandelt (Abb. 1-6).

Die Carboxylgruppe von ABA wird durch vier RCAR-Aminosäurereste (RCAR14: E147, Y124, S126, K64) über hydrogene Wechselwirkungen koordiniert (Abb. 1-6A) (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Santiago et al. 2012). Das Lysin (K64) befindet sich hierbei in der η 1-Helix, das Serin (S126) und das Tyrosin (Y124) im β 6-Faltblatt und die Glutaminsäure (E147) im β 7-Faltblatt. Außerdem verbindet ein Wassermolekül über Wasserstoffbrückenbindungen die Carboxylgruppe von ABA mit der RCAR14 Glutaminsäure (E147) und dem Asparagin (N173) in der α 3-Helix (Abb. 1-6B) (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2012). Ein weiteres Wassermolekül verbindet Glutaminsäure (E98) im RCAR14 β 4-Faltblatt mit der Carboxylgruppe und der Hydroxylgruppe von ABA über Wasserstoffbrücken (Abb. 1-6C). Ein drittes Wassermolekül koordiniert den Carbonylsauerstoff durch das Arginin (R120) im RCAR14 *Latch Loop* (Abb. 1-6D). Alle Aminosäurereste, die an der direkten Koordination von ABA in der Bindehöhle beteiligt sind, sind in allen 14 RCARs konserviert (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2012; Zhang et al. 2015).

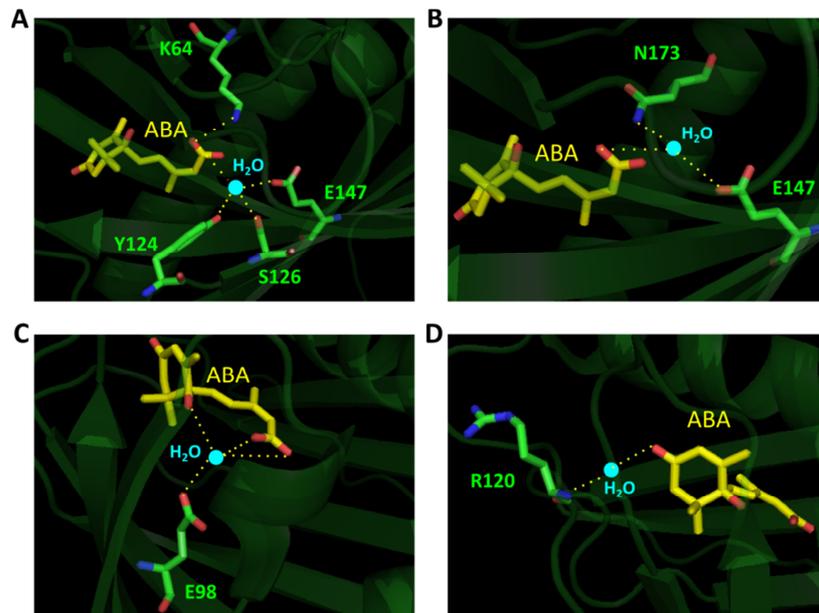


Abb. 1-6 Wahrnehmung von ABA durch RCAR14.

Dargestellt sind Ausschnitte der konservierten ABA-Bindehöhle von RCAR14. Ein Netzwerk aus hydrogenen Wechselwirkungen (gelbe Linien), vermittelt durch einzelne Wassermoleküle (blau), führt zur Koordination von ABA (gelb) in der Liganden-Höhle der RCARs. Darin involvierte RCAR-Aminosäurereste sind als grüne Sticks markiert. Die hier dargestellten Struktur-Ausschnitte sind von der Kristallstruktur abgeleitet, welche durch Yin et al. (2009) veröffentlicht wurde. Die nachträgliche Bearbeitung erfolgte mit PyMol, (PDB ID: 3KDI).

Die ABA-induzierte Konformationsänderung wird am Beispiel von RCAR11 erklärt, da nur für dieses RCAR die Kristallstruktur vom *Gate* und *Latch Loop* in offener und geschlossener Konformation vereint in einer Abbildung zur Verfügung stand.

Durch die ABA-Bindung wird eine Konformationsänderung im RCAR11 Prolin (P88, cis/trans) induziert, welche zu einer Schließung der Bindetasche über dem *Gate Loop* führt (Abb. 1-7A) (Nishimura et al. 2009; Yin et al. 2009). Des Weiteren koordiniert die Imidazol-Seitenkette vom RCAR11 Histidin (H115) nach der Konformationsänderung die Abscisinsäure (Abb. 1-7B) (Nishimura et al. 2009; Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009). Die durch die ABA-Bindung induzierte Konformationsänderungen und die neu ausgebildeten intermolekularen Wechselwirkungen führen letztendlich zu einer Stabilisierung der Bindetasche und einer Neuausrichtung der C-terminalen α 3-Helix. Zusätzlich wird eine Interaktionsfläche zur Bindung an die PP2C-Kontaktfläche erzeugt (Nishimura et al. 2009; Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009).

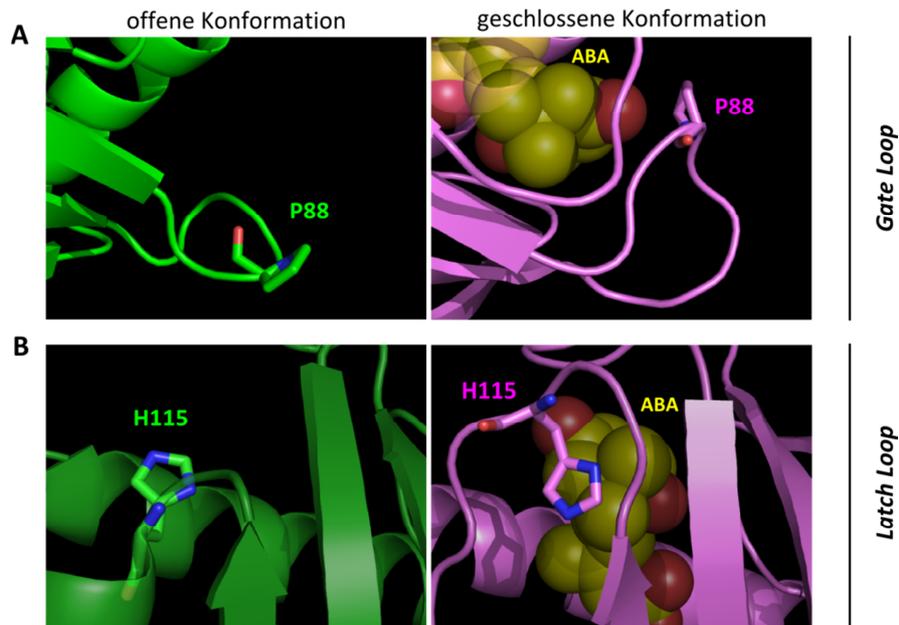


Abb. 1-7 ABA-vermittelte Konformationsänderung im *Gate* und *Latch Loop*.

Dargestellt sind Ausschnitte der *Gate* und *Latch Loop* Struktur von RCAR11 in offener Konformation (grüne Struktur) und in geschlossener (Lila) mit ABA (Gelb). Darin involvierte Aminosäurereste sind als Sticks in Grün bzw. Lila, entsprechend der Konformation, markiert. Die hier dargestellten Struktur-Ausschnitte sind aus der Kristallstruktur abgeleitet, welche von Nishimura et al. (2009) veröffentlicht wurde. Die nachträgliche Bearbeitung erfolgte mit PyMol, (PDB ID: 3K3K).

1.3.2. Komplexbildung mit PP2C

Die Ausbildung des ternären Komplexes (RCAR-ABA-PP2C) wird im nachfolgenden Abschnitt anhand der Kristallstruktur von RCAR13 im Komplex mit HAB1 erklärt.

Für die Komplexbildung sind zwei charakteristische Interaktionsregionen zwischen dem ABA-Rezeptor und dem katalytischen Zentrum der PP2C beteiligt. Durch das Andocken des ABA-Korezeptors an das RCAR bildet ein konserviertes Serin im *Gate Loop* (RCAR13 S109) eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem PP2C Carbonylsauerstoff der Glutaminsäure (HAB1 E203) aus (Abb. 1-8A), (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Dupeux et al. 2011a; Zhang et al. 2012b). Die Glutaminsäure (HAB1 E203) befindet sich im katalytischen Zentrum der Proteinphosphatase und ist in allen neun PP2Cs konserviert (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009).

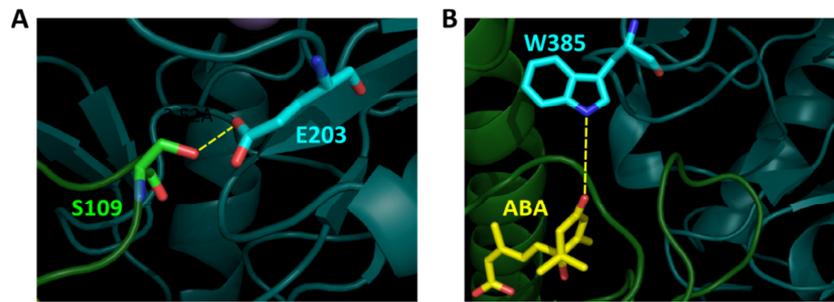


Abb. 1-8 Interaktionsregionen zwischen ABA Rezeptorkomplex und PP2C.

Dargestellt sind Ausschnitte der Interaktionsregionen zwischen RCAR13 (Grün) und HAB1 (Blau) mit den daran beteiligten Aminosäureresten bzw. mit ABA (Gelb). Die dafür notwendigen Aminosäuren von RCAR13 (S109) und HAB1 (E203 und W385) sind jeweils in Grün bzw. Blau markiert. Die dargestellten Strukturausschnitte wurden von der Kristallstruktur abgeleitet, die von Zhang et al. (2012b) publiziert wurde. Die nachträgliche Bearbeitung erfolgte mit PyMol, (PDB ID: 4DS8).

Zusätzlich wird das Tryptophan (HAB1 W385), welches mit Ausnahme von AHG1 in allen Gruppe A PP2Cs vorkommt, zwischen die RCAR *Gate Loops* eingefügt (Dupeux et al. 2011a; Fuchs et al. 2013). Das Indol des Tryptophans dient als „Deckel“ der Ligandenhöhle und koordiniert über eine Wasserstoffbrückenbindung die Keto-Gruppe von ABA (Abb. 1-8B) (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2012). Die daraus resultierende Interaktion führt zu einer Stabilisierung der ABA-Bindung an das RCAR und schließlich auch zur Stabilisierung des RCAR-PP2C Komplexes (Ma et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2009a).

Im Gegensatz zu den restlichen acht PP2Cs besitzt AHG1 ein Valin (V289) an der entsprechenden Position, welches durch das Fehlen des aromatischen Indolringes, eine deutlich kleiner Struktur aufweist verglichen zum Tryptophan. Für AHG1 konnte bisher keine direkte ABA-abhängige Inhibierung durch ein RCAR nachgewiesen werden (Dupeux et al. 2011a; Antoni et al. 2012), dafür aber eine Negativregulation von SnRK2.3 und SnRK2.6/OST1 (Umezawa et al. 2009). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ein Aminosäureaustausch, des angesprochenen Tryptophans, in einer grundlegenden Inhibierung von SnRK2.6/OST1 durch $hab1^{W385A}$ resultiert, auch in Gegenwart von ABA und RCAR1/9 bzw. RCAR12 (Dupeux et al. 2011a). Des Weiteren führt eine vergleichbare Mutation in ABI1 (W300) zum deutlichen Verlust der Bindeaffinität gegenüber RCAR12 (Miyazono et al. 2009) und demonstriert die Notwendigkeit dieses Aminosäurerestes zur Bildung des ternären Komplexes. Folglich könnte AHG1 die ABA-Antwort über die Dephosphorylierung von SnRK2.3 und SnRK2.6/OST zwar inhibieren, aber es bleibt fraglich,

ob eine direkte AHG1-Regulierung durch RCARs *in planta* vorkommt bzw. AHG1 an der ABA-abhängigen Regulierung der Signaltransduktion beteiligt ist.

1.3.3. ABA-Signaltransduktion

Durch die Anbindung des ABA-Rezeptors an die katalytische Seite der PP2C, wird die SnRK2 gleichzeitig aus der Substrattasche der Proteinphosphatase verdrängt (Soon et al. 2012; Zhou et al. 2012), da die SnRK2s eine schlechtere Bindungsaffinität gegenüber den PP2Cs aufweisen als die ABA-gebundenen RCARs (Melcher et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010; Soon et al. 2012). So wurde z.B. für RCAR1-ABI2 ein K_d von 64 nM zu ABA ermittelt (Ma et al. 2009), für RCAR4-ABI1 18 nM (Hao et al. 2011), für RCAR8- Δ NHAB1 38 nM (Santiago et al. 2009b) und für RCAR14-ABI1 250 nM (Hao et al. 2011). Die schlechtere Bindeaffinität der SnRK2s gegenüber den PP2Cs wurde von Soon et al. (2012) auf Grund von Schwierigkeiten während der Kristallisation vermutet, die mit der hohen Dissoziationsrate des SnRK2-PP2C-Komplexes in Verbindung stehen könnten.

Infolge der besseren Bindeaffinität des ABA-gebundenen RCARs gegenüber der PP2C und der damit verbundenen ternären Komplexbildung (RCAR-ABA-PP2C) wird die Phosphataseaktivität inhibiert und die SnRK2 aus der Inaktivierung durch Dephosphorylierung entlassen (Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009). Durch die damit verbundene Autoaktivierung der Proteinkinase werden nachgeschaltete ABA-Signalkomponenten direkt reguliert. SnRK2.6/OST1 aktiviert (SLAC1) und inhibiert (KAT1) verschiedene Ionenkanäle, die an der Schließung der Stomata beteiligt sind (Abb. 1-9A) (Yoshida et al. 2002; Mustilli et al. 2002; Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Sato et al. 2009). Darüber hinaus können die SnRK2s spezifische Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, welche die ABA-abhängige Genexpression regulieren und damit die ABA-Antwort initiieren (Abb. 1-9B) (Furihata et al. 2006; Fujii et al. 2007; Nakashima et al. 2009).

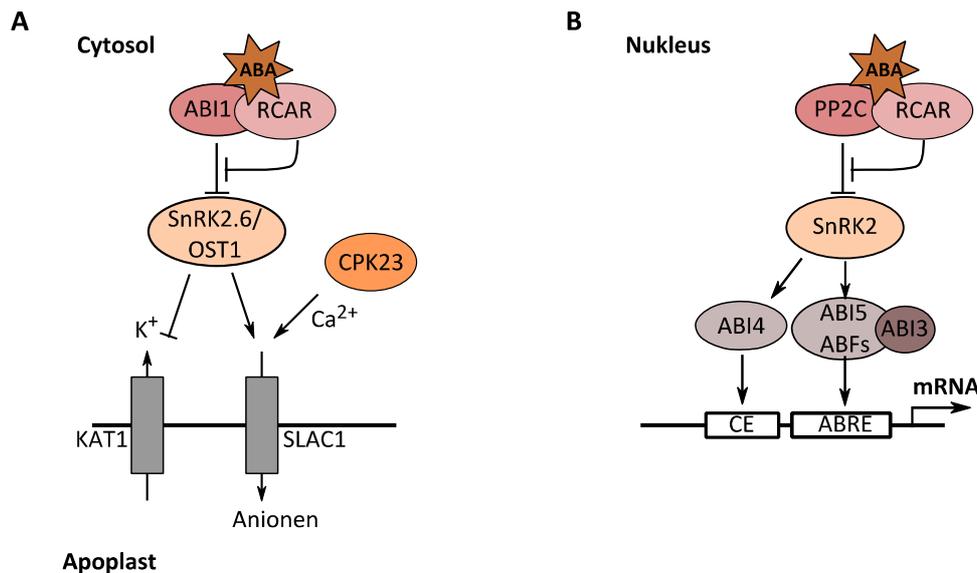


Abb. 1-9 ABA-Signalweg zur Regulierung der Stomata-Schließung und Genexpression.

In Gegenwart von ABA kommt es zur ternären Komplexbildung (RCAR-ABA-PP2C). Die daraus resultierende Inhibierung der PP2C-Phosphataseaktivität führt wiederum zur Entlassung der SnRK2 aus der Inhibierung und zur Autoaktivierung der Kinaseaktivität. (A) SnRK2.6/OST1 reguliert über Aktivierung (SLAC1) und Inhibierung (KAT1) verschiedener Ionenkanäle die Stomata-Schließung als ABA-Antwort. Neben SnRK2.6/OST1 wird SLAC1 zusätzlich auch Ca²⁺-abhängigen über CPK23 reguliert. (B) Im Nukleus erfolgt die Aktivierung verschiedener TFs mittels SnRK2-Phosphorylierung. Die TFs binden an spezifische *cis*-Elemente (GC-reiche „Coupling Elements“ oder ABREs), um die ABA-abhängige Genexpression zu regulieren und die ABA-Antwort zu initiieren. Diese Abbildung wurde nach Raghavendra et al. (2010) erstellt.

Die ABA-vermittelte Schließung der Stomata erfolgt über die Inhibierung der K⁺-Ionenkanäle (KAT) und die Aktivierung der S-Typ Anionen-Kanäle (SLAC1) über Phosphorylierung durch SnRK2.6/OST1 oder CPK23 (Calcium-Dependent Protein Kinase 23) (Sato et al. 2009; Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Brandt et al. 2012). SnRK2.6/OST1 übernimmt hierbei eine essentielle Funktion, da ausschließlich für *SnRK2.6/OST1* eine starke Promotoraktivität in den Schließzellen detektiert (Fujii et al. 2007) und nur für die *snrk2.6/ost1* Einzelknockout ein ABA-insensitiver Phänotyp in der Regulierung der Transpiration beobachtet wurde (Yoshida et al. 2002; Mustilli et al. 2002). Die Interaktion von ABI1, ABI2 bzw. PP2CA mit SnRK2.6/OST1 resultiert in der Inhibierung der Kinaseaktivität und verhindert indirekt die Aktivierung von SLAC1, sodass das Öffnen der Stomata eingeleitet wird (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009). Zusätzlich wurde für PP2CA und ABI1 auch eine direkte Inhibierung von SLAC1 durch Dephosphorylierung festgestellt (Lee et al. 2009; Brandt et al. 2012).

Neben schließzellenspezifischen Ionenkanälen können die SnRK2s auch eine Vielzahl an unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren (TF) durch Phosphorylierung regulieren. Hierzu

zählen u.a. die Klassen der B3 TF (z.B. ABI3) (Monke et al. 2004; Nakashima et al. 2006), bZIP TF (z.B. ABI5, AREBs, ABFs) (Finkelstein and Lynch 2000; Lopez-Molina and Chua 2000; Choi et al. 2000; Uno et al. 2000), AP2/ERF TF (ABI4) (Finkelstein et al. 1998; Soderman et al. 2000), HD-ZIP TF (z.B. AtHB6) (Himmelbach et al. 2002), MYB TF (MYB2) (Urao et al. 1993; Abe et al. 1997) sowie bHLH TFs (MYC2) (Urao et al. 1993; Abe et al. 1997). Die Transkriptionsfaktoren agieren als Regulatoren der Genexpression durch das Anbinden an spezifische *cis*-Elemente. Diese *cis*-Elemente befinden sich wiederum in der Promotorregion ABA-spezifischer Gene. ABI3 bindet z.B. an ein RY/Spe Sequenz-Motif (CATGCA) und aktiviert so die Expression vieler samenspezifischer Gene (Dickinson et al. 1988; Monke et al. 2004). ABI5 hingegen bindet an ABREs (ABA responsive Elements) und reguliert die Expression verschiedener Gene, die an der Samenreifung und der Ausbildung der Dormanz beteiligt sind (Bensmihen et al. 2002; Carles et al. 2002; Piskurewicz et al. 2008).

1.4. mini Singlet Oxygen Generator

„MiniSOG“ (mini Singlet Oxygen Generator) ist ein genetischer Marker, der aus dem Arabidopsis Phototropin 2 generiert wurde und zur Lokalisation von Proteinen verwendet wird. Hierbei handelt es sich um ein fluoreszierendes Flavoprotein, mit einer Größe von 106 Aminosäuren, welches unter Verwendung eines einzigen Präparates die Elektronenmikroskopie mit der Fluoreszenzmikroskopie verbindet (Shu et al. 2011).

Phototropine sind Blaulichtrezeptoren und bestehen aus zwei hochkonservierten LOV (*light-oxygen-voltage*) Domänen, LOV1 und LOV2. Diese Domänen können jeweils ein Flavin-Mononukleotid (FMN) u.a. über die Reste eines hoch konservierten Cysteins binden (Jarillo et al. 2001; Kagawa et al. 2001; Crosson and Moffat 2001). FMN ist in Zellen allgegenwärtig und übernimmt eine Reihe an biologischen Funktionen sowie die Generierung von Singulett-Sauerstoff (Massey 2000; Baier et al. 2006). Während der Anbindung des FMN an das Phototropin wird die gesamte Anregungsenergie dafür verwendet, um mit dem Cystein-Rest der LOV Domäne eine kovalente Bindung einzugehen. Diese Bindung führt wiederum dazu, dass FMN keinen Singulett-Sauerstoff mehr generieren kann, weil die gesamte Anregungsenergie aufgebraucht wurde (Swartz et al. 2001; Shu et al. 2011). Aus diesem Grund sollte ein fluoreszierendes Protein generiert werden, das zusätzlich Singulett-Sauerstoff produzieren kann. Hierfür wurde von Shu et al. (2011) das Cystein der LOV2

Domäne in ein Glycin umgewandelt, da es keine essentielle Aminosäure zur Anbindung des FMN darstellt. Durch diesen AS-Austausch wurden Mutanten generiert, die zwar Singulett-Sauerstoff produzieren, aber die Fähigkeit zur Eigenfluoreszenz verloren haben (Crosson and Moffat 2001; Shu et al. 2011). Um diesen Nachteil zu beheben, wurden zusätzlich zum Cystein fünf weitere Aminosäuren ausgetauscht, die sich in der FMN-Bindungsstelle befinden (Abb. 1-10A). Mit Hilfe dieser Mutationen wurde ein neues fluoreszierendes Protein generiert, das außerdem Singulett-Sauerstoff produzieren kann und dementsprechend als „miniSOG“ bezeichnet wurde (Shu et al. 2011).

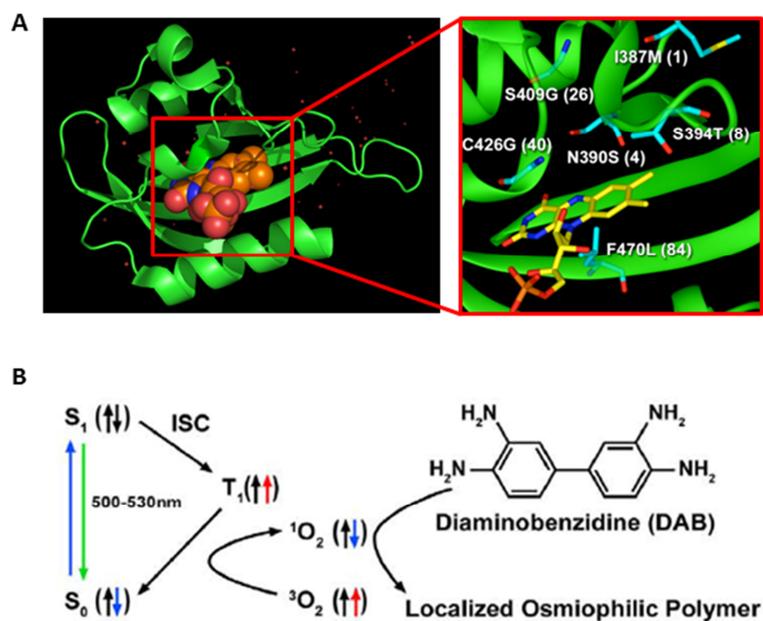


Abb. 1-10 MiniSOG Struktur und Wirkweise.

(A) Dargestellt ist die Kristallstruktur der LOV2 Domäne (grün) mit dem gebundenen FMN in orange (PDB ID: 1G28) sowie ein Ausschnitt der FMN Binderegion aus der miniSOG mit den entsprechend mutierten Aminosäuren im Vergleich zu LOV2. Die eingeklammerten Nummern basieren auf der miniSOG Proteinsequenz. (B) Schematische Darstellung wie miniSOG das TEM-Signal nach Blaulicht-Bestrahlung wiedergibt. Die elektronischen Anregungszustände sind mit Pfeilen markiert. ISC (Intersystem Crossing) stellt den Übergang vom Singulett-Sauerstoff (S_1 bzw. 1O_2) zum Triplett-Sauerstoff (T_1 bzw. 3O_2) dar, wodurch es zur Polymerisierung von DAB kommt, welches mit Hilfe von Osmium für die TEM eingefärbt werden kann. Diese Abbildung stammt aus Shu et al. (2011), wurde modifiziert und von Roger Tsien zur Verwendung für diese Arbeit genehmigt.

Die miniSOG wird mit Wellenlängen von ca. 450 nm angeregt und die daraus resultierende grüne Emission wird bei 500 bis 528 nm detektiert. Dieses grün fluoreszierende Signal kann für die gewebespezifische Lokalisation der mit miniSOG markierten Proteine über die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) detektiert werden. Durch die Anbindung des

Kofaktors FMN ist unter Bestrahlung mit Blaulicht die Generierung von Singulett-Sauerstoffmolekülen möglich. Während der Umwandlung vom Singulett-Sauerstoff zum Triplett-Sauerstoff wird Energie freigesetzt, die wiederum zur Polymerisierung von DAB (Diaminobenzidin) benötigt wird. Durch das Einfärben des polymerisierten DAB mit dem Schwermetall Osmium wird die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins im Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht (Abb. 1-10B), (Shu et al. 2011).

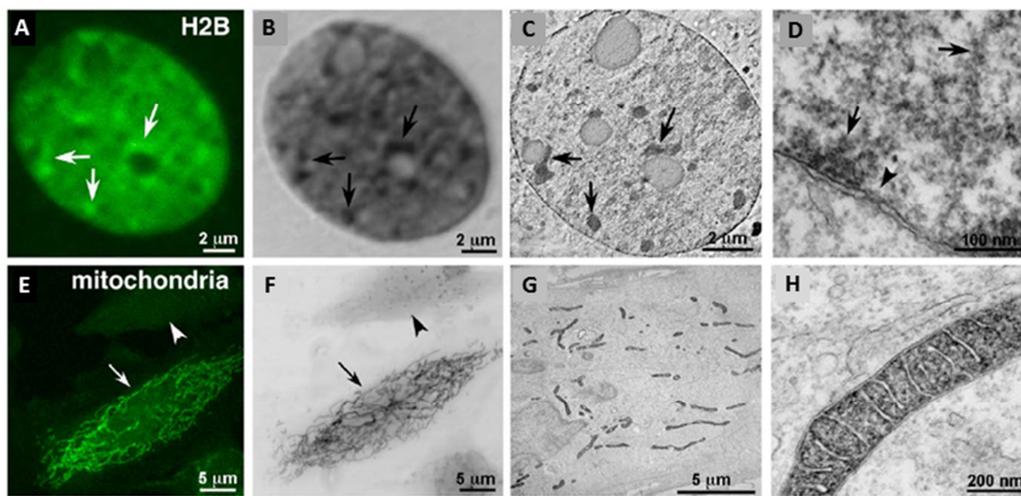


Abb. 1-11 MiniSOG-Produkte im Vergleich zwischen CLSM und TEM.

Konfokale Fluoreszenz eines Histone 2B (A) und von Mitochondrien in einer HeLa-Zelle (E), unter Durchlicht (B und F) und während der Elektronenmikroskopie (C, D, G und H). (A-D) HeLa-Zellen exprimieren mit miniSOG markiertes Histone 2B. Markiert wurden die Chromatinfasern nahe der Kernmembran (Pfeile) sowie eine Kernpore (Pfeilspitze). (E-H) Mitochondriale markierte miniSOG. (E) zeigt eine CLSM Aufnahme zu Beginn der Photooxidation und (F) eine Durchlichtaufnahme währenddessen. Mit einem Pfeil wurde eine transfizierte Zelle markiert und mit einer Pfeilspitze eine nicht-transfizierte Zelle. Mit Hilfe des TEM wurden die innere und äußere Membran sowie die Cristae des Mitochondriums sichtbar gemacht (G und H). Diese Abbildung stammt aus Shu et al. (2011) und wurde modifiziert. Die Verwendung der hier dargestellten Abbildung wurde von Roger Tsien für diese Arbeit genehmigt.

Ein entscheidender Vorteil der miniSOG ist die Größe von lediglich 106 Aminosäuren, verglichen mit GFP, das fast doppelt so groß ist. Für die Untersuchung der Proteinlokalisierung mit dem Elektronenmikroskop werden zudem keine exogenen Kofaktoren, wie Antikörper, Sonden oder Detergenzien benötigt, welche die Permeabilität der zu untersuchenden Probe (Einzeller oder mehrzelliger Organismus) herabsetzen (Shu et al. 2011; Ou et al. 2015). Mit Hilfe der miniSOG ist die gleichzeitige Proteinlokalisierung im Gewebe (CLSM) wie auch auf zellulärer Ebene im Cytosol und in Organellen (TEM) mit nur einem fixierten Präparat möglich (Abb. 1-11). Ein entscheidender Nachteil der miniSOG ist allerdings, dass die grüne

Fluoreszenz deutlich geringer ausfällt verglichen zum GFP (Shu et al. 2011; Christie et al. 2012; Ou et al. 2015).

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

In den letzten Jahren wurde mit der Charakterisierung der ABA-Rezeptoren begonnen und es wurde gezeigt, dass 13 RCARs die ABA-Antwort positiv regulieren, mit Ausnahme von RCAR7 (Fujii et al. 2009). Mit Hilfe von Hefe-Zwei-Hybrid (Y2H) Analysen sind bereits einige physikalische RCAR-PP2C Interaktionen detektiert worden (Fuchs 2013). Es ist aber weiterhin unklar, welche dieser potentiellen RCAR-PP2C Kombinationen eine regulatorische Funktion *in planta* übernehmen bzw. tatsächlich in Arabidopsis vorkommen.

Ziel dieser Arbeit ist es somit, die Kombinatorik und Spezifität aller 126 möglichen RCAR-PP2C Komplexe zu untersuchen, um ein besseres Verständnis über die Rolle der RCARs im ABA-Signalweg zu erhalten. Diese Untersuchungen erfolgen weitgehend in Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten, da diese Methode näher am Organismus Pflanze dran ist verglichen zur Y2H Analyse bzw. *in vitro* Phosphataseaktivität-Tests. Des Weiteren ist das Protoplastensystem eine einfache und vor allem schnelle Methode, um die ABA-Signaltransduktion durch transiente (Ko-)Expression von RCARs und/oder PP2Cs zu untersuchen. Die ektopische Expression der zu untersuchenden Gene erfolgt hierbei unter dem 35S Promoter, des Cauliflower Mosaic Virus, der eine konstitutive und gewebeunspezifische Expression ermöglicht. Zusätzlich sollen potentielle Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Ausbildung spezifischer ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen in Frage kommen würden. Um die Notwendigkeit dieser Aminosäurereste zu ermitteln, werden verschiedene Varianten mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese (SDM) generiert und anschließend *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Darüber hinaus soll die Funktion aller ABA-Rezeptoren auf Samenkeimung, Wurzelentwicklung und Regulation der Stomata-Apertur analysiert werden, wie es bereits für RCAR1 gezeigt wurde (Ma et al. 2009). Es soll der Frage nachgegangen werden, ob alle 14 RCARs das Potential für ABA-abhängige Funktionen *in planta* besitzen und ob spezifische oder redundante Funktionen einzelner RCARs vorhanden sind. Hierfür werden stabile überexprimierende (35S) RCAR-Linien in Arabidopsis generiert, auf Homozygotie selektiert und anschließend analysiert.

Mögliche Proteinfunktionen korrelieren mit ihrer gewebespezifischen Lokalisation. Für die Familie der RCARs liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich Genexpressionsdaten (Schmid et al. 2005; Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007), GUS-abhängige Promotoranalysen (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Antoni et al. 2013) sowie einzelne Lokalisationsdaten ektopisch exprimierter RCARs vor (Ma et al. 2009; Santiago et al. 2009b; Szostkiewicz et al. 2010). Studien zur Lokalisation der endogenen RCARs sind hingegen noch nicht vorhanden. Folglich soll mit der Generierung und Untersuchung endogener RCARs, markiert mit zwei fusionierten Fluoreszenzproteinen, begonnen werden. In diesem Zusammenhang soll ein neuartiges Reportergen, „miniSOG“, für endogene Lokalisationsanalysen *in planta* etabliert werden.

2. Ergebnisse

2.1. Regulierung der ABA-Signaltransduktion durch ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten

Die Familie der RCARs (*Regulatory Component of ABA Receptors*) besteht in Arabidopsis aus 14 Mitgliedern und lässt sich anhand ihrer Primärstruktur in drei Unterfamilien einteilen (Ma et al. 2009; Park et al. 2009; Nishimura et al. 2010). Einzelne RCARs wurden unabhängig voneinander mit Hilfe von Pyrabactin, ein Wachstumsinhibitor, (PYR1/RCAR11) (Park et al. 2009) sowie als PP2C-Interaktionspartner identifiziert (Ma et al. 2009; Nishimura et al. 2010) und deren Rolle im ABA-Signalweg analysiert. Ma et al. (2009) konnten mit der transienten Überexpression von RCAR1 in Arabidopsis Protoplasten eine starke Stimulierung der ABA-Antwort nachweisen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von RCAR1 in *A. thaliana* zu ABA-Hypersensitivität in der Samenkeimung, Wurzelelongation und in der Regulierung der Stomata-Schließung verglichen zum Wildtyp führt (Ma et al. 2009). Neben RCAR1 wurde für zwölf weitere RCARs, mit Ausnahme von RCAR7, eine ABA-Rezeptorfunktion *in vivo* nachgewiesen (Fujii et al. 2009). Um die Frage zu beantworten, ob es sich aber bei allen 14 Mitgliedern dieser Familie um einen wirksamen ABA-Rezeptor handelt, erfolgte die transiente Untersuchung aller RCARs in Arabidopsis Protoplasten.

2.1.1. RCAR-abhängige Regulierung der ABA-Signaltransduktion

Zur Charakterisierung der ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten wurde die transiente Analyse in Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten gewählt. Das Protoplastensystem ist eine einfache und vor allem schnelle Methode, um die ABA-Signaltransduktion durch ektopische (Ko-)Expression von RCAR und/oder PP2C sowie einem ABA-abhängigen Reporterkonstrukt zu untersuchen (Sheen 2001; Yoo et al. 2007). Um eine ektopische Expression der zu untersuchenden Komponenten des ABA-Signalwegs zu erreichen, wurden die codierenden Sequenz eines jeden RCARs aus bereits bestehenden Konstrukten der Lehrstuhl-Strainliste amplifiziert und mit dem konstitutiv aktiven 35S Promotor (aus *Cauliflower Mosaic Virus*, CaMV) fusioniert (Benfey and Chua 1990; Odell et al. 1985). Die 35S fusionierten PP2C-Konstrukte standen zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung und wurden von Stefan Fuchs (ehemaliger Lehrstuhlmitarbeiter) amplifiziert. Das verwendete Reporterkonstrukt setzt sich aus der Promotorregion des ABA-induzierbaren *Rd29B* (*Responsive to Desiccation*

29B) und dem nachgeschalteten Gen, welches für die *LUC* (Glühwürmchen *Photinus pyralis* Luciferase) codiert, zusammen (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1993; Luehrsen et al. 1992). Das zweite Reporterkonstrukt besteht aus dem konstitutiv aktiven 35S Promotor (Benfey and Chua 1990; Odell et al. 1985) sowie dem Gen, das für die β -Glucuronidase (GUS, (Jefferson 1987)) codiert und dient als interner Standard für eine erfolgreiche Transfektion bzw. für die Normalisierung der Versuchsdaten.

Damit für die nachfolgende Untersuchung des RCAR-Einflusses auf die Aktivierung der ABA-Antwort eine geeignete Menge an ABA bzw. Effektor-DNA eingesetzt wird, erfolgte im ersten Schritt eine Titration von RCAR bzw. ABA (Abb. 2-1). Für das Titrieren der Effektor-Menge wurden RCAR8 und RCAR11 ausgewählt, weil diese beiden RCARs als Vertreter der Unterfamilien II und III im passenden Vektor-Plasmid vorlagen und RCAR1 als Prototyp der Unterfamilie I bereits durch Ma et al. (2009) charakterisiert worden war. Für diesen Vorversuch wurden Col-0 Protoplasten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Effektor-DNA sowie den Reporter-Konstrukten (LUC und GUS) kotransfiziert und zusätzlich in Gegenwart einer festen ABA-Konzentration inkubiert (Abb. 2-1A).

Mit dem Einsatz von 5 μ g Effektor-DNA wurde für RCAR8 und RCAR11 unter Zugabe von ABA eine deutliche Induktion der Signaltransduktion relativ zur leeren Vektorkontrolle (LV) detektiert. Mit 10 μ g Effektor-DNA konnte dieser Effekt nicht weiter gesteigert werden. Dementsprechend wurde für die Titration der ABA-Konzentration, wie auch für die daran anschließende Untersuchung aller 14 RCARs, eine Effektor-Konzentration von 5 μ g festgelegt.

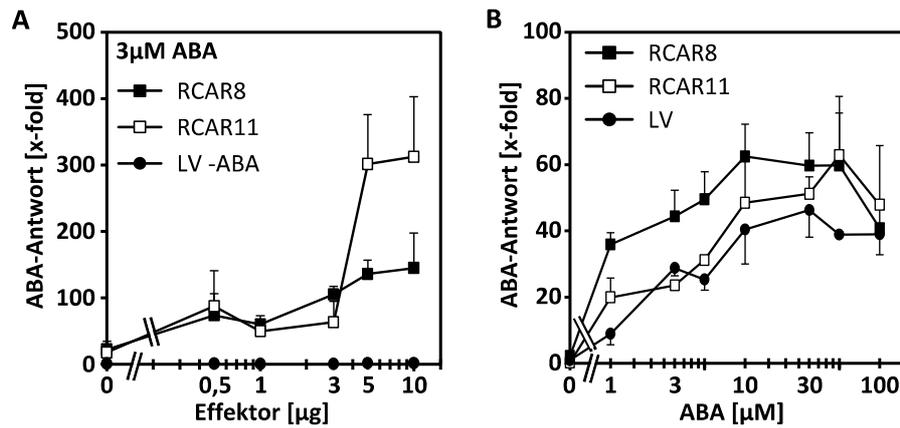


Abb. 2-1 RCAR- bzw. ABA-abhängige Induktion der Genexpression in Arabidopsis Protoplasten.

(A) RCAR8/11- bzw. (B) ABA-abhängige Induktion der Genexpression in Protoplasten von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) wurden jeweils mit $3 \mu\text{g}$ p35S::GUS, $5 \mu\text{g}$ pRD29B::LUC und steigender Konzentration (A) bzw. $5 \mu\text{g}$ (B) an pSK35S::Effektor-DNA transfiziert. Die Inkubation erfolgte bei 25°C in Ab- und Anwesenheit von $3 \mu\text{M}$ exogener ABA (A) bzw. unter Zugabe verschiedener ABA-Konzentrationen (B). Die Luciferaseaktivität wurde nach 17 ± 1 h als CPS (Counts Per Second) gemessen und auf die RFUs (Relative Fluorescence Units), des konstitutiv exprimierten GUS-Gens, normalisiert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne RCAR und ohne ABA lag für (A) bei 4138 CPS/RFU und für (B) bei $11,9$ kCPS/RFU. Beide Werte wurden auf eins normalisiert. Diese Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt (Mittelwert \pm SD) und wurde jeweils in mindestens einem unabhängigen Experimente bestätigt.

Im nächsten Schritt wurde nach einer ausreichenden ABA-Konzentration für die weiteren Untersuchungen in Protoplasten gesucht. Hierfür wurde eine konstante Menge an RCAR8- bzw. RCAR11-DNA ($5 \mu\text{g}$) mit den Reporter-Konstrukten (LUC und GUS) in Arabidopsis Protoplasten kotransfiziert und in Gegenwart verschiedener ABA-Konzentrationen untersucht. Es wurde beobachtet, dass RCAR8 die höchste Induktion der ABA-Antwort mit $10 \mu\text{M}$ exogener ABA erzielte und sich mit höheren Konzentrationen eine Sättigung der ABA-Signaltransduktion einstellte. Für RCAR11 wurde auch unter Zugabe von $30 \mu\text{M}$ ABA kein Unterschied in der Aktivierung der ABA-Antwort relativ zur LV nachgewiesen. Das für die LV-Kontrolle mit steigender ABA-Konzentration eine Zunahme der Induktion der ABA-Antwort detektiert wurde, wird damit begründet, dass in den Arabidopsis Protoplasten ausreichend endogene Komponenten der ABA-Signaltransduktion exprimiert werden, die eine Aktivierung der ABA-Antwort hervorrufen. Auf Grund der Tatsache, dass Ma et al. (2009) für RCAR1 eine ABA-Konzentration von $3 \mu\text{M}$ als ausreichend publizierten und für RCAR8 in diesem Experiment die stärkste Aktivierung der ABA-Antwort mit $10 \mu\text{M}$ exogener ABA nachgewiesen wurde, wurde für die nachfolgende Analyse eine ABA-Konzentration von $5 \mu\text{M}$ festgelegt.

2009 wurden von Fujii et al. eine ABA-Rezeptorfunktion für 13 Mitglieder der RCAR Familie *in vivo* nachgewiesen, mit Ausnahme von RCAR7. Um der Frage nachzugehen, ob es sich aber bei allen Mitglieder der RCAR Familie um wirksame ABA-Rezeptoren handelt, erfolgte die transiente Analyse aller RCARs durch ektopische Expression in Ab- und Anwesenheit von exogener ABA in Arabidopsis Protoplasten (Abb. 2-2).

In Col-0 Mesophyll-Protoplasten wurde für die RCARs der Unterfamilie I sowie die Unterfamilien II Mitglieder RCAR5, RCAR6, RCAR8 und RCAR9 eine ABA-unabhängige Induktion der Genexpression ermittelt (Abb. 2-2A). Es wurde eine zehnfach bis 90-fach höhere Induktion der ABA-Antwort relativ zur leeren Effektor-Kontrolle (LV) festgestellt. Für alle restlichen RCARs (Unterfamilie III RCARs und RCAR7/10) wurden unter Kontrollbedingungen keine Unterschiede zum LV nachgewiesen, dementsprechend auch keine Aktivierung der ABA-Signaltransduktion. Unter Zugabe von 5 μM exogener ABA wurde eine Stimulierung der ABA-Antwort für alle 14 RCARs detektiert. Die Unterfamilie I, RCAR1 bis RCAR4, induzierte die ABA-Antwort am wirksamsten mit dem 130- bis 200-fachen relativ zur unbehandelten Kontrolle. RCAR4 war hierbei besonders auffällig, da kein Unterschied in der Induktion der Signaltransduktion zwischen ohne und mit ABA-Exposition beobachtet wurde. Für die RCARs der Unterfamilien II (RCAR5-10) und III (RCAR11-14) wurde eine um 50- bis 150-fach höhere Stimulierung der ABA-Antwort relativ zur LV ohne exogene ABA-Behandlung detektiert.

Neben der Rolle als Stresshormon übt ABA auch regulatorische Funktionen in Abwesenheit von Stress aus, zu denen die Regulierung vieler Entwicklungsprozesse in Pflanzen gehören (Christmann et al. 2006). Infolgedessen besitzen auch Pflanzen die nicht unter Trocken-, Kälte- oder osmotischem Stress stehen, ein gewisses Level an endogener ABA (ca. 100 ng ABA/g Trockengewicht, (Gonzalez-Guzman et al. 2002)). Die ABA-defiziente Mutante *aba2-1* besitzt in der ABA-Biosynthese eine Mutation, bei der die Umwandlung von Xanthoxin in den ABA-Vorläufer Abscisinaldehyd gestört ist und wurde erstmals durch Leon-Kloosterziel et al. (1996) beschrieben. Rosettenblätter von *aba2-1* Pflanzen besitzen nur 20-25 % des Wildtyp ABA-Gehalts (Gonzalez-Guzman et al. 2002).

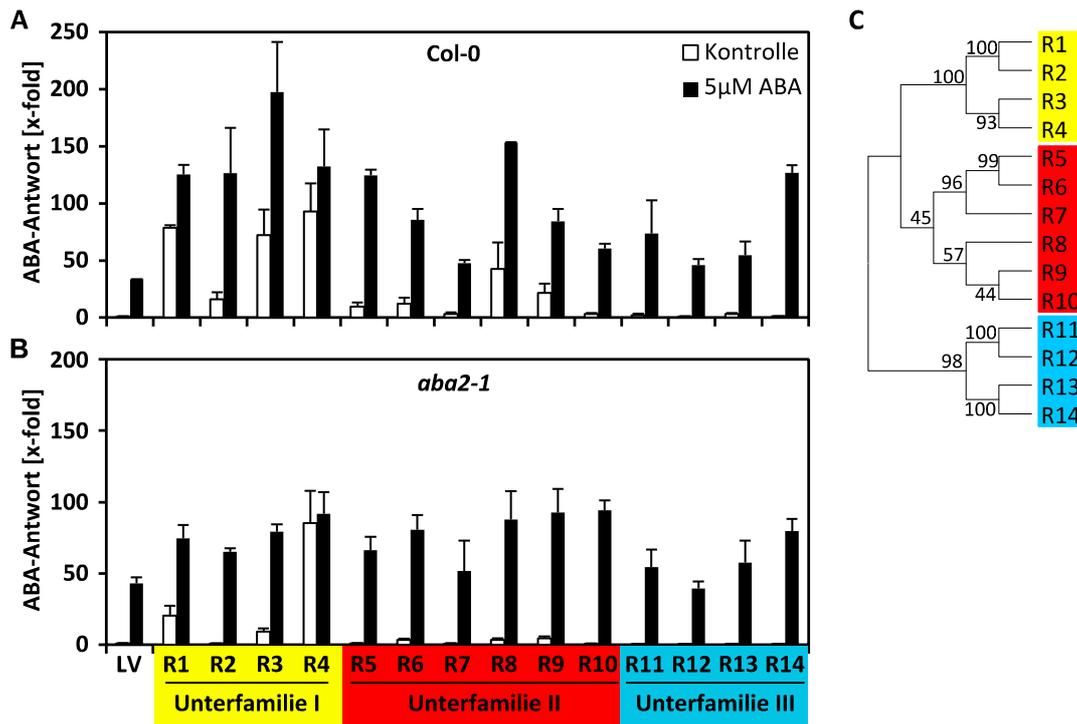


Abb. 2-2 Regulierung der ABA-Antwort durch ektopische RCAR-Expression in Arabidopsis Protoplasten.

(A und B) ABA-abhängige Genregulation durch ektopische RCAR-Expression in Protoplasten aus zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen. Col-0 (A) und *aba2-1* (B) Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) wurden jeweils mit $3 \mu\text{g}$ p35S::Effektor-DNA, $3 \mu\text{g}$ p35S::GUS und $5 \mu\text{g}$ pRD29B::LUC transfiziert. Die Inkubation erfolgte bei 25°C in An- bzw. Abwesenheit von $5 \mu\text{M}$ exogener ABA. Die Luciferaseaktivität wurde nach 17 ± 1 h als CPS gemessen und auf die RFUs, des konstitutiv exprimierten GUS-Gens, normalisiert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne RCAR lag bei $5,8$ kCPS/RFU für Col-0 Protoplasten und $2,9$ kCPS/RFU für *aba2-1* Protoplasten ohne ABA-Exposition. Beide Werte wurden jeweilig auf eins normalisiert. Diese Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt (Mittelwert \pm SD) und wurde jeweils in mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. (C) Der phylogenetische Baum wurde nach der Neighbor-Joining Methode mit MEGA Version 6 erstellt, ist identisch zu Abb. 1-3 und vergleichbar zu Ma et al. (2009) und Raghavendra et al. (2010).

Um die Frage zu beantworten, ob die RCARs der Unterfamilie I, ebenso wie einzelne Vertreter der Unterfamilie II, die Genexpression weitgehend ABA-unabhängig induzieren können, wurde der Versuch wie in Abb. 2-2A beschrieben mit *aba2-1* Mesophyll-Protoplasten wiederholt (Abb. 2-2B). Ohne ABA-Zugabe wurde für die RCARs der Unterfamilie I, mit Ausnahme von RCAR2, eine um die neun- bis 85-fach höhere Aktivierung der ABA-Antwort relativ zur Vektorkontrolle festgestellt. Mit ABA-Exposition wurde für diese RCARs eine Aktivierung der ABA-abhängige Genexpression um das 70- bis 90-fache relativ zur unbehandelten LV nachgewiesen. Für RCAR4 wurden auch in diesem Versuch keine Unterschiede in der Induktion der ABA-Antwort zwischen nicht gestressten und mit ABA behandelten Zellen beobachtet. Folglich könnte für RCAR4 entweder eine ABA-unabhängige Aktivierung der Signaltransduktion postuliert werden oder dass RCAR4 bereits mit sehr geringen Mengen der ABA, wie sie alle *aba2-1* Zellen besitzen, dazu in der Lage ist.

Von der Unterfamilie II wurde für RCAR6, RCAR8 und RCAR9 ohne exogene ABA-Behandlung eine um den Faktor Drei bis Vier höhere Induktion der Signaltransduktion relativ zur Kontrolle ermittelt. Unter Zugabe von ABA wurde für diese RCARs eine Aktivierung der ABA-Antwort um den Faktor 85 im Vergleich zur unbehandelten LV detektiert. Für RCAR5, RCAR10 und RCAR14 wurde ausschließlich in ABA-Abhängigkeit, relativ zur unbehandelten Kontrolle, eine vergleichbare Aktivierung wie für RCAR1 bis RCAR4, RCAR6, RCAR8 und RCAR9 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu, wurde für die restlichen RCARs (RCAR7 und RCAR11 bis RCAR13) nur durch ABA-Exposition eine Induktion der ABA-Antwort von 40- bis 60-fach relativ zur unbehandelten Kontrolle beobachtet, vergleichbar zur mit ABA behandelten LV.

Mit der Durchführung der transienten Untersuchung aller 14 RCARs in Arabidopsis Protoplasten, wurde eine wahre ABA-Rezeptorfunktion für RCAR1 bis RCAR6, RCAR8 bis RCAR10 und RCAR14 festgestellt. Vor allem die ektopische Expression der Unterfamilie I RCARs, mit Ausnahme von RCAR2, resultierte in der Aktivierung der ABA-Antwort bereits unter endogenen ABA-Gehalt der Protoplasten, während für RCAR2 und die RCARs der Unterfamilie II, mit Ausnahme von RCAR7, eine Induktion der ABA-Signaltransduktion durch ABA-Zugabe ermittelt wurde. Für RCAR7 und RCAR11 bis RCAR13 wurde weder in Ab- noch in Anwesenheit von exogener ABA ein Unterschied relativ zur Kontrolle nachgewiesen (in *aba2-1* Protoplasten). Für diese RCARs kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie eventuell in den Arabidopsis Protoplasten nicht exprimiert wurden, obwohl die Genexpression unter der Kontrolle des 35S Promotors stand und somit eine konstitutive und vor allem gewebeunspezifische RCAR-Expression gewährleistet wurde (Benfey and Chua 1990; Odell et al. 1985). Trotzdem wurde eine Aktivierung der ABA-Antwort in Col-0 Protoplasten für diese RCARs relativ zur LV nachgewiesen, wenn auch nur mit geringer Effizienz. Mit Ausnahme von RCAR7 wurden RCAR11 bis RCAR13 bereits als wirksame ABA-Rezeptoren beschrieben (Fujii et al. 2009). Der Unterschied zwischen den hier dargestellten Untersuchungen und dem durch Fujii et al. (2009) veröffentlichten Experiment liegt in der Koexpression von ABI1, SnRK2.6/OST1 und dem TF ABF2, zusätzlich zum entsprechenden RCAR. Wie bereits erwähnt, wird die ABA-Signaltransduktion durch die Komplexbildung eines RCAR mit einer PP2C der Gruppe A induziert (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009). Des Weiteren wurde beschrieben, dass RCARs in monomerer und/oder dimerer Form vorliegen (Nishimura et al.

2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b; Hao et al. 2011; Zhang et al. 2012b; Okamoto et al. 2013) und das eine Komplexbildung mit PP2Cs nur in monomerer Form möglich ist, die aber eine Dissoziation der dimeren RCARs voraussetzt (Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b; Hao et al. 2011). Dementsprechend ist es möglich, dass der endogene PP2C-Gehalt in Arabidopsis Protoplasten zur Komplexbildung mit ektopisch exprimierten RCAR7 bzw. RCAR11 bis RCAR13 nicht ausreichend war, um unter ABA-Zugabe die Signaltransduktion zu aktivieren, da RCAR11 bis RCAR13 als Dimer beschrieben wurden (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b; Zhang et al. 2012b). In diesem Zusammenhang ist es vorstellbar, dass *in vivo* monomere RCARs infolge ihrer besseren ABA-Affinität (Ma et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010; Dupeux et al. 2011b; Hao et al. 2011; Santiago et al. 2009b) zur Komplexbildung mit endogenen PP2Cs bevorzugt werden, weil die monomeren verglichen zu dimeren RCARs nicht erst dissoziieren müssen, um eine Komplexbildung einzugehen (Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b; Hao et al. 2011). Infolgedessen wäre es denkbar, dass die ektopische Koexpression von PP2Cs mit RCAR7 bzw. RCAR11 bis RCAR13 und zusätzlicher ABA-Behandlung zur Aktivierung der Signaltransduktion in Arabidopsis Protoplasten beitragen könnte (Fuchs et al. 2014).

2.1.2. Inhibierung der ABA-Antwort durch PP2Cs der Gruppe A

Das Arabidopsis Genom codiert neun verschiedene PP2Cs der Gruppe A (Fuchs et al. 2013) und in der Literatur werden sie als Negativregulatoren der ABA-Antwort beschrieben (Umezawa et al. 2009), durch direkte Dephosphorylierung der SnRK2s (Fujii et al. 2009; Fujita et al. 2009; Umezawa et al. 2009). Im folgenden Abschnitt wird der Frage nachgegangen, ob alle neun PP2Cs die ABA-Antwort durch ektopische Expression in Arabidopsis Protoplasten inhibieren und ob ggf. Unterschiede in der Effizienz beobachtet werden wie für die Mitglieder der RCAR-Familie. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Col-0 Mesophyll-Protoplasten mit zunehmender Konzentration an PP2C-Effektor-DNA, sowie den Reporter-Genkonstrukten (LUC und GUS), kotransfiziert und unter ABA-Behandlung untersucht (Abb. 2-3). Auch in dieser transienten Analyse erfolgte die Regulation der PP2C-Genexpression mit Hilfe des 35S Promotors, um eine ektopische Expression der PP2C in Arabidopsis Protoplasten zu gewährleisten (Odell et al. 1985; Benfey and Chua 1990).

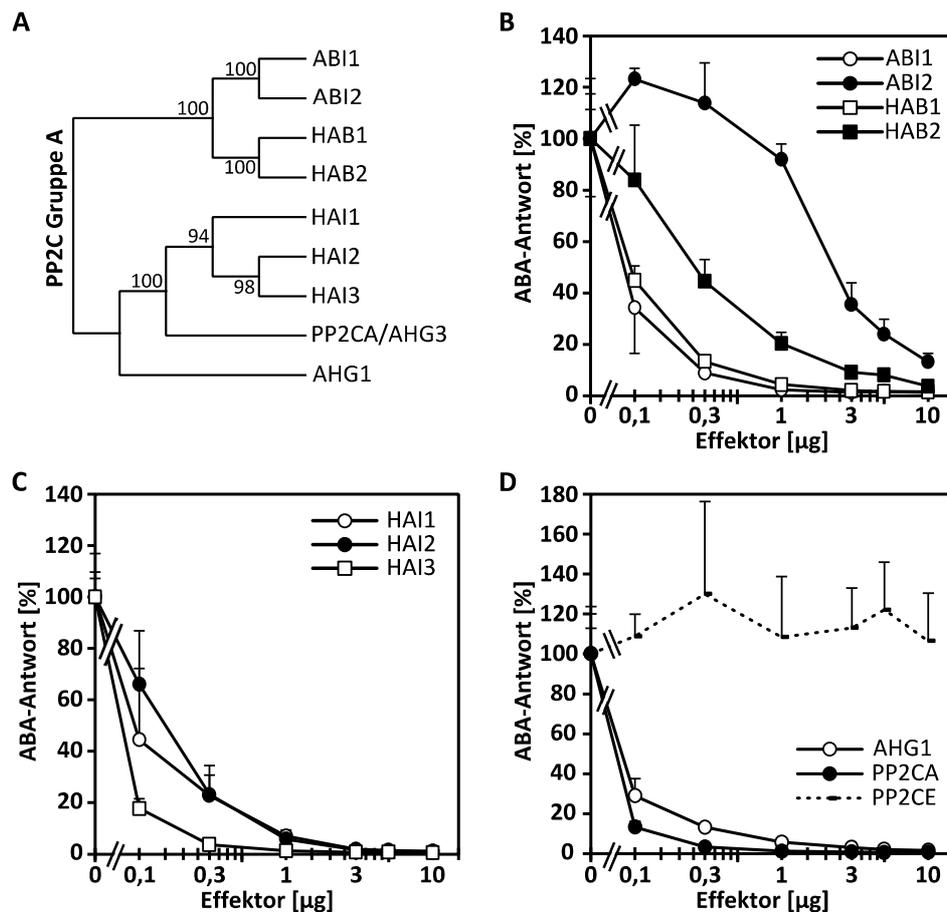


Abb. 2-3 PP2C-vermittelte Inhibierung der ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten.

(A) Phylogenetischer Baum aller neun Gruppe A PP2Cs in Arabidopsis. Diese Darstellung ist identisch zu Abb. 1-5. (B-D) Relative Inhibierung der ABA-induzierten Reporterexpression durch ektopisch exprimierte PP2Cs unter Zugabe von 10 μ M ABA. Col-0 Protoplasten (10^5 Protoplasten) von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen, wurden jeweils mit 3 μ g p35S::GUS, 5 μ g pRD29B::LUC und steigender Konzentration an p35S::Effektor-DNA transfiziert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C. Die Luciferaseaktivität wurde nach 17 \pm 1 h als CPS gemessen und auf die RFUs normalisiert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne Effektor lag für ABI1 bei 34 kCPS/RFU, für ABI2 bei 219 kCPS/RFU, für HAB1 bei 181 kCPS/RFU, für HAB2 bei 215 kCPS/RFU, für HAI1 bei 302 kCPS/RFU, für HAI2 bei 213 kCPS/RFU, für HAI3 bei 217 kCPS/RFU, für AHG1 bei 246 kCPS/RFU, für PP2CA/AHG3 bei 368 kCPS/RFU bzw. für PP2CE bei 1404 CPS/RFU. Alle Werte ohne PP2C mit ABA-Behandlung wurden auf 100 % gesetzt. PP2CE (D, unterbrochene Linie, At5g27930) diente als Negativkontrolle. Jeder Datenpunkt wurde in Triplikaten durchgeführt (Mittelwert \pm SD) und wurde in jeweils einem zweiten unabhängigen Experiment bestätigt.

Für alle neun zu untersuchenden PP2Cs wurde eine Inhibierung der ABA-Antwort mit zunehmender Effektor-Konzentration nachgewiesen, nicht dagegen bei der PP2C aus der Gruppe E (Abb. 2-3D, unterbrochene Linie). Von der PP2CE (At5g27930) wird angenommen, dass sie die Aktivität der Histon-Acetyltransferase GCN5 inhibiert und somit nicht an der Regulierung der ABA-Signaltransduktion beteiligt ist (Fuchs 2013), weshalb sie als Negativkontrolle in diesem Versuch verwendet wurde.

Für die PP2Cs HAI3 (Abb. 2-3C), PP2CA (Abb. 2-3D) und ABI1 (Abb. 2-3B) wurde der stärkste inhibitorische Effekt beobachtet. Die ektopische Expression dieser PP2Cs resultierte bereits mit 0,3 µg oder weniger Effektor-DNA und unter ABA-Zugabe in einer 90 %igen Inhibierung der ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten. Mit 1 µg Effektor-DNA wurde eine komplette Blockierung der ABA-Signaltransduktion festgestellt. Für die PP2Cs HAI1, HAI2 (Abb. 2-3C), HAB1 (Abb. 2-3B) und AHG1 (Abb. 2-3D) wurde eine 90 % Inhibierung der ABA-abhängigen Genexpression mit 0,5 bis 1 µg Effektor-DNA detektiert. Eine vollständige Inhibierung wurde mit dem Einsatz von mind. 3 µg Effektor-DNA erreicht. Im Gegensatz dazu, resultierte die ektopische Expression von HAB2 und ABI2 in der schwächsten PP2C-vermittelten Inhibierung (Abb. 2-3B). Um eine 90%ige Blockierung der ABA-Antwort nachzuweisen, war der Einsatz von 3 µg HAB2- bzw. mind. 10 µg ABI2-Effektor-DNA notwendig.

Ebenso wie in der RCAR-Familie gab es auch bei den PP2Cs Vertreter, welche die ABA-Signaltransduktion wirksamer blockierten als andere PP2Cs dieser Gruppe. Ein vergleichsweise guter Inhibitor der ABA-Antwort ist offenbar ABI1 im Gegensatz zur nah verwandten ABI2. So wurde für ABI1 eine effektive Inhibierung der ABA-Signaltransduktion bereits bei kleinen Mengen an Effektor-DNA beobachtet, wogegen für ABI2 die höchste Menge an Effektor-DNA eingesetzt werden musste, um eine vergleichbare Inhibierung der ABA-Antwort nachzuweisen. Dementsprechend wäre es möglich, dass ABI2 und HAB2 nicht ausreichend in Arabidopsis Protoplasten exprimiert wurden, um eine effektive Hemmung der ABA-Signaltransduktion zu bewirken.

Die hier dargestellte Analyse zeigt eine Funktionalität aller PP2Cs der Gruppe A in der Regulierung der ABA-Signaltransduktion in Protoplasten. Eine Inhibierung der ABA-Antwort erfolgte mit zunehmender Konzentration bzw. Expressionsstärke der untersuchten PP2Cs, mit Ausnahme von PP2CE (Negativkontrolle).

2.2. Kombinatorische Interaktionen zwischen ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten

Damit die ABA-Antwort initiiert wird, muss eine ABA-abhängige Komplexbildung zwischen RCARs und PP2Cs der Gruppe A stattfinden, um die Phosphataseaktivität der PP2C zu inhibiert (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009) und die SnRK2 aus der Dephosphorylierung zu entlassen, damit nachstehende Komponenten der ABA-Signaltransduktion reguliert werden können (Fujii et al. 2009; Fujita et al. 2009; Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009).

Wie bereits erwähnt, codiert das Arabidopsis Genom 14 RCARs und neun PP2Cs, was zu maximal 126 RCAR-PP2C Kombinationen führen kann, falls alle realisierbar sind. Die tatsächliche Anzahl möglicher Interaktionswirkungen *in planta* ist jedoch weitgehend unbekannt. Rezeptor-Korezeptor-Kombinationen wurden hauptsächlich über Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionen bestätigt. Mögliche Kombinationen wurden für RCAR1 mit HAB1/ABI1 (Ma et al. 2009) und ABI2 (Nishimura et al. 2010) sowie für RCAR3 mit ABI1/2 (Nishimura et al. 2010; Szostkiewicz et al. 2010) und für RCAR12 mit HAB1 (Park et al. 2009) nachgewiesen. Die einzige zusammenhängende Y2H Analyse aller in Betracht kommender RCAR-PP2C Kombinationen wurde von Stefan Fuchs in seiner Dissertation durchgeführt und diese Daten sind der übersichtlicher in Abb. 2-4 noch einmal zusammengefasst (Fuchs 2013).

Stefan Fuchs untersuchte alle 126 in Betracht kommenden RCAR-PP2C-Kombinationen in Ab- und Anwesenheit von 30 μ M ABA in Hefe und bestätigte insgesamt 93 potentielle Kombinationen (Abb. 2-4). 60 dieser RCAR-PP2C Kombinationen wurden in Abwesenheit der exogenen ABA detektiert und weitere 33 Komplex-Kombinationen unter ABA-Zugabe. Für die restlichen ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen, ebenso wie für die Negativkontrolle PP2CE, wurde keine Interaktion festgestellt. Interessant war, dass für HAI1 keine einzige Interaktion mit einem RCAR bestätigt wurde, weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von exogener ABA.

		ABI1	ABI2	HAB1	HAB2	HAI1	HAI2	HAI3	PP2CA	AHG1	PP2CE
I	RCAR1	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Green	Grey
	RCAR2	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Grey	Grey
	RCAR3	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Green	Grey
	RCAR4	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Grey	Grey
II	RCAR5	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Green	Grey
	RCAR6	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Grey	Grey
	RCAR7	Blue	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Grey	Grey
	RCAR8	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Grey	Grey
	RCAR9	Blue	Blue	Blue	Blue	Grey	Green	Green	Blue	Green	Grey
	RCAR10	Green	Green	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Green	Grey	Grey
III	RCAR11	Green	Green	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Green	Grey	Grey
	RCAR12	Green	Green	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Green	Grey	Grey
	RCAR13	Green	Green	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Green	Grey	Grey
	RCAR14	Green	Green	Green	Green	Grey	Green	Green	Green	Grey	Grey

ABA-abhängige Interaktion [30µM]
 ABA-unabhängige Interaktion
 keine Interaktion

Abb. 2-4 RCAR-PP2C-Interaktionen im Y2H.

Dargestellt ist eine zusammenfassende Übersicht aller möglichen Interaktionen zwischen Gruppe A PP2Cs und RCARs, die im Y2H durch Stefan Fuchs bestätigt wurden. PP2CE (At5g27930) diente als Negativkontrolle. Die Markierungen in Grün, Blau und Grau kennzeichnen ABA-abhängige Interaktionen in Gegenwart von 30 µM exogener ABA, ABA-unabhängige Interaktionen und keine Interaktionen. Diese Abbildung stammt aus der Dissertation von Stefan Fuchs und wurde etwas modifiziert (Fuchs 2013). Die Berechtigung zur Verwendung dieser Abbildung wurde von Stefan Fuchs erteilt.

Y2H Untersuchungen geben nur einen Hinweis auf mögliche Protein-Interaktion und müssen nicht unbedingt auch *in planta* detektierbar sein oder funktionelle Relevanz besitzen. Im Gegensatz zur Y2H Analyse sind Protein-Interaktionswirkungen *in planta* abhängig von deren räumlichen und zeitlichen Transkription (Ratushny and Golemis 2008; Stynen et al. 2012). Infolgedessen erscheint es als unverzichtbar alle 126 in Betracht kommenden RCAR-PP2C-Kombinationen auch *in planta* zu untersuchen.

2.2.1. RCAR- und ABA-abhängige Induktion der Genexpression

Um eine genaue Vorstellung über die funktionelle Relevanz der 126 potentiellen ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen zu erhalten, wäre die physiologische Analyse von RCAR-PP2C-Kombinationen in Arabidopsis-Kreuzungen eine Möglichkeit. Hierfür würden sich Kreuzungen aus entsprechenden Überexpressions- oder Knockoutlinien anbieten. Daraus ergibt sich aber das Problem, dass mögliche redundante Funktionen innerhalb der RCAR

Familie bzw. der PP2Cs unentdeckt bleiben könnten. Um dieses Hindernis zu umgehen, müssten multiple *rcar x pp2c* Knockoutlinien geniert werden. Jedoch ist es enorm zeitaufwändig stabile homozygote Linien für verschiedene multiple Knockoutkombinationen zu generieren und diese anschließend zu analysieren. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung der 126 ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen und deren funktionelle Relevanz in der ABA-Signaltransduktion erneut die transiente Analyse in Arabidopsis Protoplasten herangezogen.

Damit ein geeignetes Verhältnis von RCAR zu PP2C eingesetzt und eine ausreichende Menge an exogener ABA verwendet wird, um die ABA-Signaltransduktion zu aktivieren, wurden zunächst Titrations für zwei RCARs zusammen mit einer PP2C und anschließend für die ABA-Konzentration durchgeführt (Abb. 2-5). Für diese Voranalysen wurden beispielhaft RCAR12 und RCAR13 in Kombination mit HAB1 gewählt, da eine physikalische Interaktion von RCAR12 mit HAB1 bereits bestätigt wurde (Park et al. 2009; Fuchs 2013) und die Funktion von RCAR13 hingegen noch weitgehend unbekannt war.

Um ein passendes Verhältnis an Effektor-DNA (RCAR vs. PP2C) für die Untersuchung der Rezeptor-Kombinatorik einzusetzen, wurde eine Titrierungsreihe von RCAR12 (Abb. 2-5B) bzw. RCAR13 (Abb. 2-5C) in Koexpression mit HAB1 unter ABA-Exposition durchgeführt. Hierfür wurden Col-0 Protoplasten mit steigender Konzentration an RCAR-Effektor-DNA, den Reporter-Konstrukten (LUC und GUS) und HAB1 kotransfiziert. Für HAB1 wurde die Menge an Plasmid-DNA gewählt, die in etwa 90 % Inhibierung der ABA-Antwort resultierte (Abb. 2-5A). In diesem Fall entsprach das einer DNA-Konzentration von 0,5 µg für HAB1. Da die RCAR12-HAB1 Interaktion bereits bestätigt wurde (Park et al. 2009; Fuchs 2013), war zu erwarten, dass die durch HAB1-vermittelte Blockierung der ABA-Antwort mit steigender RCAR12-Effektor-Konzentration und durch ABA-Zugabe wiederhergestellt wird.

Im Vergleich zur der moderaten Induktion der Signaltransduktion durch RCAR12 bzw. RCAR13 während der ersten transienten Analyse (Abb. 2-2), wurde durch Koexpression mit HAB1 eine deutlich stärkere Aktivierung der ABA-Antwort für beide RCARs festgestellt (Abb. 2-5B und C). In Gegenwart von 5 µM exogener ABA wurde für RCAR12 eine bis zu 240-fach höhere Induktion der ABA-Signaltransduktion relativ zur Kontrolle beobachtet (Abb. 2-5B)

und für RCAR13 eine 200-fach höhere Induktion (Abb. 2-5C). Im Gegensatz dazu wurde für die leere Vektorkontrolle (LV) keine Aktivierung der ABA-Antwort detektiert, durch die effektive Inhibierung der Signaltransduktion durch HAB1. Zusätzlich wurde festgestellt, dass ohne ABA-Behandlung weder für RCAR12 noch für RCAR13 in Koexpression mit HAB1 eine Aktivierung der ABA-Antwort möglich war. Nur durch ABA-Exposition wurde eine klare Induktion, bis zu 240-fach höher relativ zur LV, nachgewiesen.

Anhand der hier erzielten Befunde wurde für nachfolgende transiente Analysen jeweils die Menge an PP2C-Effektor-DNA eingesetzt, für unter Zugabe von 10 μ M ABA eine 90 %ige Inhibierung der ABA-Antwort ermittelt wurde (Abb. 2-3) und 5 μ g an RCAR-Effektor-DNA, um die blockierte ABA-Signaltransduktion, falls realisierbar, wieder zu aktivieren.

RCAR12 und RCAR13 liegen als Dimere vor (Dupeux et al. 2011b; Zhang et al. 2012b) und müssen ABA-abhängig dissoziieren, um als Monomer mit PP2Cs einen ABA-Rezeptorkomplex zu bilden und die Signaltransduktion zu aktivieren (Santiago et al. 2009a; Hao et al. 2011). Es ist bekannt, dass monomere RCARs eine deutlich höhere Affinität zu ABA aufweisen verglichen zu dimeren (Ma et al. 2009; Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Hao et al. 2011). Um zu überprüfen wie viel exogene ABA notwendig ist, um eine effektive Aktivierung der ABA-Signaltransduktion durch Koexpression von RCAR12 bzw. RCAR13 mit HAB1 transient in Protoplasten zu detektieren, wurde eine Titration von exogener ABA durchgeführt. Hierfür wurden erneut Arabidopsis Protoplasten mit HAB1 und RCAR12 bzw. RCAR13 sowie den Reporter-Konstrukten (LUC und GUS) kotransfiziert und in Gegenwart unterschiedlicher ABA-Konzentrationen untersucht. Die Auswertung der erzielten Ergebnisse wurden in Abb. 2-5D zusammengefasst.

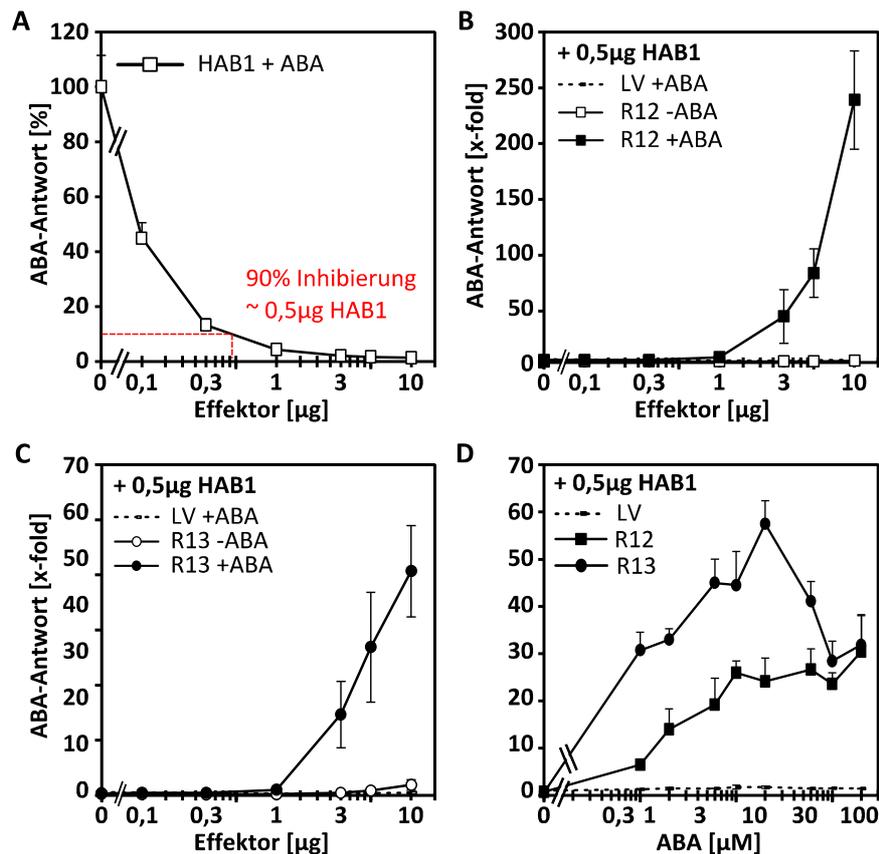


Abb. 2-5 RCAR- bzw. ABA-abhängige Induktion der Genexpression in Arabidopsis Protoplasten.

(A) Relative Inhibition der ABA-induzierten Reporterexpression durch ectopische Expression von HAB1 unter Zugabe von $10 \mu\text{M}$ ABA. Die Durchführung erfolgte wie bei Abb. 2-3 beschrieben. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne HAB1 lag bei 181 kCPS/RFU und wurde auf 100% gesetzt. (B) RCAR12- bzw. (C) RCAR13-abhängige Wiederherstellung der durch HAB1-vermittelten Inhibition der ABA-Signaltransduktion in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ exogener ABA. (D) Relative Aktivierung der ABA-Antwort durch Koexpression von HAB1 mit RCAR12 bzw. RCAR13 durch Zugabe verschiedener ABA-Konzentrationen. Col-0 Protoplasten (10^5), von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen, wurden jeweils mit $3 \mu\text{g}$ p35S::GUS, $5 \mu\text{g}$ pRD29B::LUC, $0,5 \mu\text{g}$ p35S::HAB1 (entspricht ca. 90% Inhibition der ABA-Antwort) und steigender Konzentration an p35S::Effektor-DNA (B und C) bzw. $5 \mu\text{g}$ Effektor-DNA (D) kotransfiziert. Die Inkubation erfolgte bei 25°C in Ab- und Anwesenheit von exogener ABA. Die Luciferaseaktivität wurde nach $17 \pm 1 \text{ h}$ als CPS gemessen und auf die RFUs, des konstitutiv exprimierten GUS-Gens, normalisiert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne Effektor und ohne ABA-Exposition lag bei 565 CPS/RFU (B und C) bzw. bei $2,0 \text{ kCPS/RFU}$ (D). Diese Werte wurden für die LV auf ein normalisiert. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt (Mittelwert \pm SD) und wurde in zwei unabhängigen Wiederholungen bestätigt.

Unter Kontrollbedingungen (LV) wurde, infolge der effektiven Inhibition der ABA-Antwort durch koexprimiertes HAB1, keine Aktivierung der Signaltransduktion festgestellt (Abb. 2-5D). Im Gegensatz dazu wurde eine deutliche Zunahme der ABA-Antwort mit steigender ABA-Konzentration für die Arabidopsis Protoplasten nachgewiesen, bei denen HAB1 mit RCAR12 bzw. RCAR13 kotransfiziert wurden (Abb. 2-5D). Für den ABA-Rezeptorkomplex RCAR12-HAB1 wurde eine 25-fach höhere Aktivierung der Signaltransduktion durch Zugabe von $10 \mu\text{M}$ exogener ABA detektiert. Mit der max. Zugabe von $100 \mu\text{M}$ ABA wurde eine

weitere Steigung der induzierten ABA-Antwort auf das 30-fache registriert. Für die Koexpression von RCAR13 mit HAB1 wurde eine Induktion der ABA-Antwort um max. 60-fach durch ABA-Exposition relativ zur Kontrolle beobachtet. Die höchste Induktion wurde in diesem Fall mit 10 μ M ABA detektiert. Bei höheren ABA-Konzentrationen wurde hingegen eine Abnahme der ABA-abhängigen Genexpression festgestellt.

Da unter Zugabe von 10 μ M ABA die stärkste Aktivierung der Signaltransduktion in RCAR13-HAB1 kotransfizierten Protoplasten detektiert und vergleichbares für die Koexpression von RCAR12-HAB1 nachgewiesen wurde, erschien die ABA-Exposition von 10 μ M als ausreichend, um die biologische Relevanz aller 126 möglichen RCAR-PP2C-Kombinationen transient in Arabidopsis Protoplasten nachfolgend zu untersuchen.

Darüber hinaus bestätigten die hier durchgeführten Untersuchungen den von Park et al. (2009) und Fuchs (2013) detektierten RCAR12-HAB1 Rezeptorkomplex. Des Weiteren wurde für RCAR12/13 erfolgreich demonstriert, dass die Koexpression einer spezifischen PP2C und eines RCARs durch Zugabe von exogener ABA in einer deutlich stärkeren Aktivierung der ABA-Antwort in Protoplasten resultierte verglichen zur Transfektion ohne PP2Cs (Abb. 2-2). Zusätzlich wurde bewiesen, dass RCAR12 bzw. RCAR13 in den Protoplasten exprimiert wurden, da sonst keine Unterschiede in der Induktion der ABA-Antwort relativ zur Kontrolle festgestellt worden wären. Infolge dessen könnte der endogene PP2C-Gehalt in den Arabidopsis Protoplasten ausschlaggebend für die marginale Aktivierung der ABA-Antwort von RCAR12 bzw. RCAR13 während der ersten transienten Analyse aller RCARs (Abb. 2-2) gewesen sein. Ob diese Aussage auch für RCAR7 bzw. RCAR11 Gültigkeit hat und ob die von Stefan Fuchs detektierten RCAR-PP2C Kombinationen transient in Protoplasten bestätigt werden konnten, wurde im nächsten Abschnitt untersucht.

2.2.2. Regulierung der ABA-Antwort durch ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten

Die möglichen 126 RCAR-PP2C-Kombinationen wurden mit dem zuvor etablierten Assay transient in Arabidopsis Protoplasten überprüft. Hierfür wurde die Aktivierung der PP2C-vermittelten Inhibierung der ABA-Signaltransduktion in Koexpression mit RCARs untersucht. Im Falle einer möglichen ternären Komplexbildung zwischen RCAR, ABA und PP2C wird die SnRK2 aus der Inaktivierung durch PP2C-Dephosphorylierung entlassen und kann

nachfolgende Komponenten ihrerseits regulieren, die wiederum zur Aktivierung der ABA-Antwort in Protoplasten führt (Fujii et al. 2009; Cutler et al. 2010). Um festzustellen, ob einzelne RCARs, vornehmlich monomere, auch ohne ABA-Behandlung die PP2C-inhibierte ABA-Antwort klar aktivieren können, wurden alle möglichen ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen in Ab- und Anwesenheit von exogener ABA untersucht und in Abb. 2-6 zusammengefasst.

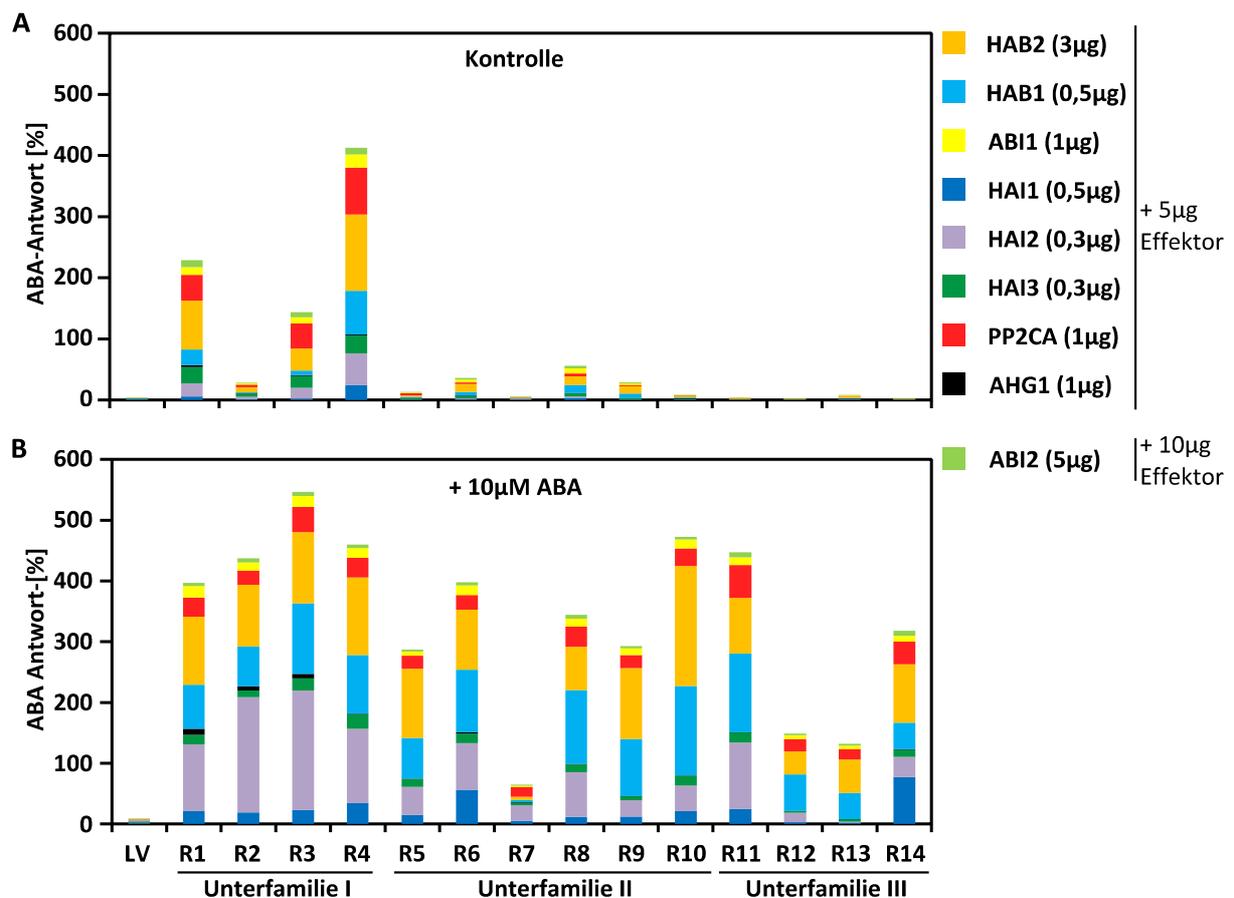


Abb. 2-6 Transiente Analyse aller 126 RCAR-PP2C-Kombinationen in Arabidopsis Protoplasten.

RCAR-abhängige Aktivierung der durch PP2Cs-vermittelten Inhibierung der ABA-Antwort in (A) Ab- und (B) Anwesenheit von 10 µM exogener ABA in Protoplasten von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen. Col-0 Protoplasten (10^5 Protoplasten) wurden jeweils mit 3 µg p35S::GUS, 5 µg pRD29B::LUC, 5 bzw. 10 µg Effektor-DNA (RCAR bzw. LV) und ausgeschriebener Menge der Inhibitor-DNA (= PP2C-DNA-Konzentration, bei der eine 90 %ige Inhibierung der ABA-Antwort festgestellt wurde) transfiziert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C in Ab- und Anwesenheit von 10 µM exogener ABA. Die Luciferaseaktivität wurde nach 17 ± 1 h als CPS gemessen und auf die RFUs, des konstitutiv exprimierten GUS-Gens, normalisiert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne RCAR und mit 10 µM exogener ABA lag bei 3,76 kCPS/RFU (HAB2), 6,2 kCPS/RFU (HAB1), 21,65 kCPS/RFU (ABI1), 78,1 kCPS/RFU (ABI2), 4,79 kCPS/RFU (HAI2), 15,6 kCPS/RFU (HAI3), 3,96 kCPS/RFU (HAI1), 17,3 kCPS/RFU (PP2CA) und 14,1 kCPS/RFU (AHG1). Alle Werte wurden jeweils auf eins normalisiert. Diese Untersuchungen wurden in Triplikaten durchgeführt und wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt.

Ohne ABA-Behandlung ließ sich durch Koexpression mit RCAR1, RCAR3, RCAR4, RCAR6, RCAR8 bzw. RCAR9 eine Aktivierung der PP2C-inhibierten ABA-Antwort feststellen (Abb. 2-6A). Es wurde erneut beobachtet, dass vor allem die RCARs der Unterfamilie I, mit Ausnahme von RCAR2, eher unabhängig von exogener ABA eine klare Aktivierung der inhibierten Signaltransduktion induzieren, vergleichbar zur transienten Analyse der Abb. 2-2. Für RCAR4 wurden in Koexpression mit acht PP2Cs die effektivsten Induktionen der ABA-Antwort nachgewiesen. Die ektopische Koexpression mit RCAR2, RCAR5, RCAR6, RCAR8 und RCAR9 führte dagegen zu einer marginalen Aktivierung der durch spezifische PP2Cs (HAB1/2 und ABI1/2) blockierten ABA-Antwort. Für die restlichen RCARs (RCAR7, RCAR10-14) wurde in Koexpression mit PP2Cs ohne ABA-Exposition keine Aktivierung der ABA-Signaltransduktion beobachtet, vergleichbar zur Induktion der ABA-Antwort ohne PP2C-Behandlung (Abb. 2-2).

Unter Zugabe von 10 μ M ABA ließ sich eine klare Aktivierung der ABA-Signaltransduktion für alle RCARs nachweisen, wenn auch nicht in Koexpression mit allen PP2Cs (Abb. 2-6B). Es wurde sowohl ein breites Substratspektrum als auch Substratspezifität seitens der RCARs wie auch bei den PP2Cs festgestellt. Zu den RCARs, die nur mit spezifischen PP2Cs die ABA-Antwort aktivierten, gehören die RCAR4 bis RCAR14. Vor allem für RCAR7 und RCAR13 wurde eine hohe Regulationsspezifität gegenüber den PP2Cs ermittelt. Für RCAR7 wurde eine klare Induktion der PP2CA- bzw. HAI2-inhibierten ABA-Antwort nachgewiesen verglichen zur marginalen Aktivierung in Kombination mit HAI1/3 bzw. HAB1/2. Für die Koexpression von RCAR7 mit AHG1 bzw. ABI1/2 wurde keine Regulierung der ABA-Antwort festgestellt. Im Gegensatz zu RCAR7, wurde für RCAR13 die effektivste Induktion der ABA-Signaltransduktion durch Koexpression mit PP2CA, HAB2 bzw. HAB1 beobachtet. Deutlich schwächer erfolgte die Aktivierung in Kombination mit HAI3 bzw. ABI1, während in Kombination mit HAI1/2, ABI2 bzw. AHG1 keine Stimulierung der ABA-Antwort ermittelt wurde.

Zusätzlich wurden auch RCARs identifiziert, die sich gegenüber den PP2Cs durch Zugabe von ABA wenig selektiv verhalten haben. Genauer gesagt, RCAR1, RCAR2 und RCAR3 waren in der Lage jede PP2C-vermittelte Blockierung der ABA-Antwort zu überwinden. Aber auch hier wurden Unterschiede in der Effektivität der Aktivierung beobachtet. Für die Koexpression von RCAR1 bis RCAR3 in Kombination mit HAI2, HAB1/2 bzw. PP2CA wurde eine klare

Induktion der ABA-Antwort festgestellt im Vergleich zur deutlich schwächeren Aktivierung durch die Koexpression mit ABI2 und AHG1.

Ausgeprägte Spezifität und Substratspezifität wurde auch seitens der PP2Cs beobachtet. So ließ sich eine klare Aktivierung der durch PP2CA-inhibierten Signaltransduktion durch Koexpression mit allen 14 RCARs und unter ABA-Behandlung feststellen, während die durch ABI2, HAI1/2/3 bzw. AHG1-inhibierte ABA-Antwort nur durch spezifische RCARs induziert wurde. Wie bereits erwähnt, wurde nur für die Koexpression von RCAR1 bis RCAR3 mit AHG1 in Gegenwart von exogener ABA eine Aktivierung der blockierten ABA-Antwort registriert. Die HAI1- bzw. ABI2-vermittelte Inhibierung der Signaltransduktion wurde weder durch Kotransfektion mit RCAR7, RCAR12 oder RCAR13 erneut induziert, während die HAI2-Blockierung lediglich durch RCAR13 nicht aufgehoben werden konnte. Auch für die HAI3-induzierte Inhibierung der ABA-Antwort wurde nur eine selektive Wiederherstellung durch RCAR1 bis RCAR11 bzw. RCAR14 beobachtet.

Um zu überprüfen, ob die teils marginale Aktivierung der Signaltransduktion wirklich die Ursache der RCAR-PP2C-Koexpression darstellte und nicht eine Diskriminierung durch endogen exprimierte PP2Cs hervorgerufen wurde, erfolgte eine zusätzliche Auswertung der erzielten Versuchsdaten aus Abb. 2-6B. In dieser Untersuchung wurde die ABA-Signaltransduktion durch ektopische PP2C-Expression auf ca. 10 % Restaktivität gehemmt. Um sicherzustellen, dass in Abb. 2-6B keine RCAR-spezifische Aktivierung der ABA-Antwort beobachtet wurde, welche auf der Regulierung endogener ABA-Korezeptoren beruhte, wurde von den normalisierten Werten erneut 20 % abgezogen. Zusätzlich wurde eine RCAR-vermittelte PP2C-Regulierung als effektiv gewertet, welche in einer mindestens dreifach höheren Aktivierung der ABA-Signaltransduktion verglichen zur LV resultierte. Die daraus erzielten Befunde wurden in Abb. 2-7 zusammengefasst.

Mittels der nachträglichen Korrektur ließ sich feststellen (Abb. 2-7), dass die marginale Aktivierung der ABA-Antwort von koexprimierten HAI3 mit RCAR12 bzw. RCAR13 (Abb. 2-6B) wahrscheinlich nicht durch die RCAR-vermittelte Regulierung von HAI3 hervorgerufen wurde, sondern durch die Regulierung endogen exprimierte PP2Cs. Vergleichbares wurde auch für RCAR5 und RCAR9 in Koexpression mit ABI2 nachgewiesen. Vor der

Induktionswertkorrektur (Abb. 2-6B) wurde eine mögliche Aktivierung der ABI2-inhibierten ABA-Antwort durch ektopisch koexprimiertes RCAR5 bzw. RCAR9 festgestellt. Nachdem 20 % der endogen vermittelten Restaktivierung der ABA-Signaltransduktion abgezogen wurden, war keine RCAR5- bzw. RCAR9-vermittelte Regulierung von ABI2 in Arabidopsis Protoplasten feststellbar (Abb. 2-7). Alle restlichen ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen konnten mit der nachträglich durchgeführten Korrektur bestätigt werden.

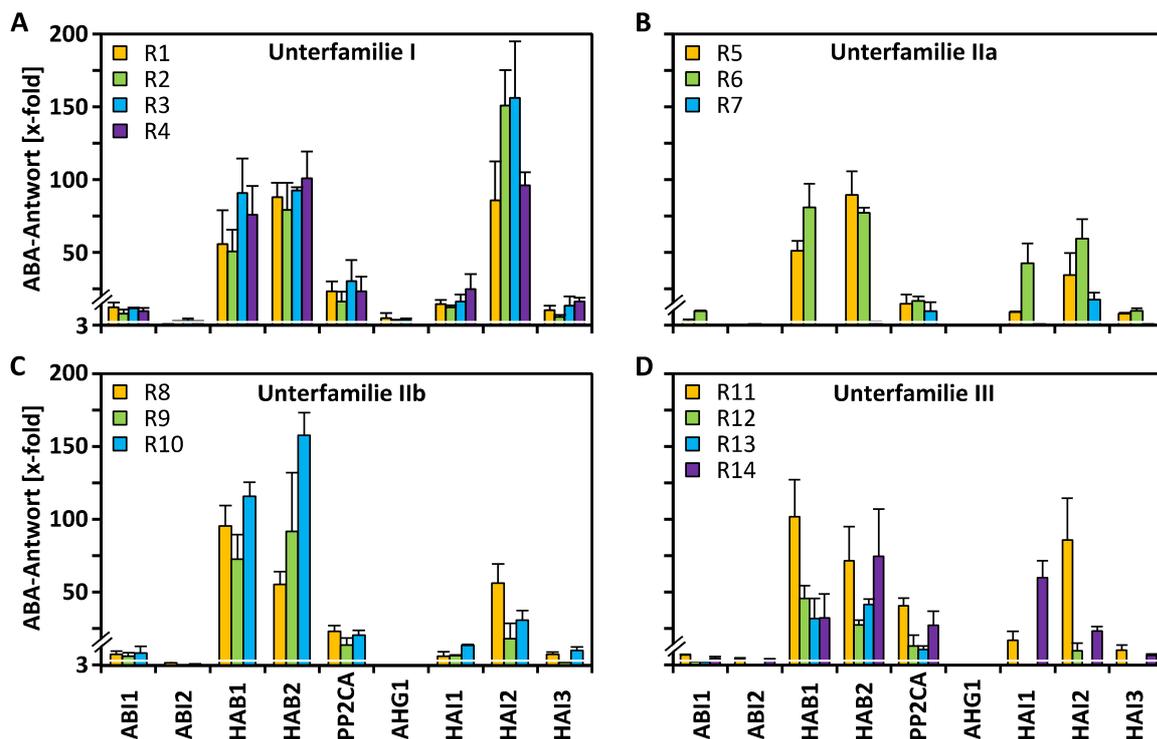


Abb. 2-7 Normalisierung der RCAR-vermittelten PP2C-Regulation unter ABA-Exposition.

Zusammenfassende Darstellung der RCAR-vermittelten PP2C-Regulation in Col-0 Mesophyll-Protoplasten unter ABA-Zugabe basierend auf Abb. 2-6B. Um auszuschließen, dass endogene PP2C durch ektopisch exprimierte RCARs reguliert wurden und in einer marginalen Aktivierung der ABA-Antwort resultierten, wurde von den normalisierten Induktionswerten der Abb. 2-6B 20 % abgezogen. Die Reduzierung dieser Werte beruhen auf max. 90 % Inhibierung der ABA-Signaltransduktion durch die ektopische Koexpression einer PP2C. Die Aktivierung der ABA-Antwort durch RCAR-PP2C-Koexpression wurde als effektiv gewertet, wenn eine mind. dreifach höhere Induktion verglichen zur LV vorlag.

Die aus dieser Untersuchung abgeleiteten Matrizen der ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen (Abb. 2-6 und Abb. 2-7) gewähren einen umfassenden Einblick in potentiell realisierbare RCAR-PP2C-Komplexe *in planta*. Es wurden über 50 Kombinationen ohne und über 100 Möglichkeiten mit ABA-Behandlung identifiziert. Zusätzlich wurde mit dieser Untersuchung eine tatsächliche ABA-Rezeptorfunktion für alle 14 RCARs bestätigt. Wie für RCAR12 bzw. RCAR13 führte die Koexpression von RCAR7 bzw. RCAR11 mit einer

spezifischen PP2C und unter Zugabe von 10 μ M ABA zu einer eindeutigen Aktivierung der ABA-Signaltransduktion in Protoplasten. Diese Ergebnisse bestätigen die ektopische Expression von RCAR7 und RCAR11 in Arabidopsis Protoplasten und lassen vermuten, dass ein Mangel an endogenen PP2Cs der Grund für die marginale Induktion der ABA-Antwort durch RCAR7 bzw. RCAR11 während der ersten transienten Analyse war (Abb. 2-2). Die aufgestellte Matrix verdeutlicht außerdem, dass einzelne RCAR-PP2C Kombinationen sich in der Aktivierung der ABA-Antwort stark unterscheiden. Es wurden effektive Kombinationen identifiziert als auch schwächer wirkende. Zusätzlich wurde Interaktionsspezifität und Substratspezifität seitens der RCARs und PP2Cs beobachtet.

2.3. RCAR-abhängige Regulierung von AHG1

Es wurde bereits angesprochen, dass unter Zugabe von exogener ABA nur RCAR1, RCAR2 und RCAR3 die AHG1-vermittelte Inhibierung der ABA-Antwort wirksam aktivieren konnten. Da dieser Effekt in der Abb. 2-6B bzw. Abb. 2-7 schlecht zu erkennen war, wurde dieser Befund in Abb. 2-8A besser veranschaulicht. Interessant war, dass RCAR1, RCAR3, RCAR4, RCAR6 und RCAR9 unter endogenem ABA-Gehalt die AHG1-blockierte ABA-Antwort um das Drei- bis Neunfache relativ zur LV aktivieren konnten und unter ABA-Zugabe nur RCAR1, RCAR2 und RCAR3 in der Lage waren, die inhibierte Signaltransduktion um das Sieben- bis Zehnfache relativ zur ABA-behandelten Kontrolle zu induzieren. Weder für die Koexpression mit RCAR4, RCAR6 noch mit RCAR9 wurde ein vergleichbarer Effekt beobachtet. Infolgedessen ist anzunehmen, dass exogenes ABA die Komplexbildung mit AHG1 in diesen Fällen nicht stabilisierte.

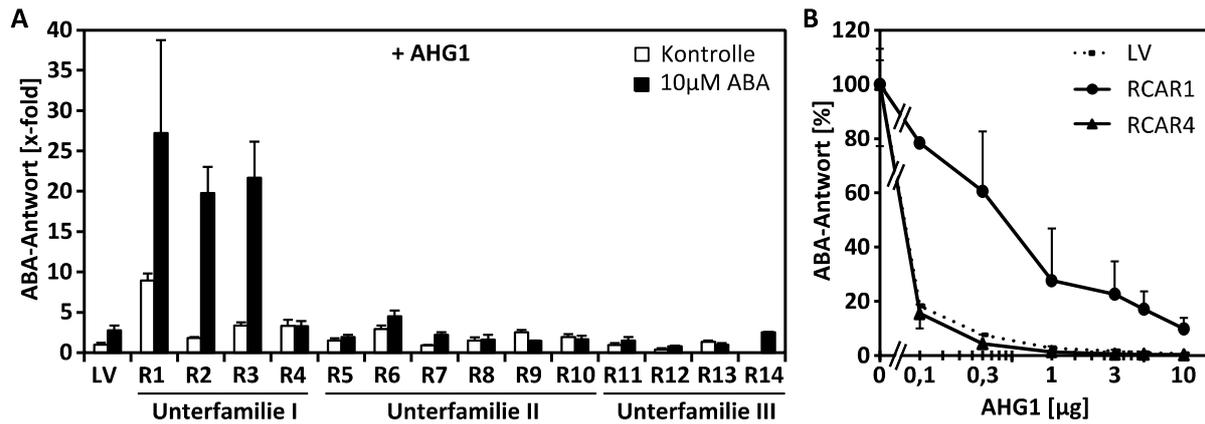


Abb. 2-8 RCAR-abhängige Regulierung von AHG1 in Arabidopsis Protoplasten.

(A) Partielle Aktivierung der AHG1-inhibierten ABA-Antwort durch Koexpression von RCARs in Protoplasten von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen. Col-0 Protoplasten (10^5 Protoplasten) wurden jeweils mit $3 \mu\text{g}$ p35S::GUS, $5 \mu\text{g}$ pRD29B::LUC, $5 \mu\text{g}$ Effektor-DNA (RCAR bzw. LV) und $1 \mu\text{g}$ AHG1 transfiziert und in Ab- und Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ ABA inkubiert. (B) Inhibierung der ABA-induzierten Reporterexpression durch ektopische Koexpression von AHG1 mit leerer Vektorkontrolle (LV), RCAR1 (schwarzer Kreis) und RCAR4 (schwarzes Dreieck) unter Zugabe von $10 \mu\text{M}$ ABA. Col-0 Zellen wurden jeweils mit $3 \mu\text{g}$ p35S::GUS, $5 \mu\text{g}$ pRD29B::LUC, $5 \mu\text{g}$ p35S::Effektor DNA und verschiedene Konzentrationen p35S::AHG1 transfiziert. Die Inkubation erfolgte für 17 ± 1 h bei 25°C . Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf RFUs normalisiert. Die Reporterexpression lag für LV mit AHG1 und ohne ABA-Behandlung bei $5,0$ kCPS/RFU und wurde auf eins normalisiert (A). Für den Versuch (B) lag die Reporterexpression für transfizierte Protoplasten ohne AHG1 und mit leerem Vektor bei 335 kCPS/RFU, mit RCAR1 bei 500 kCPS/RFU und für Zellen mit RCAR4 bei 584 kCPS/RFU. Alle drei Werte wurden auf 100% normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (\pm SD) von drei unabhängigen Transfektionen. Die Versuche wurden mind. zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei der interaktiven AHG1-Regulation durch RCAR1 bzw. RCAR4 um einen Dosis-abhängigen Effekt handelte, wurden Arabidopsis Protoplasten mit RCAR1 bzw. RCAR4 und verschiedenen Konzentrationen an AHG1-DNA kotransfiziert und mit $10 \mu\text{M}$ exogener ABA behandelt. Mit der Erhöhung der AHG1-Exposition wurde eine Zunahme in der Inhibierung der ABA-Antwort festgestellt (Abb. 2-8B), allerdings mit Unterschieden in der Effektivität zwischen kotransfizierten Zellen mit RCAR1 bzw. RCAR4/LV. Eine 90% ige Blockierung der ABA-Signaltransduktion ließ sich mit RCAR4 bzw. LV transfizierten Protoplasten durch Zugabe von ca. $0,3 \mu\text{g}$ AHG1-Effektor-DNA erzielen, vergleichbar zur Abb. 2-3D. Im Gegensatz dazu, wurde für die Koexpression mit RCAR1 die Zugabe von $10 \mu\text{g}$ AHG1-Effektor-DNA benötigt, um eine vergleichbare Inhibierung der ABA-Signaltransduktion zu erreichen. Die Effizienz der AHG1-Inhibierung wurde durch Koexpression von RCAR1, im Vergleich zu RCAR4 bzw. LV, deutlich verzögert. Dementsprechend könnte exogene ABA zur Stabilisierung des RCAR1-AHG1 Komplexes in Protoplasten beitragen, während die Koexpression mit RCAR4 unter den gleichen Behandlungen keinen Einfluss auf die AHG1-Regulation ausübt.

2.3.1. Spezifität der RCAR-AHG1-Komplexbildung

RCAR1 bis RCAR4 gehören auf Grund ihrer Primärstruktur zur gleichen RCAR-Unterfamilie (Ma et al. 2009; Park et al. 2009; Nishimura et al. 2010). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von RCAR1 und RCAR4 offenbarte eine Identität beider Proteine von 69 %. Im Vergleich, für RCAR4 und RCAR9 wurde eine Übereinstimmung von 51 % festgestellt (Protein Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hinsichtlich dieser hohen Sequenzhomologie, innerhalb der Unterfamilien I RCARs, stellte sich die Frage, worin sich RCAR1, RCAR2 und RCAR3 von RCAR4 und den anderen RCAR-Vertretern unterscheiden. Ein Alignment aller Primärstrukturen der RCARs, mit Hilfe von Clustal Omega (www.ebi.ac.uk), sollte darüber Aufschluss bringen (Abb. 2-9).

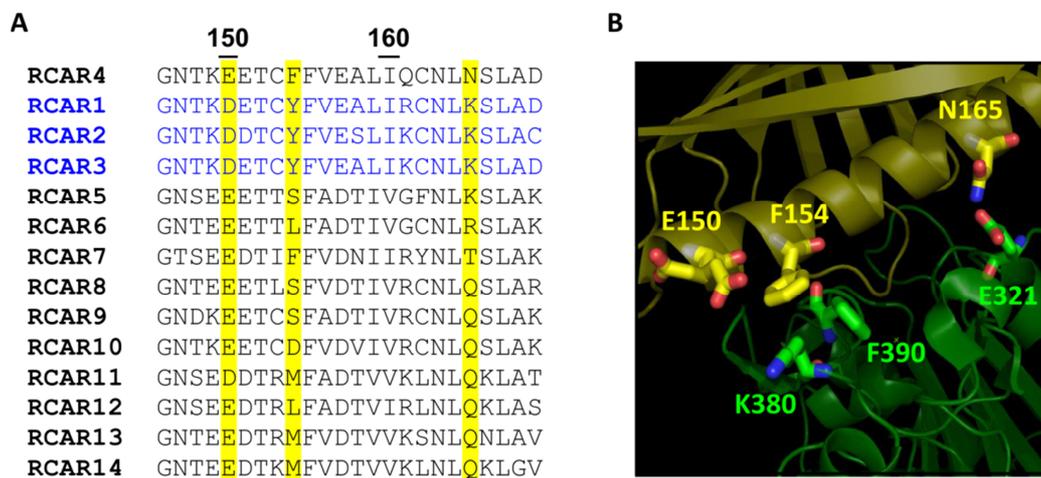


Abb. 2-9 RCAR-Alignment und Kristallstruktur der RCAR-PP2C-Bindungsfläche.

(A) Alignment der Primärstruktur aller 14 RCARs. Es wird ein Teilausschnitt der AS-Sequenzen gezeigt, mit der Position der Aminosäureresten von Asparaginsäure (D), Tyrosin (Y) und Lysin (K) in RCAR1 bis 3, hervorgehoben in Gelb, die bei anderen RCAR Familienmitgliedern variieren. (B) Kristallstruktur von RCAR4 (Gelb) und HAB1 (Grün). Die drei Aminosäurereste, die sich im Vergleich zu RCAR1, 2 und 3 unterscheiden, sind für RCAR4 gelb markiert. Die drei Aminosäurereste von HAB1, welche die Kontaktfläche zum RCAR4 darstellen, sind in Grün hervorgehoben. Der Ausschnitt zeigt einen Teil der Kristallstruktur von RCAR4-HAB1 (PDB ID: 3RT0, (Hao et al. 2011)) und wurde mit PyMOL so bearbeitet (www.pymol.org), dass lediglich die Aminosäurereste von E150, F154 und N165 sowie E321, K380 und F390 sichtbar sind.

Mit Hilfe des durchgeführten Alignments, der Kristallstruktur von RCAR4-HAB1 (Hao et al. 2011) und dem Programm PyMOL (www.pymol.org) wurde nach RCAR-spezifischen Aminosäureresten gesucht, die sich an der Kontaktfläche zur PP2C befanden und sich bei RCAR1/2/3 von RCAR4 bzw. den anderen RCARs unterscheiden (Abb. 2-9). Hierbei wurden drei Aminosäurereste identifiziert (Abb. 2-10). Dabei handelte es sich um

Asparaginsäure („D“, Position 156 bei RCAR1), Tyrosin („Y“, Position 160 bei RCAR1) und Lysin („K“, Position 171 bei RCAR1). RCAR4 besitzt im Gegensatz zur Asparaginsäure eine Glutaminsäure („E“, Position 154), anstatt Tyrosin ein Phenylalanin („F“, Position 154) und für Lysin ein Asparagin („N“, Position 165). Interessant war, dass die RCAR1 Asparaginsäure auch bei RCAR11 vorhanden ist und das Lysin auch bei RCAR5. Das Tyrosin hingegen wurde nur bei RCAR1, RCAR2 und RCAR3 an der vergleichbaren Position gefunden.

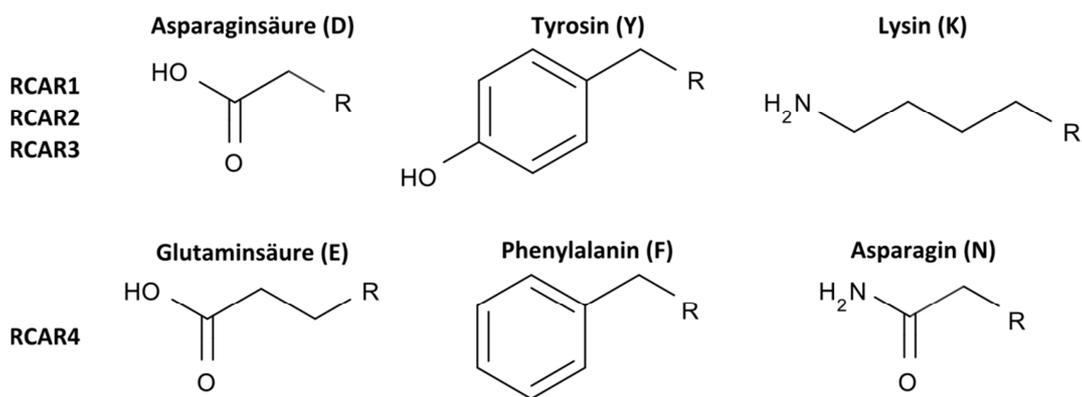


Abb. 2-10 Strukturen der identifizieren Aminosäurereste.

Dargestellt sind die Strukturen der drei Aminosäurereste mit entsprechendem Einbuchstabencode, die sich zwischen RCAR1, RCAR2 und RCAR3 zu RCAR4 unterschieden. In RCAR1/2/3 sind an den entsprechenden Positionen Asparaginsäure, Tyrosin und Lysin, während bei RCAR4 Glutaminsäure, Phenylalanin und Asparagin vorhanden sind.

Bei Asparaginsäure und Glutaminsäure handelt es sich wegen der zweiten Carboxylgruppe in der Seitenkette, um saure Aminosäuren. Der Unterschied zwischen diesen beiden Aminosäuren liegt in der zusätzlichen CH₂-Gruppe der Glutaminsäure. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Asparaginsäure, infolge ihrer chemischen Eigenschaft, eine essentielle Rolle bei der Komplexbildung zwischen RCAR und AHG1 ausübt. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die räumliche Anordnung und die, gegenüber der Glutaminsäure, fehlende CH₂-Gruppe eine Notwendigkeit für die Komplexbildung darstellt.

Das Tyrosin besitzt am Ende der Seitenkette eine Hydroxylgruppe, gehört zu den polaren/neutralen Aminosäuren und besitzt hydrophile Eigenschaften, während es sich bei Phenylalanin um eine unpolare, hydrophobe Aminosäure handelt. Anlässlich der enormen Unterschiede in ihren chemischen Eigenschaften wird für Tyrosin eine positive Funktion in der RCAR-AHG1-Komplexbildung erwartet, wogegen sich Phenylalanin negativ auf die

Komplexbildung auswirken könnte, da wahrscheinlich keine Wechselwirkung mit dem passenden AHG1-Aminosäurerest ausgebildet wird.

Die letzte interessante Aminosäure, das Lysin, ist eine basische Aminosäure auf Grund der zusätzlichen Aminogruppe am Ende der Seitenkette. Der Gegenspieler Asparagin hingegen gehört zu den polar/neutralen Aminosäuren, besitzt eine Amidgruppe und hydrophile Eigenschaften. Auch für das Lysin könnte eine entscheidende Funktion in der RCAR-AHG1-Interaktion erwartet werden, da sich beide Aminosäuren in ihrer räumlichen Struktur, Lysin besitzt zwei zusätzliche CH₂-Gruppen verglichen mit Asparagin, und in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden.

2.3.2. *In vivo* und *in vitro* Analysen der RCAR1/4 Varianten mit AHG1

Um zu überprüfen, ob ggf. einer dieser Aminosäurereste für die Ausbildung des ABA-abhängigen RCAR-AHG1-Komplexes notwendig ist, wurden unter Anwendung der zielgerichteten Mutagenese (kurz SDM) RCAR1- und RCAR4-Varianten generiert, bei denen die entsprechenden Aminosäuren ausgetauscht wurden. Für jedes dieser beiden RCARs wurden Einfach-, Zweifach- und Dreifachvarianten hergestellt.

Im ersten Schritt wurde eine Y2H Analyse durchgeführt, um eine mögliche physikalische Interaktion der RCAR-Varianten mit AHG1 zu überprüfen. Dafür wurde die CDS von AHG1 mit der GAL4 TF Aktivator-Domäne fusioniert und die CDS aller generierter RCAR Varianten mit der GAL4 DNA Bindedomäne. Anschließend wurden die Konstrukte in den Hefestamm AH109 transformiert und auf Doppeltransformaten mit Hilfe von -L/-W selektivem Medium getestet (James et al. 1996). Wenn die Bindedomäne und die Aktivator-Domäne der beiden Fusionsproteine (RCAR-Variante und AHG1) miteinander interagieren, wird das Reporter-gen für Histidin aktiviert und ermöglicht das Wachstum der Hefen auf -L/-W/-H selektivem Medium (Gietz et al. 1997).

Die Interaktionsstudie von AHG1 mit den RCAR-Varianten wurde in An- und Abwesenheit von 30 µM ABA durchgeführt (Abb. 2-11). Stefan Fuchs bestätigte in seiner Dissertation, dass in Anwesenheit von 30 µM ABA eine Interaktion von RCAR1 mit AHG1 möglich war, nicht aber von RCAR4 mit AHG1 (Fuchs 2013). Dementsprechend wurde RCAR1 im nachfolgenden

Versuch als Positivkontrolle verwendet und als Negativkontrolle RCAR4 sowie Hefezellen transformiert mit leerem pBridge-Vektor (LV), um eine Autoaktivierung auszuschließen.

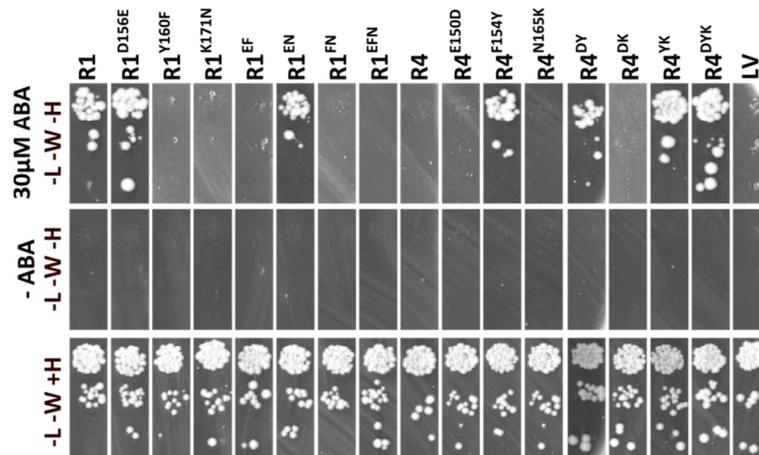


Abb. 2-11 Y2H Interaktionsanalyse von AHG1 mit RCAR-Varianten.

Hefekulturen wurden als Verdünnungsreihe auf selektives Medium getropft und inkubierten für fünf Tage bei 30 °C in An- und Abwesenheit von 30 μM ABA. Wachstum auf Medium mit -L/-W dient als Kontrolle für die Doppeltransformation, während das Wachstum auf -L/-W/-H Interaktionen anzeigt. Leerer Vektor (LV) und RCAR4 (R4) wurden als Negativkontrolle verwendet und RCAR1 (R1) als Positivkontrolle. AHG1 wurde mit der GAL4 TF Aktivator-Domäne fusioniert und die RCAR-Varianten mit der GAL4 DNA Bindedomäne.

Die Interaktionsstudie im Y2H zeigte, dass in Abwesenheit von ABA keine Interaktion von AHG1 mit den RCAR-Varianten bzw. der Positivkontrolle RCAR1 möglich war (Abb. 2-11). Unter Zugabe von 30 μM ABA wurde, wie erwartet, eine Interaktion von AHG1 mit RCAR1 bestätigt (Fuchs 2013). Vergleichbares wurde für die RCAR1-Einzelvariante, bei der Asparaginsäure gegen Glutaminsäure ausgetauscht wurde (R1^{D156E}), und für die RCAR1-Doppelmutante, Austausch von Asparaginsäure/Lysin gegen Glutaminsäure/Asparagin (R1^{EN}), detektiert. Keine Interaktion wurde für alle RCAR1-Varianten ermittelt, bei denen das RCAR1 Tyrosin durch das RCAR4 Phenylalanin ersetzt wurde, also die Einfachmutante (R1^{Y160F}), zwei Zweifachmutanten (R1^{EF}, R1^{FN}) und die Dreifachmutante (R1^{EFN}). Des Weiteren wurde auch für die RCAR1-Variante (R1^{K171N}) keine Interaktion mit AHG1 detektiert, bei der Lysin durch Asparagin ersetzt wurde (Abb. 2-11).

Bei Betrachtung von RCAR4 wurde, wie erwarten, in dieser Studie weder ohne noch mit ABA-Exposition eine Interaktion mit AHG1 beobachtet (Fuchs 2013). Interessanterweise wurden in Gegenwart von ABA Interaktionen zwischen AHG1 und allen RCAR4-Varianten nachgewiesen, bei denen das eigene Phenylalanin gegen das RCAR1 Tyrosin ausgetauscht

wurde ($R4^{F154Y}$, $R4^{DY}$, $R4^{YK}$ und $R4D^{YK}$). Für die restlichen RCAR4-Varianten konnte keine AHG1-Interaktion *in vivo* bestätigt werden.

Mit der hier durchgeführten Analyse in Hefe wurde der von Fuchs (2013) detektierte RCAR1-AHG1-Komplex sowie die Rolle von RCAR4 als Negativkontrolle bestätigt. Des Weiteren wurden Interaktionswechselwirkungen von AHG1 mit verschiedenen RCAR1- bzw. RCAR4-Varianten nachgewiesen. Die Identifikation dieser Proteininteraktionen erfolgte ausschließlich unter Zugabe von ABA. Um zu überprüfen, ob diese RCAR-Varianten die AHG1-inhibierte ABA-Antwort in Pflanzenzellen regulieren können, erfolgte eine entsprechende Untersuchung in Col-0 Protoplasten (Abb. 2-12).

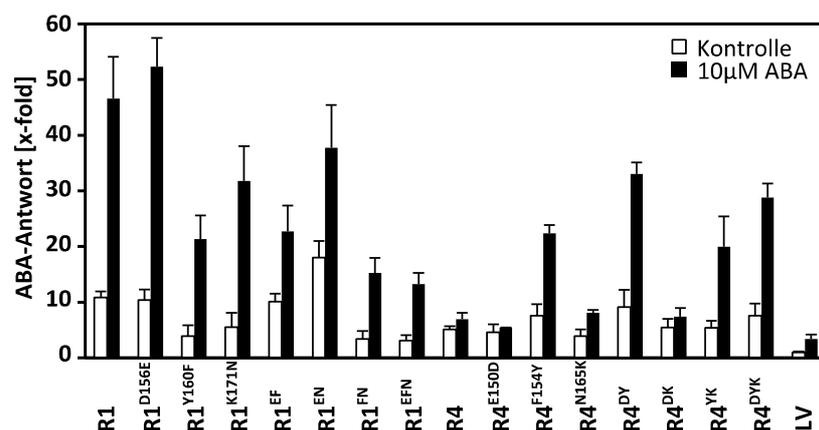


Abb. 2-12 *In vivo* Analyse aller RCAR-Varianten in Arabidopsis Protoplasten.

Partielle Aktivierung der durch AHG1-inhibierten ABA-Antwort durch Koexpression von RCAR-Varianten in Arabidopsis Protoplasten. Col-0 Protoplasten (10^5 Protoplasten) wurden jeweils mit $3 \mu\text{g}$ p35S::GUS, $5 \mu\text{g}$ pRD29B::LUC, $5 \mu\text{g}$ Effektor DNA (RCAR bzw. LV) und $1 \mu\text{g}$ AHG1 kotransfiziert und in Ab- und Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ exogener ABA für 17 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf RFUs normalisiert. Die Reporterexpression lag für LV mit AHG1 sowie ohne exogener ABA bei $2,18$ kCPS/RFU und wurde auf eins normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (\pm SD) aus drei unabhängigen Transfektionen. Der Versuche wurde zweimal wiederholt, mit vergleichbaren Ergebnissen.

Für die verwendeten Negativkontrollen LV und RCAR4 wurden unter Zugabe von ABA eine AHG1-reprimierte Signaltransduktion beobachtet (Abb. 2-12, vergleichbar zu Abb. 2-8A). Eine klare Aktivierung der AHG1-inhibierten Signaltransduktion, um den Faktor zwölf bis 17 relativ zur LV, ließ sich für RCAR1, $R1^{D156E}$ und $R1^{EN}$ feststellen. Im Y2H wurde für alle anderen RCAR1 Varianten ($R1^{Y160F}$, $R1^{K171N}$, $R1^{EF}$, $R1^{FN}$ und $R1^{EFN}$) keine Interaktion mit AHG1 detektiert. Transient in Protoplasten wurde für diese Varianten eine partielle Aktivierung der

AHG1-gehemmten ABA-Antwort nachgewiesen, mit einer fünf- bis neunfach höheren Induktion relativ zur LV bzw. RCAR4. Jene RCAR1-Varianten waren in dieser Analyse aktiver verglichen zu RCAR4.

Während der Y2H Studie wurden Interaktionen von AHG1 zu allen RCAR4-Varianten mit dem RCAR1 Tyrosin (R4^{F154Y}, R4^{DY}, R4^{YK}, R4^{DYK}) ermittelt (Abb. 2-11). Vergleichbare Befunde wurden infolge der partiellen Aktivierung der AHG1-inhibierten ABA-Antwort in Protoplasten registriert (Abb. 2-12). Diese führten zu einer sechs- bis zehnfach höheren Aktivierung der ABA-Signaltransduktion. Alle anderen RCAR4-Varianten verhielten sich vergleichbar zum wildtypischen RCAR4.

Um die Befunde der identifizierten RCAR-AHG1-Komplexe zu bestätigen, wurden Proteinphosphataseaktivitätstests *in vitro* mit AHG1 und RCAR1, RCAR4 bzw. RCAR4^{DYK} durchgeführt. Dafür wurde die Expressionskassette von AHG1, RCAR1 und RCAR4 sowie RCAR4^{DYK} in den Vektor pET21(+) kloniert und heterolog in *E. coli*-Zellen exprimiert. Die Kultivierungsbedingungen der *E. coli*-Zellen und die benötigte Konzentration an IPTG, zur Induktion der Proteinexpression, wurden für RCAR1, RCAR4 und die PP2Cs nach Vorhersage von Christian Wunschel (Lehrstuhlmitarbeiter) durchgeführt.

Für den Phosphataseaktivitätstest, wurde 2 µM AHG1 zusammen mit der doppelten Konzentration an RCAR1, RCAR4 bzw. RCAR4^{DYK} und verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Umsetzung bzw. Dephosphorylierung des Substrates Methylumbelliferyl-Phosphat (MUP) zum fluoreszierenden Methylumbelliferyl analysiert (Abb. 2-13A). Mit zunehmender Konzentration an ABA wurde in Gegenwart von RCAR1 bzw. RCAR4^{DYK} eine effektive Inhibierung der AGH1-Phosphataseaktivität beobachtet. Durch Zugabe von 50 nM ABA wurde die AHG1-Aktivität durch RCAR1 um 50 % inhibiert. Die Zugabe von 1,5 µM ABA führte zur kompletten Inhibierung der Phosphataseaktivität. Für RCAR4^{DYK} wurde, im Vergleich zu RCAR1, eine schwächere Inhibierung der AHG1-Aktivität nachgewiesen. In Gegenwart von 8 µM ABA wurde eine 50%ige Blockierung der Phosphataseaktivität durch diese RCAR4-Variante festgestellt. Im direkten Vergleich zu RCAR1, musste für RCAR4^{DYK} mehr als das 100-fache an ABA zugegeben werden, um eine

vergleichbare Inhibierung der AHG1-Aktivität zu detektieren. Für das wildtypische RCAR4 wurde auch bei Zugabe von 0,5 mM ABA keine Inhibierung der AHG1-Phosphataseaktivität beobachtet.

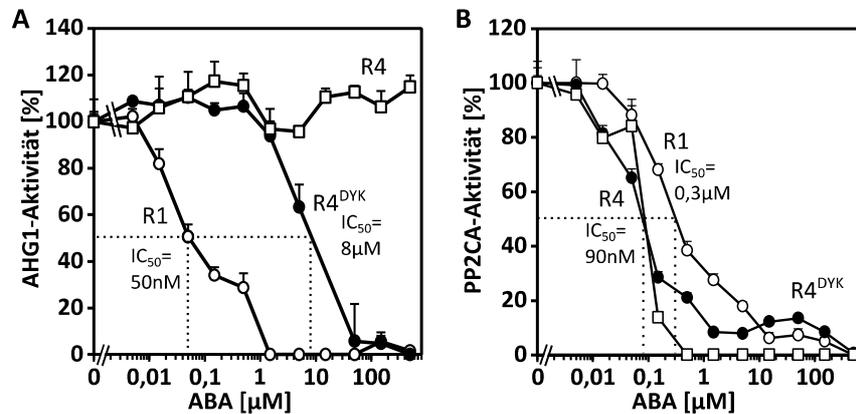


Abb. 2-13 Inhibierung der Phosphataseaktivität durch RCAR-Varianten.

(A) RCAR1- (weißer Kreis) bzw. RCAR4^{DYK}- (schwarzer Kreis) vermittelte spezifische Inhibierung der AHG1-Phosphataseaktivität durch ABA. AHG1 Protein (2 μM) wurde in Gegenwart der doppelten Menge an RCAR-Protein und verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert. Der IC₅₀-Wert ist für jedes RCAR angegeben. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Quatruplikaten (±SD) und wurde zweimal mit gleichem Ergebnis wiederholt. (B) RCAR1 (weißer Kreis), RCAR4 (weisses Viereck) und RCAR4^{DYK} (schwarzer Kreis) vermittelte Inhibierung der PP2CA/AHG3-Phosphataseaktivität durch ABA. PP2CA/AHG3 (405 nM) wurde in Gegenwart der doppelten Menge an RCAR-Protein und verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert. Der Versuch wurde wie unter (A) beschrieben, einmal durchgeführt.

Aus den Versuchsdaten von Christian Wunschel ist bekannt, dass RCAR1 und RCAR4 die Proteinphosphatase PP2CA/AHG3 ABA-abhängig inhibieren können (Wunschel, unveröffentlicht). Um zu überprüfen, ob RCAR4 als funktionsfähiges Protein in *E. coli* exprimiert wurde und eine PP2C inhibieren kann, erfolgte eine zusätzliche *in vitro* Untersuchung von RCAR4, RCAR1 sowie RCAR4^{DYK} in Kombination mit 0,4 μM PP2CA/AHG3 (Abb. 2-13B). Für alle drei RCARs wurde eine ABA-abhängige Inhibierung der PP2CA-Phosphataseaktivität festgestellt. RCAR4 und RCAR4^{DYK} waren mit einer 50 %igen Inhibierung in Gegenwart von 90 nM ABA effektiver verglichen zu RCAR1, wo 300 nM ABA eingesetzt werden mussten, um eine vergleichbare Inhibierung von PP2CA/AHG3 zu erzielen. Dementsprechend lag RCAR4 im vorangegangenen Versuch als aktives Protein vor, welches, verglichen zu RCAR1 und RCAR4^{DYK}, die Phosphataseaktivität von AHG1 nicht inhibieren konnte.

Die Befunde aus beiden *in vivo* Analysen (Abb. 2-11 und Abb. 2-12) und dem *in vitro* Phosphataseaktivitätstest (Abb. 2-13) ergaben den Hinweis auf eine entscheidende Rolle des RCAR1 Tyrosins (Y160) bei der ABA-abhängigen Komplexbildung mit AHG1. Durch das Einbringen dieses Tyrosin in RCAR4 wurden Varianten generiert, die eine neue regulatorische Funktion gegenüber AHG1 aufwiesen. Die transiente Analyse in Protoplasten implizierte, dass weitere Aminosäurereste von RCAR1/2/3 an der Komplexbildung mit AHG1 beteiligt bzw. notwendig sind. Für alle RCAR1-Varianten, wo das Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde, ließ sich eine partielle Aktivierung der AHG1-inhibierten ABA-Antwort beobachten. Neben dem RCAR1 Tyrosin wurde auch für das Lysin eine untergeordnete Funktion für die Komplexbildung mit AHG1 ermittelt, aber nur in Kombination mit dem Tyrosin. Entsprechende RCAR4-Variante (RCAR4^{N165K}) waren weiterhin nicht in der Lage, mit AHG1 zu interagieren (Y2H) oder in Protoplasten die durch AHG1-blockierte ABA-Antwort zu aktivieren. Wie erwartet, wurde für den Austausch von Asparaginsäure (RCAR1) gegen Glutaminsäure (RCAR4) keine regulatorische Funktion für die Komplexbildung mit AHG1 detektiert, weder in Hefen noch transienten in Protoplasten.

2.4. ABA-Rezeptorfunktion von RCAR7

In der hier vorgestellten transienten Analysen wurden spezifische wie auch unspezifische RCAR-PP2C-Kombinationen in Arabidopsis Protoplasten nachgewiesen (Abb. 2-6 und Abb. 2-7). Auffällig war die ABA-abhängig Aktivierung der Signaltransduktion durch spezifische RCAR7-PP2C Kombinationen, obwohl bisher für alle anderen 13 RCARs eine wirksame ABA-Rezeptorfunktion beschrieben wurde (Fujii et al. 2009; Zhao et al. 2013). Infolgedessen wurde die genauere Charakterisierung von RCAR7 durchgeführt.

2.4.1. Regulierung der ABA-Signaltransduktion durch RCAR7 Expression

Zu Beginn dieser Arbeit wurde für die ektopische Expression von RCAR7 eine marginale Aktivierung der Signaltransduktion in Arabidopsis Protoplasten beobachtet (Abb. 2-2). Mit dem endogenen ABA-Gehalt ließ sich für RCAR7 eine dreifach höhere Induktion der ABA-Antwort relativ zur LV in Col-0 Protoplasten feststellen und unter ABA-Zugabe eine 50-fach höhere Aktivierung (Abb. 2-2A). Allerdings wurde für fast alle anderen RCARs unter gleicher Behandlung eine deutlich höhere Induktion nachgewiesen, mit Ausnahme von RCAR11 bis

RCAR13, die der Unterfamilie III zugehörig sind. Eine Nichtexpression von RCAR7 in Protoplasten wurde mit Hilfe der umfassenden RCAR-PP2C-Kombinationsuntersuchung ausgeschlossen (Abb. 2-6). Es war aber weiterhin unklar, ob die marginale RCAR7-abhängige Induktion der Signaltransduktion wegen einer schlechten ABA-Affinität verursacht wurde und/oder durch den endogenen PP2C-Gehalt.

Zur Überprüfung, ob RCAR7 eventuell eine vergleichbare Affinität gegenüber ABA aufweist wie dimere RCARs, wurde eine Titration von ABA mit RCAR7 transfizierten Col-0 Protoplasten durchgeführt (Abb. 2-14A). Mit steigender ABA-Zugabe ließ sich eine kontinuierliche Induktion der ABA-Antwort in RCAR7 transfizierten Protoplasten beobachten. Durch Zugabe von mind. 1 μ M ABA wurde eine max. zweifach höhere Aktivierung der Signaltransduktion relativ zur LV nachgewiesen. In Gegenwart von niedrigeren exogenen ABA-Konzentrationen wurde kein Unterschied in der Aktivierung relativ zur Kontrolle festgestellt. Dieser Befund implizierte, dass es sich bei RCAR7 womöglich um ein Dimer handeln könnte. Bekräftigt wurde diese Annahme auf Grund der klaren Aktivierung der ABA-Antwort in Col-0 Protoplasten unter endogenen ABA-Gehalt induziert durch ektopische Expression von bekannten monomeren RCAR1, 3 und 4 (Hao et al. 2011) bzw. der nicht nachweisbaren Aktivierung durch Dimere (RCAR11 bis RCAR13, (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b; Zhang et al. 2012b)) (Abb. 2-2A).

Um ausschließen zu können, dass eine unzureichende ektopische Expression von RCAR7 die Ursache für den marginalen Unterschied in der Aktivierung der Signaltransduktion relativ zur LV darstellt, wurde im nächsten Schritt eine ABA-abhängige Titration von RCAR7 transient in Protoplasten durchgeführt (Abb. 2-14B). Als ABA-Exposition wurden 5 μ M ABA verwendet, weil sich diese Menge in einer vorangegangenen transienten Analysen als ausreichend herausstellte, um die ABA-Signaltransduktion angemessen zu induzieren (Abb. 2-1B).

Unter Zugabe von 5 μ M ABA wurde mit zunehmender RCAR7-Konzentration ein kontinuierlicher Anstieg der ABA-Signaltransduktion in Col-0 Protoplasten detektiert (Abb. 2-14B). Es wurde eine bis zu 65-fach höhere Induktion der ABA-Antwort beobachtet relativ zur unbehandelten Kontrolle. In Gegenwart von exogener ABA wurde eine max. vierfach höhere Aktivierung mit maximaler RCAR7-Zugabe feststellen verglichen zu ohne RCAR7-

Exposition unter gleichen Bedingungen. Auf Grund der schwachen Aktivierung der ABA-Antwort, induziert durch ABA-Zugabe oder Erhöhung der RCAR7-Effektor-DNA, lag der Verdacht nah, dass es sich bei RCAR7 um einen unwirksamen ABA-Rezeptor handelte (Zhao et al. 2013). Allerdings wurden mind. zwei verschiedene RCAR7-PP2C Kombinationen bestätigt, bei denen eine effektive RCAR7-abhängige Aktivierung der PP2C-inhibierten ABA-Antwort nachgewiesen wurde (Abb. 2-7).

Mit diesem Befund erhärtete sich der Verdacht, dass der endogene PP2C-Gehalt und die schlechte ABA-Affinität die eigentlichen Ursachen für die marginale Induktion der ABA-Antwort in RCAR7-transfizierten Zellen darstellte (Fuchs et al. 2014) vergleichbar zu RCAR11, RCAR12 und RCAR13.

Die effektivste Aktivierung der Signaltransduktion wurde für RCAR7 in Kombination mit HAI2 bzw. PP2CA/AHG3 beobachtet (Abb. 2-7), zwei PP2Cs für welche in dieser Arbeit eine wirksame Inhibierung der ABA-Antwort festgestellt wurde (Abb. 2-3). Um ausschließen zu können, dass es sich bei der bestätigten RCAR7-PP2CA/AHG3 Kombination um einen Dosis-abhängigen Effekt handelte, wurde die Titration von PP2CA/AHG3 in Arabidopsis Zellen mit bzw. ohne Koexpression von RCAR7 unter exogener ABA-Zugabe wiederholt (Abb. 2-14C). Anlässlich der beobachteten Aktivierung der ABA-Signaltransduktion durch ektopische Koexpression von RCAR7 und PP2CA/AHG3 unter Zugabe von 10 μ M ABA (Abb. 2-7), wurde die gleiche ABA-Konzentration auch für diese Titrationsanalyse verwendet.

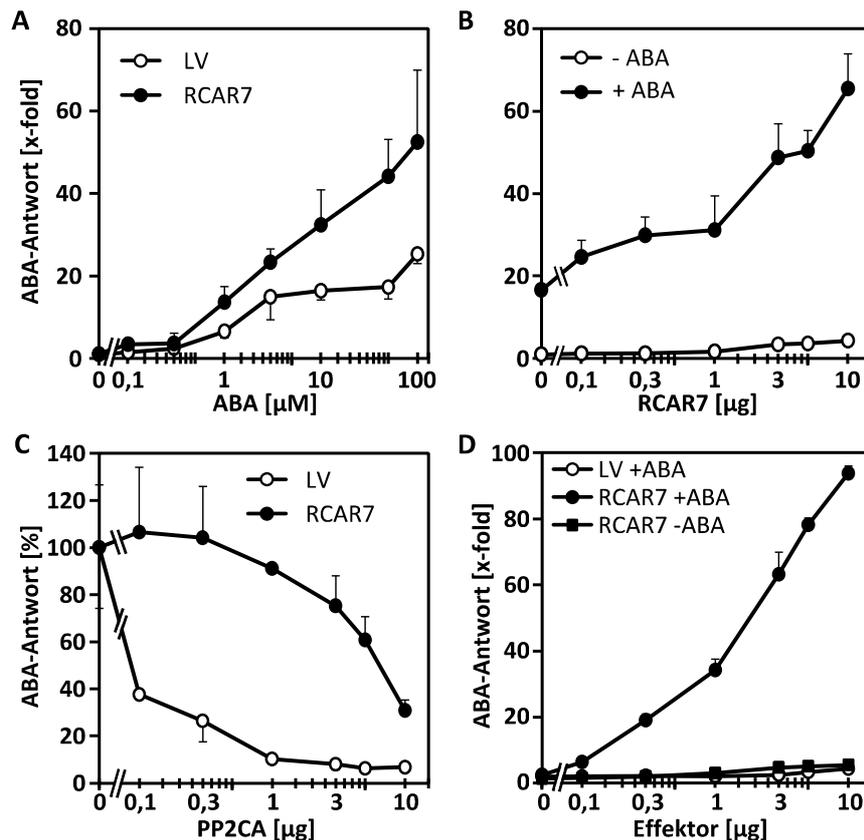


Abb. 2-14 Regulierung der ABA-Signaltransduktion durch RCAR7-Expression in Arabidopsis Protoplasten.

Col-0 Protoplasten (10^5) von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen, wurden jeweils mit $3 \mu\text{g}$ p35S::GUS, $5 \mu\text{g}$ pRD29B::LUC und verschiedenen Konzentrationen an Effektor-DNA transfiziert. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 17 ± 1 h. Die Luciferaseaktivität wurde als RLU gemessen und auf die RFUs, des konstitutiv exprimierten GUS-Gens, normalisiert. (A) RCAR7- und ABA-abhängige Aktivierung der ABA-Antwort. Col-0 Protoplasten wurden zusätzlich mit $3 \mu\text{g}$ p35S::Effektor transfiziert in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an exogener ABA. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne Effektor (LV) lag bei 202 RLU/RFU und wurde auf eins gesetzt. (B) Aktivierung der ABA-Antwort durch RCAR7-Titration in Ab- und Anwesenheit von $5 \mu\text{M}$ exogener ABA. Col-0 Zellen wurden zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen an p35S::RCAR7 transfiziert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne Effektor (LV) lag bei 133 RLU/RFU und wurde auf eins gesetzt. (C) Relative Inhibierung der ABA-induzierten Reporterexpression durch ektopisch exprimierte PP2CA/AHG3 in Ab- und Anwesenheit von RCAR7 und $10 \mu\text{M}$ exogener ABA. Protoplasten wurden zusätzlich mit $3 \mu\text{g}$ p35S::RCAR7 bzw. leere Vektorkontrolle und steigender Konzentration an p35S::Effektor DNA transfiziert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne PP2CA/AHG3 lag für ohne RCAR7 bei 2,8 kRLU/RFU und für mit RCAR7 8,0 kRLU/RFU. Beide Werte wurden jeweils auf 100 % gesetzt. (D) Wiederherstellung der PP2CA/AHG3-vermittelten Inhibierung der ABA-Antwort ist abhängig von ABA und RCAR7. Col-0 Protoplasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Effektor-DNA und $1 \mu\text{g}$ PP2CA/AHG3-DNA (=90 % Inhibierung der ABA-Antwort) kotransfiziert in Ab- und Anwesenheit von $5 \mu\text{M}$ exogener ABA. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne RCAR7 und ohne exogener ABA lag bei 212 RLU/RFU und wurde auf 1 gesetzt. Als zusätzliche Kontrolle wurde der LV unter Zugabe von exogener ABA dargestellt. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen lag hierfür bei 593 RLU/RFU und wurde auf 1 gesetzt. Diese Abbildung stammt aus Fuchs et al. (2014) und wurde modifiziert.

Ohne Kotransfektion mit RCAR7 wurde mit zunehmender PP2CA/AHG3-Effektor-DNA eine wirksame Inhibierung der ABA-Antwort festgestellt (Abb. 2-14C), vergleichbar zu Abb. 2-3D. Mit $1 \mu\text{g}$ PP2CA/AHG3-Effektor-DNA wurde die ABA-Signaltransduktion um 90% inhibiert. Infolge der Koexpression mit RCAR7 wurde die Effektivität der PP2CA-vermittelten

Blockierung deutlich zu Gunsten der ABA-Signaltransduktionsintensität verschoben. Durch Zugabe von 1 µg PP2CA/AHG3-DNA wurde die ABA-Antwort in Gegenwart von koexprimierten RCAR7 nur noch um max. 10 % inhibiert. Auch bei 10 µg Effektor-DNA wurde die ABA-Antwort unter diesen Bedingungen um max. 70 % inhibiert. Folglich ist RCAR7 unter ABA-Zugabe ein wirksamer Regulator von PP2CA/AHG3 in Arabidopsis Protoplasten. Dementsprechend wurde angenommen, dass eine Koexpression beider ABA-Signalkomponenten zu einer wirksameren Aktivierung der ABA-Antwort führen sollte verglichen zur RCAR7 Expression allein. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die unter Abb. 2-14B beschriebene RCAR7-Titration in Koexpression mit PP2CA wiederholt (Abb. 2-14D). Um dabei den RCAR7-abhängigen Effekt auf die Aktivierung der ABA-Signaltransduktion zu untersuchen, wurden die Col-0 Protoplasten mit 1 µg PP2CA/AHG3-DNA kotransfiziert, was in einer 90 %igen Hemmung der ABA-Antwort resultierte (auf Grundlage von Abb. 2-3D).

Unter ABA-Zugabe ließ sich für RCAR7 eine effektive Aktivierung der PP2CA-inhibierten Signaltransduktion feststellen (Abb. 2-14D). Die ABA-Antwort wurde um bis zu 90-fach höher induziert relativ zur Kontrolle ohne ABA-Behandlung. Zur Erinnerung, ohne Koexpression von PP2CA wurde für RCAR7 unter exogener ABA-Exposition maximal eine vierfach höhere Aktivierung der ABA-Antwort registriert (Abb. 2-14B). Unter endogenen ABA-Gehalt wurden keine Unterschiede von der RCAR7-PP2CA/AHG3 Koexpression zur unbehandelten Kontrolle festgestellt.

Anhand der hier durchgeführten *in vivo* Untersuchungen, wurde für RCAR7 eine tatsächliche ABA-Rezeptorfunktion in Arabidopsis Protoplasten nachgewiesen. In Koexpression mit PP2CA/AHG3 wurde eine klare ABA-abhängige Aktivierung der Signaltransduktion detektiert, zu der RCAR7 allein mit dem endogenen PP2CA-Gehalt offensichtlich nicht in der Lage war.

2.4.2. RCAR7-abhängige Regulierung der PP2Cs

Neben PP2CA/AHG3 wurde auch für die HAI2-vermittelte Inhibierung der ABA-Antwort eine deutliche Regulierung durch Koexpression von RCAR7 beobachtet (Abb. 2-7). Eine offenbar marginale Induktion wurde in Kombination mit HAB1/2 bzw. HAI1/3 festgestellt, während die ABI1/2- bzw. AHG1-vermittelte Inhibierung der Signaltransduktion durch Koexpression mit RCAR7 nicht reguliert werden konnte. Diesbezüglich wurde der direkte Einfluss von RCAR7 auf die Inhibierung der ABA-Antwort durch die restlichen acht PP2Cs, wie für PP2CA/AHG3 in Abb. 2-14C bereits beschrieben, transient in Arabidopsis Protoplasten untersucht (Abb. 2-15).

Ohne Kotransfektion mit RCAR7 wurde, wie erwartet, eine entsprechende Inhibierung der Signaltransduktion zu Abb. 2-3 durch die ektopische Expression der untersuchten PP2Cs in Col-0 Protoplasten festgestellt (Abb. 2-15). Vergleichbar zu PP2CA/AHG3, führte die Koexpression von RCAR7 zu einer Verzögerung der HAI2-vermittelten Blockierung der ABA-Antwort (Abb. 2-15B). Ohne RCAR7 Kotransfektion wurde eine 90 %ige Inhibierung der Signaltransduktion mit ca. 0,5 µg HAI2-Effektor-DNA nachgewiesen. Durch die Koexpression von RCAR7 wurden dagegen 10 µg HAI2-DNA benötigt, um den gleichen Effekt zu erzielen. Vergleichbares, nur mit einer deutlich schwächeren Effizienz, wurde auch für die HAI3- bzw. HAB2-vermittelte Inhibierung der ABA-Antwort beobachtet (Abb. 2-15C und E). In Abwesenheit von ektopisch exprimierten RCAR7 wurde die Signaltransduktion hierbei mit 0,5-1 µg PP2C-DNA um 90 % inhibiert. Durch RCAR7-Koexposition mussten die Protoplasten mit 5 µg HAI3- bzw. 3 µg HAB2-Effektor-DNA kotransfiziert werden, um die ABA-Antwort erneut um 90 % zu blockieren. Für die Koexpression von RCAR7 mit HAI1, HAB1, AHG1 bzw. ABI1/2 wurde allerdings kein Effekt gegenüber der PP2C-vermittelte Inhibierung der Signaltransduktion festgestellt (Abb. 2-15A, D, F-H). Eine 90 %ige Hemmung der ABA-Antwort wurde mit 0,3 bis 3 µg PP2C-Effektor-DNA beobachtet, egal ob in Ab- oder Anwesenheit von kotransfiziertem RCAR7. Für ABI2 ließ sich ein vergleichbarer Effekt beobachten, mit dem Unterschied, dass die ektopische Expression dieser PP2C erneut in einer max. 80 %igen Inhibierung der ABA-Signaltransduktion resultierte, egal ob in Koexpression mit RCAR7 oder allein.

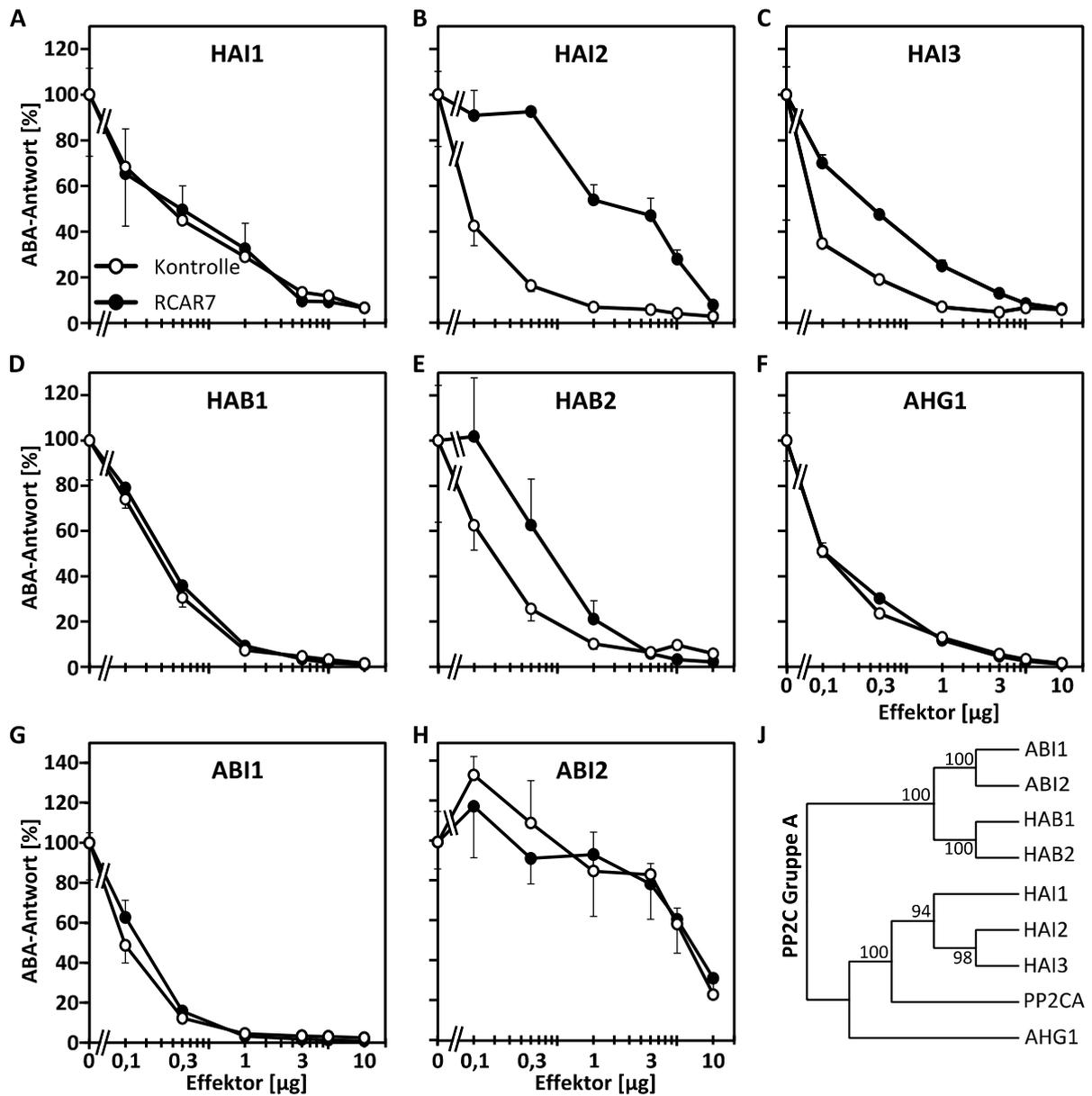


Abb. 2-15 RCAR7-abhängige Regulation der PP2C-inhibierten ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten.

(A-H) Relative Inhibierung der ABA-induzierten Reporterexpression durch ektopisch exprimierte PP2Cs in Ab- (weißer Kreis) und Anwesenheit (schwarzer Kreis) von koexprimiertem RCAR7 und 10 μ M exogener ABA. Col-0 Protoplasten (10^5) wurden jeweils mit 3 μ g p35S::GUS, 5 μ g pRD29B::LUC, 3 μ g p35S::RCAR7 bzw. leere Vektorkontrolle und steigender Konzentration an p35S::Effektor-DNA kotransfiziert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C für 17 \pm 1 h. Die Luciferaseaktivität wurde als RLU gemessen und auf die RFUs, des konstitutiv exprimierten GUS-Gens, normalisiert. Die Reporterexpression der transfizierten Zellen ohne Effektor lag für (A) HAI1 bei 2,6 kRLU/RFU (LV) bzw. 8,1 kRLU/RFU (RCAR7), (B) HAI2 bei 9,2 kRLU/RFU (LV) bzw. 25,7 kRLU/RFU (RCAR7), (C) HAI3 bei 3,6 kRLU/RFU (LV) bzw. 8 kRLU/RFU (RCAR7), (D) HAB1 bei 8,7 kRLU/RFU (LV) bzw. 19,9 kRLU/RFU (RCAR7), (E) HAB2 bei 11 kRLU/RFU (LV) bzw. 26,7 kRLU/RFU (RCAR7), (F) AHG1 bei 17,1 kRLU/RFU (LV) bzw. 28,2 kRLU/RFU (RCAR7), (G) ABI1 bei 16,3 kRLU/RFU (LV) bzw. 29,9 kRLU/RFU (RCAR7) und (H) ABI2 bei 6,9 kRLU/RFU (LV) bzw. 16 kRLU/RFU (RCAR7). Alle Werte ohne PP2C mit ABA-Zugabe wurden auf 100 % gesetzt. Jeder Datenpunkt wurde in Triplikaten durchgeführt (Mittelwert \pm SD) und wurde jeweils in einem zweiten unabhängigen Experiment bestätigt. (J) Phylogenetischer Baum aller neun PP2Cs der Gruppe A in Arabidopsis. Diese Darstellung ist vergleichbar zur Abb. 1-5.

Zusätzlich zu PP2CA/AHG3 wurde auch für HAI2/3 und HAB2 eine regulatorische Funktion von RCAR7 in Arabidopsis Protoplasten beobachtet. Durch ektopische Expression von RCAR7 wurde die Effektivität dieser PP2C-vermittelten Inhibierungen der ABA-Antwort klar herabgesetzt. Es musste deutlich mehr PP2C-Effektor-DNA eingesetzt werden, um ein vergleichbare Hemmung der Signaltransduktion zu erzielen relativ zur Protoplasten-Transfektion ohne ektopische RCAR7-Expression. Für die restlichen PP2Cs (HAI1, HAB1, AHG1 und ABI1/2) ließ sich kein regulatorischer Effekt von RCAR7 auf die PP2C-vermittelte Inhibierung bestätigen. Mit diesen Befunden wurde die vermutete Substratspezifität von RCAR7 gegenüber PP2Cs bestätigt.

2.4.3. Physiologische Relevanz von RCAR7

Die bisher erzielten Befunde über RCAR7 unterstützten die Hypothese einer tatsächlichen ABA-Rezeptorfunktion. ABA steuert eine Vielzahl an physiologischen Prozessen wie die Samenkeimung (Bewley 1997; Holdsworth et al. 1999), die Wurzelelongation (Zeevaart and Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000) und das Schließen der Stomata (Schroeder et al. 2001). Da die RCARs in verschiedenen Entwicklungsstadien und Pflanzengeweben überlappende Genexpression aufweisen (Schmid et al. 2005; Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007), ist auch mit überlappenden oder redundanten Funktionen der RCARs in der ABA-Antwort zu rechnen. Um zu überprüfen, ob RCAR7 spezifische oder redundante Funktionen in der Regulierung der ABA-Antwort besitzt, wurden RCAR7-Überexpressionslinien sowie Einzel- und Doppelknockouts für *RCAR7* (SALK 071488), *RCAR8* (SM 3.3493), *RCAR9* (SM 3.17321) bzw. *RCAR10* (SAIL 517C08) analysiert. Der Einfluss dieser transgenen Arabidopsis-Linien wurde auf die Samenkeimung, die Wurzelelongation und die Schließung der Stomata ABA-abhängig überprüft. Die hierbei erzielten Befunde wurden für die RCAR7-Überexpressionslinien und Einzel- bzw. Doppelknockout von *RCAR7* und *RCAR9* in Abb. 2-16 zusammengefasst. Die Ergebnisse der restlichen untersuchten *rcar* Knockout-Linien können dem Anhang entnommen werden (Abb. 5-3).

Zur Überprüfung einer möglichen Bedeutung von RCAR7 in der Regulierung der Keimung, wurden Samen transgener Arabidopsis-Linien unter Zugabe verschiedener ABA-

Konzentrationen auf MS-Platten ausgebracht. Nach zwei Tagen Stratifizierung und drei Tagen Keimung unter Dauerlicht erfolgte die Auswertung der Keimungsrate (Abb. 2-16A und D). Für beide hier dargestellten RCAR7-Überexpressionslinien wurde eine ABA-Hypersensitivität der Samenkeimung relativ zum Col-0 Wildtyp festgestellt (Abb. 2-16A). Die ektopische Expression von RCAR7 resultierte in einer 50 %igen Inhibierung der Keimung unter Zugabe von 0,1-0,3 μM ABA verglichen zur Wildtypkontrolle, bei der eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 0,5 μM ABA nachgewiesen wurde. Mit der ABA-Exposition von 5 μM wurde die Samenkeimung der Überexpressionslinien nahezu vollständig inhibiert, während für 40 % der Wildtyp-Samen unter gleicher Behandlung eine Keimung beobachtet wurde. Bei Betrachtung der *rcar7* bzw. *rcar9* Einzelknockouts ließen sich keine Unterschiede in der Samenkeimung zur Wildtypkontrolle feststellen (Abb. 2-16D). Vergleichbares wurde auch für die Knockoutkombinationen von *RCAR7* mit *RCAR8* und/oder *RCAR10* relativ zur Col-0 Kontrolle beobachtet (Abb. 5-3A und B). Im Gegensatz dazu resultierte der *rcar7 x rcar9* Doppelknockout in einem ABA-insensitiven Phänotyp relativ zum Col-0 Wildtyp. Für diese Funktionsverlustmutante wurde ein deutlich höherer IC_{50} von 3,4 μM ABA ermittelt verglichen zur Wildtypkontrolle mit 0,5 μM ABA (IC_{50}). Des Weiteren wurde für den *rcar7 x rcar9* Doppelknockout unter Zugabe von 5 μM ABA eine relative Keimung von 60 % beobachtet, während für die Kontrolle unter den gleichen Bedingungen nur noch max. 30 % der Samen keimten.

Da ABA auch die Wurzelelongation reguliert (Zeevaart and Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000), wurde die biologische Relevanz von RCAR7 diesbezüglich untersucht. Hierfür wurden sechs Tage alte Arabidopsis Keimlinge (gleiche Linien wie bei der Samenkeimung) auf MS Platten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen überführt. Nach drei Tagen erneuter Inkubation erfolgte die Auswertung der dazugewonnen Wurzellänge relativ zum Col-0 Wildtyp. Im Gegensatz zur relativen Samenkeimung wurde weder für die RCAR7-Überexpressionslinien noch für die *rcar7 x rcar9* Funktionsverlustmutante ein Unterschied im Wurzelwachstum relativ zur Wildtypkontrolle beobachtet (Abb. 2-16B und F). Vergleichbares ließ sich für die restlichen Knockoutkombinationen aus *rcar7*, *rcar8* und *rcar10* feststellen (Abb. 5-3C und D).

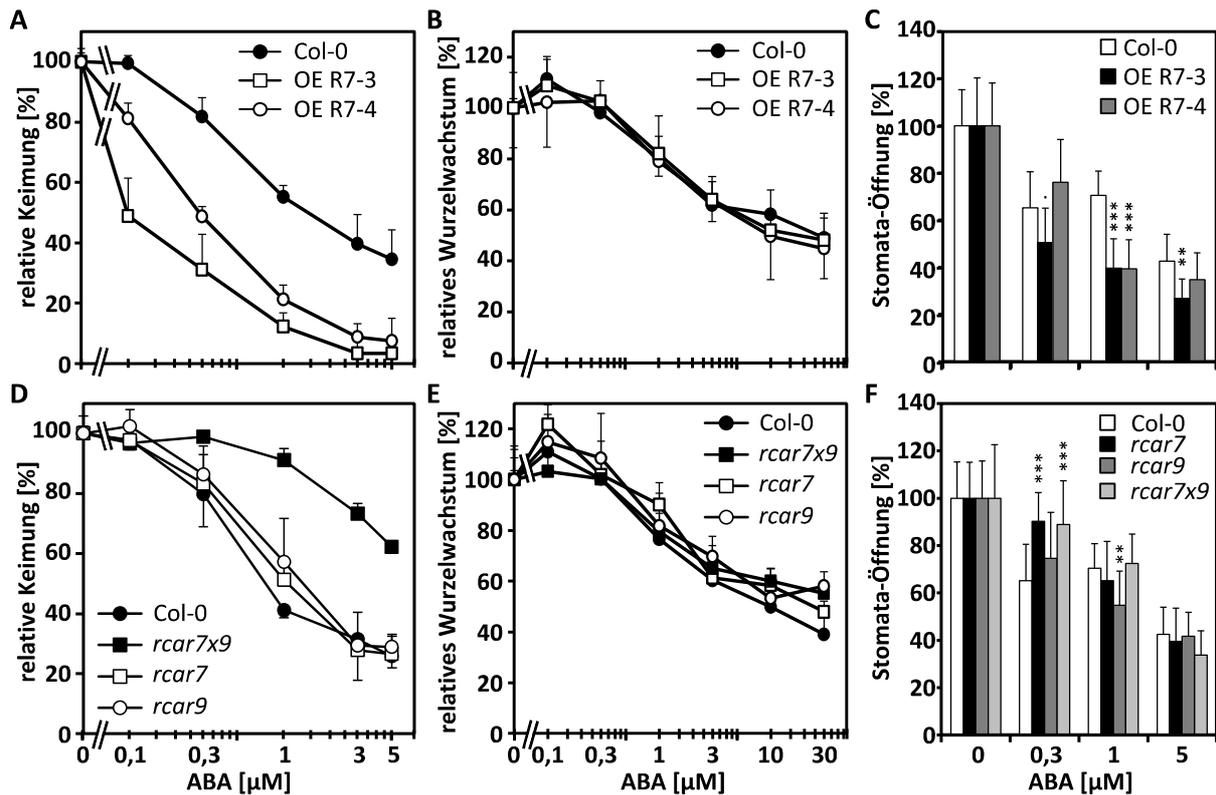


Abb. 2-16 RCAR7-abhängige Regulierung der ABA-Antwort in Arabidopsis.

Regulierung der ABA-Antwort in Arabidopsis Pflanzen. (A und D) Relative Inhibierung der Samenkeimung von RCAR7 Überexpressions- (OE R7) bzw. Knockoutlinien für *RCAR7* und *RCAR9* relativ zum Col-0 WT nach insgesamt fünf Tagen auf MS-Medium in Gegenwart verschiedener ABA-Konzentrationen. Die Samen wurden für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und keimten anschließend für drei weitere Tage unter Dauerlicht bei 22 °C. Die relative Keimung wurde in Prozent dargestellt und bezieht sich mit dem Wert 100 % auf die absolute Keimung (85-100 %) der Samen auf MS-Medium ohne ABA-Zugabe. Pro Datenpunkt wurden n=90 (\pm SD) Samen untersucht. Die Keimungsversuche wurden mind. zweimal durchgeführt, mit ähnlichen Ergebnissen. (B und F) Relative Inhibierung des Wurzelwachstums von neun Tage alten RCAR7 Überexpressions- bzw. *rcar7* und *rcar9* Knockout-Keimlingen relativ zu Col-0 in Gegenwart verschiedener ABA-Konzentrationen. Die Samen wurden für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert, keimten für vier Tage bei 22 °C und Dauerlicht und wurden anschließend auf MS Platten transferiert (pro Linie und ABA-Konzentration 10 Keimlinge). Die Auswertung erfolgte nach drei Tagen erneuter Inkubation bei 22 °C im Dauerlicht relativ zum absoluten Wurzelwachstum ohne ABA-Zugabe. Das absolute Wurzelwachstum in 72 h ohne ABA, wurde auf 100 % gesetzt und betrug für die einzelnen Linien bei (B) 19,15 \pm 0,71 mm (Col-0); 19,16 \pm 3,0 mm (OE R7-3) und 17,18 \pm 2,4 mm (OE R7-4). (D) 15,26 \pm 1,81 mm (Col-0); 14,8 \pm 0,54 mm (*rcar7x9*); 13,99 \pm 1,19 mm (*rcar7*) und 16,99 \pm 2,25 mm (*rcar9*). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus n \geq 6 Keimlingen (\pm SD). Der Versuch wurde ein- bis zweimal durchgeführt, mit ähnlichen Ergebnissen. (C und F) Relative Stomata-Schließung von RCAR7-Überexpressions- (OE R7) bzw. Knockoutlinien für *RCAR7* und *RCAR9* relativ zum Col-0 WT unter Zugabe verschiedener ABA-Konzentrationen. Analysiert wurden Blätter von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen. Die Blätter inkubierten für 2,5 h im Inkubationsmedium mit Weißlichtbelichtung, um das Öffnen der Stomata anzuregen. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation mit verschiedenen ABA-Konzentrationen für 2 h und Weißlichtbelichtung. Nach dem Abfotografieren der Stomata, unter einem Lichtmikroskop, erfolgte die *in silico* Auswertung der Stomata-Apertur. Die Größe der Spaltöffnung wurde als Verhältnis von Breite zu Länge ausgemessen. Ohne ABA-Zugabe bezieht sich dieses Verhältnis auf 100 %. Pro Linie und ABA-Konzentration wurden n=20 Spaltöffnungen analysiert. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert (\pm SD), *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05; „“ P < 0,1 und „ „“ P \leq 1 geben den Signifikanzunter zur Kontrolle an (statistische Signifikanz wurde mit Hilfe der Varianzanalyse, zweifractionelle ANOVA, und dem Tukey-Test ermittelt). Die Stomata Versuche wurden für jede transgene Arabidopsis Linie mind. drei Mal durchgeführt, aber mit einer gewissen Varianz der erzielten Befunde.

Im letzten Schritt wurde die mögliche Relevanz von RCAR7 hinsichtlich der Regulierung der Stomata-Schließung untersucht. Für diese Analyse wurden die gleichen transgenen RCAR7- und RCAR9-Linien verwendet, wie in der Keimungs- und Wurzelwachstumsanalyse. Blätter von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen inkubierten in Gegenwart verschiedener ABA-Konzentrationen unter Weißlichtbestrahlung, um das Schließen der Stomata zu induzieren. Anschließend wurden die Spaltöffnungen über ein Lichtmikroskop abfotografiert und *in silico* ausgewertet. Die dabei erzielten Ergebnisse wurde in Abb. 2-16C und F zusammengefasst.

Mit steigender ABA-Exposition wurde für beide OE RCAR7-Linien eine ABA-Hypersensitivität im Schließen der Stomata relativ zur Wildtypkontrolle beobachtet. Die ektopische Expression von RCAR7 resultierte unter Zugabe von mind. 1 μM ABA in signifikant kleineren Stomata-Aperturen verglichen zum Col-0 Wildtyp (Abb. 2-16C). Eine komplette Schließung der Spaltöffnungen wurde weder für die Überexpressionslinien noch für die Wildtypkontrolle festgestellt. In der hier zusammengefassten Darstellung wurde für die *rcar* Knockoutlinien eine ABA-Insensitivität in der Stomata-Schließung unter Zugabe von 0,3 μM ABA relativ zur Col-0 Kontrolle ermittelt (Abb. 2-16F). Dieser deutliche Effekt ging mit Erhöhung der ABA-Exposition verloren, sodass für *rcar7* Einzelknockout keine Unterschiede zur Wildtypkontrolle festgestellt wurden. Vergleichbares ließ sich für *rcar9* Einzelknockout und *rcar7 x rcar9* Doppelknockout nachweisen.

Es sollte erwähnt werden, dass die beobachtete ABA-hypersensitive Schließung der Stomata nur für die RCAR7-Überexpressionslinie #3 unter Zugabe von 0,3-1 μM ABA in drei weiteren unabhängigen Wiederholungen bestätigt werden konnte, während für die zweite OE RCAR7-Linie (#4) dieser hypersensitive Phänotyp nur in einem weiteren Experiment reproduziert wurde (Abb. 2-16 und Abb. 5-4). Für die untersuchten Knockoutlinien aus *rcar7* und *rcar9* war es nicht möglich, die Befunde einer Stomata-Untersuchung zu reproduzieren. In mehreren unabhängigen Analysen wurden entweder keine Unterschiede zur Col-0 Wildtypkontrolle beobachtet, eine ABA-Hypersensitivität oder teilweise auch eine ABA-Insensitivität (Abb. 2-16 und Abb. 5-4). Dementsprechend könnte diese Methode einer gewissen Varianz unterliegen, die es erschwert eine potentielle Relevanz einzelner RCARs in Bezug auf die Regulierung der Stomata-Apertur zu untersuchen.

Anhand der hier durchgeführten physiologischen Charakterisierung wurde auch *in planta* eine wirksame ABA-Rezeptorfunktion von RCAR7 nachgewiesen. Die ektopische Expression von RCAR7 resultierte in einem ABA-hypersensitiven Phänotyp in der Samenkeimung und beim Schließen der Stomata relativ zur Wildtypkontrolle. Da in diesem Zusammenhang nur für die *rcar7 x rcar9* Doppelmutante in der Samenkeimung eine ABA-Insensitivität beobachtet wurde, lassen diese Befunde auf eine mögliche redundante Funktion von RCAR7 in der Regulierung der Samenkeimung vermuten. Eine biologische Relevanz von RCAR7 in Bezug auf die Regulierung der Wurzelelongation wurde hingegen ausgeschlossen, da weder für die RCAR7-Überexpressionslinien noch für die entsprechenden Knockoutlinien ein Unterschied zum Col-0 Wildtyp beobachtet wurde.

2.5. Physiologische Charakterisierung der RCAR Familie

Es wurde bereits angesprochen, dass ABA-regulatorische Funktionen in verschiedenen physiologischen Prozessen, wie Samenkeimung (Bewley 1997; Holdsworth et al. 1999), Wurzelwachstum (Zeevaart and Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000) und Schließen der Stomata (Schroeder et al. 2001) besitzt. Mit den vorangegangenen Analyse in Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten wurde eine wirksame ABA-Rezeptorfunktion für alle 14 RCARs nachgewiesen (Abb. 2-2, Abb. 2-7, Abb. 2-14). Ob die RCARs eine biologische Relevanz in der ABA-Signaltransduktion besitzen, war zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unklar. Das Vorhandensein einer biologischen Funktion setzt die Transkription und Translation des RCARs im entsprechenden Pflanzengewebe bzw. Entwicklungsstadium voraus. Veröffentlichte Daten weisen darauf hin, dass die RCARs in verschiedenen Entwicklungsstadien und Pflanzengeweben überlappende Genexpression aufweisen (Schmid et al. 2005; Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007), mit Ausnahme von *RCAR4* bis *RCAR7*, für die eine Expression bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht detektiert werden konnte. Um diese Aussage zu überprüfen, wurde eine Genexpressionsanalyse für alle 14 *RCARs* in zwölf Tage alten Col-0 Keimlingen relativ zu *Ubiquitin10* (*UBI10*) durchgeführt (Abb. 2-17A). Für diese und nachfolgenden Genexpressionsuntersuchungen wurde *UBI10* als Referenzgen, auf Grund der stabilen Expression in allen Entwicklungsstadien (Czechowski et al. 2005), verwendet. Zusätzlich wurde eine Übersicht erstellt, welche die zur Verfügung stehenden Expressionsdaten der RCARs zusammenfasst (Abb. 2-17B).

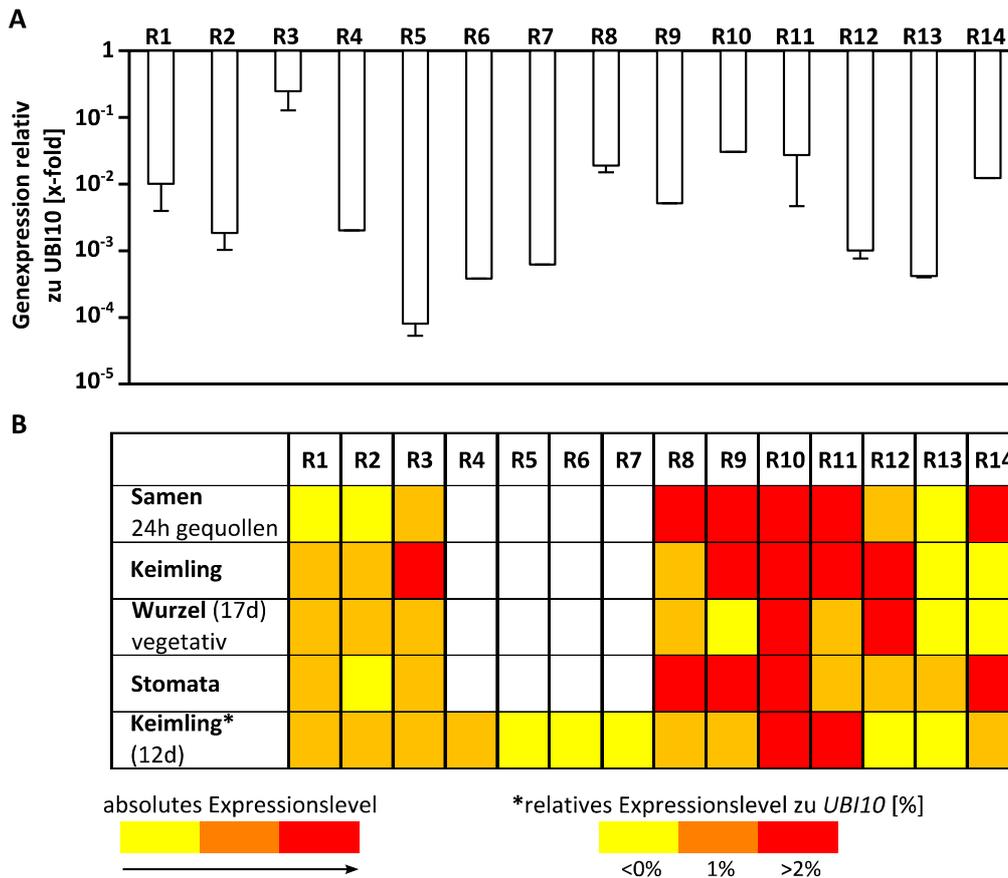


Abb. 2-17 Genexpression der RCARs in Arabidopsis.

(A) qPCR Analyse der wildtypisch exprimierten RCARs (Rx) in Col-0 von zwölf Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen. Dargestellt ist die Transkriptmenge relativ zum Referenzgen *UBI10* (weiße Balken, \pm SD, 2 biologische Replikate). Der Wert für *UBI10* wurde auf eins gesetzt. (B) Öffentlich zugängliche Genexpressionsdaten von *RCARs* im Samen, Keimling (7 d), Wurzel (17 d) und in Stomata (fünf Wochen alte Blätter) von *Arabidopsis*. Die gelbe Markierung signalisiert keine bzw. nur schwache Expression, Orange markiert mittlere Genexpression und Rot weist auf starke Expression hin. Für *RCAR4-7* standen keine Werte zur Genexpression aus Datenbanken zur Verfügung (weiße Markierung). Diese Abbildung wurde mit Hilfe der Expressionsdaten vom „*Arabidopsis* eFP Browser“ erstellt (Schmid et al. 2005; Nakabayashi et al. 2005; Yang et al. 2008) und mit den Genexpressionsdaten aus (A) von zwölf Tage alten Keimlingen ergänzt (Keimling*). Hierbei wurde eine Transkriptmenge von mind. 2 % relativ zu *UBI10* als starke Expression gewertet (Rot), $\geq 0,10\% \leq 2\%$ als moderat (Orange) und $\leq 0,10\%$ als schwach (Gelb).

Anhand der durchgeführten Genexpressionsanalysen wurde ein unterschiedliches Transkriptlevel aller *RCARs*, relativ zu *UBI10*, in zwölf Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen detektiert (Abb. 2-17A). Die stärkste Expression wurde dabei für *RCAR3*, *10* und *RCAR11* mit einer relativen Transkriptmenge von 25 bzw. 3 % zu *UBI10* beobachtet. Ein moderate Expression wurde für *RCAR1*, *2*, *4*, *8*, *9* und *14* mit einer relativen Transkriptmenge von 0,2-2 % zu *UBI10* detektiert und für die restlichen *RCARs* (*RCAR5-7*, *12* und *13*) wurde ein eher schwaches Expressionslevel mit einer Transkriptmenge von $<0,2\%$ relativ zum Referenzgen nachgewiesen. Mit dieser Untersuchung war eine Detektion aller *RCARs* in Col-0 Wildtypkeimlingen möglich.

Um eine regulatorische Funktion in der Samenkeimung, Wurzelelongation und/oder Regulation der Stomata-Apertur zu besitzen, müssen die RCARs auch in den entsprechenden Pflanzengeweben und Entwicklungsstadien lokalisiert sein. Mit Hilfe der Befunde des „Arabidopsis eFP Browser“ (Abb. 2-17B) wurde ein hohes Transkriptlevel von *RCAR8* bis *RCAR11* und *RCAR14* in gequollenen Samen detektiert, während in Keimlingen *RCAR3* und *RCAR9* bis *RCAR12* eine starke Expression aufwiesen. In Wurzeln von 17 Tage alten Arabidopsis Pflanzen wurde nur für *RCAR10* und *RCAR12* eine hohe Transkriptmenge beobachtet verglichen zu *RCAR9*, *RCAR13* und *RCAR14*, die schwach exprimiert werden. In Stomata von fünf Wochen alten Arabidopsis Blättern wurde eine moderate bis starke Expression für fast alle *RCARs* detektiert, mit Ausnahme der schwachen Expression von *RCAR2* und *RCAR4* bis *RCAR7*, für die in keinem Entwicklungsstadium ein Transkriptlevel detektiert werden konnte.

Anhand dieser Befunde wurde deutlich, dass die RCARs überlappende Genexpression in den hier untersuchten Entwicklungsstadien aufwiesen und dass das Transkriptlevel einer Varianz unterlag. Für einzelne RCARs, z.B. *RCAR13*, wurde eine stetig schwache bis moderate Expression in den hier dargestellten Entwicklungsstadien bzw. Pflanzengewebe festgestellt verglichen zu andere Vertreter, z.B. *RCAR11*, welche ein deutlich höheres Expressionslevel aufwiesen. Des Weiteren wurde für alle 14 *RCARs* in zwölf Tage alten Arabidopsis Keimlinge eine Expression nachgewiesen. Diese Resultate ließen auf biologische Funktionen in diesen Entwicklungsstadien bzw. Pflanzengeweben vermuten.

Damit in dieser Studie untersucht werden konnte, welche der RCARs eine biologische Relevanz in der Keimung, im Wurzelwachstum und der Regulierung der Stomata-Apertur besaßen, wurden für jedes RCAR mehrere unabhängige Linien generiert, welche mit Hilfe des 35S Promotor konstitutiv exprimiert wurden. Um Kenntnisse über das Transkriptlevel der generierten RCAR-Überexpressionslinien zu erhalten und ob sich diese zur Verwendung der physiologischen Charakterisierung eigneten, erfolgte eine quantitative Echtzeit-PCR mit zwölf Tage alten Arabidopsis Keimlingen im Vergleich zum Col-0 Wildtyp. Das detektierte Expressionslevel zweier jeweils unabhängiger RCAR-Überexpressionslinien wurden relativ

zum Referenzgen *UBI10* (schwarze Balken) und relativ zum Wildtyp-RCAR (Zahlenwert) in Abb. 2-18 zusammengefasst.

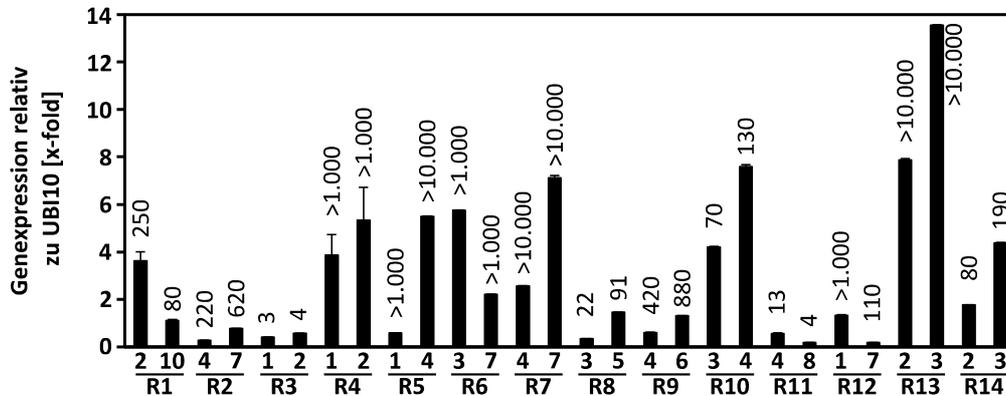


Abb. 2-18 Relative Genexpression der OE RCAR-Linien.

Genexpressionsanalyse ektopisch exprimierter RCAR-Linien (T3) relativ zum Referenzgen *UBI10* (\pm SD, 3 techn. Replikate) sowie relativ zum wildtypisch exprimierten RCAR (Zahlenangaben, 3 techn. Replikate). Die Genexpressionsdaten wurde auf das Referenzgen normalisiert, dessen Wert auf eins gesetzt wurde. Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige Linien für jedes RCAR. Analysiert wurden zwölf Tage alte Arabidopsis Keimlinge, die auf MS-Platten und unter Dauerlicht angezogen wurden. Die Genexpressionsanalyse wurde in einem zweiten Experiment mit T4 Pflanzen und vergleichbaren Ergebnissen bestätigt. Für OE RCAR2/13-Linien wurde für diesen Versuch heterozygote T2 verwendet.

Für jede untersuchte transgene RCAR-Linie wurde eine Überexpression relativ zum Wildtyp-RCAR beobachtet, allerdings mit starker Varianz (Abb. 2-18). Die Überexpressionslinien von RCAR4-7 und RCAR13 wiesen die stärkste Expression relativ zum entsprechenden Wildtyp-RCAR auf. Für diese Linien wurde eine mind. 1000-fach höhere Genexpression verglichen zum schwach exprimierten Wildtyp-RCAR detektiert (Abb. 2-17A). Des Weiteren wurde für diese Linien ein zwei- bis 14-fach höheres Transkriptlevel relativ zum *UBI10* nachgewiesen. Demgegenüber wurde für beide OE Linien von RCAR3 bzw. RCAR11 eine eher schwache Überexpression von max. vier- bzw. 13-fach relativ zum starken Wildtyplevel festgestellt, dass einer relativen Transkriptmenge von max. 60 % verglichen zum Referenzgen *UBI10* entsprach. Für alle anderen OE Linien wurde eine 20- bis 900-fach höhere Genexpression relativ zum wildtypischen RCAR-Expressionslevel beobachtet.

Um zu überprüfen ob die RCARs eine tatsächliche biologische Relevanz in der Samenkeimung, Wurzelelongation und/oder in der Regulierung der Stomata-Apertur

besitzen, wurden die hier aufgeführten RCAR-Überexpressionslinien diesbezüglich untersucht.

2.5.1. Keimung

Die ABA-Akkumulierung während der Embryogenese und der Samen-Ausreifung, ist essentiell für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Dormanz (Koornneef et al. 1982). Folglich ist ABA eine Schlüsselkomponente in der Samenentwicklung, der Dormanz sowie während der Inhibierung der Samenkeimung (Zeevaart and Creelman 1988; Holdsworth et al. 1999; Bewley 1997). In dieser Studie wurde eine wirksame ABA-Rezeptorfunktion für alle 14 RCARs in Arabidopsis Protoplasten bestätigt. Ma et al. (2009) stellten einen ABA-hypersensitiven Phänotyp während der Samenkeimung von überexprimierenden RCAR1-Linien relativ zur Wildtyp-Kontrolle fest. Zusätzlich wurde auch für RCAR8 in Arabidopsis eine ABA-Hypersensitivität in der Samenkeimung, durch ektopische Expression, nachgewiesen (Santiago et al. 2009b). Eine zusammenhängende Analyse aller RCARs lag bis zu Beginn dieser Arbeit aber nicht vor. Deshalb wurde die biologische Relevanz aller RCAR-Überexpressionslinien in Bezug auf die Samenkeimung untersucht.

Hierfür wurden Samen transgener Arabidopsis Linien auf MS-Platten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen ausgebracht. Nach zwei Tagen Stratifikation und weiteren drei Tagen Keimung unter Dauerlicht erfolgte die Auswertung. Da es sich hierbei um mehr als 60 untersuchte Linien handelte, wurden für diese Studie jeweils zwei repräsentative OE Linien pro RCAR ausgewählt und relativ zum Col-0 Wildtyp in der Abb. 2-19 zusammengefasst. Die Ergebnisse für die Keimungsuntersuchung aller analysierten Linien können dem Anhang entnommen werden (Abb. 5-5).

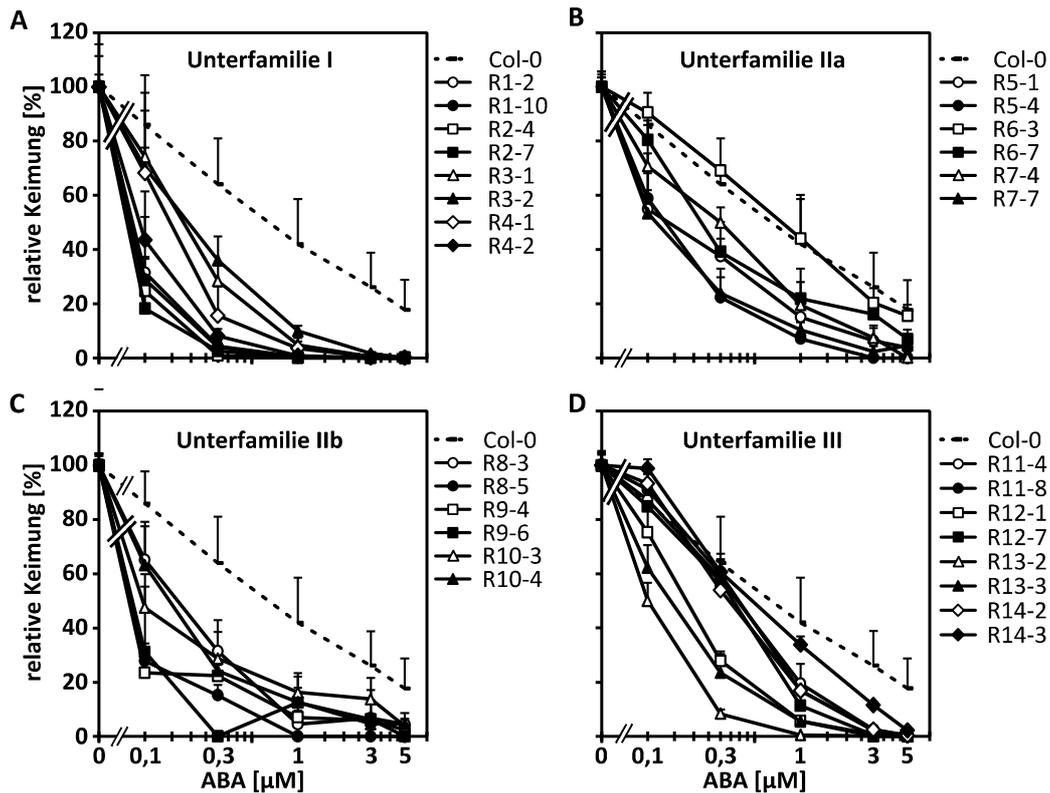


Abb. 2-19 Relative Keimung der RCAR-Überexpressionslinien.

(A bis D) Relative Inhibierung der Samenkeimung von überexprimierten RCAR-Linien relativ zum Col-0 WT nach insgesamt fünf Tagen auf MS-Medium in Gegenwart verschiedener ABA-Konzentrationen. Die Samen wurden zunächst für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und keimten anschließend für drei weitere Tage unter Dauerlicht bei 22°C. (A) Relative Keimung der RCAR Unterfamilie I (RCARs 1 bis 4), (B und C) Unterfamilie II (RCARs 5 bis 10) sowie (D) Unterfamilie III (RCARs 11 bis 14). Dargestellt wurden jeweils zwei unabhängige Linien pro OE RCAR (Rx) verglichen mit Col-0. Die relative Keimung wurde in Prozent dargestellt und bezieht sich mit dem Wert 100 % auf die absolute Keimung der Samen auf MS-Medium ohne ABA-Zugabe. Die absolute Keimung der zu untersuchenden Linien lag bei ca. 90-100%, mit Ausnahme von OER4-1 (24%), OE R9-6 (18%) und OE R11-4 (70%). Pro Datenpunkt wurden n=90 (\pm SD) Samen analysiert. Die relative Keimung der Kontrolle (Col-0) repräsentiert den Mittelwert (\pm SD) aus 14 unabhängigen Keimungsversuchen. Der Keimungsversuch wurde für jedes OE RCAR insgesamt zweimal wiederholt, mit ähnlichen Ergebnissen. Für die OE RCAR2/13 Linien wurden heterozygote T2 Samen verwendet.

Für alle analysierten OE RCAR-Linien wurde eine ABA-abhängige Hypersensitivität in Samenkeimung mit unterschiedlicher Intensität festgestellt (Abb. 2-19), mit Ausnahme der Linie OE RCAR6-3, für die keine Unterschied zu Col-0 Wildtyp nachgewiesen wurde.

Die ektopische Expression aller RCARs der Unterfamilie I (RCAR1 bis 4) führte bereits bei 0,1 μ M ABA zu einer Inhibierung der Samenkeimung um 25 bis 80 % im Vergleich zur Wildtypkontrolle, die unter gleicher Behandlung eine Inhibierung von 10 % aufwies (Abb. 2-19A). Für den Col-0 Wildtyp wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} Wert) von 0,5 μ M ABA ermittelt, während der IC_{50} -Wert für die Unterfamilie I RCARs bei 0,05-0,2 μ M ABA lag. Eine vollständige Inhibierung der Samenkeimung wurde für diese OE RCAR-

Linien durch Zugabe von 1-3 μM ABA beobachtet, wogegen für Col-0 Wildtyp durch 5 μM ABA-Zugabe noch immer eine Keimung von 20 % möglich war. Interessant war, dass für beide OE RCAR3 Linien eine ABA-insensitivere Keimungsinhibierung registriert wurde verglichen zu den anderen OE RCAR-Linien der Unterfamilie I. Dieser Effekt könnte eventuell im Zusammenhang mit der schwachen Überexpression von RCAR3 gestanden haben.

Die ektopische Expression der Unterfamilie II RCARs (RCAR5-10) führte in Gegenwart von ABA zu einer hypersensitiven Samenkeimung relativ zur Wildtypkontrolle (Abb. 2-19B und C), wenn auch nicht so effektiv wie bei den OE RCAR1-4 Linien. Für beide OE RCAR9-Linien sowie OE RCAR8-5 wurde ein IC_{50} -Wert von unter 0,1 μM ABA ermittelt und eine vollständige Inhibierung der Keimung wurde durch Zugabe von 5 μM ABA erzielt (Abb. 2-19C). Dem gegenüber wurde für die anderen OE RCAR-Linien der Unterfamilie II ein IC_{50} -Wert von 0,1-0,3 μM ABA berechnet, mit Ausnahme von OE RCAR6-3 die sich vergleichbar zum Col-0 Wildtyp verhielt, obwohl für diese Linie ein deutlich höheres Expressionslevel detektiert wurde verglichen zur zweiten unabhängigen OE RCAR6-Linie.

Für die OE Linien der Unterfamilie III RCARs (RCAR11 bis 14) wurde nur durch Zugabe hoher ABA-Konzentrationen ein hypersensitiver Phänotyp relativ zur Wildtypkontrolle während der Samenkeimung beobachtet, mit Ausnahme beider OE RCAR13 Linien und OE RCAR12-1, für die eine vergleichbare Hypersensitivität zu den Unterfamilie II RCAR-Linien detektiert wurde. Für beide OE RCAR13 Linien und OE RCAR12-1 wurde ein IC_{50} von 0,1-0,2 μM , vergleichbar zur Unterfamilie II, berechnet, während für beide OE RCAR11/14 Linien und OE RCAR12-5 ein deutlich höherer Wert von ca. 0,4 μM ABA ermittelt wurde. Der niedrigere IC_{50} -Wert für OE RCAR13 und OE RCAR12-1 könnte im direkten Zusammenhang mit der detektierten Überexpression stehen. Für beide OE RCAR13-Linien wurde eine über 10.000-fach höhere Expression relativ zum Wildtyp-RCAR13 nachgewiesen und für OE RCAR12-1 eine zehnfach höhere Genexpression verglichen zur zweiten unabhängigen OE RCAR12-Linie (Abb. 2-18).

Zusammenhängend wurde festgestellt, dass die ektopische Expression eines jeden RCARs zur ABA-Hypersensitivität in der Samenkeimung relativ zum Col-0 Wildtyp führte (Abb. 2-19). Für die OE Linien der Unterfamilie I wurde die effektivste Inhibierung der Samenkeimung durch ABA-Zugabe beobachtet, während für die OE Linien der Unterfamilie III RCARs bei niedrigen ABA-Konzentrationen kein Unterschied zur Wildtypkontrolle festgestellt wurde, mit

Ausnahme von OE RCAR13 und OE RCAR12-1. Für diese transgenen RCAR-Linien wurde eine starke Überexpression beobachtet, im Vergleich zu OE RCAR11/14 bzw. OE RCAR12-5, die im direkten Zusammenhang mit der ABA-Hypersensitivität in der Samenkeimung gestanden haben könnte. Die RCARs der Unterfamilie II befanden sich, hinsichtlich ihres Keimungsverhaltens in Gegenwart von exogener ABA, zwischen Unterfamilie I und III (Abb. 2-19B und C). Interessant war, dass ein vergleichbares Verhalten bereits während der transienten Untersuchungen in Col-0 Protoplasten beobachtet wurde. Für die ektopische Expression der Unterfamilie I RCARs wurde bereits unter endogenen ABA-Gehalt eine klare Aktivierung der Signaltransduktion beobachtet, wogegen die ektopische Expression der Unterfamilie III RCARs nur durch exogener ABA-Zugabe zu einer moderaten/marginalen Aktivierung führte und für die RCARs der Unterfamilie II entweder eine vergleichbare Aktivierung zur Unterfamilie I oder III nachgewiesen wurde (Abb. 2-2). Das einzelne RCARs eine potentielle biologische Funktion in der Regulierung der Samenkeimung besitzen, wurde auf Grund der Expressionsdaten in Abb. 2-17B bekräftigt.

2.5.2. Wurzelwachstum

Neben der Regulierung der Samenreife, der Aufrechterhaltung der Dormanz und der Keimung (Zeevaart and Creelman 1988; Holdsworth et al. 1999; Bewley 1997), übt ABA auch regulatorische Funktionen in der Wurzelelongation aus (Spollen et al. 2000; Himmelbach et al. 1998). So wurde zusätzlich zur inhibitorischen Wirkung von ABA, bezüglich des vegetativen Pflanzenwachstums, auch ein positiver Effekt auf das Wurzelwachstum durch Zugabe geringer ABA-Konzentrationen nachgewiesen (Zeevaart and Creelman 1988). Ein definiertes Level an endogener ABA, ca. 100 ng ABA/g Trockengewicht, wurde bei Pflanzen ermittelt, die weder abiotischen noch biotischen Umweltfaktoren ausgesetzt waren (Gonzalez-Guzman et al. 2002). In den hier durchgeführten Untersuchungen in Protoplasten, wurde für die RCARs der Unterfamilie I sowie für RCAR6, RCAR8 und RCAR9 bereits mit dem endogenen ABA-Gehalt eine Aktivierung der ABA-Antwort festgestellt. Für die restlichen RCARs war eine Exposition von 5 μ M exogener ABA nötig, um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen (Abb. 2-2A, Abb. 2-6A und Abb. 2-7). Folglich wurde im nächsten Schritt die biologische Relevanz der ektopischen RCAR-Expression auf das Wurzelwachstum unter Kontrollbedingungen untersucht. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die ektopische

Expression einzelne RCARs die Wurzelelongation mit dem endogenen ABA-Gehalt fördert oder bereits inhibiert im Vergleich zum Col-0 Wildtyp. Zur Beantwortung dieser Fragestellung, wurden sechs Tage alte Keimlinge von Col-0 Wildtyp und den transgenen RCAR-Linien auf MS Platten ohne ABA-Zugabe transferiert. Nach drei Tagen erneuter Inkubation erfolgte die Auswertung des dazugewonnenen Wurzelwachstums (Abb. 2-20).

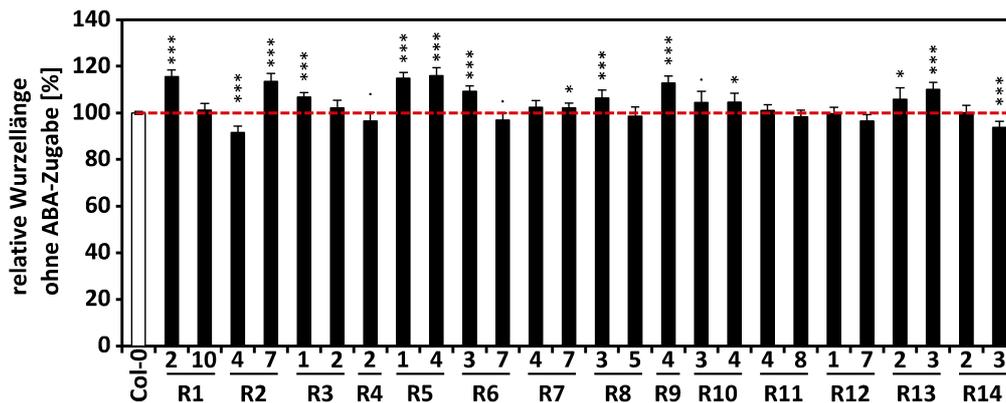


Abb. 2-20 Relatives Wurzelwachstum der OE RCAR-Linien ohne ABA-Zugabe.

Dargestellt ist das relative Wurzelwachstum der OE RCAR-Linien (kurz „R, schwarze Balken) im Vergleich zum Col-0 Wildtyp (weißer Balken) nach drei Tagen Inkubation auf MS-Platten ohne ABA-Zugabe. Die Samen wurden zunächst für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert, keimten für vier Tage unter Dauerlicht bei 22°C und wurden anschließend auf MS-Platten transferiert, auf denen sie erneut für drei Tage unter Dauerlicht bei 22°C inkubierten. Die Keimlinge von OE RCAR4-1 und OE RCAR9-4 wurden auf Grund ihres verzögerten Wachstums erst nach sieben bzw. fünf Tagen auf MS-Platten transferiert. Das absolute Wurzelwachstum von Col-0 wurde pro Versuch relativ zum Mittelwert auf 100 % gesetzt. Für jede Durchführung wurden $10 \leq n \leq 30$ Wurzeln ausgewertet und der absolute Mittelwert betrug $18,27 \pm 2,11$ mm. Die Wurzellänge der OE RCAR-Linien wurde für jeden Versuch einzeln relativ zu Col-0 berechnet. Jeder Datenpunkt der OE RCAR-Linien repräsentiert den relativen Mittelwert aus $28 \leq n \leq 74$ bzw. für Col-0 $n > 1000$ Wurzeln ($\pm \text{conf.int} = 0,95$), *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,1$; „ „ $P < 0,5$ und „ “ $P \leq 1$ geben den signifikanten Unterschied zum Col-0 Wildtyp an (Zweistichproben t-Test mit unterschiedlicher Varianz).

Für beide untersuchte Überexpressionslinien von RCAR5 und RCAR13 bzw. von OE RCAR9-4 wurde eine signifikante Stimulierung des Wurzelwachstums relativ zur Wildtypkontrolle beobachtet (Abb. 2-20). Es wurden durchschnittlich 5-15 % längere Wurzeln verglichen zu Col-0 Wildtyp nachgewiesen. Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle wurden dagegen für beide analysierten OE Linien von RCAR11 und RCAR12 bzw. für OE RCAR4-2 festgestellt. Eine signifikante Inhibierung des Wurzelwachstums unter endogenem ABA-Gehalt wurde nur für OE RCAR2-4 beobachtet, während die zweite unabhängige OE Linie von RCAR2 eher in einer Stimulierung des Wurzelwachstums resultierte. Für die restlichen RCAR-Überexpressionslinien (RCAR1, RCAR3, RCAR6 bis RCAR8 und RCAR14) wurde jeweils nur für eine unabhängige Linie Förderung der Wurzelelongation unter endogenem ABA beobachtet,

wogegen für die jeweils zweite untersuchte Linie keine signifikanten Unterschiede zur Wildtypkontrolle festgestellt wurden.

Neben der positiven Wirkung auf das Wurzelwachstum, unter geringen ABA-Gehalt, übt ABA vor allem unter hohen Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf die Wurzelelongation aus (Zeevaart and Creelman 1988; Spollen et al. 2000). Zusätzlich zum ABA-hypersensitiven Phänotyp während der Samenkeimung, wurden für die OE RCAR1-Linien von Ma et al. (2009) auch eine ABA-Hypersensitivität im Wurzelwachstum feststellen, ebenso wie Santiago et al. (2009) für RCAR8. Darüber hinaus wurde ein hohes Transkriptlevel von *RCAR10* und *RCAR12* bzw. ein moderates Expressionslevel von *RCAR1-3*, *8* und *11* in der Wurzel von 17 Tage alten Arabidopsis Pflanzen detektiert (Abb. 2-17B). Diese Befunde gaben einen Hinweis auf eine mögliche biologische Funktion dieser RCARs in der Regulierung des Wurzelwachstums. Um zu überprüfen ob neben der Überexpression von RCAR1 bzw. RCAR8 (Ma et al. 2009; Santiago et al. 2009b) auch die ektopische Expression eines weiteren RCARs zu einem vergleichbaren Effekt führte, wurde in dieser Arbeit eine ABA-abhängige Wurzelwachstums-Untersuchung aller RCAR-Überexpressionslinien durchgeführt. Zur Überprüfung einer möglichen biologischen Relevanz der RCARs auf die Wurzelelongation, wurden sechs Tage alte Arabidopsis Keimlinge auf MS-Platten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen überführt. Nach drei Tagen erneuter Inkubation erfolgte die Auswertung der dazu gewonnenen Wurzellänge relativ zum Col-0 Wildtyp. Da auch für diese Studie mehr als 50 unabhängige Linien untersucht wurden, wurde für diese Auswertung die gleichen Linien verwendet wie in Abb. 2-19 aufgeführt. Die ermittelten Befunde wurden in Abb. 2-21 zusammengefasst. Die Ergebnisse für das relative Wurzelwachstum aller untersuchten Linien können dem Anhang entnommen werden (Abb. 5-6).

Im Unterschied zur Keimungsanalyse wurde im Wurzelwachstum nicht für jede OE RCAR-Linie eine ABA-abhängige Hypersensitivität beobachtet. Bei Betrachtung der Unterfamilie I (RCAR1-4) war der detektierte Wurzelphänotyp der OE RCAR4-2 besonders auffällig (Abb. 2-21A). Für die Keimlinge dieser transgenen Linie wurde bereits durch Zugabe von 0,1 μM ABA eine Inhibierung des Wurzelwachstums um 70 % relativ zur Wildtypkontrolle festgestellt. Eine nahezu vollständige Inhibierung wurde durch Zugabe von 30 μM ABA

nachgewiesen, während für Col-0 Wildtyp unter gleichen Bedingungen nur 50 % des Wurzelwachstums gehemmt wurden. Für alle restlichen überexprimierenden RCAR-Linien der Unterfamilie I wurde bei geringen ABA-Konzentrationen von max. 0,3 μM ABA kein Unterschied zur Wildtypkontrolle festgestellt, mit Ausnahme von OE RCAR1-10, für die bereits durch geringe ABA-Exposition eine Hypersensitivität im Wurzelwachstum beobachtet wurde. Für OE RCAR1-10 wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 0,7 μM ABA ermittelt und für OE RCAR4-2 0,01 μM ABA. Für die restlichen Unterfamilie I OE Linien wurde ein IC_{50} -Wert von ca. 1,5 μM und für die Wildtypkontrolle 1,2 μM ABA berechnet. Aber, im Unterschied zum Col-0 Wildtyp wurde eine fast vollständige Inhibierung des Wurzelwachstums für alle OE RCAR-Linien der Unterfamilie I in Gegenwart von 30 μM ABA ermittelt, mit Ausnahme von OE RCAR3-2. Für den Wildtyp ließ sich unter gleicher Behandlung eine maximale Inhibierung des Wurzelwachstums von 50 % feststellen.

Die ektopische Expression der Unterfamilie II RCARs (RCAR5-10) führte erneut zu zwei verschiedenen ABA-abhängigen Phänotypen (Abb. 2-21B und C). Während für die Überexpressionslinien von RCAR5-7 nur geringe Unterschiede in der ABA-abhängigen Inhibierung des Wurzelwachstums relativ zur Wildtypkontrolle beobachtet wurden, wurde eine klare ABA-Hypersensitivität für OE RCAR8-5, OE RCAR9-4 und beide untersuchten OE Linien von RCAR10 festgestellt. Für die in Abb. 2-21B zusammengefassten transgenen RCAR Linien wurde ein zum Col-0 Wildtyp vergleichbarer IC_{50} -Wert von ca. 1 μM ABA detektiert. Im Vergleich dazu wurde für die zweite Hälfte der Unterfamilie II RCAR-Linien ein deutlich niedriger IC_{50} von ca. 0,4 μM ABA berechnet, mit Ausnahme von OE RCAR8-3 (IC_{50} =0,9 μM ABA) (Abb. 2-21C). Aber auch hier sollte erwähnt werden, dass für OE RCAR8-3 eine vierfach schwächer *RCAR8*-Expression aufwies verglichen zur OE RCAR8-5 (Abb. 2-18). Zusätzlich wurde für die OE Linien von RCAR8-10 eine fast vollständige Inhibierung des Wurzelwachstums in Gegenwart von 30 μM ABA beobachtet, während die ektopische Expression der Linien RCAR5-7 zu max. 70 % Inhibierung unter gleichen Bedingungen führte.

Die ektopische Expression der Unterfamilie III RCARs (RCAR11-14) führte unter Zugabe hoher ABA-Konzentrationen zur hypersensitiven Inhibierung des Wurzelwachstums verglichen zum Col-0 Wildtyp, mit Ausnahme von OE RCAR14 wo keine Unterschiede zur Kontrolle beobachtet wurden (Abb. 2-21D). Allerdings wurde für beide OE RCAR12 Linien sowie für OE RCAR11-8 eine nahezu vollständige Hemmung des Wurzelwachstums in Gegenwart von

30 μ M ABA erzielt. Die restlichen Überexpressionslinien der Unterfamilie III RCARs resultierten unter gleichen Bedingungen in einer 50-80 %igen Inhibierung der Wurzelelongation.

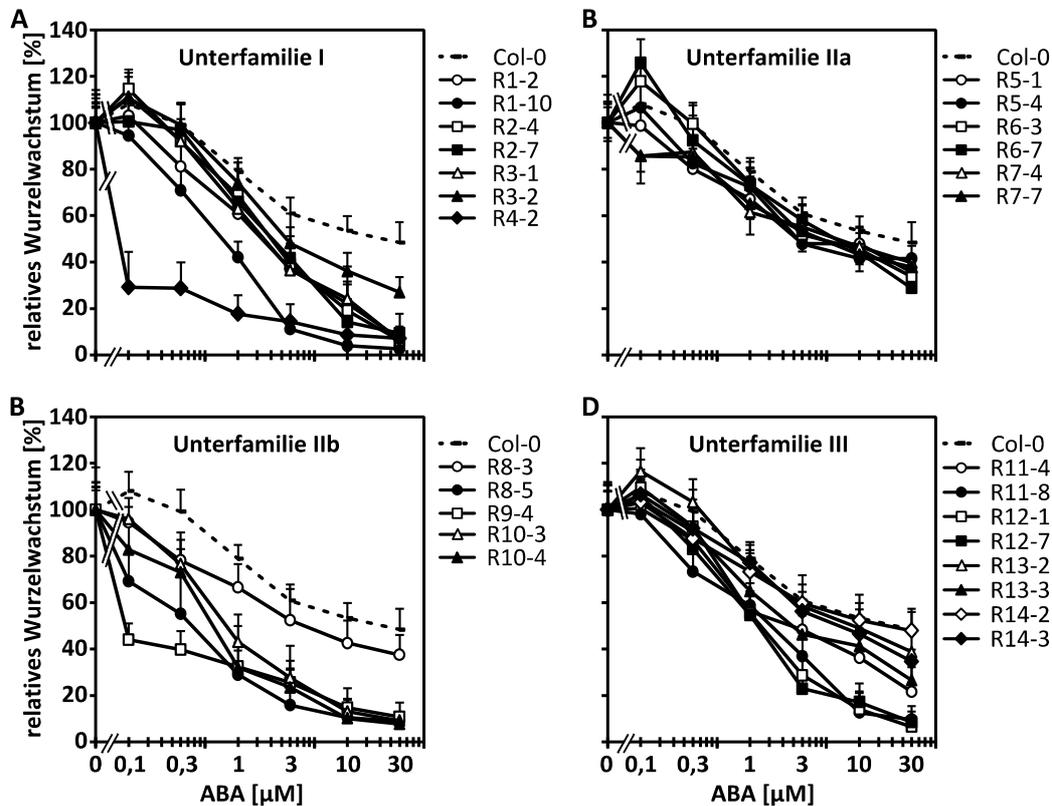


Abb. 2-21 Relatives Wurzelwachstum der RCAR-Überexpressionslinien.

(A bis D) Relative Inhibierung des Wurzelwachstums von neun Tage alten RCAR überexprimierenden Keimlingen (R) im Vergleich zu Col-0 in Anwesenheit verschiedener ABA-Konzentrationen. Die Samen wurden zunächst für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert, keimten für vier Tage bei 22 °C und Dauerlicht und wurden anschließend auf MS-Platten transferiert (pro Linie und ABA-Konzentration 30 Keimlinge). Die Keimlinge von OE RCAR4-2 und OE RCAR9-4 wurden auf Grund ihres verzögerten Wachstums erst nach sieben bzw. fünf Tagen auf MS-Platten transferiert. Die Auswertung erfolgte nach drei Tagen erneuter Inkubation bei 22 °C im Dauerlicht relativ zum absoluten Wurzelwachstum unter Kontrollbedingungen, MS-Platten ohne ABA. Das absolute Wurzelwachstum in 72 h, ohne ABA wurde hierbei auf 100 % gesetzt und betrug für die einzelnen Linien 17,66 \pm 2,12 mm (Col-0); 17,83 \pm 1,23 mm (R1-2); 16,69 \pm 1,37 mm (R1-10); 13,76 \pm 1,23 mm (R2-4); 15,86 \pm 1,97 mm (R2-7); 19,72 \pm 1,26 mm (R3-1); 17,89 \pm 1,89 mm (R3-2); 16,55 \pm 2,33 mm (R4-2); 18,32 \pm 1,47 mm (R5-1); 19,06 \pm 1,76 mm (R5-4); 19,38 \pm 1,31 mm (R6-3); 16,05 \pm 1,38 mm (R6-7); 19,34 \pm 1,52 mm (R7-4); 19,33 \pm 1,24 mm (R7-7); 19,52 \pm 1,63 mm (R8-3); 16,53 \pm 3 mm (R8-5); 18,74 \pm 1,81 mm (R9-4); 21,19 \pm 2,11 mm (R10-3); 22,59 \pm 2,64 mm (R10-4); 18,27 \pm 1,99 mm (R11-4); 16,79 \pm 1,34 mm (R11-8); 18,52 \pm 1,97 mm (R12-1); 17,65 \pm 1,73 mm (R12-7); 19,14 \pm 2,25 mm (R13-2); 18,48 \pm 1,96 mm (R13-3); 19,96 \pm 2,08 mm (R14-2) und 18,65 \pm 1,47 mm (R14-3). Jeder dargestellte Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus n \geq 15 Keimlingen (\pm SD). Das relative Wachstum der Kontrolle (Col-0) repräsentiert den Mittelwert (\pm SD) aus 14 unabhängigen Experimenten. Jeder Versuch wurde mindestens zweimal durchgeführt mit vergleichbaren Ergebnissen. Für OE RCAR2/13 wurden heterozygote T2 Keimlinge verwendet.

In der Literatur wird beschrieben, dass ABA eine inhibitorische Wirkung auf das Wurzelwachstum ausübt und zusätzlich in geringen Mengen auch stimulierend wirken kann (Zeevaart and Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000). Zusätzlich wurde für *RCAR1* bis *RCAR3*, *RCAR8* und *RCAR10* bis *RCAR12* ein moderates bis hohes Transkriptlevel in Wurzeln von 17 Tage alten Arabidopsis Pflanzen detektiert (Abb. 2-17B). Im Laufe der Überprüfung, ob die ektopische Expression der RCARs eine biologische Relevanz in der Regulierung der Wurzelelongation besitzt, lies sich für die Überexpressionslinien von *RCAR5*, *RCAR9* und *RCAR13* ein signifikante Stimulierung des Wurzelwachstums relativ zur Wildtypkontrolle unter endogenem ABA-Gehalte feststellen. Des Weiteren wurde für die OE Linien von *RCAR4*, *RCAR9* und *RCAR10* sowie OE *RCAR1-10* und OE *RCAR8-5* eine ABA-hypersensitive Inhibierung der Wurzelelongation in Gegenwart von submikromolarer exogener ABA relativ zum Col-0 Wildtyp beobachtet. Ein vergleichbarer Phänotyp wurde für die Überexpressionslinien von *RCAR2*, *RCAR3*, *RCAR11* und *RCAR12* bzw. *RCAR1-2* und *RCAR13-3* in Gegenwart hoher ABA-Konzentrationen (mind. 3 μ M ABA) festgestellt. Für die restlichen transgenen RCAR-Linien wurden keine Unterschiede zur Wildtypkontrolle ermittelt. Auf Grund dieser Befunde wäre eine biologische Relevanz von *RCAR5*, *RCAR9* und *RCAR13* in der Stimulierung des Wurzelwachstums vorstellbare, während *RCAR1* bis *RCAR4* und *RCAR8* bis *RCAR12* regulatorische Funktionen in der ABA-abhängigen Inhibierung der Wurzelelongation besitzen könnten.

2.5.3. Stomata Regulierung

Neben der Regulierung der Samenreifung bzw. -keimung (Parcy et al. 1994; Bewley 1997; Holdsworth et al. 1999) und des Wurzelwachstums (Zeevaart and Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000), reguliert ABA auch den Wasserhaushalt durch Schließen der Stomata (Schroeder et al. 2001; MacRobbie 1998). Allerdings bedeutet eine Minderung der Stomata-Konduktanz gleichzeitig die Reduktion der CO₂-Aufnahme, was wiederum zur Reduzierung der Photosynthese führt und letztendlich in einem verringerten vegetativen Wachstum resultiert (Cutler et al. 2010; Fujii and Zhu 2009). Des Weiteren führen geschlossene Stomata zur Reduzierung der Transpirationskühlung, das die Erhöhung der Oberflächentemperatur zur Folge hat (Wall et al. 2001). Ob die ektopische Expression

der RCARs die Blatttemperatur und/oder das vegetative Wachstum beeinflussen kann, wurde mit Hilfe der Thermografie analysiert. Über die Messung der Oberflächentemperatur der transgenen Arabidopsis Pflanzen, konnten innerhalb kürzester Zeit mehrere überexprimierende RCAR-Linien von Herrn Zhenyu Yang (Lehrstuhlmitarbeiter) untersucht und ausgewertet werden. Hierfür wurden Arabidopsis Keimlinge auf MS-Platten angezogen und nach insgesamt zehn Tagen in Töpfe mit Erde umgesetzt. Nach weiteren acht Tagen wurde die Evaporation mit einer luftundurchlässigen Folie gestoppt und am Tag 40 erfolgte die Thermobildaufnahme jeder zu untersuchenden Blattrosette. In Abb. 2-22 wurden die von Herrn Yang erzielten Ergebnisse zusammengefasst (Yang, unveröffentlicht).

Es ließ sich nur für die Überexpressionslinien von RCAR1, RCAR6, RCAR8 und RCAR10 eine signifikant höhere Oberflächentemperatur der Rosettenblätter verglichen zum Col-0 Wildtyp feststellen. Für OE RCAR1-2 wurde ein Temperaturunterschied von 0,5 °C gegenüber der Kontrolle beobachtet und für OE RCAR6/8 bzw. OE RCAR10 ein Unterschied von 1-1,5 °C. Für alle anderen hier dargestellten RCAR-Überexpressionslinien wurde kein signifikanter Unterschied zur Wildtypkontrolle festgestellt (Abb. 2-22B).

Bei der Betrachtung des vegetativen Wachstums war besonders auffällig, dass die ektopische Expression von RCAR4, RCAR8 bzw. RCAR9 in einer erkennbar kleineren Blattrosette resultierte im Vergleich zum Col-0 Wildtyp (Abb. 2-22A). Ein vergleichbares vegetatives Wachstum wurde auch für OE RCAR10-4 beobachtet, aber nicht für OE RCAR10-3. Während der Überprüfung der Genexpression wurde für die Linie 4 ein zweifach höheres Transkriptlevel für *RCAR10* ermittelt verglichen zur Linie 3 (Abb. 2-18), was den Unterschied in der Größe der Blattrosette erklären könnte. Interessant war auch, dass für beide OE RCAR4 Linien zwar eine Reduktion im vegetativen Wachstum, aber keine Unterschiede in der Oberflächentemperatur zur Wildtypkontrolle festgestellt wurden. Für die Überexpressionslinien von RCAR1, RCAR2, RCAR5 bis RCAR7 und RCAR11 bis RCAR13 wurde im Vergleich zur Wildtypkontrolle nur eine marginale Reduktion der Blattrosettengröße beobachtet. Mit Ausnahme der ektopischen Expression von RCAR1 und RCAR6, wurde für keine dieser RCAR-Überexpressionen ein Unterschied in der Oberflächentemperatur zum Col-0 Wildtyp nachgewiesen.

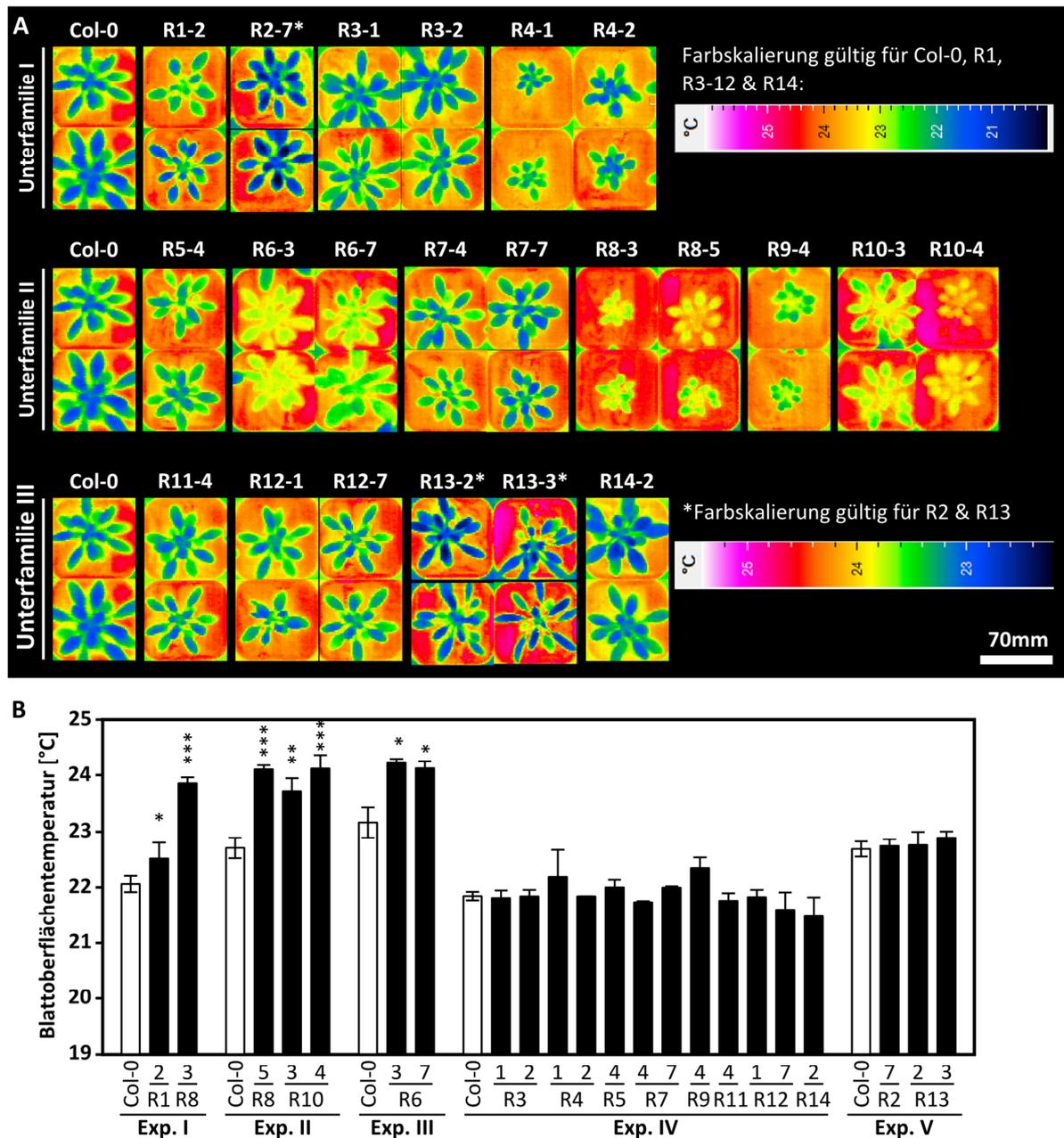


Abb. 2-22 Oberflächentemperatur und vegetatives Wachstum der OE RCAR-Linien in Arabidopsis.

Dargestellt sind Thermalbilder (A) von Col-0 WT im Vergleich zu RCAR Überexpressionslinien („R“) 40 Tage alter Pflanzen in Falschfarben, welche die unterschiedlichen Oberflächentemperaturen in Grad Celsius (°C) der Arabidopsis Blätter angeben. Die Pflanzen wurden in Schalen, ausgelegt für 24 Töpfe, in zufälliger Anordnung angezogen (insgesamt je zwei bis vier biologische Replikate, gezeigt werden allerdings nur zwei). Hierfür wurden Arabidopsis Keimlinge, nach Stratifizierung der Samen für zwei Tage bei 4 °C, für acht Tage bei 22 °C unter Dauerlicht angezogen und anschließend in Töpfe mit Erde überführt. Nach weiteren acht Tagen wurde diese Erde vollständig mit einer luftundurchlässigen Folie abgedeckt, um die Evaporation zu gestoppt. Nach weiteren 22 Tagen erfolgte die Thermalbilderaufnahme. Das Wasserpotential betrug hierbei $\Phi > -0,03$ bar, sodass gewährleistet wurde, dass für die zu untersuchenden Pflanzen keine Trockenstressbedingungen zu diesem Zeitpunkt vorlagen. Der weiße Skalierungsbalken entspricht 70 mm. (B) Durchschnittliche Blattoberflächentemperatur der in (A) dargestellt Arabidopsis Linien. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (\pm SD) aus zwei bis vier biologischen Replikaten eines Experimentes (kurz Exp.) und *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,1$; „ $P < 0,5$ “ und „ $P \leq 1$ “ geben den signifikanten Unterschied zum Col-0 Wildtyp an (Zweistichproben t-Test mit unterschiedlicher Varianz. Für jedes Experiment wurden separate Wildtyp-Kontrollen angezogen. Die hier dargestellten Daten stammen von Zhenyu Yang (Yang, unveröffentlicht) und wurden mind. zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt, mit Ausnahme von OE RCAR2 und OE RCAR13, für die nur ein Versuch durchgeführt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die ektopische Expression von RCAR1 und RCAR8 sowie die Überexpressionslinie RCAR10-4 eine höhere Blattoberflächentemperatur und ein vermindertes Rosettenwachstum im Vergleich zur Wildtypkontrolle festgestellt wurde. Zusätzlich konnte für die Überexpressionslinien von RCAR6 sowie für OE RCAR10-3 eine höhere Oberflächentemperatur verglichen zum Col-0 Wildtyp beobachtet werden, dafür aber keine Unterschiede im vegetativen Wachstum. Die ektopische Expression von RCAR4 bzw. RCAR9 resultierte genau im Gegenteil, kein Unterschied zur Kontrolle in der Blatttemperatur, aber dafür eine offensichtliche Reduktion der Blattrosette. Für alle anderen hier aufgeführten OE RCAR-Linien wurden nur marginale Unterschiede in der Oberflächentemperatur und/oder im vegetativen Wachstum zur Wildtypkontrolle festgestellt.

2.6. Etablierung eines Reportergen-Konstruktes zur Lokalisierung der RCARs in *planta*

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde die biologische Relevanz der ektopisch exprimierten RCARs in Arabidopsis Linien untersucht. Es wurde eine ABA-abhängige Inhibierung der Samenkeimung (Abb. 2-19) und im Wurzelwachstums (Abb. 2-21) für einzelne transgene RCAR-Linien beobachtet sowie ein Einfluss auf die Regulierung der Stomata-Apertur (Abb. 2-22). Anhand der physiologischen Untersuchung von *rcar7/rcar9* Einzel- bzw. Doppelknockouts wurde eine redundante Funktion dieser beiden RCARs während der ABA-abhängigen Inhibierung der Samenkeimung festgestellt (Abb. 2-16A und D).

Die Befunde der transienten Analyse in Arabidopsis Protoplasten ergaben Hinweise auf realisierbare RCAR-PP2C Komplexe *in planta* (Abb. 2-6 und Abb. 2-7). Es ist bekannt, dass RCARs und auch PP2Cs überlappende Genexpression in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben von Arabidopsis aufweisen (Kilian et al. 2007; Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007). Allerdings gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten über die *in planta* Lokalisation der endogenen RCARs bzw. PP2Cs, die darauf schließen lassen, welche der 103 bestätigten ABA-Rezeptorkomplexe unter welchen Stressbedingungen bzw. in welchen Entwicklungsstadien tatsächlich realisierbar sind.

Aus diesem Grund wurde damit begonnen, die Promotorregion und die genomische DNA aller 14 RCARS aus dem Arabidopsis Genom zu amplifizieren und diese mit einem

Reporter-gen-Konstrukt zu fusionieren. Dieses Reporter-gen-Konstrukt besitzt zwei Reporter-domänen, zum einen das verbesserte grün fluoreszierende Protein (eGFP) und ein sogenanntes miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator) (Shu et al. 2011). Mit dem eGFP ist eine gewebe- und zellspezifische Lokalisation von Proteinen in Organismen möglich, während die miniSOG eine intrazelluläre Detektion von Proteinen über das TEM ermöglicht (Shu et al. 2011). Die Kombination beider Reporter-gene in einem Konstrukt erlaubt die Untersuchung eines einzigen Objektes mit beiden Mikroskopie-Techniken, insbesondere die hochauflösende Analyse im TEM.

2.6.1. Transiente Überprüfung in *A. thaliana* und *N. benthamiana*

Für die Lokalisation aller 14 RCARs *in planta* wurden 2-3 kbp der jeweiligen putativen Promotorregion vor dem Startcodon sowie die nachfolgende gDNA aus *A. thaliana* (Col-0) mit Hilfe entsprechender Primer amplifiziert (Tab. 15), mit dem Reporter-gen-Konstrukt eGFP:miniSOG fusioniert und mittels eines binären Vektorsystems stabil in Arabidopsis transformiert. Die entsprechenden amplifizierten Sequenzen aller 14 RCARs können dem Anhang entnommen werden (5.3).

Um die Funktionalität der generierten pRCAR::RCAR:Reporter-gene-Konstrukte zu überprüfen, erfolgte eine transiente Analysen von RCAR1, RCAR8 und RCAR12 in Arabidopsis Protoplasten sowie in Blättern von *N. benthamiana*, weil für diese RCARs eine hohes Genexpressionslevel in allen vegetativen Entwicklungsstadien postuliert wurde (Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007; Gonzalez-Guzman et al. 2012; Antoni et al. 2013). Die daraus detektierten Befunde über die intrazelluläre Lokalisation der analysierten RCARs wurden in Abb. 2-23 zusammengefasst. Für alle drei hier dargestellten RCARs wurde in Protoplasten sowie in jungen Blättern von *N. benthamiana* eine Lokalisation im Cytosol und im Zellkern beobachtet. Bei den stark fluoreszierenden Objekten in den Blättern von *N. benthamiana* könnte es sich um Agro-Kolonien handeln, da diese Objekte nicht in transfizierten Protoplasten nachgewiesen wurden. Des Weiteren konnte mit diesen Untersuchungen die Funktionalität der genierten Plasmid-Vektoren bestätigt werden und die stabile Transformation in Arabidopsis erfolgte.

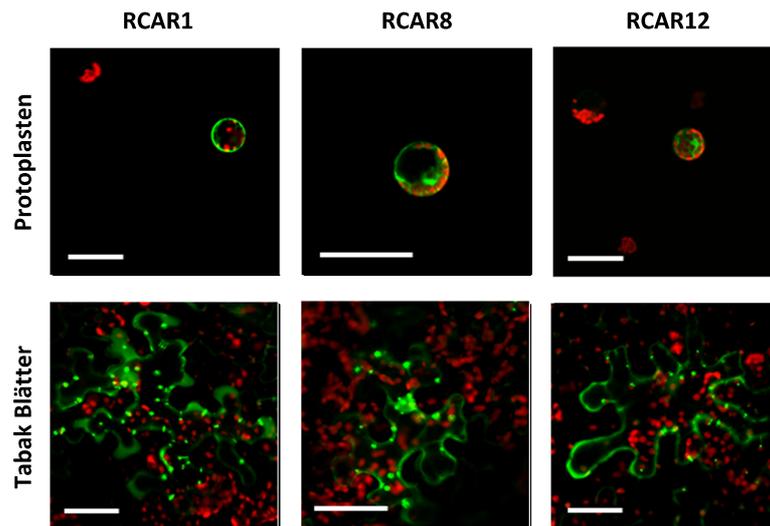


Abb. 2-23 Intrazelluläre Lokalisation endogener RCARs in Arabidopsis Protoplasten und Tabakblättern.

Transiente Analyse der intrazellulären Lokalisation von endogenem RCAR1, RCAR8 und RCAR12 in Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten und Blättern von *N. benthamiana*. Dargestellt sind die fusionierten Bilder vom eGFP- und Chlorophyll-Signal. Col-0 Protoplasten (10^5) wurden mit 5 μ g Effektor-DNA transfiziert und inkubierten für 17 ± 1 h bei 25 °C. Junge Blätter von fünf bis sieben Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit *A. tumefaciens* infiltriert (1:1 Verhältnis von p19 und binärem Effektor-Plasmid in den Agros) und inkubierten für drei bis vier Tage. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CLMS. Die weißen Skalierungsbalken entsprechen 50 μ m.

2.6.2. *In planta* Lokalisation von RCAR12

In einer bereits veröffentlichten Studie wurde Promotoraktivierte GUS-Expression von RCAR3, RCAR11, RCAR12 und RCAR14 in Wurzeln und im vaskulären Gewebe von Blättern sowie in Schließzellen von fünf bzw. 15 Tage alten Arabidopsis Keimlingen nachgewiesen (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Demnach sollte in diesen Entwicklungsstadien von Arabidopsis auch eine Lokalisation mit dem hier vorgestellten Reporter-Gen-Konstrukt fusioniert mit den beschriebenen RCARs möglich sein. Aus Zeitgründen wurden allerdings nur fünf bzw. zwölf Tage alte Arabidopsis Keimlinge untersucht, die stabil mit pRCAR12::RCAR12:eGFP:miniSOG transformiert wurden (Abb. 2-24 und Abb. 2-25).

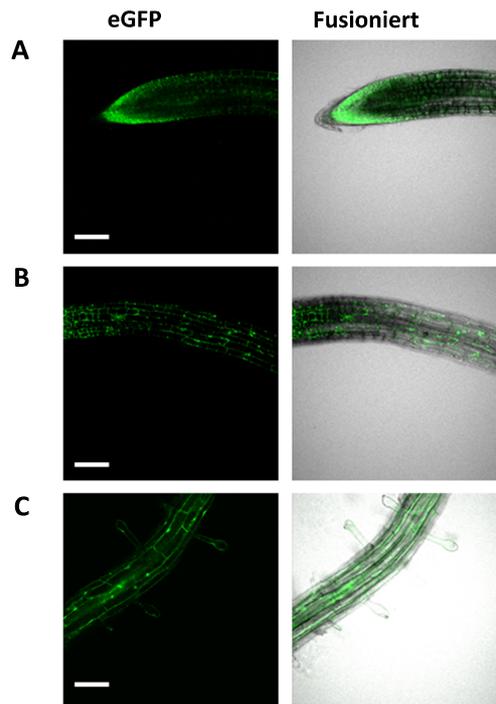


Abb. 2-24 Lokalisierung von RCAR12:eGFP in Arabidopsis Wurzel.

pRCAR12::RCAR12:eGFP::+miniSOG Lokalisierung in fünf Tagen alten Arabidopsis Keimlingen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie. Dargestellt ist das eGFP Signal in der (A) Wachstumszone, (B) Teilungszone und in der (C) Differenzierungszone. Die abgebildeten weißen Skalierungsbalken entsprechen 100 μm .

Mit Hilfe der CLMS wurde endogenes RCAR12 gewebespezifisch in der Wurzel von fünf Tage alten Arabidopsis Keimlingen in bis zu vier unabhängigen pRCAR12::RCAR12:eGFP:miniSOG Linien lokalisiert (Abb. 2-24). Ein besonders starkes GFP-Fluoreszenzsignal wurde in der Wurzel-Wachstumszone der untersuchten Keimlinge registriert, aber nicht in der Kalyptra. Des Weiteren wurde RCAR12 in den Wurzelzellen der Teilungs- und Differenzierungszone sowie in den Wurzelhaaren detektiert. Darüber hinaus war eine eindeutige Lokalisation des RCAR12 markierten GFP-Signals im Hypokotyl, in den Keim- und Sekundärblätter sowie in den Stipule von fünf und zwölf Tage alten Arabidopsis Pflanzen erkennbar (Abb. 2-25).

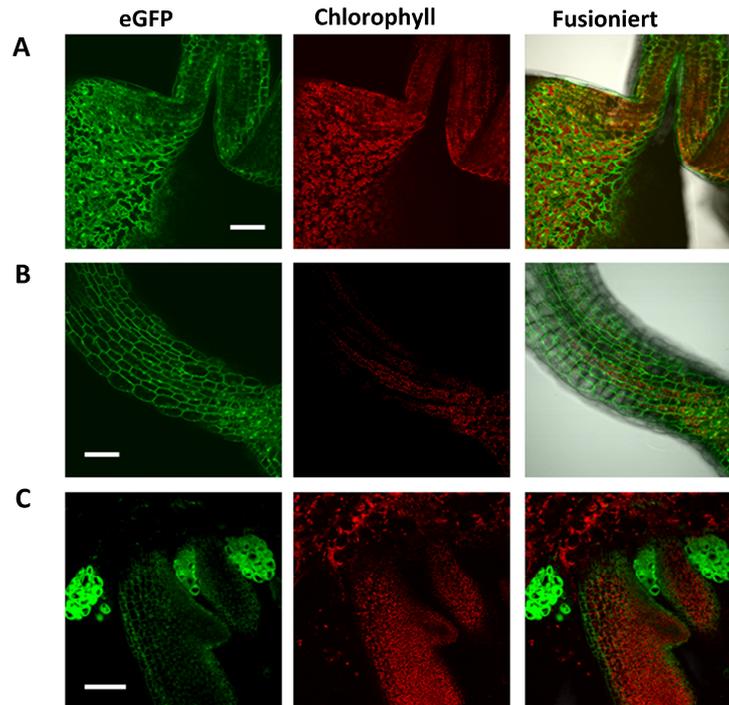


Abb. 2-25 Lokalisierung von RCAR12:eGFP in Arabidopsis.

pRCAR12::RCAR12:eGFP:miniSOG Lokalisierung in fünf (A und B) bzw. zwölf (C) Tagen alten Arabidopsis Keimlingen mittels CLMS. Dargestellt ist das eGFP- sowie Chlorophyll Signal in verschiedenen Geweben. (A) In Epidermiszellen eines Keimblattes. Der abgebildete weiße Skalierungsbalken entspricht 100 μm . (B) Im Hypokotyl. Skalierungsbalken entspricht 100 μm . (C) In Stipule und Epidermiszellen der Sekundärblätter. Skalierungsbalken entspricht 60 μm .

Während der Fokussierung von Schließ-, Epidermis-, Hypokotyl- und Wurzelzellen wurde ein zellkernspezifisches und Cytosollokalisiertes Fluoreszenzsignal für RCAR12 beobachtet (Abb. 2-26). Auch hierbei wurden vergleichbare Ergebnisse mit mehreren unabhängigen pRCAR12::RCAR12:eGFP:miniSOG Arabidopsis Linien nachgewiesen, was auf eine reproduzierbare *in planta* Lokalisation von RCAR12 schließen lässt.

RCAR12-markiertes GFP-Signal wurde eindeutig in jedem Gewebe der untersuchten Arabidopsis Keimlinge detektiert. Des Weiteren war eine intrazelluläre Lokalisation im Cytosol und Zellkern möglich, wie es auch bei Überexpression für RCAR1 (Ma et al. 2009) und RCAR8 (Santiago et al. 2009b) bereits gezeigt wurde. Gonzalez-Guzman et al. (2012) und Antonie et al. (2013) konnten hingegen nur in Wurzel, vaskulärem Gewebe und Schließzellen von fünf bzw. 15 Tage alten Arabidopsis Keimlingen Promotor::GUS-Aktivität für RCAR12 nachweisen (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Antoni et al. 2013).

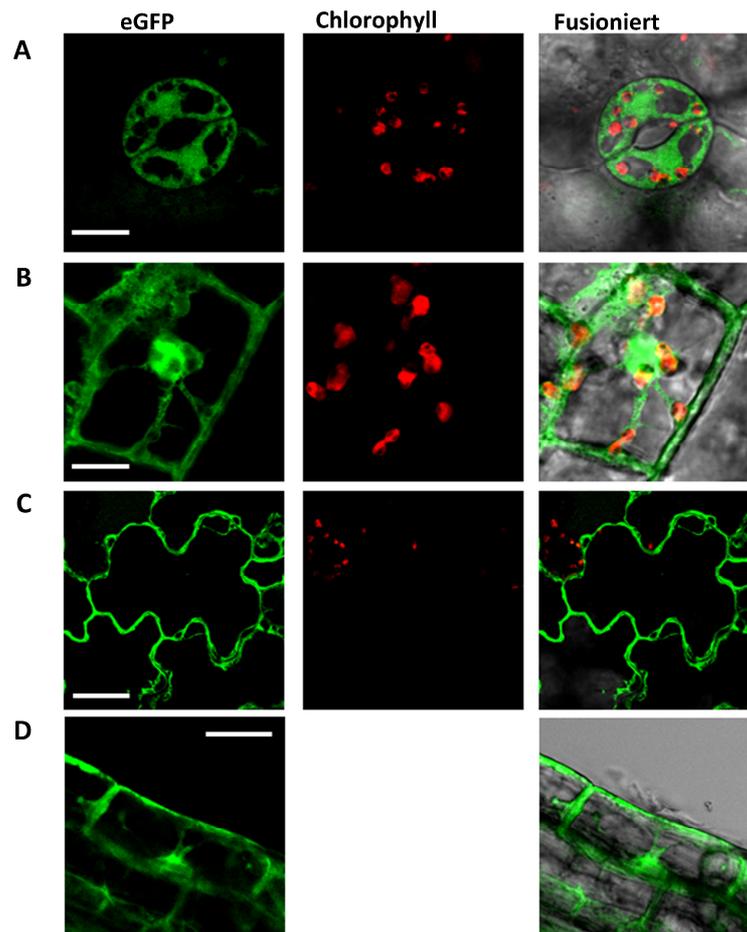


Abb. 2-26 Zelluläre Lokalisation von RCAR12:eGFP in Arabidopsis.

Cytosol- und Kernlokalisierung von pRCAR12::RCAR12:eGFP:miniSOG in Zellen von 5 Tagen alten Arabidopsis Keimlingen mittels CLMS. Dargestellt ist das eGFP- sowie Chlorophyll Signal in verschiedenen Gewebezellen. (A) Stomata und (B) Hypokotylzelle. Der abgebildete weiße Skalierungsbalken entspricht 100 μm . (C) Epidermiszelle vom Keimblatt und (D) Wurzelzelle. Skalierungsbalken entspricht 20 μm .

Anhand der hier aufgeführten Befunde wurde erfolgreich demonstriert, dass eine *in planta* Lokalisation von endogenen RCARs mit dem hier vorgestellten Reportgen-Konstrukt, das sich aus eGFP und miniSOG zusammensetzt, mit Hilfe der CLSM möglich ist. Ein Test über die Funktionalität der miniSOG *in planta* mit Hilfe des TEM steht noch aus.

3. Diskussion

Abscisinsäure (ABA) ist ein wichtiges Pflanzenhormon, das die Anpassung an biotische und abiotische Stressfaktoren reguliert (Christmann et al. 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006; Adie et al. 2007). Als Antwort auf Kältestress, osmotischen Stress oder Trockenstress initiiert ABA das Schließen der Stomata, zur Transpirationsreduktion (MacRobbie 1998; Schroeder et al. 2001; Kim et al. 2010) und kontrolliert das Wachstum (Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000) durch die Regulierung der Expression verschiedener Gene (Skriver and Mundy 1990; Parcy et al. 1994; Chandler and Robertson 1994; Busk and Pages 1998). Zu den Kernkomponenten des ABA-Signalwegs zählen die ABA-Rezeptoren (RCARs, PYR1/PYLs), welche die Gruppe A PP2Cs, auch ABA-Korezeptoren genannt, inhibieren und die Proteinkinasen SnRK2s (Fujii et al. 2009; Cutler et al. 2010; Umezawa et al. 2010; Miyakawa et al. 2013). Um die ABA-Antwort zu aktivieren, muss die Bindung des Liganden in der konservierten hydrophoben Höhle der RCARs erfolgen (Iyer et al. 2001; Radauer et al. 2008; Melcher et al. 2009). Diese ABA-Bindung führt zur Konformationsänderung der RCARs, sodass eine neue Oberfläche zur Anbindung an die PP2Cs geschaffen wird. Durch die Bildung des ternären Komplexes (RCAR-ABA-PP2C) wird wiederum die Phosphataseaktivität der PP2C blockiert (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009). Dadurch wird die SnRK2 aus der PP2C-Inhibierung entlassen (Fujii et al. 2009; Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009), kann nachfolgende Signalkomponenten regulieren und die ABA Antwort aktivieren (Wasilewska et al. 2008; Cutler et al. 2010; Raghavendra et al. 2010).

Mit der Identifizierung von 14 RCARs und neun PP2Cs der Gruppe A stellte sich die Frage, welche dieser Komponenten Teil einer ABA-Rezeptorkomplex-Bildung sind. Formal ergeben $9 \times 14 = 126$ potentielle Kombinationen. Für 13 von 14 RCARs ist eine wahre ABA-Rezeptorfunktion postuliert (Fujii et al. 2009), aber in welchen PP2C-Komplexen diese vorliegen bzw. tatsächlich in Pflanze realisierbar sind, ist offen. Erschwerend kommt hinzu, dass einzelne Untersuchungen bislang auf wenig RCARs und PP2Cs beschränkt bleiben (Ma et al. 2009, Fujii et al. 2009, Szostkiewicz et al. 2010, Zhao et al. 2013). Die erste umfangreiche Analyse bezüglich der Kombinatorik zwischen RCARs und PP2Cs ist die Untersuchung von Herrn Fuchs mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System (Fuchs 2013).

3.1. Kombinatorik der ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten

Unter ABA-Exposition konnten in Arabidopsis Protoplasten ~82 % der 126 möglichen RCAR-PP2C-Kombinationen identifiziert werden (Abb. 3-1A). Interessant hierbei ist, dass RCAR1, RCAR2 und RCAR3 jede der neun PP2Cs in Pflanzenzelle regulieren konnten. Vergleichsweise spezifisch erfolgte die PP2C-Regulierung durch die restlichen elf RCARs, welche 74 % der 103 bestätigten ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen betragen (Abb. 3-1B). Zusätzlich ließen sich seitens der PP2Cs RCAR-Diskriminierung und unspezifische Regulierung durch alle RCARs feststellen (Abb. 3-1A). Genauer, 73 % aller identifizierten RCAR-PP2C-Kombinationen wiesen eine RCAR-Diskriminierung seitens der PP2Cs auf (Abb. 3-1B), während die Regulierung von PP2CA und HAB2 durch alle RCARs in Protoplasten mögliche war (entspricht 27 %).

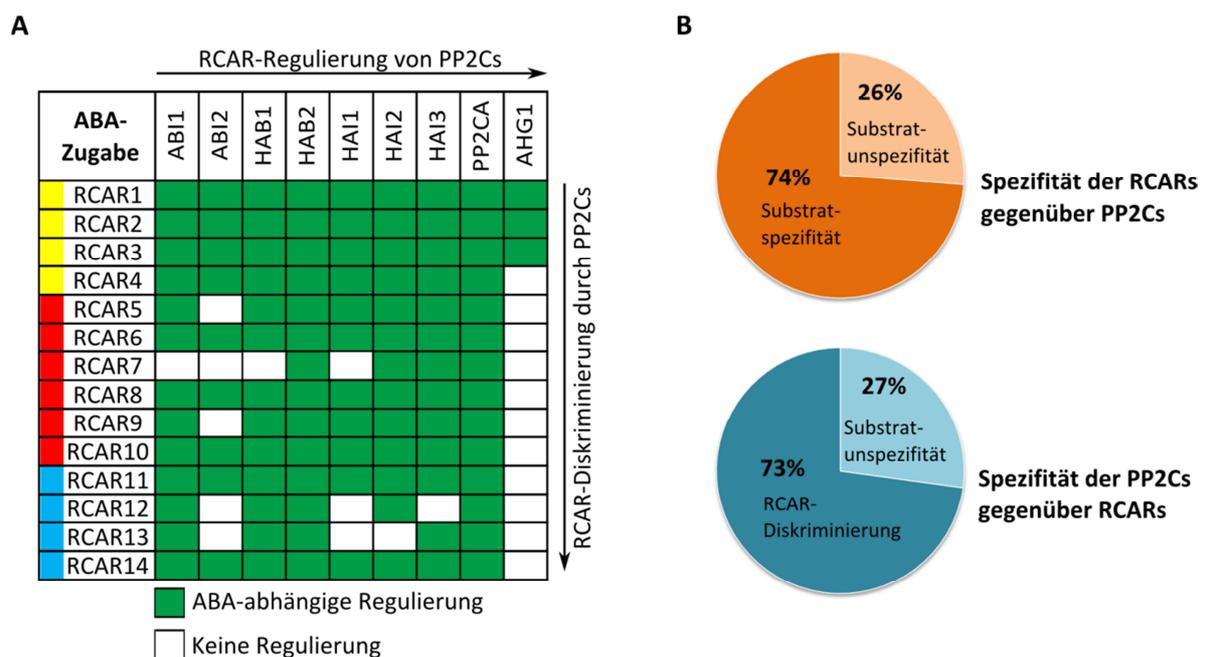


Abb. 3-1 RCAR-vermittelte Regulierung der PP2Cs unter ABA-Exposition.

(A) Zusammenfassung aller bestätigten ABA-Rezeptorkombinationen in Arabidopsis Protoplasten unter Zugabe von 10 μ M ABA. Diese Matrix basiert auf der Auswertung der Abb. 2-7. Eine RCAR-vermittelte PP2C-Regulierung wurde als bestätigt gewertet, wenn mindestens eine dreifach höhere Aktivierung der PP2C-inhibierten ABA-Antwort verglichen zur LV beobachtet wurde. (B) Auswertung der ermittelten Substratspezifität bzw. Substratunspezifität seitens der RCARs und der PP2Cs ausgehend von 103 bestätigten ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen.

Mit dem endogenen ABA-Gehalt ließen sich ~47 % der möglichen 126 RCAR-PP2C-Kombinationen in Pflanzenzellen nachweisen (Abb. 3-2A). Auffällig hierbei ist, dass für keines

der als reine Dimere beschriebenen RCARs (RCAR11 (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a), RCAR12 und RCAR14 (Dupeux et al. 2011b)) eine PP2C-Regulierung in Protoplasten beobachtet werden konnte. RCAR13 bildet zusammen mit RCAR11, RCAR12 und RCAR14, infolge ihrer Primärstrukturhomologie (Ma et al. 2009; Raghavendra et al. 2010), die Unterfamilie III der RCARs (Abb. 3-2B). Im Gegensatz zu den restlichen Vertretern dieser Unterfamilie, kann RCAR13 *in vitro* als Monomer und Dimer vorliegen (Zhang et al. 2012b). Zusätzlich zu RCAR1 bis RCAR10 ließ sich auch für RCAR13 eine Regulierungen der PP2Cs in unbehandelten Protoplasten nachweisen (Abb. 3-2A). Auch diese RCARs, mit Ausnahme von RCAR7, sind als Monomere beschrieben (Hao et al. 2011; Okamoto et al. 2013). Darüber hinaus wurde *in vitro* für monomere RCARs in Kombination mit PP2Cs eine höhere Affinität gegenüber ABA ermittelt verglichen zu dimeren (Ma et al. 2009; Melcher et al. 2009; Santiago et al. 2009b; Szostkiewicz et al. 2010; Hao et al. 2011). Infolge der unterschiedlichen ABA-Affinitäten zwischen monomeren und dimeren RCARs könnte das die Ursache für die detektierte RCAR-Regulierung von PP2Cs unter endogenem ABA-Gehalt darstellen.

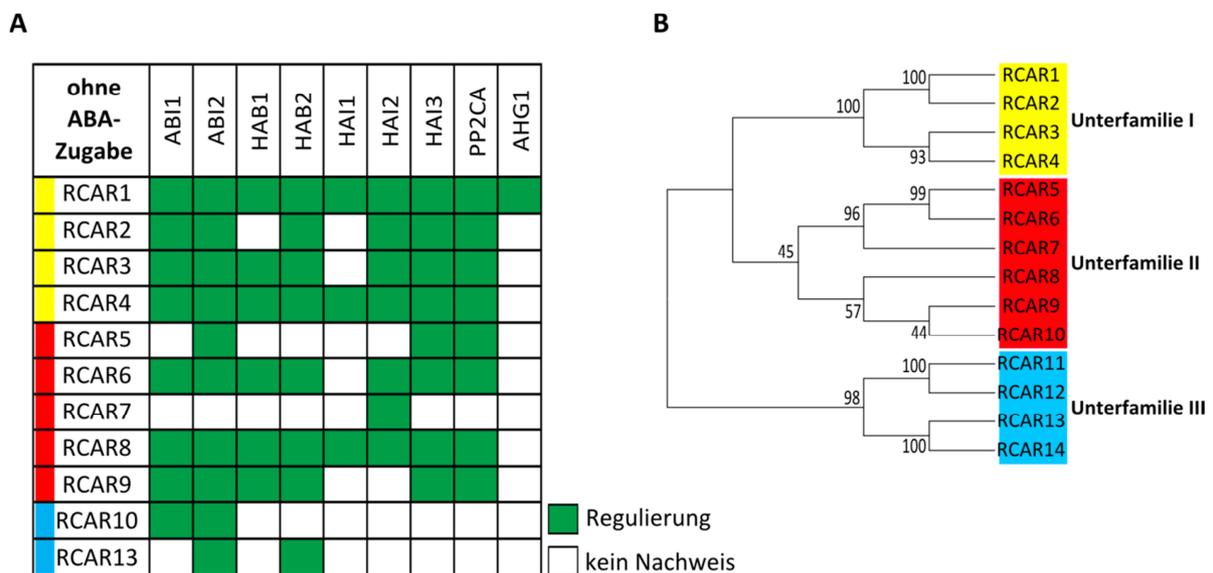


Abb. 3-2 RCAR-vermittelte Regulierung der PP2Cs mit endogenem ABA.

(A) Zusammenfassung aller bestätigten ABA-Rezeptorkombinationen in Arabidopsis Protoplasten unter endogenem ABA-Gehalt. Diese Matrix basiert auf der Normalisierung der Abb. 2-6A nach der Vorgehensweise wie in Abb. 2-7. Eine RCAR-vermittelte PP2C-Regulierung wurde als bestätigt gewertet, wenn mindestens eine dreifach höhere Aktivierung der PP2C-inhibierten ABA-Antwort verglichen zur LV beobachtet wurde. (B) Phylogenetischer Baum der RCAR-Familie in Arabidopsis. Diese Darstellung ist vergleichbar zur Abb. 1-3.

3.1.1. Neu identifizierte PP2C-Regulierungen durch RCARs in Pflanzenzellen

Transient in Protoplasten wurden insgesamt 103 Kombinations aus RCARs und PP2Cs identifiziert (Abb. 3-1). 59 dieser Kombinationen ließen sich in unbehandelten Pflanzenzellen nachweisen (Abb. 3-2). In der Literatur wurde mit vergleichbaren Methoden bereits acht ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen unter endogenem ABA-Gehalt beschrieben und 20 Kombinationen unter ABA-Zugabe. So konnten mit dieser Studie in unbehandelten Pflanzenzellen die RCAR-PP2C Kombinationen RCAR1/2-ABI1/2 (Ma et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010), RCAR3/7-HAI2 (Lim et al. 2012; Zhao et al. 2013) sowie RCAR4/8-HAB1 (Lim and Lee 2015; Santiago et al. 2009b) bestätigt werden. Werden diese acht bereits beschriebenen Kombinations aus der Matrix der Abb. 3-2A eliminiert, bleiben 51 RCAR-PP2C-Kombinationen übrig, welche in dieser Studie erstmalig in Pflanzenzellen beschrieben wurden (Abb. 3-3A).

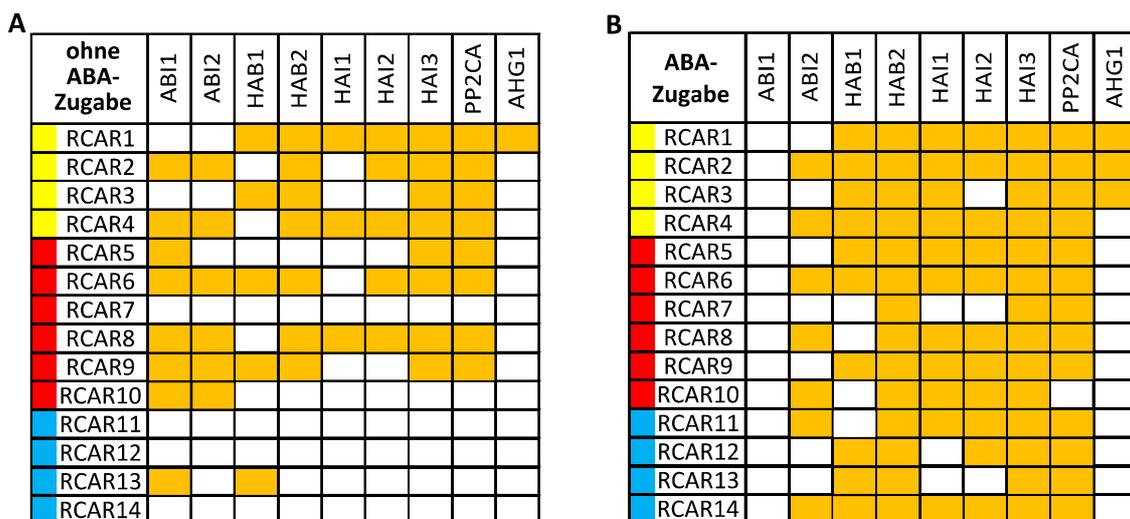


Abb. 3-3 Erstmals bestätigte ABA-Rezeptorkomplexe in Arabidopsis.

Zusammenfassende Matrix aller in dieser Studie neu identifizierten ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen in unbehandelten (A) und mit ABA-behandelten (B) Pflanzenzellen. Erstmals nachgewiesene Kombinationen sind in Orange hervorgehoben.

Demgegenüber wurden unter ABA-Exposition die Kombinationen RCAR-ABI1 (Fujii et al. 2009; Ma et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010), RCAR1/3-ABI2 (Ma et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010), RCAR3/7-HAI2 (Lim et al. 2012; Zhao et al. 2013), RCAR8/10/11-HAB1 (Santiago et al. 2009b; Pizzio et al. 2013; Fujii et al. 2009) und RCAR10-PP2CA (Pizzio et al. 2013) mit vergleichbaren Methoden identifiziert und bereits beschrieben. Daraus ergeben sich 83 ABA-

Rezeptorkomplex-Kombinationen, welche mit dieser Studie erstmalig in Protoplasten nachgewiesen werden konnten und in Abb. 3-3B zusammengefasst sind.

Zusätzlich wurden in Pflanzenzellen RCAR-abhängige HAI1-Regulierungen beobachtet (Abb. 3-1 und Abb. 3-2), welche im Hefe-Zwei-Hybrid-System durch entsprechenden Proteininteraktionen nicht detektiert werden konnten (Abb. 2-4 (Fuchs 2013)). Damit eine physikalische Proteininteraktion in Hefen nachgewiesen werden kann, wird die Transkription der zu untersuchenden Proteine im Zellkern vorausgesetzt (Fields and Song 1989). HAI1 wurde im Golgi-Apparat von Schließzellen lokalisiert (Zhang et al. 2012a), was das Nichtdetektieren potentieller RCAR-HAI1 Interaktionen *in vivo* erklären könnte.

3.1.2. Funktionelle Differenzierung der ABA-Rezeptorkomplexe

Die zusammenfassenden Matrizen der Abb. 3-1A und Abb. 3-2A veranschaulichen die enorme Vielfalt an ABA-Rezeptorkombinationen und lassen erahnen wie komplex die Regulierung der ABA-Signalkaskade in Pflanzen erfolgt. Doch warum wird eine so enorme Vielfalt benötigt?

In vitro wurde für RCAR1, RCAR3, RCAR4, RCAR8 und RCAR9 eine ABA-unabhängige Inhibierung der PP2C-Phosphataseaktivität ermittelt, während RCAR11 bis RCAR14 ABA-Zugabe benötigten, um in einem vergleichbaren Effekt zu resultieren (Hao et al. 2011). In Col-0 Protoplasten wurde in Koexpression von RCAR1 bis RCAR10 bzw. RCAR13 und PP2Cs ohne ABA-Behandlung eine Regulierung der Signaltransduktion beobachtet, verglichen zu den restlichen RCARs, für die keine Regulierung ermittelt wurde (Abb. 3-2A). Diese Befunde implizieren, dass RCAR1 bis RCAR10 und RCAR13 (*in vitro* Monomere (Hao et al. 2011; Okamoto et al. 2013; Zhang et al. 2012b)) unabhängige von ABA PP2Cs regulieren und die Signaltransduktion aktivieren könnten, im Gegensatz zu RCAR11, RCAR12 und RCAR14 (*in vitro* Dimere (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b)). Hierbei sollte aber beachtet werden, dass Col-0 Blätter in Abwesenheit von Stress einen endogenen ABA-Gehalt von ~40 nM aufweisen (Gonzalez-Guzman et al. 2002). Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Protoplasten eine ABA-unabhängige Regulierung der PP2Cs durch RCARs beobachtet oder diese Regulierung möglicherweise durch den endogenen ABA-Gehalt induziert wurde. Während der Untersuchung des RCAR-Einflusses auf die Regulierung des Wurzelwachstums, wurde für keine RCAR-Überexpressionslinie unter

Kontrollbedingungen ein verkürztes Primärwurzelwachstum verglichen zur Wildtypkontrolle festgestellt (Abb. 2-20), obwohl die ektopische Expression einzelner RCARs unter Zugabe von ABA in einem hypersensitiven Wurzelwachstum resultierte (Abb. 2-21). In diesen Befunden inbegriffen ist auch die ektopische Expression von RCAR4, obwohl für dieses RCAR bis dato die Hypothese in Betracht gezogen wurde, ABA-unabhängige PP2Cs zu regulieren (Hao et al. 2011). Bestätigt wurde diese Annahme bisher auf Grund der transienten Untersuchung von RCAR4 in Arabidopsis Protoplasten, bei denen eine klare Aktivierung der Signaltransduktion unter endogenem ABA-Gehalt beobachtet wurde und keine Unterschiede in der Induktion zu mit ABA behandelten Protoplasten festgestellt wurden (Abb. 2-2). Des Weiteren konnte Herr Fuchs in Hefen ausnahmslos ABA-unabhängige Interaktionen zwischen RCAR4 und verschiedenen PP2Cs bestätigen (Fuchs 2013). Die bisherige Annahme wird jedoch mit dem beobachteten Phänotyp im Wurzelwachstum von OE RCAR4 widerlegt. Infolgedessen wird in Pflanze definitiv ABA benötigt, um die RCAR-vermittelte Inhibierung der PP2Cs zu regulieren und die Signaltransduktion zu induzieren. Hierfür bindet ABA in die hydrophobe RCAR-Höhle und induziert eine Konformationsänderung der *Gate* und *Latch Loops* die zu einer Neuausrichtung der C-terminalen $\alpha 3$ -Helix führen und zusammen eine Interaktionsfläche zur Bindung an die PP2C-Kontaktfläche darstellen (Nishimura et al. 2009; Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009). Der ABA-gebundene Rezeptor bindet an die katalytische Seite der PP2Cs, sodass der ternäre Komplex stabilisiert (Abb. 3-4B) und gleichzeitig die SnRK2 aus der Substrattasche der Proteinphosphatase verdrängt wird (Soon et al. 2012; Zhou et al. 2012). Mit der Autoaktivierung der SnRK2 werden nachgeschaltete Signalkomponenten reguliert und die ABA-Antwort initiiert (Cutler et al. 2010; Umezawa et al. 2010) (Abb. 3-5B).

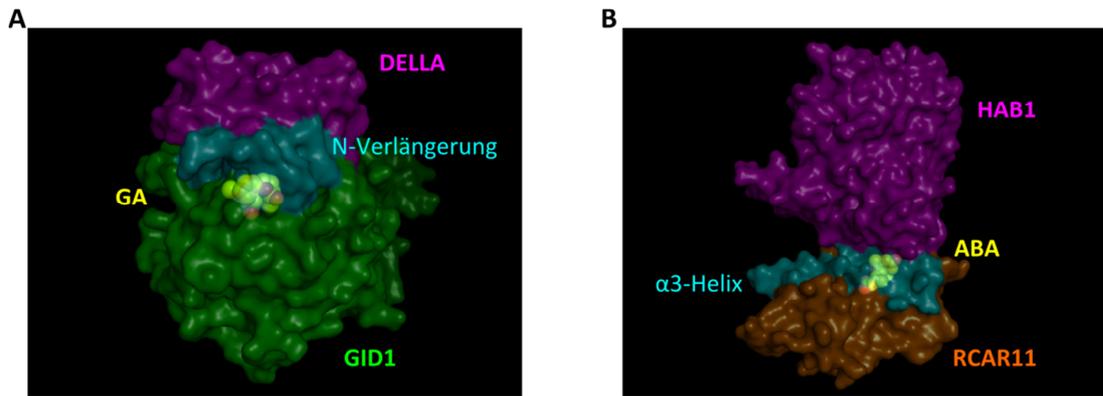


Abb. 3-4 Vergleich ternärer Komplex der GA- bzw. ABA-Signaltransduktion.

(A) Kristallstruktur des GA4-gebundenen Rezeptors (GID1) in Komplex mit DELLA (Teilstruktur). Farblich hervorgehoben ist der GA-Rezeptor GID1 (Grün) mit N-terminale Verlängerung in Cyan, der Ligand GA4 (Gelb) und das Repressor-Protein DELLA (Magenta). (B) Kristallstruktur des ABA-gebundenen Rezeptors (RCAR11) in Komplex mit HAB1. Farblich hervorgehoben ist der ABA-Rezeptor RCAR11 (Orange) mit α 3-Helix in Cyan, der Ligand ABA (Gelb) und HAB1 (Magenta). Die Kristallstrukturen wurden von Murase et al. (2008) (GID1-GA-DELLA, PDB ID: 2ZSI) bzw. Dupeux et al. (2011a) (RCAR11-ABA-HAB1, PDB ID: 3QN1) veröffentlicht und nachträglich mit PyMOL bearbeitet.

Die Bildung und Stabilisierung des ABA-Rezeptorkomplexes erfolgt vergleichbar zur Bildung des GA-Rezeptorkomplexes. Der GA-Rezeptor GID1 (GA INSENSITIVE DWARF1) ist eine lösliches Protein und im Cytosol und Zellkern lokalisiert (Ueguchi-Tanaka et al. 2005; Nakajima et al. 2006). Die GA-Bindung erfolgt in der GID1-Höhle und induziert eine Konformationsänderung, sodass die N-terminale Verlängerung den Eingang zur GA-Bindehöhle verdeckt und gleichzeitig eine Interaktionsoberfläche zum Anbinden von DELLA gebildet wird (Murase et al. 2008) (Abb. 3-4A). Durch die Bindung des DELLA-Proteins an den GA-Rezeptor, wird der gesamte ternäre Komplex stabilisiert, ohne das DELLA einen direkten Kontakt zum GA besitzt (Murase et al. 2008; Shimada et al. 2008), während im ABA-Rezeptorkomplex ein konservierter PP2C Tryptophan-Rest die ABA-Bindung zum RCAR stabilisiert (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2012). Infolge der Bindung von DELLA an den GA-GID1-Komplex wird eine Konformationsänderung induziert, welche eine Anbindung des Ubiquitin E3 Ligase SCF Komplexes ermöglicht und DELLA für die Degradierung durch 26S Proteasomen markiert (Shimada et al. 2008). Durch den DELLA-Abbau wird die Unterdrückung der GA-Antwort aufgehoben (Abb. 3-5A) (Shimada et al. 2008; Murase et al. 2008).

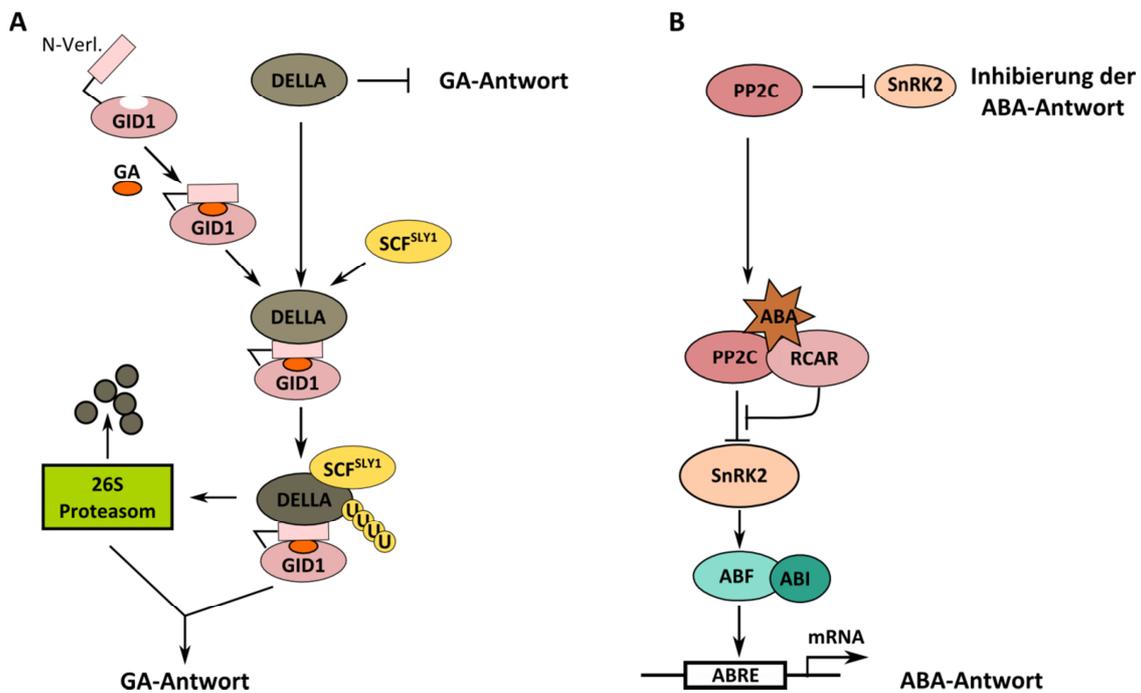


Abb. 3-5 Vergleich Induktion der GA- bzw. ABA-Antwort.

(A) In Abwesenheit von GA unterdrückt DELLA die GA-Antwort. In Gegenwart von GA bindet der Ligand in die GID1-Höhle und induziert eine Konformationsänderung des GA-Rezeptors, welche die Interaktion mit dem DELLA-Protein ermöglicht. Gleichzeitig wird DELLA vom Ubiquitin E3 Ligase SCF Komplex für die Degradierung durch 26S Proteasomen markiert, sodass die GA-Antwort eingeleitet wird (Murase et al. 2008; Shimada et al. 2008). Diese Abbildung wurde nach Sun (2010) erstellt. (B) Die ABA-Bindung an das RCAR ermöglicht die Komplexbildung mit einer PP2C, wodurch die inhibierte SnRK2 aus der Dephosphorylierung entlassen wird und nachgeschaltete TFs regulieren kann und die ABA-Antwort initiiert (Finkelstein 2013). Die Abbildung wurde nach Raghavendra et al. (2010) erstellt.

Auf Grund der ABA-abhängigen PP2C-Regulierung durch RCARs, könnte die Vielfalt der ABA-Rezeptorkomplexe mit den unterschiedlichen Affinitäten der RCARs gegenüber ABA begründet werden. In Abwesenheit von ABA ist die Kontaktfläche für PP2Cs bei dimeren RCARs verdeckt und ABA wird hierbei zur Induktion der Konformationsänderung der *Gate* und *Latch Loops* benötigt wie auch zur Dimer-Trennung (Dupeux et al. 2011b). Die niedrige ABA-Affinität könnte daher als Konsequenz des thermodynamischen Nachteils der Dimer-Dissoziation angesehen werden. (Dupeux et al. 2011b).

Monomere RCARs könnten aus diesen Gründen in Gegenwart von niedrigen und mittleren ABA-Konzentrationen die Signaltransduktion aktivieren (Dupeux et al. 2011b). Hierzu wäre die Regulierung von entwicklungspezifischen Prozessen und frühen Stressantworten denkbar. Im Gegensatz dazu könnten dimere RCARs durch hohe intrazelluläre ABA-Konzentrationen infolge starken oder lang anhaltenden Stresses aktiviert werden und die ABA-Antwort regulieren (Dupeux et al. 2011b). In Col-0 Rosettenblätter wurde ein

endogener ABA-Gehalt von ~40 nM ermittelt, während in trockengestressten Rosettenblättern ein achtfach höhere ABA-Gehalt (~300 nM) nachgewiesen wurde (Gonzalez-Guzman et al. 2002). In Wurzel hingegen wurde unter Kontrollbehandlung und Trockenstress kein Unterschied im endogenen ABA-Gehalt detektiert (Christmann et al. 2007). Mit Hilfe der zusätzlichen Regulierung der gewebe- und entwicklungspezifischen RCAR-Expression könnten monomere RCARs als „Erste-Hilfe“ Reaktion aktiviert werden und dimere RCARs zur längerfristigen Anpassung an stressbedingte Umweltfaktoren beitragen.

3.1.3. Limitierung der transienten Analyse in Protoplasten

Mit Hilfe von Protoplasten kann im großen Stil die Regulation und die Funktion von ganzen Gen-Familien untersucht werden, die möglicherweise als interessant in einer Signalkaskade anzusehen sind (Sheen 1998, 2001; Yoo et al. 2007), ohne vorher langwierig stabile Arabidopsis-Mutanten zu generieren. Die transiente Protoplasten-Analyse gibt Informationen über eine mögliche biologische Relevanz der zu untersuchenden Proteine *in planta* verglichen zu Heterologen Systemen bei denen lediglich Proteinwechselwirkungen untersucht werden (Yoo et al. 2007). Ob tatsächlich alle 103 bestätigten ABA-Rezeptorkomplexe aber auch in Pflanze realisierbar sind, kann derzeit nicht beantwortet werden, da auch die transiente Analyse in Protoplasten Einschränkungen aufweist.

Die Untersuchung ektopisch exprimierter RCARs und PP2Cs in Protoplasten gibt Aufschluss über eine mögliche Regulierung der vorhandenen ABA-Signaltransduktion in dem Entwicklungsstadium und Pflanzengewebe wieder, aus denen die Protoplasten isoliert worden sind (Sheen 1998, 2001; Yoo et al. 2007). Werden z.B. spezifische SnRK2s und/oder Transkriptionsfaktoren in diesem Entwicklungsstadium in Arabidopsis-Blättern nicht exprimiert, könnte die RCAR-spezifische Regulierung von PP2Cs verborgen bleiben, wie es für den ABA-Rezeptorkomplex RCAR7-HAI1 vermutet wird.

Die ektopische Expression von RCARs und PP2Cs in Arabidopsis Protoplasten gewährleistet zwar eine konstitutive und gewebeunspezifische Expression, aber garantiert nicht, dass die zu untersuchenden Proteine auch in einer aktiven Form vorliegen. So wurde zwar für ABI1 eine effektive Inhibierung der ABA-Antwort in Protoplasten beobachtet, aber nicht für die nahe Verwandte ABI2 (Abb. 2-3B). Folglich stellte sich hier die Frage, ob ABI2 eine unwirksame Proteinphosphatase ist oder als nichtaktives Protein translatiert wurde. Da

RCAR-abhängige Regulierungen von ABI2 in Mesophyll-Protoplasten beobachtet wurden, konnten diese beiden Optionen ausgeschlossen werden.

Die erstmalige Identifizierung von über 80 neuen ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen in Pflanzenzellen ermöglicht einen umfassenden Einblick in die Vielfalt der Regulierung der ABA-Signaltransduktion. Um eine Aussage über die biologische Relevanz einer möglichen RCAR-PP2C-Kombination zu erhalten, ist eine Charakterisierung der ABA-Rezeptorkomplex-Komponenten unerlässlich.

3.2. Spezifitäten in der RCAR-PP2C Kombinatorik

Die kombinatorische Untersuchung potentieller RCAR-PP2C Kombinationen in behandelten Pflanzenzellen identifizierte neben einem breiten Substratspektrum seitens der RCARs und PP2Cs auch RCAR-Diskriminierungen durch PP2Cs sowie individuelle PP2C-Regulierung durch spezifische RCARs (Abb. 3-1A). Als besonders interessant stellte sich RCAR7 und AHG1 heraus. Zu Beginn dieser Studie war unklar, ob RCAR7 ein wirksamer ABA-Rezeptor ist (Fujii et al. 2009). Jedoch wurde für RCAR7 in Koexpression mit PP2CA, HAB2 bzw. HAI2/3 eine Regulierung der ABA-Signaltransduktion in Protoplasten beobachtet (Abb. 3-1A). Damit im Einklang führte die ektopische Expression von RCAR7 in Arabidopsis zu einem ABA-hypersensitiven Phänotyp in der Samenkeimung und Regulierung der Stomata-Schließung (Abb. 2-16) (Fuchs et al. 2014). Für AHG1 war bis dato unklar, ob eine ABA-abhängige Inhibierung der Phosphataseaktivität durch RCARs möglich ist, da AHG1 verglichen zu den anderen acht PP2Cs ein Valin an Stelle eines konservierten Tryptophans (HAB1 W385, ABI1 W300) (Dupeux et al. 2011b; Fuchs et al. 2013) besitzt. Während der ternären Komplexbildung wird dieser Tryptophan-Rest zwischen die RCAR *Gate* und *Latch Loops* eingefügt (Dupeux et al. 2011b) und koordiniert über sein Indol-Rest und einer Wasserstoffbrückenbindung die Keto-Gruppe von ABA (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2012), was in einer Stabilisierung des gesamten ternären Komplexes resultiert (Ma et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b). PP2C-Mutationen in diesem Tryptophan (ABI1^{W300A}, HAB1^{W385A}) führten zum Verlust der Bindeaffinität gegenüber RCAR12 (Miyazono et al. 2009) bzw. in einer konstitutiven Inhibierung von SnRK2.6/OST1 (Dupeux et al. 2011b). Demgegenüber

wurde in dieser Studie für AHG1 in Koexpression mit RCAR1, RCAR2 und RCAR3 eine ABA-abhängige spezifische Regulierung der Signaltransduktion in Arabidopsis-Zellen gefunden (Abb. 3-1A).

Verantwortlich für die beobachtete Substratspezifität für RCAR7 bzw. AHG1 könnten unterschiedliche Aminosäurereste in den entsprechenden Interaktionsregionen sein.

3.2.1. RCAR-AHG1-Rezeptorkomplex

In Protoplasten wurde eine RCAR1/2 bzw. RCAR3-vermittelte Regulierung von AHG1 beobachtet. Für alle anderen RCARs, RCAR4 bis RCAR14, ließ sich keine Aktivierung der AHG1-inhibierten ABA-Antwort feststellen (Abb. 3-1), trotz hoher Sequenzhomologie von RCAR1 bis RCAR4 (Raghavendra et al. 2010). Ein Primärstruktur-Alignment und die Kristallstruktur des RCAR4-HAB1-Komplexes (Hao et al. 2011) identifizierte drei spezifische RCAR-Aminosäurereste, die möglicherweise im direkten Zusammenhang mit der Ausbildung des ternären RCAR-ABA-AHG1 Komplexes stehen könnten (Abb. 3-6).

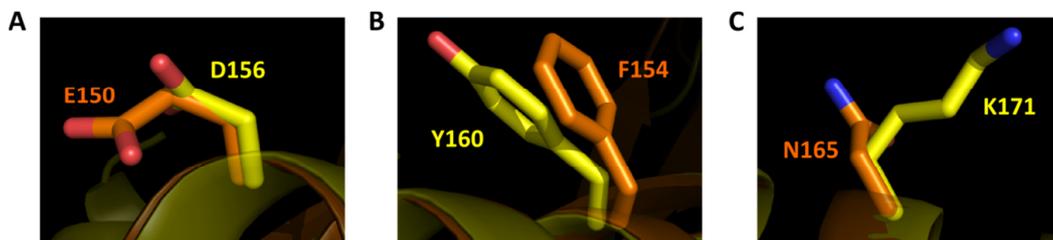


Abb. 3-6 Aminosäurerest-Vergleich von RCAR1 und RCAR4.

Gegenüberstellung der Aminosäurereste, die in RCAR1 (gelb) und RCAR4 (orange) variieren und sich an der Kontaktfläche zur PP2C befinden. Gegenüberstellung der AS-Rest von (A) Asparaginsäure (D156) und Glutaminsäure (E150), (B) Tyrosin (Y160) und Phenylalanin (F154) bzw. (C) Lysin (K171) und Asparagin (K165) Dargestellt sind entsprechende Ausschnitte des Kristallstruktur-Alignments von RCAR1 (Zhang et al. 2013) bzw. RCAR4 (Hao et al. 2011). Die nachträgliche Bearbeitung erfolgte mit PyMOL (PDB ID: 3OQU (RCAR1) und 3RT0 (RCAR4)).

Das Tyrosin (RCAR1 Y160) ist die einzige der drei identifizierten Aminosäurereste, welche ausschließlich in RCAR1 bis RCAR3 in diesem Bereich präsent ist. Die Asparaginsäure (RCAR1 D156) und das Lysin (RCAR1 N171) sind in diesen drei RCARs auch identisch und nicht in der vergleichbaren Position von RCAR4 vorhanden, allerdings ist die Asparaginsäure in RCAR11 (E154) präsent und das Lysin in RCAR5 (K147). Im direkten Vergleich wurde für RCAR4 eine

Glutaminsäure (E150) statt einer Asparaginsäure identifiziert, ein Phenylalanin-Rest (F154) statt eines Tyrosin-Restes und ein Asparagin (N165) statt eines Lysins.

Der Austausch der Asparaginsäure gegen Glutaminsäure (RCAR1^{D156Y} bzw. RCAR4^{E150D}) führte zu keine Unterschiede gegenüber dem wildtypischen RCAR1 bzw. RCAR4. In Hefen wurde unter ABA-Exposition für RCAR1^{D156Y}, vergleichbar zu RCAR1 WT, eine physikalische Interaktion mit AHG1 detektiert. Des Weiteren wurde für diese Variante in Protoplasten eine RCAR1^{D156Y}-vermittelte Regulierung von AHG1 beobachtet. Für RCAR4^{E150D} konnte weder in Hefen eine Interaktion mit AHG1 festgestellt werden, noch eine ABA-abhängige Regulation in Col-0 Protoplasten. Asparaginsäure und Glutaminsäure gehören beide zur Gruppe der sauren Aminosäuren. Die zusätzliche CH₂-Gruppe der Glutaminsäure, die wie eine Verlängerung des Aminosäurerestes wirkt (Abb. 3-6A), führte zu keinem negativen Effekt bezüglich der Komplexbildung mit AHG1. Betrachtet man beide Aminosäuren in der Kristallstruktur wird deutlich, dass beide Reste zu weit entfernt sein könnten, um Wechselwirkungen mit AHG1-spezifischen Aminosäureresten auszubilden und einen ternären Komplex zu formieren (Abb. 3-7). Folglich ist RCAR1^{D156} nicht für die Regulierung von AHG1 notwendig.

Demgegenüber resultierte der Austausch von Tyrosin (RCAR1 Y160) in Phenylalanin (RCAR F154) zu einer nachweislichen Interaktion zwischen RCAR4-Varianten (RCAR4^{F154Y}, RCAR4^{DY}, RCAR4^{YK}, RCAR4^{DYK}) und AHG1 unter Zugabe von ABA, vergleichbar zum WT RCAR1. Für alle gegenteiligen RCAR1-Varianten (RCAR1^{Y160F}, RCAR1^{EF}, RCAR1^{FN}, RCAR1^{EFN}) wurden, identisch zu WT RCAR4, keine Interaktionen mit AHG1 in Hefen detektiert. Das Tyrosin ist die einzige identifizierte Aminosäure, die sich direkt im Kontaktbereich zur PP2C befindet und nur in RCAR1 bis RCAR3 vorhanden ist (Abb. 3-7B). Die restlichen RCARs besitzen, in der vergleichenden Position, andere Aminosäurereste. In Arabidopsis Protoplasten wurde für alle Tyrosin-tragenden RCAR4 Varianten eine moderate Aktivierung der AHG1-inhibierten ABA-Antwort ermittelt, nicht vergleichbar zur deutlichen Induktion durch RCAR1-Wildtyp. Parallel dazu wurde für alle RCAR1-Varianten, bei denen Tyrosin (D156) gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde, ebenfalls eine partielle Aktivierung der AHG1-inhibierte ABA-Antwort beobachtet. Tyrosin zählt zu polaren Aminosäuren und bildet mittels der zusätzlichen Hydroxylgruppe am Phenylrest (Abb. 3-6B) Wasserstoffbrückenbindungen aus. Im Vergleich dazu, gehört das Phenylalanin zu den unpolaren Aminosäuren und bildet mit dem Phenylring

hydrophobe Wechselwirkungen aus. Anhand dieser Befunde kann postuliert werden, dass der RCAR1 Tyrosin-Rest (D160) zwar wichtig für die ABA-abhängige Komplexbildung mit AHG1 ist, aber wahrscheinlich auch andere Aminosäurereste daran beteiligt sind.

Für den dritten Aminosäure-Austausch zwischen RCAR1 und RCAR4 wurde für die entsprechende RCAR1-Variante ein veränderter Effekt zum Wildtyp festgestellt. Durch den Austausch des Lysins (RCAR1 K171) gegen das RCAR4 Asparagin war eine AHG1-Interaktion mit RCAR1^{K171N} in Hefen nicht mehr nachweisbar. Auch für die gegenteilige RCAR4-Variante (RCAR4^{N165K}) konnte keine Interaktion mit AHG1 in Hefen und keine Aktivierung der AHG1-inibhierten ABA-Signaltransduktion in Protoplasten beobachtet werden. Lysin gehört zu den basischen Aminosäuren und bildet mit dem positiv geladene Aminosäurerest Ionenbindungen ausbildet. Asparagin demgegenüber ist eine polare Aminosäure und bildet Wasserstoffbrückenbindungen aus. Des Weiteren ist Lysin, durch seine zusätzliche CH₂ Gruppe, strukturell gesehen, länger verglichen zu Asparagin. Folglich könnte der interagierende Aminosäurerest der PP2C für Asparagin zu weit weg sein könnte, um passende Wechselwirkungen auszubilden (Abb. 3-6C). Diese Unterschiede könnten die Ursache für den Verlust der RCAR1^{K171N}-AHG1 Interaktion in Hefen darstellen. Interessant war, dass für die Doppelvariante RCAR1^{EN} eine Detektion der AHG1-Interaktion in Hefen möglich war. Führt man sich vor Augen, dass zusätzlich der RCAR1 Asparaginsäure-Rest durch den etwas verlängerten Glutaminsäure-Rest in RCAR1^{EN} ausgetauscht wird, könnte diese Aminosäuresubstitution Einfluss auf Interaktionsoberfläche von AHG1 nehmen. Dadurch könnten spezifische Aminosäurereste der AHG1-Kontaktfläche näher zum RCAR1 hin verschoben werden, was wiederum Wechselwirkungen zwischen dem in RCAR1 eingefügten Asparagin-Rest mit passenden Aminosäureresten von AHG1 ermöglicht und in einer RCAR1^{EN}-AHG1 Komplexbildung resultieren konnte. Auch in diesem Fall ist es denkbar, dass der RCAR1-Tyrosin-Reste eine, wenn auch untergeordnete Rolle, bei der Ausrichtung der flexiblen Interaktionsoberfläche von AHG1 einnimmt. Bestätigt wird diese Annahme, auf Grund von nicht detektierten AHG1-Interaktionen mit den entsprechenden RCAR4^K- bzw. RCAR4^{DK}-Varianten und auch die Nicht-Aktivierung der AHG1-inibhierten ABA-Antwort in Protoplasten. Infolgedessen könnte auch der RCAR1-Lysin-Rest (K171) wichtig für die ternäre Komplexbildung mit AHG1 sein, aber nur in Kombination mit dem Tyrosin (D156).

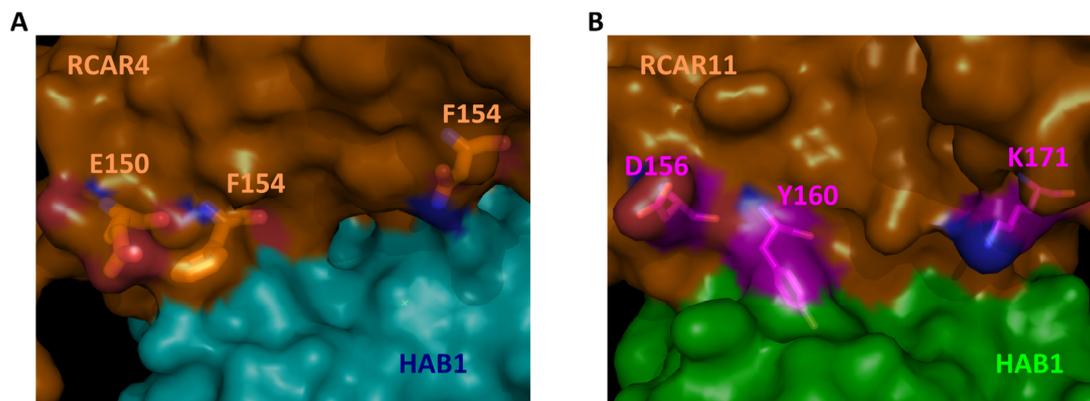


Abb. 3-7 RCAR-HAB1-Kontaktfläche.

Ausschnitt aus der Kristallstruktur der Kontaktfläche von (A) RCAR4 (Orange) im Vergleich zu (B) RCAR11 (Orange) jeweils mit HAB1 (Cyan/Grün). Hervorgehoben sind die identifizierten Aminosäurereste, welche sich von RCAR1 (Magenta) zu RCAR4 (bis RCAR14) unterscheiden und an der ABA-abhängigen Komplexbildung mit AHG1 beteiligt sein könnten. Die Kristallstrukturen wurden von Hao et al. (2011) (RCAR4-HAI1, PDB ID: 3RTO) bzw. Dupeux et al. (2011a) (RCAR11-HAB1, PDB ID: 3QN1) veröffentlicht und wurden mit PyMOL nachträglich bearbeitet.

Wie bereits erwähnt wird davon ausgegangen, dass das Tyrosin in RCAR1 bis RCAR3 sowie das Lysin nicht die einzigen zwei Aminosäuren sind, die für eine ternäre Komplexbildung mit AHG1 benötigt werden. Bestätigt wird diese Annahme mit den hier erzielten Befunden der ABA-abhängigen Inhibierung der AHG1-Phosphataseaktivität durch RCAR1 und RCAR4^{DYK}. Für RCAR1 wurde eine effektive Inhibierung der AHG1-Phosphataseaktivität im nanomolaren ABA-Bereich festgestellt verglichen zur RCAR4-Dreifachvariante, für die eine vergleichbare Inhibierung nur durch den Einsatz von mikromolarer ABA detektiert wurde. Wie erwartet, ließ sich eine RCAR4-vermittelte Inhibierung der AHG1-Phosphataseaktivität aber nicht beobachten. Weitere spezifische RCAR-Aminosäuren, welche für die Komplexbildung mit AHG1 als essentiell erscheinen, konnten allein mit dem Primärstruktur-Alignment aller RCARs nicht identifiziert werden.

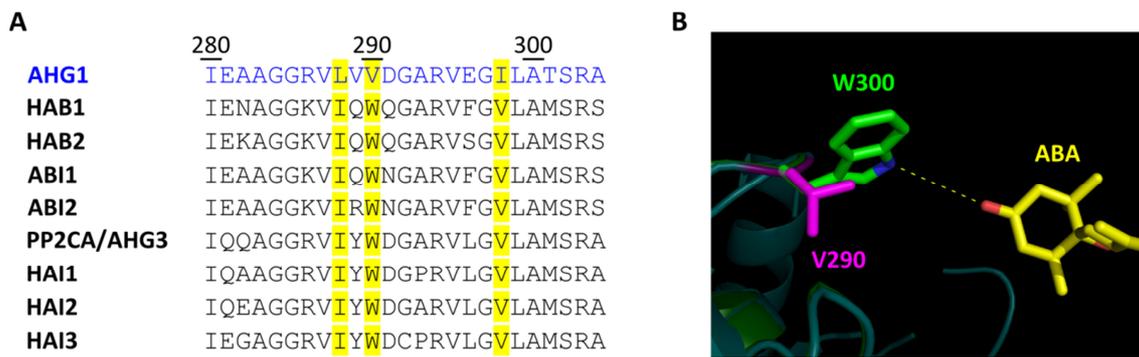


Abb. 3-8 PP2C-Alignment und Tryptophan-Valin-Vergleich.

(A) Alignment der Primärstruktur der Gruppe A PP2Cs. Es wird ein Ausschnitt der Primärstruktur gezeigt, mit AHG1-spezifischen Aminosäuren im Vergleich zu den konservierten Aminosäuren der restlichen acht PP2Cs hervorgehoben in Gelb. (B) Überlagerung der Kristallstruktur von ABI1 (Grün, PDB ID: 3KDJ) und HAB1 (Cyan PDB ID: 3QN1) zusammen mit ABA (Gelb). Hervorgehoben sind das konservierte Tryptophan (Grün, ABI1 W300) und das AHG1-spezifische Valin (Magenta, V290). Die dargestellten Strukturausschnitte wurden von Yin et al. (2009) (ABI1) bzw. Dupeux et al. (2011a) (HAB1) und nachträglich mit PyMOL bearbeitet.

In dieser Studie wurde durch den Austausch dreier Aminosäuren aus dem RCAR4 ein mutierter ABA-Rezeptor generiert, der nun die Fähigkeit besaß mit AHG1 und ABA einen ternären Komplex zu bilden und die Phosphatase-Aktivität von AHG1 wirksam zu inhibieren, zu dem er vorher nicht in der Lage war. Des Weiteren wurde *in vivo* und *in vitro* eine RCAR1-vermittelte Regulierung von AHG1 in Abhängigkeit zu ABA bestätigt. Doch woraus resultiere die allgemeine Annahme, dass AHG1 den ternären Komplex nicht stabilisieren kann und dementsprechend eine Regulierung durch RCARs ausgeschlossen wird? Ein konservierter PP2C-Aminosäurerest dient der Stabilisierung des ternären Komplexes (Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011a; Santiago et al. 2012) und dieser Tryptophan-Rest unterscheidet sich nur in AHG1 durch einen Valin-Rest (Dupeux et al. 2011a; Fuchs et al. 2013) zusätzlich zu zwei weiteren konservierten Aminosäuren (AHG1 L288, I298) (Abb. 3-8). Es wurden PP2C-Mutanten generiert, bei denen das Tryptophan gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (ABI1^{W300A}, HAB1^{W385A}) und in einer Resistenz gegenüber der ABA-abhängigen RCAR-Inhibierung resultierte, ohne dabei die Phosphataseaktivität zu beeinträchtigen (Miyazono et al. 2009; Dupeux et al. 2011a). Interessant hierbei ist, dass neben RCAR8 und RCAR11/12 auch RCAR1 die Phosphataseaktivität von HAB1^{W385A} unter ABA-Exposition nicht inhibieren konnte (Dupeux et al. 2011a). Da in dieser Arbeit eine RCAR1-Regulierung von AHG1 *in vivo* und *in vitro* beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass AHG1 das Nichtvorhandensein des Tryptophans mit Wechselwirkungen zwischen eigenen und RCAR1-spezifischen

Aminosäureresten kompensieren könnte, um den RCAR1-ABA-AHG1 Komplex zu bilden. Somit könnte es zu einer vergleichbaren Stabilisierung des ternären Komplexes kommen, wie für GID1-GA-DELLA, wo kein direkter Kontakt zwischen DELLA-Aminosäureresten und GA besteht (Murase et al. 2008; Shimada et al. 2008).

3.2.2. RCAR7-PP2C-Rezeptorkomplexe

Während der Untersuchung der Kombinatorik wurde für RCAR7 eine Induktion der PP2C-inhibierten ABA-Antwort in Koexpression mit PP2CA, HAB2 und HAI2/3 unter exogener ABA-Zugabe ermittelt (Abb. 3-1A). Darüber hinaus wurde *in vitro* eine hohe ABA-Affinität im nanomolaren Bereich für den RCAR7-PP2CA Rezeptorkomplex detektiert ($IC_{50}=30$ nM), wogegen eine RCAR7-vermittelte Inhibierung der HAB1-Phosphataseaktivität im mikromolaren ABA-Bereich nicht nachgewiesen werden konnte (Fuchs et al. 2014).

Für HAB2 wurde eine 72 %ige Übereinstimmung der Primärstruktur gegenüber HAB1 ermittelt, obwohl gleichzeitig eine Diskriminierung von RCAR7 gegenüber HAB1 und eine RCAR7-vermittelte Regulierung von HAB2 transient in Protoplasten beobachtet wurde. Durch die Überprüfung der Primärstruktur beider PP2Cs (Abb. 5-2) wurden zwei Aminosäurereste-Unterschiede ermittelt, die sich direkt im Kontaktbereich zum RCAR befinden, zwischen HAB1 und HAB2 variieren und eventuell die Ursache für die HAB1 Diskriminierung durch RCAR7 darstellen (Abb. 3-9). HAB1 besitzt im erwähnten Bereich ein S322 und ein F391, während in HAB2 ein P322 und ein S391 detektiert wurde. Hierbei handelt es sich jeweils um den Austausch eines unpolaren Aminosäurerests (Prolin, Phenylalanin) gegen einen polaren (Serin), die sich in ihren chemischen Eigenschaften und in der Ausbildung von Wechselwirkungen deutlich unterscheiden. Unpolare Aminosäurereste bilden hydrogene Wechselwirkungen mit gleichnamigen Aminosäureresten aus verglichen zur Hydroxylgruppe von polaren Aminosäureresten, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit Hydroxyl- oder Aminogruppen bilden.

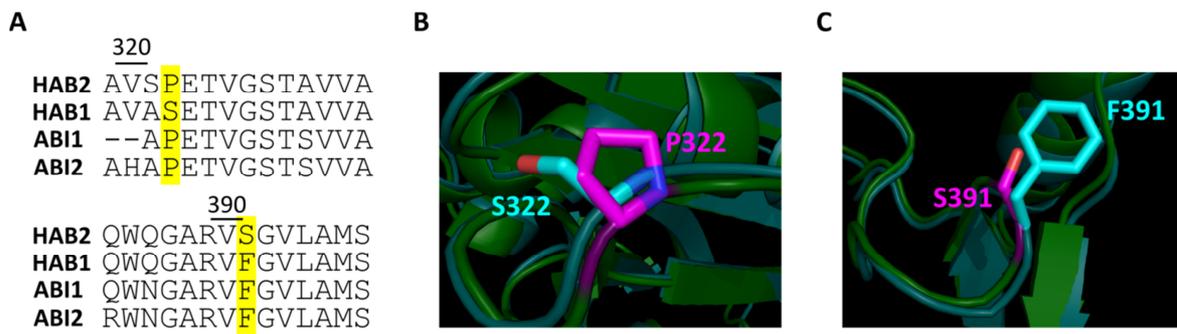


Abb. 3-9 Unterschiede in der RCAR-Kontaktoberfläche von HAB1 und HAB2.

(A) Ausschnitt aus dem Alignment der Primärstruktur von HAB1/2 und ABI1/2. Markiert sind die Aminosäuren in der RCAR-Kontaktoberfläche, wo sich HAB2 von HAB1 und ABI1/2 unterscheidet. (B und C) Teilausschnitt der überlagerten Kristallstruktur von HAB1 (Cyan, PDB ID: 3QN1) bzw. ABI2 (Grün, PDB ID: 3UJL). Hervorgehoben sind die variierenden Aminosäurereste von HAB1 (Cyan) und HAB2 (Magenta), (B) S322/P322 und (C) F391/S391. Die dargestellten Strukturausschnitte wurde von Dupeux et al. (2011a) (HAB1) bzw. Soon et al. (2012) (ABI2) veröffentlicht. Die nachträgliche Bearbeitung erfolgte mit PyMOL.

Erwähnenswert ist auch, dass das HAB2 S391 nur in dieser Proteinphosphatase vorhanden ist im Gegensatz zu den restlichen PP2Cs bei denen an der vergleichenden Position eine unpolare oder saure Aminosäure zu finden ist. Das HAB2 P322 hingegen ist auch in ABI1 (P237) und ABI2 (P227) vorhanden (Abb. 3-9A), obwohl für diese beiden PP2Cs keine RCAR7-abhängige Regulierung in Arabidopsis Protoplasten festgestellt wurde. Fuchs et al. (2014) konnten *in vitro* eine RCAR7- und ABA-abhängige Inhibierung der Phosphataseaktivität von ABI1 nachweisen. Eine vergleichbare Inhibierung von HAB1 war nicht möglich (Fuchs et al. 2014). Interessant hierbei ist, dass bei dem strukturellen Vergleich der ABI1- bzw. HAB1-Kontaktoberfläche zum RCAR drei Aminosäureunterschiede identifiziert wurden und es sich bei einer dieser Unterschiede um das HAB1 S322 handelt (Fuchs et al. 2014). Für eine entsprechend genierte HAB1^{S322P}-Mutante, die vergleichbar zum HAB2 P322 ist, wurde in Hefe eine Interaktion mit RCAR7 detektiert (Abb. 3-10A). In Protoplasten wurde kein Unterschied zu ohne und mit Koexpression von RCAR7 beobachtet (Abb. 3-10B) ebenso wie keine ABA-abhängige Regulierung der HAB1^{S322P}-Phosphataseaktivität durch RCAR7 festgestellt werden konnte (Abb. 3-10C) (Fuchs et al. 2014). Dieser einzelne Aminosäureaustausch führte zu einer nachweislichen RCAR7-HAB1^{S322P} Interaktion in Hefe, aber zu keiner wirksamen HAB1^{S322P}-Regulierung durch RCAR7 in Protoplasten und *in vitro*. Diese Befunde lassen vermuten, dass es noch weitere strukturelle Unterschiede zwischen HAB1 und HAB2 gibt, die letztendlich zur Ausbildung des spezifischen RCAR7-HAB2 Rezeptorkomplexes notwendig sind. Bei einer dieser Aminosäuren könnte es sich wahrscheinlich um das hier identifizierte HAB2 S391 handeln.

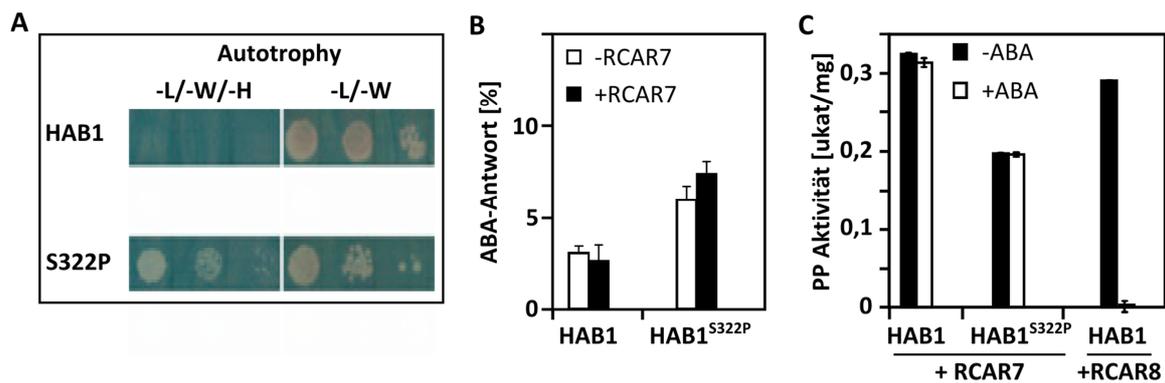


Abb. 3-10 RCAR7 und HAB1^{S322P}.

(A) Y2H Untersuchung von RCAR7 mit HAB1^{S322P}. Der Aminosäureaustausch vom Serin zum Prolin führte zum eindeutigen Wachstum der Hefen auf selektivem Medium (-H), welches eine Interaktion mit RCAR7 signalisiert. (B) Aktivierung der ABA-Antwort durch Koexpression von RCAR7 (schwarzer Balken) bzw. LV (weißer Balken) mit HAB1/HAB1^{S322P} in Arabidopsis Protoplasten in Gegenwart von 5 μ M exogener ABA. (C) ABA-abhängige Inhibierung von HAB1 durch RCAR. Der HAB1-RCAR8 Komplex diente als Positivkontrolle zur HAB1-Regulation. Diese Abbildung stammt aus Fuchs et al. (2014) und wurde modifiziert, sodass nur die Befunde für HAB1 Wildtyp und HAB1^{S322P} dargestellt sind.

Zusätzlich zur HAB1-Diskriminierung durch RCAR7 konnte für die HAI1-inhibierte ABA-Antwort in Protoplasten keine Regulierung durch RCAR7-Koexpression nachgewiesen werden (Abb. 3-1A). Im Gegensatz dazu, war eine Aktivierung der Signaltransduktion von RCAR7 in Koexpression mit PP2CA bzw. HAI2/3 feststellbar. Die Primärstruktur von HAI1 weist eine ca. 56%ige Übereinstimmung zu PP2CA und HAI2/3 auf. Werden die Aminosäuren dieser vier PP2Cs, welche sich in der Kontaktregion zum RCAR befinden (Dupeux et al. 2011a), mit einander verglichen, konnten keine essentiellen Unterschiede von HAI1 zu PP2CA bzw. HAI2/3 identifiziert werden, die eine mögliche Begründung für die HAI1-Diskriminierung durch RCAR7 darstellen (Abb. 3-11A). Möglicherweise ist eine Erklärung dieser Diskrepanz in der Lokalisation von HAI1 zu finden. HAI1 wurde im Golgi-Apparat von Schließzellen detektiert (Zhang et al. 2012a) und die ektopische Expression von RCAR7 resultiert in einer ABA-hypersensitiven Stomata-Schließung (Abb. 2-16C). Die Untersuchung der ABA-Signaltransduktion in Protoplasten bezieht sich auf die ABA-abhängige Regulierung der Genexpression und nicht auf eine mögliche Funktion in der Regulierung der Stomata-Schließung. Infolgedessen wäre eine RCAR7-abhängige Regulierung von HAI1 transient in Protoplasten nicht nachweisbar, obwohl möglicherweise eine biologische Funktion dieses ABA-Rezeptorkomplexes in Schließzellen vorliegen könnte.

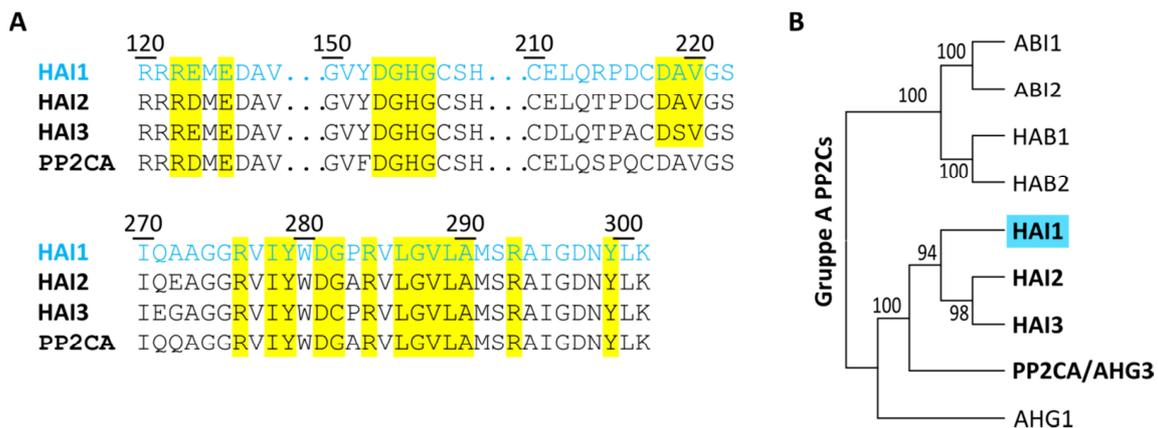


Abb. 3-11 Primärstruktur-Alignment der RCAR-Kontaktoberfläche.

(A) Ausschnitte des Primärstruktur-Alignment von HAI1 (blau) im Vergleich zur HAI2/3 und PP2CA. Gelb hervorgehoben sind jene Aminosäuren, welche nach Dupeux et al. (2011a) für die Komplexbildung mit RCAR notwendig sind. (B) Phylogenetischer Baum aller neun PP2Cs Gruppe A in Arabidopsis. Diese Darstellung ist vergleichbar zur Abb. 1-5.

3.3. Physiologische Funktion der ABA-Rezeptoren

ABA ist an der Regulierung von vielen physiologischen Prozessen wie Pflanzenwachstum und -entwicklung, Schließen der Stomata und Schutz der Photosynthese-Maschinerie beteiligt (Levchenko et al. 2005; Christmann et al. 2006; Hirayama and Shinozaki 2007; Vahisalu et al. 2008; Cutler et al. 2010). Verschiedene Datenbanken und Veröffentlichungen weisen auf überlappende Genexpressionsmuster der RCARs in unterschiedlichen Pflanzengeweben und Entwicklungsstadien hin (Schmid et al. 2005; Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007). In zwölf Tage alten Arabidopsis Keimlingen wurde für *RCAR3*, *RCAR8*, *RCAR10* und *RCAR11* die höchste Transkriptmenge aller RCARs nachgewiesen. Für alle restlichen RCARs wurde eine moderate bis schwache Expression relativ zu *UBI10* im Col-0 Wildtyp ermittelt (Abb. 2-17A). Darüber hinaus wurden für *RCAR1 bis RCAR3* und *RCAR8 bis RCAR14* überschneidende Genexpression in verschiedenen Pflanzengeweben und Entwicklungsstadien beobachtet (Schmid et al. 2005; Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007; Yang et al. 2008). Das höchste Expressionslevel wurde für *RCAR3* und *RCAR10 bis RCAR12* u.a. in der Wurzel, im Keimling, jungen Blättern und im gesamten Blütenstand detektiert (Gonzalez-Guzman et al. 2012).

Genexpressions- und Promotoranalysen geben zunächst nur einen Hinweis auf die potentielle Lokalisation des zu untersuchenden Proteins. Weil für kein RCAR bis jetzt

endogenen Lokalisationsdaten in Arabidopsis vorliegen, kann über mögliche biologische Funktionen spezifischer ABA-Rezeptorkomplex-Kombinationen *in planta* nur spekuliert werden. Des Weiteren kann keine Aussage darüber getroffen werden, welcher dieser Komplexe zu welchen Stressbedingungen oder in welchen Entwicklungsstadien ausgebildet werden, um die ABA-Signaltransduktion zu aktivieren.

In dieser Studie wurde ein fusioniertes Reportergenkonstrukt (eGFP:miniSOG) vorgestellt, mit dessen Hilfe die endogene Lokalisation von Proteinen unter Verwendung der CLSM und der TEM möglich ist (Shu et al. 2011). Das eGFP erlaubt die gewebe- und zellspezifische Lokalisation des zu untersuchenden Proteins mit Hilfe der CLMS im lebenden Objekt, während die miniSOG die intrazelluläre Detektion gewährt und durch Verwendung nur eines Präparates die CLMS mit der EM verbinden kann (Shu et al. 2011). Unter Verwendung dieses Reporterkonstrukts wurde RCAR12 erfolgreich in der Wurzel, im Hypokotyl und Kotyledone von fünf Tage alten Keimlingen sowie zusätzlich in den Primärblättern von zwölf Tage alten Pflanzen lokalisiert (Abb. 2-24 und Abb. 2-25). Demgegenüber wurde in zwölf Tage alten Arabidopsis Keimlingen nur ein schwaches Expressionslevel für RCAR12 detektiert (Abb. 2-17A). Vergleichbare Befunde erzielten Gonzalez-Guzman et al. (2012) für die ProRCAR12-induzierte GUS-Expression in fünf Tage alten Keimlingen. Diese Resultate zeigen, dass die Transkription und Translation von RCAR12 nicht zu vereinheitlichen ist. Umso wichtiger ist es, neben Genexpressions- und Promotoranalysen, auch Lokalisationsstudien von Proteinen durchzuführen, um eindeutige Rückschlüsse auf biologische Funktionen in einem bestimmten Entwicklungsstadium und/oder in einer spezifischen Zelle zu erhalten. Aber auch diese Informationen sind nicht ausreichend, um eine biologische Relevanz zu postulieren, sodass eine physiologische Charakterisierung herangezogen werden muss.

Bis auf diese Arbeit gibt es aber keine zusammenhängende physiologische Untersuchung aller 14 RCARs, bei welcher der Einfluss der ektopischen RCAR-Expression auf die Keimung, die Wurzelelongation und die Stomata-Apertur analysiert wurde.

3.3.1. Inhibierung der Samenkeimung durch ektoxische RCAR-Expression

ABA wird u.a. zur Ausbildung der Dormanz und zur Inhibierung der Samenkeimung benötigt (Karssen et al. 1983; Koornneef et al. 1989; Bewley 1997). Sind die Umgebungsbedingungen zur Samenkeimung nicht ausreichend, wird die Dormanz durch den endogenen ABA-Gehalt und der Regulierung der Genexpression weiterhin aufrechtgehalten, was in der Inhibierung der Keimung resultiert und das Überleben des Keimlings gewährleistet (Karssen et al. 1983; Koornneef et al. 1989; Okamoto et al. 2010). Dass die ektoxische Expression von RCAR1 (Ma et al. 2009), RCAR4/5 (Lim and Lee 2015) und RCAR8 (Santiago et al. 2009b) in einer ABA-hypersensitiven Inhibierung der Samenkeimung resultiert, wurde bereits gezeigt. Zusätzlich wurde für multiple *rcar*-Knockoutlinien (*rcar1* bis *3*, *rcar8* bis *12* und *rcar14*) eine ABA-Insensitivität während der Samenkeimung nachgewiesen (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Antoni et al. 2013). Eine Untersuchung mit allen 14 RCARs gibt es bislang nur in dieser Arbeit.

Hierfür wurden Arabidopsis-Linien generiert, welche die einzelnen RCARs ektoxisch exprimieren, und anschließend bezüglich ihres Keimungsverhaltens durch exogene ABA-Zugabe analysiert (Abb. 2-19 und Abb. 5-5). Dabei wurde für alle untersuchten RCAR-Überexpressionslinien eine ABA-Hypersensitivität in der Inhibierung der Samenkeimung ermittelt, mit Ausnahme der Linie OE RCAR6-3, für die kein Unterschied zur Wildtypkontrolle nachgewiesen wurde, obwohl für diese Linie eine über 1000-fach höhere *RCAR6*-Expression verglichen zum Wildtyp detektiert wurde (Abb. 2-18). Neben der allgemeinen ABA-Hypersensitivität wurde für die untersuchten OE RCAR-Linien ein Unterschied in der Intensität der Keimungsinhibierung festgestellt. Die effektivste Inhibierung der Samenkeimung wurde für die Überexpressionslinien der Unterfamilie I RCARs festgestellt, mit Ausnahme von RCAR3. Für diese transgenen Linien wurde bereits im nanomalen ABA-Bereich eine wirksame Inhibierung der Keimung beobachtet (Abb. 2-19A) und bestätigen die Befunde von Ma et al. (2009) für OE RCAR1 bzw. von Lim and Lee (2015) für OE RCAR4. Die ektoxische Expression der Unterfamilie II RCARs ebenso wie für RCAR3 und RCAR13 resultierte in einer moderaten Inhibierung der Samenkeimung. Die restlichen RCAR-Überexpressionslinien, also Unterfamilie III, führten unter Zugabe mikromolarer ABA-Konzentrationen zu einer Hypersensitivität (Abb. 2-19D).

Für *RCAR3*, *RCAR8* bis *RCAR12* und *RCAR14* wurde ein moderates bis starkes Expressionslevel u.a. in gequollenen Samen detektiert (Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007). Zusätzlich wurde für die ektopische Expression dieser RCARs, ebenso wie für *RCAR4* bis *RCAR7*, eine ABA-Hypersensitivität während der Inhibierung der Samenkeimung beobachtet (Abb. 2-19). Die Dormanz wird durch endogenes ABA aufrechterhalten (Karszen et al. 1983) und durch Stratifikation, Licht und Feuchtigkeit gebrochen, worauf die Keimung im gequollenen Samen induziert wird (Bewley 1997). Sind die Umgebungsbedingungen nicht ausreichend für die Samenkeimung, wird die Dormanz aufrechterhalten und die Keimung inhibiert (Finkelstein et al. 2002). In Anbetracht der nachgewiesenen Expression im gequollenen Samen und des ermittelten Phänotyps in der ABA-abhängigen Samenkeimung, könnten *RCAR3*, *RCAR8* bis *12* und *RCAR14* biologische Relevanz in der Regulierung der Samenkeimung besitzen. Bestätigt wird diese Annahme mit der ABA-insensitiven Keimung von multiplen Knockoutlinien für *RCAR3*, *RCAR8*, *RCAR10* bis *12* und *RCAR14* (Park et al. 2009; Gonzalez-Guzman et al. 2012). Zu erwähnen ist, dass *rcar3* im *A. thaliana* Ökotyp Wassilevskaja generiert wurde. Des Weiteren wurde nur dann ein ABA-Insensitiver Phänotyp beobachtet, wenn mind. drei dieser RCARs ausgeschaltet wurden (Park et al. 2009; Gonzalez-Guzman et al. 2012). Diese Befunde lassen auf redundante Funktionen dieser RCARs während der Inhibierung der Samenkeimung schließen. Interessant ist auch, dass bereits eine Doppelknockout für *RCAR7/9* zu einer ABA-insensitiven Samenkeimung führte verglichen zu den Einzelknockouts, für die keine Unterschiede zur Col-0 Wildtypkontrolle ermittelt wurden (Abb. 2-16D) (Fuchs et al. 2014). Wurden diese Einzelknockouts mit *rcar8* und/oder *rcar10* kombiniert, wurde keine ABA-Insensitivität beobachtet (Abb. 5-3A und B), während eine Kombination aus z.B. *rcar8* x *rcar10* x *rcar11* in einem Insensitiven Phänotyp in der Samenkeimung resultierte (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Dementsprechend könnten *RCAR7* und *RCAR9* redundante Funktionen in diesem Entwicklungsprozess besitzen (Fuchs et al. 2014), die sich aber von *RCAR3*, *RCAR8*, *RCAR10* bis *12* bzw. *RCAR14* eventuell unterscheiden.

Um die Samenkeimung ABA-abhängig zu inhibieren, müssen die daran beteiligten RCARs mit entsprechenden PP2Cs einen Komplex bilden, der wiederum durch die ABA-Bindung stabilisiert wird (Cutler et al. 2010; Raghavendra et al. 2010; Miyakawa et al. 2013; Dupeux et al. 2011a).

Von den neun PP2Cs wurde für *ABI1*, *HAB2* und *PP2CA* ein moderates Transkriptlevel in gequollenen Samen nachgewiesen verglichen zu den restlichen PP2Cs, für die eine schwache bis nicht detektierbare Expression ermittelt wurde (Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007). Im trockenen Samen werden alle neun PP2Cs moderat bis stark expimiert (Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007). Für die Funktionsverlustmutanten *pp2ca-1* (Yoshida et al. 2006b; Kuhn et al. 2006), *ahg1-1* (Nishimura et al. 2007), *abi1-2* und *hab1-1* (Saez et al. 2006) ließ sich ein ABA-hypersensitiven Phänotyp in der Keimung beobachten. Im Gegensatz dazu, wurden für die Funktionsverlustmutanten *hai1-1* (Antoni et al. 2012), *hai2-1*, *hai3-1* (Bhaskara et al. 2012) und *abi2-2* (Rubio et al. 2009) keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt. Vergleichbar zu den RCARs, erzeugen Doppel- und Dreifachknockouts aus *hab1-1*, *abi1-2*, *abi2-2* und *pp2ca-1* eine effektivere ABA-Hypersensitivität in der Keimung (Saez et al. 2006; Rubio et al. 2009; Antoni et al. 2012) verglichen zu verschiedenen Knockoutkombinationen aus *hai1-2*, *hai2-2* und *hai3-1*, welche in einer ABA-Insensitivität resultieren (Bhaskara et al. 2012). Diese Befunde und die erhöhten Genexpression von *ABI1*, *HAB2* bzw. *PP2CA/AHG3* im gequollenen Samen lassen auf dominante überlappende Funktionen in der Aktivierung der Samenkeimung vermuten, während *ABI2*, *HAB1* und *AHG1* eher eine Rolle in der Brechung der Dormanz besitzen könnten.

Mit Hilfe der hier durchgeführten Untersuchung der RCAR-PP2C Kombinatorik in Arabidopsis Protoplasten wurden potentielle Kombinationen identifiziert (Abb. 3-1A), welche an der Regulierung der Samenkeimung tatsächlich beteiligt sein könnten (Abb. 3-12). Um die Samenkeimung in Gegenwart von ABA zu inhibieren, könnte eine Hemmung der Phosphataseaktivität von *ABI1*, *HAB1/2* bzw. *PP2CA* durch *RCAR3*, *RCAR8*, *RCAR9* und/oder *RCAR10* im nanomolaren ABA-Bereich induziert werden bzw. durch *RCAR11*, *RCAR12* und/oder *RCAR14* im mikromolaren Bereich. *HAB2* bzw. *PP2CA* könnten in diesem Entwicklungsprozess zusätzlich mit *RCAR7* einen ternären Komplex bilden, der letztendlich in der Blockierung der Samenkeimung resultieren würde.

Da im trockenen Samen ein endogener ABA-Gehalt von ~30 nM ermittelt wurde, welcher nach 24h quellen auf 5-10 nM verringert wurde (Kushiro et al. 2004), könnten die monomere *RCAR3*, *RCAR8*, *RCAR9* und *RCAR10* durch kurzfristigen Trockenstress aktiviert werden und die Samenkeimung inhibieren, während die dimere *RCAR11*, *RCAR12* bzw. *RCAR14*

redundante Funktionen unter starken bzw. langanhaltenden Trockenstress besitzen könnten bzw. aktiviert werden (Abb. 3-12).

Für die Überexpressionslinien von RCAR4 bis RCAR6 wurde ein ABA-hypersensitiver Phänotyp in der Keimung beobachtet, aber es kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob diese RCARs eine biologische Relevanz in der Regulierung der Samenkeimung besitzen. Zum einen sind weder Genexpressionsdaten jener *RCARs* in diesem Entwicklungsstadium vorhanden noch wurden entsprechenden Funktionsverlustmutanten untersucht. Da in *Arabidopsis* Protoplasten eine Regulierung von ABI1, HAB2 bzw. PP2CA durch diese RCARs bestätigt wurde (Abb. 3-1A), wären die Voraussetzungen für eine biologische Funktion dieser ABA-Rezeptorkomplexe in der Regulierung der Samenkeimung denkbar (Abb. 3-12).

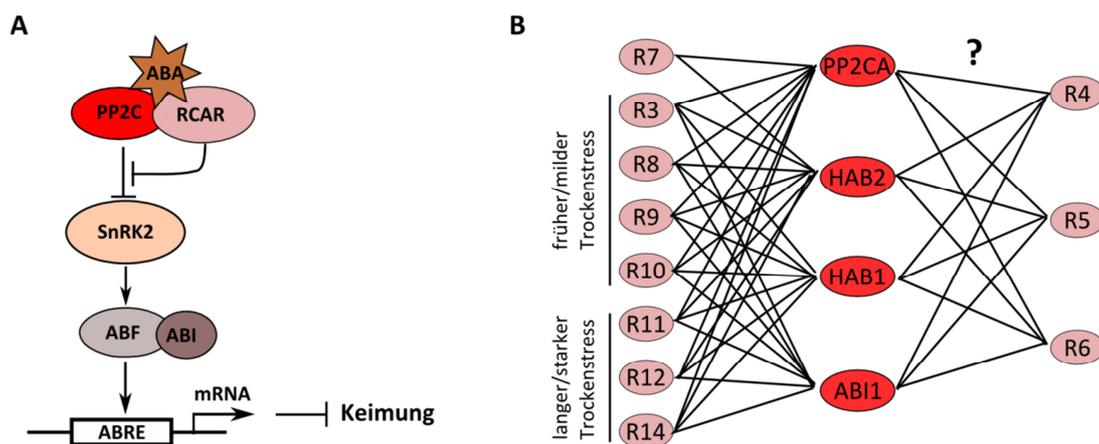


Abb. 3-12 Modell zur ABA-abhängigen Inhibition der Samenkeimung.

(A) Vereinfachtes Modell für die Regulierung der ABA-Antwort während der Samenkeimung nach Raghavendra et al. (2010). Die ABA-Bindung an das RCAR ermöglicht die Komplexbildung mit einer PP2C, wodurch die inhibierte SnRK2 aus der Dephosphorylierung entlassen wird und nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren regulieren kann. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren binden an ABREs und regulieren die Expression samenspezifischer Gene, sodass die Samenkeimung inhibiert wird (Finkelstein 2013). (B) In Betracht kommende ABA-Rezeptor-Kombinationen, die an der Regulierung der Samenkeimung beteiligt sein könnten. Die biologische Relevanz von RCAR4 bis RCAR6 bleibt dagegen offen.

Obwohl für die ektopische Expression von RCAR1, RCAR2 und RCAR13 eine vergleichbare ABA-Hypersensitivität in der Keimung nachgewiesen wurde, ist eine biologische Funktion in diesem Entwicklungsprozess der Keimungsinhibition eher unwahrscheinlich. Für diese drei RCARs wurde in gequollenen Samen ein schwaches Transkriptionslevel nachgewiesen, und

im trockenen Samen wurde für RCAR1 und RCAR2 eine erhöhte Expression detektiert (Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007). In Folge der *in vivo* und *in vitro* Regulierung von AHG1 durch RCAR1 könnte aber eine Regulierung der Dormanz für diesen ABA-Rezeptorkomplex in Betracht gezogen werden.

3.3.2. Redundante Regulierung des Wurzelwachstums

Zuzüglich zur Regulierung der Samenreife, Dormanz und Keimung (Zeevaart and Creelman 1988; Holdsworth et al. 1999; Bewley 1997) ist ABA auch an der Regulierung der Wurzelelongation beteiligt (Spollen et al. 2000; Himmelbach et al. 1998). Neben der inhibitorischen Wirkung von ABA auf das Wurzelwachstum, wurde auch eine Induktion der Wurzelelongation unter Zugabe nanomolarer ABA-Konzentrationen beschrieben (Zeevaart and Creelman 1988).

Die ektopische Expression von RCAR1, RCAR2, RCAR3, RCAR11 und RCAR12 resultierte im mikromolaren ABA-Bereich in einer wirksamen Inhibierung des Wurzelwachstums (Abb. 2-21A und D). Demgegenüber wurde im nanomolaren ABA-Bereich für die Überexpressionslinien von RCAR4, RCAR8 bis RCAR10 ein vergleichbarer Effekt beobachtet (Abb. 2-21A und C). Die detektierte ABA-Hypersensitivität in der Wurzelelongation wurde in dieser Arbeit für die ektopische Expression von RCAR1 (Ma et al. 2009), RCAR4 (Lim and Lee 2015) bzw. RCAR8 (Santiago et al. 2009b) und RCAR10 (Pizzio et al. 2013) bestätigt. Vergleichbar zur Keimungsuntersuchung, wurden Unterschiede in der Effizienz der Wurzelwachstumsinhibierung festgestellt. Für die ektopische Expression von RCAR4 wurde die wirksamste Wurzelwachstumsinhibierung (mind. 60 %) in Gegenwart nanomolarer Menge an exogener ABA nachgewiesen. Dementsprechend könnte es sich bei RCAR4 um den effektivsten ABA-Rezeptor handeln, welcher die höchste ABA-Affinität besitzt (Hao et al. 2011) und bereits in Gegenwart nanomolarer ABA-Konzentrationen die Signaltransduktion effektiv regulieren kann.

Zwar wurde für die meisten RCAR-Überexpressionslinien eine ABA-Hypersensitivität im Wurzelwachstum beobachtet, aber für *rcar*-Einzelknockouts konnte ein vergleichbarer Effekt nicht bestätigt werden (Antoni et al. 2013; Fuchs et al. 2014). Nur das Ausschalten mehrerer RCARs (3, 8, 10 bis 12 und 14) resultiert in einer ABA-insensitiven Wurzelelongation und je mehr dieser RCARs ausgeschalten werden, um so insensitiver reagiert das Wurzelwachstum

auf exogene ABA-Exposition (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Antoni et al. 2013). Dass diese RCARs redundante Funktionen in der Inhibierung des Wurzelwachstums besitzen könnten, wird von der Promotorinduzierten GUS-Expression dieser RCARs unterstützt, die in Arabidopsis-Wurzel detektiert wurden (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Zusätzlich wurde die Lokalisation von RCAR12 im Cytosol und Nucleus von Wurzelzellen bestätigt (Abb. 2-24 und Abb. 2-26D). Auch für *RCAR1*, *RCAR2* und *RCAR9* wurde, zusätzlich zu diesen RCARs, eine erhöhte Transkriptmenge in Keimlingswurzeln und/oder Wurzeln von 17 Tage alten Arabidopsis detektiert (Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007), sodass eine biologische Relevanz in der Regulierung des Wurzelwachstums nicht ausgeschlossen werden kann.

Für *ABI1*, *HAB2* und *PP2CA* wurde in Keimlingswurzeln und in Wurzeln von 17 Tage alten Pflanzen eine erhöhte Expression nachgewiesen. Ein schwaches Transkriptlevel wurde für die restlichen PP2Cs detektiert (Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007). Die Funktionsverlustmutanten *pp2ca-1* bzw. *pp2ca-2* resultieren in einem ABA-hypersensitiven Phänotyp im Wurzelwachstum (Kuhn et al. 2006), wogegen für andere *pp2c* Einzelknockouts keine Unterschiede zur Wildtypkontrolle beobachtet wurden (Rubio et al. 2009; Bhaskara et al. 2012; Antoni et al. 2012). Werden diese einzelnen Funktionsverlustmutanten miteinander kombiniert (*hab1-1*, *abi1-2*, *abi2-2*, *pp2ca-1*, *hai1-1*, *hai2-1* bzw. *hai3-1*), führen diese multiplen Knockouts zu einer ABA-hypersensitiven Wurzelelongation (Rubio et al. 2009; Bhaskara et al. 2012; Antoni et al. 2012). Die *abi1-1*, *abi2-1* und *hab1*^{G246D} Mutanten resultierten dagegen in einem ABA-insensitiven Wurzelwachstum (Gosti et al. 1999; Saez et al. 2004; Saez et al. 2006), infolge ihres Aminosäureaustausches in der katalytischen Domäne, der eine Komplexbildung mit RCARs verhindert (Ma et al. 2009). Demgegenüber führte die ektopische Expression von *HAB1* zu einem ABA-insensitiven Phänotyp im Wurzelwachstum (Saez et al. 2006), aber nicht von *PP2CA* (Kuhn et al. 2006). In Anbetracht dieser Befunde besitzt keine PP2C eine spezifische Funktion in der Regulierung der Wurzelelongation, sondern, vergleichbar zu den RCARs, eher redundante Funktionen, obwohl einzelne Vertreter nur schwach in der Wurzel exprimiert werden (Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007). Entsprechend der meisten anderen PP2C wurde für die *ahg1-1* Funktionsverlustmutante kein Unterschied zur Wildtypkontrolle im Wurzelwachstum festgestellt (Nishimura et al. 2004). Anlässlich der starken Expression von *AHG1* während der Embryogenese und im reifen bzw. trockenen Samen und dem anschließenden Rückgang der

Transkriptmenge bis acht Tage nach Einsetzen der Blüte (Nakabayashi et al. 2005; Nishimura et al. 2007; Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007; Umezawa et al. 2009), wird für AHG1 als einzige PP2C eine biologische Relevanz in der Wurzelwachstumsregulierung ausgeschlossen.

Berücksichtigt man die bestätigte RCAR-PP2C Komplexe (Abb. 3-1A) und die hier erzielten Befunde, ergeben sich viele Möglichkeiten von relevanten ABA-Rezeptoren die redundante Funktionen in der Inhibierung des Wurzelwachstums besitzen könnten. Folglich könnten eine Feinregulierung der ABA-Antwort über die Expression bzw. die Aktivierung der entsprechenden RCARs erfolgen. RCARs mit einer hohen Affinität gegenüber ABA (z.B. RCAR1 (Ma et al. 2009), RCAR3 (Szostkiewicz et al. 2010), RCAR4 (Hao et al. 2011), RCAR8 (Santiago et al. 2009b)) könnten demnach infolge von entwicklungspezifischen Prozessen oder durch leichten bzw. milden Trockenstress aktiviert werden. Im Gegensatz dazu, könnten RCARs mit schlechterer ABA-Affinität (z.B. RCAR12 (Miyazono et al. 2009), RCAR14 (Yin et al. 2009)) eher durch starken oder langanhaltenden Trockenstress aktiviert werden und spezifische PP2Cs regulieren, um das Wurzelwachstum zu inhibieren. Eher fraglich erscheint die biologische Relevanz von RCAR7 in diesem Prozess, da weder für die Überexpressionslinien noch für die untersuchten Knockoutkombinationen mit *rcar8* bis *rcar10* ein ABA-abhängiger Phänotyp ermittelt werden konnte.

Das Wurzelwachstum wird durch nanomolare ABA-Konzentrationen gefördert (Finkelstein 2013), indem ABA die Differenzierung der Wurzelmeristem-Stammzellen unterdrückt, was in der Inhibierung des Seitenwurzelswachstums und in einem kontinuierlichen Längenwachstum der Wurzel resultiert (Zhang et al. 2010). Unter endogenem ABA-Gehalt führte die ektopische Expression von RCAR1, RCAR5, RCAR9, RCAR10 und RCAR13 zu einer längeren Primärwurzel verglichen zur Wildtypkontrolle (Abb. 2-20). Vergleichbares wurde für die Funktionsverlustmutanten *hai2-1* und *hai3-1* ermittelt (Bhaskara et al. 2012). Im Gegensatz dazu, resultieren die Knockoutkombinationen *hab1-1 x abi1-2 x pp2ca-1* und *hab1-1 x abi1-2 x abi2-2* in einem verkürzten Wurzelwachstum verglichen zur Wildtypkontrolle, während für die entsprechenden Einzel- oder Doppelknockouts keine Unterschiede zur Kontrolle aufweisen (Rubio et al. 2009; Rodrigues et al. 2009). Dass diese PP2Cs in Koexpression mit RCAR1, RCAR5 bzw. RCAR9 die ABA-Antwort aktivieren können, wurde in dieser Arbeit

bestätigt (Abb. 3-1A), folglich wäre eine biologische Funktion dieser ABA-Rezeptorkomplexe in der Stimulierung des Wurzelwachstums tatsächlich möglich (Abb. 3-13).

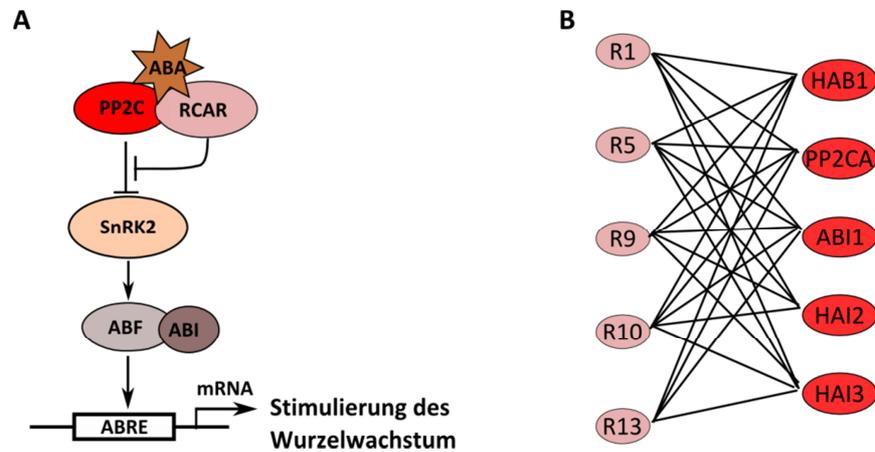


Abb. 3-13 Modell zur Stimulierung des Wurzelwachstums.

(A) Vereinfachtes Modell zur Stimulierung des Wurzelwachstums in Gegenwart nanomolarer ABA-Konzentrationen nach Raghavendra et al. (2010). Die ABA-Bindung an das RCAR ermöglicht die Komplexbildung mit einer PP2C, wodurch die inhibierte SnRK2 aus der Dephosphorylierung entlassen wird und nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren regulieren kann. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren binden an ABREs und regulieren die Expression wurzelspezifischer Gene, sodass die Differenzierung der Wurzelmeristem-Stammzellen unterdrückt und das Längenwachstum der Primärwurzel stimuliert wird (Finkelstein 2013). (B) In Betracht kommende ABA-Rezeptor-Kombinationen, die an der Stimulierung des Wurzelwachstums in Gegenwart nanomolarer ABA-Konzentrationen beteiligt sein könnten.

3.3.3. RCAR-vermittelte Regulierung der Stomata-Apertur

ABA induziert, als Reaktion auf Trockenstress, das Schließen der Stomata, was die Reduktion der Transpiration zur Folge hat (Schroeder et al. 2001; MacRobbie 1998; Christmann et al. 2005) und letztendlich in einer erhöhten Oberflächentemperatur resultiert (Wall et al. 2001).

Eine solche erhöhte Blattoberflächentemperatur wurde in dieser Studie für die Überexpressionslinien von RCAR1, RCAR6, RCAR8 und RCAR10 verglichen zum Wildtyp beobachtet (Abb. 2-22). Im Durchschnitt wurde hierbei eine 0,5 bis 1,5 °C höhere Blatttemperatur im Vergleich zur Col-0 Kontrolle registriert. Die Erhöhung der Blattoberfläche bzw. die Minderung der Transpirationskühlung steht im direkten Zusammenhang mit einer Reduktion der Stomata-Konduktanz (Gasaustausch, g_s) (Wall et al. 2001). Des Weiteren wurde eine niedrige g_s mit einer kleineren Stomata-Apertur in Verbindung gebracht (Gonzalez-Guzman et al. 2012), da für multiple Knockoutlinien von *rcar3*, *rcar8*, *rcar10* bis *rcar12* und *rcar14* eine höhere g_s und gleichzeitig auch größere

Stomata-Öffnungen verglichen zur Wildtypkontrolle nachgewiesen wurden (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Merilo et al. 2013). Dementsprechend könnte die ektopische Expression von RCAR1, RCAR6, RCAR8 und RCAR10 verkleinerte Stomata-Aperturen zur Folge haben, die in einer verminderten g_{st} und Transpirationskühlung resultieren und somit zu einer höheren Blattoberflächentemperatur führen. Bestätigt wird diese Vermutung mit der niedrigen g_s der Überexpressionslinien von RCAR6 und OE RCAR10 (Yang, unveröffentlicht). Für alle anderen transgenen RCAR-Linien wurden keine Unterschiede zur Wildtypkontrolle in der Blattoberflächentemperatur festgestellt (Abb. 2-22).

Eine erhöhte Oberflächentemperatur als Konsequenz einer reduzierten Transpirationskühlung und Stomata-Konduktanz (Wall et al. 2001) steht im direkten Zusammenhang mit einer verminderten CO_2 -Aufnahme und einer Reduktion der Photosynthese, das schließlich zu einem verringerten vegetativen Wachstum führt (Cutler et al. 2010; Fujii and Zhu 2009). Damit im Einklang wurde für die RCAR8- und RCAR10-Überexpressionslinien eine deutlich kleiner Blattrosette im Vergleich zur Wildtypkontrolle ermittelt, ebenso wie für OE RCAR4 und OE RCAR9 (Pizzio et al. 2013; Yang, unveröffentlicht). Die ektopische Expression von RCAR1, RCAR2, RCAR5 bis RCAR7 und RCAR11 bis RCAR13 resultierte in einer marginalen Reduktion der Blattrosettengröße. Ein moderates bis starkes Transkriptlevel und Promotorinduzierte GUS-Expression wurde für *RCAR1*, *RCAR3* und *RCAR8* bis *RCAR14* in Schließzellen detektiert (Yang et al. 2008; Gonzalez-Guzman et al. 2012). Zusätzlich konnte RCAR12 im Cytosol und Zellkern von Schließzellen lokalisiert werden (Abb. 2-26A). Darüber hinaus wurde für multiple Knockoutlinien aus diesen RCARs eine höhere Stomata-Konduktanz und größere Stomata-Aperturen verglichen zur Wildtypkontrolle ermittelt (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Merilo et al. 2013; Yin et al. 2013). Auf Grund dieser Befunde könnten vor allem RCAR8 und RCAR10 dominante Funktionen in der Regulation der Transpirationskühlung übernehmen, während die restlichen RCARs in diesem Prozess eher redundante Funktionen besitzen.

Von den PP2Cs wurde für *ABI1/2*, *HAB1/2* und *PP2CA* eine moderate Expression in den Schließzellen detektiert (Yang et al. 2008). Der Aminosäureaustausch in der katalytischen Domäne von *abi1-1* bzw. *abi2-1* führte (Leung et al. 1994; Rodriguez et al. 1998a), neben

einer ABA-insensitiven Samenkeimung und Wurzelelongation (Koorneef et al. 1984; Finkelstein and Somerville 1990; Leung et al. 1997), auch zu vergrößerten Stomata-Aperturen und zu einer kühleren Blattoberflächentemperatur bzw. mehr Wasserverlust im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Leung et al. 1997; Merlot et al. 2001), infolge der konstitutiven Inhibierung der SnRK2s (Ma et al. 2009). Multiple Funktionsverlustmutanten für *abi1-2*, *abi2-2*, *hab1-1* und *pp2ca-1* resultieren in kleineren Stomata-Aperturen und in einer Reduktion der Stomata-Konduktanz (Rubio et al. 2009; Merilo et al. 2013). Einzelknockouts und Doppelknockouts dieser Mutanten zeigen keine Unterschiede zur Wildtypkontrolle (Kuhn et al. 2006; Saez et al. 2006), sodass diese vier PP2Cs wahrscheinlich redundante Funktionen in der Regulierung der Transpirationskühlung besitzen.

In Koexpression mit ABI1/2, HAB1/2 bzw. PP2CA wurden für alle RCARs eine Regulierung der ABA-Antwort in Protoplasten bestätigt (Abb. 3-1A). Dementsprechend wäre es möglich, dass diese ABA-Rezeptorkomplexe an der Regulierung der Transpirationskühlung bzw. Stomata-Konduktanz beteiligt sein könnten. Es sollte aber beachtet werden, dass die transiente Analyse in Protoplasten nur Hinweise auf mögliche RCAR-PP2C Kombinationen gibt, welche die ABA-abhängige Genexpression induzieren können. Ob diese identifizierten ABA-Rezeptorkomplexe auch Ionenkanäle in Schließzellen regulieren können und letztendlich die Stomata-Aperture beeinflussen, bleibt allerdings offen.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Lehle Seeds (Round Rock, Texas, USA) bezogen. Die molekularbiologischen Kits stammen von Thermo Analytik Jena AG (Jena, Deutschland), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) und Genomed (Löhne, Deutschland).

4.1.2. Geräte

Tab. 1 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophorese	EPS 200	Pharmacia Biotech
Elektroporationssystem	Eporator	Eppendorf
Geldoc UV System	UV 312 nm	Bachhofer
	Doc-It	UVP
	P91D	Mitsubishi
Gelelektrophorese	E844	Consort
Homogenisator	Tissue LyserII	Qiagen
Inkubator	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshaker	Gerhardt
	ES-20	PeqLab
Kippschüttler	Rotor Shaker Genie	Scientific Industries
Luminometer	CHAMELEON Plate	HIDEX
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
Mikroskop	Stemi SV11	Zeiss
	HBO 50 Axioskop	Zeiss
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
NanoDrop Photometer	NanoPhotometer 7122	Implen

	V1.4	
PCR Cycler	T-Gradient	Biometra
	C1000 Thermal Cycler	Biorad
PCR Detection System	CFX 96 Real Time System	Biorad
Peristaltikpumpe	REGLO ICC	Ismatec
pH Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV	Pharmacia Biotech
Rundschüttler	Rotamax 120	Heidolph
SDS-PAGE System	Mini Protean Tetra System	BioRad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls	Bandelin
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vortexer	MS3 basic	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
	BP 110S	Sartorius
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5424	Eppendorf
	Typ 5424R	Eppendorf
	Universal 16	Hettich

4.1.3. Software

Für alle *in silico* Analysen wurden folgende Programme und online zur Verfügung stehende Software verwendet:

- **TAIR**
<https://www.arabidopsis.org/>
(Ermittlung von DNA Sequenzen)
- **Arabidopsis eFP Browser**
http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi
(Ermittlung von Genexpressionsdaten)
- **BLAST**
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
(Homologie-Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen)
- **Clustal Omega**
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
(Aminosäure Alignment)
- **RCSB PDB**
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
(Kristallstrukturen von Proteinen)
- **Primer3Plus**
<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>
(Primerdesign)
- **Gentle, Vector NTI** (Invitrogen)
(Alignments, Übersetzung der DANN in Aminosäuresequenz, Generierung von Vektorkarten)
- **ImageJ**
<http://imagej.nih.gov/ij/>
(Ausmessen des Wurzelwachstums)
- **FV10-ASW** Version 04.00.02.09 (Olympus)
(Bearbeitung der Mikroskopie-Bilder)
- **PyMOL**
<https://www.pymol.org/>
(Bearbeitung der Kristallstruktur von Proteinen)

- **MEGA6**
<http://www.megasoftware.net/>
 (Erstellen von phylogenetischen Bäumen)
- **ACD/ChemSketch** (Freeware) 2015 (www.acdlabs.com)
 (Erstellung von chemischen Strukturen)
- **Statistik - Excel**
 (T-Test zweier Stichproben mit unterschiedlicher Varianz, Konfidenzintervall)

4.1.4. Verwendete Organismen und ihre Kultivierung

Tab. 2 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	#	Quelle
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96, relA1	keine	3334	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ M15 Tn10(Tetr)]	Tetracyclin	3340	Stratagene (Heidelberg)
BL21 (E3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) galdcmrne131 (DE3)	keine	4481	Promega (Fitchburg, USA)
Rosetta pLys	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) galdcm (DE3) pLysSRARE (Cam ^R)	Camalexin	2470	Merck Millipore (Billerica, USA)

Tab. 3 *Agrobacterium tumefaciens* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	#	Quelle
C58 GV3101	Ti Plasmid pMP90/ pSOUP	Gentamycin Tetracyclin Rifampicin	625	Csaba Koncz (MPI Köln)
C58 GV3101	Ti Plasmid pMP90	Gentamycin Rifampicin	845	Csaba Koncz (MPI Köln)

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in flüssigem LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Die Flüssigkulturen wurden im Schüttler bei 200 rpm und 37 °C angezogen.

Für die Proteinexpression wurden *E. coli* in flüssigem TB-Medium über Nacht bei 18 °C und 200 rpm angezogen.

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte in flüssigem LB-Medium im Schüttler bei 200 rpm bzw. auf LB-Agarplatten bei 30 °C.

LB-Medium [g/ l]

Hefeextrakt	5
Pepton	10
NaCl	10
Agar (nur für Festmedium)	15

pH = 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren

TB-Medium [g/ l]

Hefeextrakt	24
Pepton	12
87% Glycerin	4 ml

10 x Phosphatpuffer [g/ l]

K ₂ HPO ₄	94
KH ₂ PO ₄	22

Autoklavieren, nach Abkühlen Zugabe von Phosphatpuffer.

Die Transformanten wurden mit Antibiotika im Nährmedium selektiert (Tab. 4). Die jeweiligen Antibiotika wurden zum LB-Medium hinzugegeben, nachdem es auf ca. 60 °C abgekühlt ist.

Tab. 4 Antibiotika und Konzentration im Nährmedium

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{l}/\text{ml}$]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	100	100, in sterilem mQ H ₂ O
Gentamycin	25	25, in sterilem mQ H ₂ O
Kanamycin	50	50, in sterilem mQ H ₂ O
Rifampicin	25	25, in 100 % EtOH
Tetracyclin	25	25, in sterilem mQ H ₂ O

Die Aufbewahrung der verwendeten *E. coli* sowie *A. tumefaciens* Stämme erfolgte in sterilem 87 % (v/v) Glycerin (500 μl Glycerin und 500 μl Flüssigkultur) bei - 80°C.

Tab. 5 Hefestamm

Stamm	Genotyp	#	Quelle
AH109	MATa, trp1-109, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2AS-GAL2TATA-ADE2, URA::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	3332	Clontech Matchmaker- System

Die Kultivierung der verwendeten Hefen erfolgte im flüssigen SD- oder YPD-Medium bzw. auf SD-Agarplatten bei 30 °C. Die Flüssigkulturen wurden im Schüttler bei 200 rpm angezogen.

SD-Medium

Makrosalze (10 x), steril	100 ml/ l
Mikrosalze (1000 x), steril	1 ml/ l
mQ H ₂ O	800 ml/ l

Material & Methoden

Agar (nur für Festmedium) 20 g/ l
pH = 5,8 (KOH)

Nach dem Autoklavieren Medium auf 50 °C abkühlen lassen und folgendes hinzufügen:

Dropout-Lösung (10 x), steril 100 ml/ l
Supplement (100 x), steril 10 ml/ l
Glucose (40 %), steril 50 ml/ l

1000 x Mikrosalze für SD	[mg/ l]	10 x Makrosalze für SD	[g/ l]
Biotin	2	Kaliumhydrogenphosphat	10
Pantothensäure Calciumsalz	400	Magnesiumsulfat Heptahydrat	10,24
Folsäure	20	Natriumchlorid	1
Myo-Inositol	2000	Calciumchlorid Anhydrat	1
Nicotinsäure	400	Ammoniumsulfat	50
p-Aminobenzolsäure	200		
Pyridoxinhydrochlorid	400		
Riboflavin	200		
Thiamin HCl	400		
Borsäure	500		
Kupfersulfat	40		
Kaliumiodid	100		
Eisen-II-chlorid	200		
Mangansulfat	400		
Natriummolybdän	200		
Zinksulfat	400		

Die Mikrosalze werden in Aliquotes bei - 20°C gelagert.

10 x Dropout Lösung	[mg /l]	Supplement Lösung	[g /l]
L-Adenin Hemisulfatsalz	200	Histidin-Supplement (100 x)	2
L-Arginin HCl	200	Leucin-Supplement (100 x)	10
L-Isoleucin	300	Tryptophan-Supplement (100 x)	2
L-Lysin HCl	300		

L-Methionin	200
L-Phenylalanin	500
L-Threonin	2000
L-Tyrosin	300
L-Uracil	200
L-Valin	1500

YPD	[g/ l]
Pepton	20
Hefeextrakt	10
mQ H ₂ O	950 ml
Agar (für Festmedium)	20

Nach dem Autoklavieren werden 50 ml Glucose (40 %) hinzugegeben.

Die Selektion transformierter Hefen in flüssigem bzw. festem SD-Medium erfolgte, entsprechend der Plasmid Eigenschaften (Mangel an Aminosäuren), mittels verschiedener Supplement Lösungen.

4.1.5. Verwendetes Pflanzenmaterial und ihre Kultivierung

In dieser Arbeit wurde mit den Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* (Wildtyp) gearbeitet.

Von *A. thaliana* wurde der Ökotypen Columbia (Col-0) sowie die in diesem Ökotyp generierte Mutante *aba2-1*, Einzelknockouts für *RCAR7* und *RCAR9*, die Doppelknockouts *rcar7x9*, *rcar7x10* bzw. *rcar8x9* und die Triple Knockouts für *rcar7x8x9* bzw. *rcar7x8x10* verwendet. Diese Pflanzen dienten als Material für RNA Extraktion, Generierung von Protoplasten, physiologische Untersuchungen und wurden für stabile Pflanzentransformation verwendet. Der Ökotyp Col-0 ist über das *Arabidopsis Biological Resource Center* in Ohio, USA, erhältlich, die *aba2-1* Mutante wurde vom Nottingham Arabidopsis Stock Center bezogen ebenso wie die Einzelknockouts für *RCAR7* (SALK 071488), *RCAR8* (SM 3.3493), *RCAR9* (SM 3.17321) und *RCAR10* (SAIL 517C08). Die Doppel- und Triple Knockoutlinien wurde durch Kreuzen der

Elternpflanzen durch Johanna Berger (ehemalige TA am Lehrstuhl für Botanik) generiert und auf Homozygotie selektiert.

Die Anzucht von *A. thaliana* und *N. benthamiana* erfolgte in Töpfen, mit einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ 7), in Phytokammern (Convicon, Kanada) unter Langtagbedingungen von 16 h mit Licht ($\sim 180 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22°C, 65 % Luftfeuchtigkeit) und für 8 h in Dunkelheit (17°C, 75 % Luftfeuchtigkeit). Unter diesen Bedingungen lag die Generationszeit für *A. thaliana* bei 6 bis 8 Wochen.

Für sterile Kultivierung von *A. thaliana* wurden die Samen sterilisiert und auf MS-Agarplatten ausgebracht. Zur Brechung der Dormanz wurden die Samen für 48 h bei 4 °C stratifiziert. Die Keimung erfolgte im Zellkulturraum unter konstanten Lichtbedingungen ($60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bei 22 °C.

4.1.6. Enzyme und Oligonukleotide

Alle eingesetzten Enzyme sowie Puffer und Größenstandards wurden von Fermentas (Thermo Scientific GmbH, Deutschland), New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) und Promega GmbH (Mannheim, Deutschland) verwendet. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen und mit mQH_2O auf eine Stammkonzentration von 100 μM eingestellt. Die eingesetzten Oligonukleotide können dem Anhang (Tab. 15) entnommen werden.

Für die Herstellung der Enzymlösung, zur Protoplastierung, wurde Cellulase Onozuka R10 und Macerozym R10 importiert (Yakult Honsha Co. Ltd., Japan)

4.1.7. Plasmide und Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten und generierten Konstrukte können dem Anhang (Verwendete Plasmide) entnommen werden. Sie sind nach der Lehrstuhlinterne Stammsammlung nummeriert und werden in entsprechenden *E. coli* oder *A. tumefaciens* Stämmen bei -80 °C gelagert.

Der in dieser Arbeit neu klonierter pSK Ascl eGFP:miniSOG Vektor, für Lokalisierungsstudien, wird im Folgenden kurz beschrieben.

4.1.8. Erstellung eines Reporter-gen fusionierten Vektor-Plasmids

Für die Generierung eines geeigneten Reporter-gen-Konstruktes, zur Lokalisierung der endogenen RCARs *in planta*, wurde pmCherry-miniSOG-N1 (Shu et al. 2011), pSK Ascl eGFP (generiert von Dr. Czap, ehemaliger Lehrstuhlmitarbeiter) und pSK Ascl p35S (Hoffmann 2001) verwendet (Abb. 4-1 und Abb. 4-2).

Die Sequenz von mCherry:miniSOG wurde mit entsprechenden Klonierungsprimern (#1337 und #1338, siehe Anhang Tab. 15) aus dem Ausgangsmaterial amplifiziert, das zuvor von Frau Dr. Assaad vom Urheber bestellt wurde (Shu et al. 2011). Ein Teil der Multiple Cloning Site (MCS) von der pmCherry-miniSOG-N1 Ausgangssequenz wurde beibehalten (Abb. 4-2). Zeitgleich erfolgte die Entfernung des konstitutiv aktiven p35S mit den Restriktionsenzymen FseI und SacI aus dem Vektor pSK Ascl p35S (Hoffmann 2001), um das Vektor-Rückgrat als Ausgangs-Plasmid weiterverwenden zu können. Anschließend erfolgte die Ligation von mCherry:miniSOG mit dem Vektor-Rückgrat von pSK Ascl sowie das Einbringen einer neuen Ascl Schnittstelle in der Position von FseI mit Hilfe von Oligo-Nukleotiden (#1861 und #1862, siehe Anhang Tab. 15) (Abb. 4-1). Diese zweite Ascl Schnittstelle wurde benötigt, um die pRCAR::RCAR:Reportergene fusionierte Vektorkassette in ein binäres Vektorsystem zu klonieren, welches wiederum für die stabile Transformation in *Arabidopsis* mit Hilfe von *A. tumefaciens* zu einem späteren Zeitpunkt benötigt wurde.

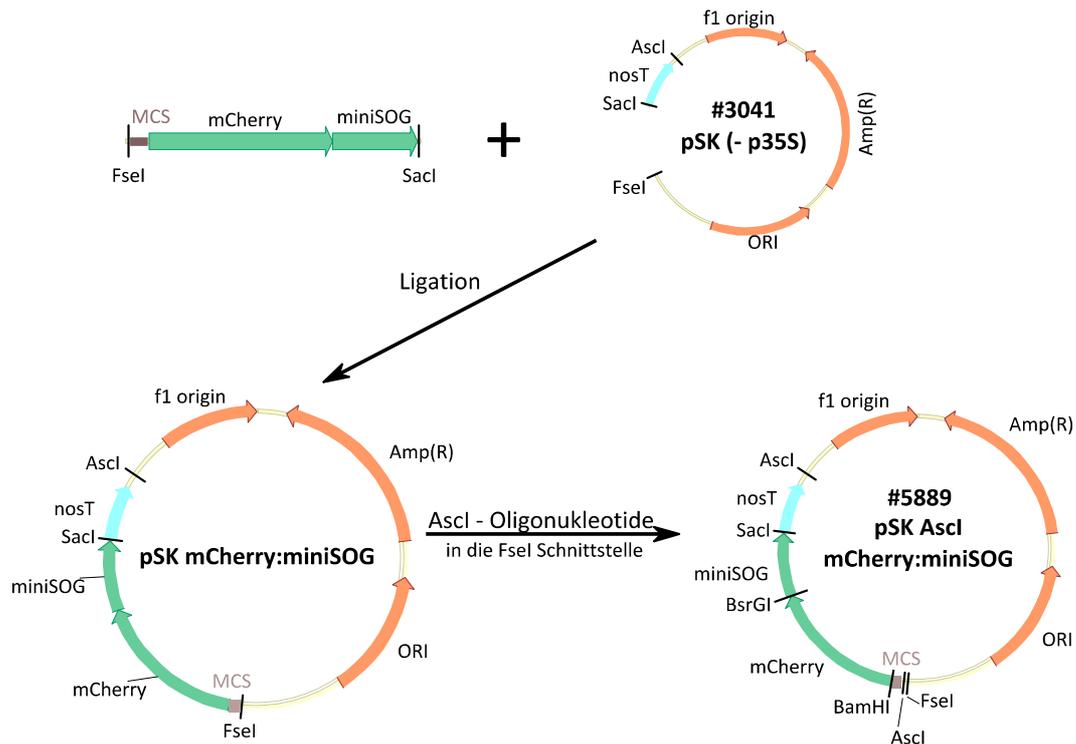


Abb. 4-1 Schematische Darstellung für die Klonierung von mCherry:miniSOG in pSK Ascl.

Details zur Umklonierung können dem Text entnommen werden.

Im nächsten Schritt wurde die mCherry-Sequenz durch die Restriktionsenzyme BamHI und BsrGI entfernt und durch die eGFP-Sequenz, gekoppelt an einen 10-fach Alanin-Linker, ersetzt (Abb. 4-2). Das Reporter-gen mCherry wurde gegen eGFP ausgetauscht, da die Lokalisation der endogenen RCARs in allen Entwicklungsstadien von transgenen Arabidopsis Pflanzen untersucht werden sollte und für einige RCARs ein sehr geringes Genexpressionslevel postuliert wurde (Schmid et al. 2005; Winter et al. 2007; Kilian et al. 2007). Aus diesem Grund wurde eGFP als Fluoreszenzprotein gewählt, da mCherry eine deutlich geringere Helligkeit und Photostabilität aufweist, verglichen zu eGFP (Shaner et al. 2005) und für die Lokalisation der RCARs *in planta* ein stark fluoreszierendes Fusionsprotein benötigt wird.

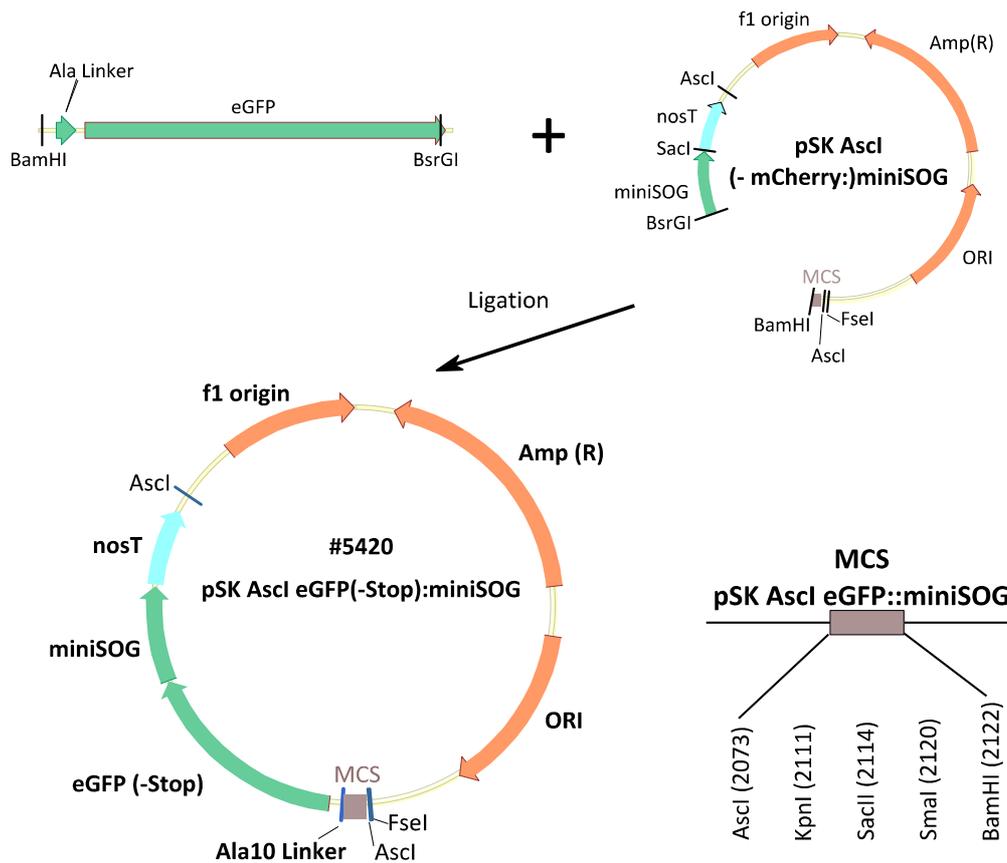


Abb. 4-2 Schematische Darstellung zur Generierung von pSK Ascl eGFP:miniSOG und MCS.

Details zur Umklonierung von pSK Ascl mCherry:miniSOG zu pSK Ascl eGFP:miniSOG können dem Text entnommen werden.

4.1.9. Generierung der Vektor-Plasmide für die RCAR Lokalisation

Für die Lokalisation aller 14 RCARs *in planta* wurden 2-3 kbp der jeweiligen putativen Promotorregion vor dem Startcodon sowie die nachfolgende genomische DNA aus *A. thaliana* (Col-0) (siehe Putative Promotorregionen und gDNA der RCARs)mit entsprechenden Primern amplifiziert (siehe Anhang, Tab. 15). Anschließend erfolgte die Klonierung in den Reporter-gen-Vektor pSK Ascl eGFP:miniSOG mit Hilfe spezifischer Restriktionsenzyme, die in der Primer-Sequenz bereits enthalten waren. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde die pRCAR::RCAR:eGFP:miniSOG Fusionscassette über die Ascl Restriktionsschnittstelle in das binäre Vektorsystem pGreen Ascl BAR (#5238, Tab. 19) bzw. pBI Ascl BAR (#690) kloniert, mit *A. tumefaciens* stabil in Arabidopsis transformiert und auf Homozygotie selektiert

4.2. Physiologische Methoden

4.2.1. Oberflächensterilisation von Arabidopsis Samen

Für die sterile Anzucht von Arabidopsis wurden zunächst die Samen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 80 % (v/v) EtOH und 0,1 % (v/v) Triton X-100 für 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgte die Sterilisation der Samen mit 3 % NaOCl-Lösung für 3 min. Als nächstes wurden die Samen fünf Mal mit autoklaviertem ddH₂O unter der Sterilbank gewaschen und gleichmäßig auf MS-Agarplatten ausgebracht.

MS-Medium [pro Liter] (Murashige and Skoog 1962)

Mikrosalze für MS (400 x)	2,5 ml
Makrosalze für MS (10 x)	100 ml
Saccharose	10 g
MES	1 g
Agar	9 g
pH = 5,8 (KOH)	
autoklavieren	

400 x Mikrosalze für MS	[g/ l]	10 x Makrosalze für MS	[g/ l]
Eisen-II-Sulfat Heptahydrat	11,12	Ammoniumnitrat	16,5
Na ₂ EDTA Dihydrat	14,89	Kaliumnitrat	19
Kaliumjodid	0,3	Kaliumhydrogenphosphat	1,7
Magnesium-II-Sulfat H ₂ O	4,0	Calciumchlorid Dihydrat	4,4
Borsäure	1,2	Magnesiumsulfat Heptahydrat	3,7
Zinksulfat Heptahydrat	0,8		
Natrium-Molybdat Dihydrat	0,1		
Kupfersulfat Pentahydrat	0,01		
Kobalt-II-Chlorid Hexahydrat	0,01		

Die MS Mikrosalze wurden als Aliquoten bei -20 °C gelagert. Die MS Makrosalze wurden nach dem Autoklavieren bei RT gelagert.

Zum autoklavierten und auf 50 °C abgekühlten MS-Medium wurde Abscisinsäure (0,1 bis 30 µM), Antibiotika (25 mg/ml Kanamycin) oder Glufosinat-Ammoniumsalz (10 mg/ml) hinzugegeben. Die benötigten MS-Platten wurden unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

ABA-Stocklösung: 5 mM 2-*cis*-4-*trans*-(+) Abscisinsäure (London Bio Technology, China, <http://www.lomonbio.com>) in 10 mM MES in Wasser (pH = 7,0).

4.2.2. Keimungsversuche

Die Untersuchung des Keimungsverhaltens der Arabidopsis Samen erfolgte auf MS-Agarplatten mit verschiedenen Konzentrationen an ABA (0 bis 5 µM). Arabidopsis Samen, von gleichem Alter, wurden sterilisiert und einzeln auf die entsprechenden MS-Platten ausgebracht. Zur Brechung der Samenruhe erfolgte die Stratifizierung für 48 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Platten mit den Samen waagrecht in den Zellkulturraum gestellt und unter Dauerlicht ($60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) und konstanten 22 °C zum Keimen gebracht. Die Keimung wurde nach 3 Tagen im Zellkulturraum ausgewertet. Die Keimung wurde als erfolgreich gewertet, wenn der Durchbruch der Radicula durch die Samenschale sichtbar war. Pro Arabidopsis Linie und ABA-Konzentration wurden 3 x 30 Samen analysiert.

4.2.3. Wurzelversuche

Das Wurzelwachstum von Arabidopsis Keimlingen wurde auf MS-Platten mit verschiedenen ABA-Konzentrationen (0 bis 30 µM) analysiert. Für diese Untersuchung wurden 4 Tage alte, vertikal gekeimte Arabidopsis Keimlinge mit einer Federstahlpinzette auf ABA-haltige MS-Platten umgesetzt und erneut für 3 Tage vertikal im Zellkulturraum inkubiert. Zu Versuchsbeginn wurde die aktuelle Position der Wurzelspitze (mit einem wasserfesten Stift oder einer Nadel) auf der Platte markiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die MS-Platten mit den Keimlingen eingescannt (HP Scanjet G4050) und mit Hilfe der Software ImageJ 1.48v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) und MS Excel 2010 ausgewertet. Pro Arabidopsis Linie und ABA-Konzentration wurde für jeweils 30 Keimlinge das Wurzelwachstum untersucht.

4.2.4. Stomata-Versuche

Für die Analyse der Spaltöffnung wurden Blätter von 2 bis 3 Wochen alten Arabidopsis Pflanzen verwendet. Die Blätter wurden separat in einer mit 1,5 ml Inkubationsmedium gefüllte 12-Well-Platte transferiert und für 2,5 h mit Belichtung von Weißlicht ($150 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bei RT vorinkubiert, um das Öffnen der Stomata anzuregen. Das Weißlicht wurde mit einem Wasserbad gefiltert, damit eine Erwärmung der Proben bzw. des Inkubationsmediums zu verhindert wurde. Nach der Vorinkubation von 2,5 h wurden die Blattproben in neue 12-Well-Platten mit Inkubationsmedium transferiert, welche mit verschiedenen ABA-Konzentrationen (0 bis 5 μM) versetzt waren. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 2 h unter den gleichen Bedingungen wie bereits angegeben (Gonugunta et al. 2008; Kolla et al. 2007). Nach Beendigung der Inkubation wurden die Blätter vorsichtig mit Papiertüchern trocken getupft. Anschließend wurde die Epidermis der Blattunterseite mit Hilfe zweier Tesa-Filmstreifen abgezogen und auf einen Objektträger geklebt. Die Stomata wurden mittels einer mit dem Lichtmikroskop verbundenen Kamera fotografiert. Die Messung von Länge und Breite der Spaltöffnung erfolgte mit der Software ImageJ 1.48V. Die Auswertung und grafische Darstellung der Stomata Apertur (Verhältnis: Breite zu Länge) erfolgte mit Hilfe von MS Excel 2010. Für den Spaltöffnungsversuch wurden pro Arabidopsis Linie und ABA-Konzentration 2 x 20 Stoma analysiert.

Inkubationsmedium

MES 10 mM

pH = 6,15 (KOH)

Kaliumchlorid 50 mM

Inkubationsmedium wird steril-filtriert und bei -20°C gelagert.

4.2.5. Floral Dip von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte mit Hilfe des *A. tumefaciens* vermittelten Transfers nach der Floral Dip Methode (Clough and Bent 1998; Zhang et al. 2006). Als binärer Ausgangsvektor wurden pGreen (Hellens et al. 2000) oder pBI121 (Jefferson 1987) für die Klonierung der Konstrukte verwendet. Für die Transformation wurden, in einer 3 ml Übernachtskultur mit selektivem Medium (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin,

50 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Rifampicin), *Agrobacterium* Zellen mit dem gewünschten Konstrukt aus einer einzelnen Kolonie bei 30 °C angezogen. Mit der frischen Vorkultur wurde eine 200 ml Hauptkultur (ohne Selektion) angeimpft und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die *Agrobacterium* Zellen wurden danach bei 3000 g und 4 °C für 10 min geerntet und in 300 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Der Floral Dip wurde mit 3 Wochen alte Arabidopsis Pflanzen durchgeführt, die zu mehreren in einem Topf wuchsen und bei die Infloreszenz bereits vorhanden war. Hierfür wurden die Infloreszenzen kopfüber für mehrere Sekunden in die *Agrobacterium* Zellsuspension getaucht, ggf. wurden einzelne Infloreszenzen mit der Zellsuspension separat benetzt. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen wurde dieser Vorgang nach 5 Tagen wiederholt. Die infiltrierten Pflanzen wurden anschließend für ca. 6 Wochen, bis zur vollständigen Samenreife, kultiviert. Die Samen (T0) wurden mit Hilfe von Kanamycin (20 µg/ml) im MS Medium (pBI121) bzw. mittels BASTA/ Glufosinat-Ammonium (10 µg/ml) auf Erde/ im MS Medium nach positiven Transgenen selektiert. Die Transformationseffizienz betrug i.d.R. zwischen 0,1 und 1 %.

Infiltrationsmedium

Saccharose (7 % Endkonzentration)	70 g/ l
MES	0,5 g/ l
pH = 5,8 (KOH)	
Silwet L-77	500 µl/ l

4.2.6. Tabakinfiltration

Für die Agroinfiltration wurde der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 verwendet. Als binäre Ausgangsvektoren für die Konstrukte wurden auch hier pGreen (Hellens et al. 2000) bzw. pBI121 (Jefferson 1987) verwendet. Zunächst wurden die *Agrobacterium* Zellen über einen Zeitraum von 24 h in 20 ml LB mit Selektion (25 µg/ µl Gentamycin, 50 µg/ µl Kanamycin, 50 µg/ µl Rifampicin) bei 28 °C und 200 rpm angezogen. Die Zellen wurden bei 4500 rpm für 10 min geerntet, im Tabakinfiltrationsmedium resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 eingestellt. Vor der Infiltration inkubierte die *Agrobacterium* Kultur für 3 h bei RT und 70 rpm (Wydro et al. 2006). Für die Tabakinfiltration wurden junge Blätter von 5 bis 7 Wochen alte *N. benthamiana* Pflanzen verwendet. Die Blattunterseite wurde mit einem 1:1

Mix aus dem binären Ausgangsvektor, welches das entsprechende Konstrukt beinhaltet, sowie dem binären Vektor, welcher den viralen Suppressor p19 (unter konstitutiv aktivem Promotor) beinhaltet, mit einer 2 ml Spritze, ohne Nadel, infiltriert. Der Suppressor p19 sorgt für eine höher transiente Proteinexpression in Blättern von *N. benthamiana* (Voinnet et al. 2003). Das p35S::p19-Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Glawischnig (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Die infiltrierten Tabakblätter wurden nach 3 Tagen (Liu et al. 2010) mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie analysiert.

Tabakinfiltrationsmedium

Magnesiumchlorid	10 mM
MES	10 mM
pH = 5,7 (KOH)	
Acetosyringon	150 µM

4.2.7. Isolierung von Arabidopsis Protoplasten

Die Präparation und Transfektion von Arabidopsis Mesophyll Protoplasten erfolgte nach modifizierten Protokollen (Abel and Theologis 1994; Yoo et al. 2007). Für die Protoplastierung wurden 2 bis 3 Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Von diesen Pflanzen wurden 2 bis 3 g Blattmaterial vorsichtig abgeschnitten und mit 16 ml Enzymlösung in einer Petrischale vollständig benetzt. Das Blattmaterial wurde im Inkubator über einen Zeitraum für 4 h bei 25 °C und 50 rpm verdaut. Die Protoplastensuspension wurde mit Hilfe eines Nylon-Netz (150 µm Maschenweite) gefiltert, um unverdautes Pflanzenmaterial abzutrennen. Die Petrischale wurde mit 10 ml W5 Lösung gespült und zur Protoplastensuspension hinzugefügt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 2 min und 60 g. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wieder in 10 ml W5 Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten in einem geeigneten Volumen in MaMg-Lösung aufgenommen. Zur Überprüfung der Vitalität der Protoplasten und um ihre Zellzahl zu bestimmen wurden die Zellen mit Fluoresceindiacetat angefärbt. 50 µl Protoplasten wurden mit 0,5 µl Fluoreszein Diacetat (FDA) versetzt. Mit Hilfe einer Thomakammer (Zählkammer) wurde die Anzahl fluoreszierender Protoplasten pro

Volumeneinheit mit einem Zeiss Axioskop und HBO 50 und einem FITC Filtersatz (480 nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 nm Emissionsfilter) bestimmt (Widholm 1972; Huang et al. 1986). Die Protoplastensuspension wurde anschließend mit MaMg-Lösung auf $0,5 - 1 \times 10^6$ Protoplasten pro ml eingestellt und für mind. 30 min bei 4 °C inkubiert.

Die Herstellung der Enzymlösung sowie die für die Dialyse benötigten Schläuche erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook and Russell 2001). Die Dialyseschläuche wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt. Eine Stammlösung mit 2 % Cellulase, 0,5 % Macerozym, AEBSF und 10 mM MES (pH = 5,6) wurde zweimal für jeweils 40 min gegen 10 mM MES (pH = 5,6) dialysiert. Anschließend wurde Mannitol und CaCl₂ zugesetzt. Unter Kontrolle des pH-Wertes (5,6) wurde BSA hinzugefügt und die fertige Lösung durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Die Enzymlösung wurde in 50 ml Aliquotes bei -20 °C gelagert.

Enzymlösung

Cellulase „Onozuka“ R - 10 (Yakult, Tokyo, Japan)	1 % (w/ v)
Macerozym R – 10 (Yakult, Tokyo, Japan)	0,25 % (w/ v)
AEBSF	2,5 nM
Mannitol	400 mM
CaCl ₂	8 mM
MES	5 mM
BSA	0,6 % (w/ v)
pH = 5,6 (KOH)	

MaMg-Lösung

Mannitol	400 mM
MgCl ₂	15 mM
MES	5 mM
pH = 5,7 (KOH)	

W5 –Lösung

NaCl	154 mM
CaCl ₂	125 mM
KCl	5 mM
MES	2 mM
pH = 5,7 (KOH)	

FDA-Lösung

1 mg/ ml in Aceton

4.2.8. Transfektion von Protoplasten

In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden die zu transfizierende DNA vorgelegt:

pRD29B::LUC Reporter Plasmid	5 µg
35S::GUS Reporter Plasmid	3 µg
Effektor Plasmid/ leerer Vektor DNA	x µg
Mannitol (0,8 M)	25 µl
ad mQ H ₂ O auf Σ	50 µl

Zu der in den 2 ml Reaktionsgefäßen vorgelegter DNA wurden jeweils 100 µl der Protoplastensuspension sowie 130 µl PEG hinzugegeben. Das PEG fördert dabei die Löslichkeit der DNA. Mit anschließender Zugabe von 1 ml W5-Lösung wurde die Transfektion abgestoppt. Die Reaktionsgefäße mit dem Protoplastenansatz wurden erneut mehrmals invertiert und für 2 min bei 250 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Protoplasten-Pellet in 250 µl WIMK aufgenommen. Jeder Protoplastenansatz wurde anschließend in jeweils zwei 120 µl Aliquoten aufgeteilt und mit oder ohne ABA versetzt. Die Inkubation der Protoplastenansätze erfolgte in 96-Well Platten bei konstanten 25 °C im Inkubator für 18 h bei Licht.

PEG		WIMK	
PEG 4000	40 % (w/ v)	Mannitol	500 mM
Mannitol	200 mM	KCl	20 mM
CaCl ₂	100 mM	MES	4 mM
		pH = 5,7 (KOH)	

ABA-Stocklösung

ABA	5 mM
MES	10 mM
(pH = 7,0 bis 7,5)	

Aus dieser Stocklösung wurden immer frische ABA-Verdünnungen mit WIMK hergestellt. Die Endkonzentration von ABA betrug zwischen 0,5 μM bis 300 μM in den Protoplastenproben.

4.2.9. Messung der β -D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten

Das 35S::GUS Reporter Plasmid wurde zur Bestimmung der Transformationseffizienz und zur Normalisierung der LUC Aktivität für jeden Protoplastenansatz verwendet. Hierfür wurde die Aktivität der β -Glucuronidase fluorimetrisch bestimmt, durch die Umsetzung des Substrats 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG). Methylumbelliferon kann fluorimetrisch bei 365 nm Anregung und 460 nm Emission quantifiziert werden. Die GUS- Messung wurde in schwarzen Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 50 μl Protoplastenansatz mit 100 μl einer 1,5 x MUG- Puffer versetzt und über einen Zeitraum von 10 min bei 37 °C im BioTek Synergy 2 Plate Reader gemessen. Die GUS-Aktivität wurde dabei über die Zunahme der relativen Fluoreszenz pro Zeiteinheit als RFU/ sec (*relativ fluorescence units*) bestimmt, welche direkt proportional zur Enzymaktivität ist.

1,5 x MUG-Puffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/ \text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH = 7,0	50 mM
Na_2EDTA	10 mM
Triton X100	0,1 %
DTT	1 mM
4-Methylumbelliferyl-b-D-Glucuronid	0,5 mM

4.2.10. Messung der Luciferase-Aktivität in Protoplasten

Das zweite Reporter Plasmid (RD29B::LUC) enthält das Promotorelement von RD29B, ein ABA abhängiges Gen, das wiederum das Luciferase Gen im Plasmid kontrolliert. Wird die ABA Signalkaskade in den Protoplasten aktiviert, kommt es zeitgleich zur starken Expression des Luciferase Genes, welche wiederum gemessen werden kann. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 50 μl Protoplasten in eine weiße 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und im Luminometer gemessen. Im Luminometer wurde zu jeder Protoplastenprobe separat 100 μl LAR Substrat hinzugefügt, welches die

Lumineszenzreaktion startete. Das durch das LAR Substrat emittierte Licht wurde über einen Zeitraum von jeweils 20 sec gemessen und als (Counts per second) ausgegeben. Die relative Aktivität von LUC zu GUS gibt die Aktivierung der ABA-abhängigen Antwort wieder.

LAR (Luciferase Assay Reagent)

Tricin (NaOH pH = 7,8)	20 mM
MgSO ₄	2,7 mM
EDTA	0,5 mM
DTT	33,3 mM
ATP	0,53 mM
MgCO ₃	1 mM
Coenzyme A	250 µM
Luciferin	500 µM

Das LAR Substrat wurde sterilfiltriert und in 50 ml Aliquotes bei -20 °C gelagert.

4.3. Molekularbiologische Methoden

Die hier beschriebenen Methoden der Herstellung und Transformation kompetenter Zellen, Restriktionsverdau, Dephosphorylierung, Ligation, PCR und Agarosegelelektrophorese wurden, sofern nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (Sambrook and Russell 2001) durchgeführt.

4.3.1. Herstellung kompetenter *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine 250 ml Hauptkultur (Medium A) bei 18 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4 °C, für 15 min bei 2500 g geerntet. Das Pellet wurde mit 80 ml eisgekühltem TB-Medium resuspendiert, mit 0,7 ml DMSO versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden in

Aliquotes zu 200 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Medium A		TB-Medium	
Pepton	20 g/ l	PIPES (pH = 6,4)	10 mM
Hefeextrakt	5 g/ l	MnCl ₂	55 mM
NaCl	10 mM	CaCl ₂	15 mM
KCl	2,5 mM	KCl	250 nM
MgCl ₂	10 mM		
MgSO ₄	10 mM		

Elektrokompetente *A. tumefaciens* Zellen

Eine 500 ml Hauptkultur mit Selektion im LB-Medium wurde mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ = 0,1 angeimpft. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 30 °C und 200 rpm bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 erreicht wurde. Die *A. tumefaciens* Kultur wurde auf Eis abgekühlt und bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit 500 ml eisgekühltem mQH₂O gewaschen und erneut bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nachdem dieser Wasch- und Zentrifugationsschritt noch einmal wiederholt wurde, wurden die Pellets in jeweils 20 ml 10 % (v/ v) sterilem Glycerin resuspendiert und erneut für 10 min und bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in insgesamt 9 ml 10 % (v/ v) Glycerin (steril) resuspendiert, als 100 µl Aliquote in flüssigem N₂ Schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.2. Transformation kompetenter *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* Zellen

Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 bis 200 ng DNA bzw. 2 bis 5 µl Ligationsansatz versetzt und kurz durchmischt. Es folgte eine Inkubation für mind. 30 min auf Eis mit anschließendem Hitzeschock für 60 sec. bei 42 °C. Die Zellen wurden für 1 bis 3 min auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und inkubierten für 1 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C. Die *E. coli* Zellen wurden bei 6000 rpm für 5 min geerntet und auf selektiven LB-Agar ausplattiert. Das Wachstum transformierter Zellen

erfolgte über Nacht bei 37 °C. Gewachsene Zellen wurden anschließend mittels Kolonie PCR und Kontrollverdau überprüft.

Transformation von elektrokompetenten *A. tumefaciens*

Die elektrokompetenten *A. tumefaciens* Zellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Zu den kompetenten Zellen wurde 10 bis 50 ng DNA zugegeben und gemischt. Nach dem Vorkühlen der sterilen Küvette wurden die kompetenten *A. tumefaciens* Zellen samt DNA in die Küvette gegeben. Bei einem Küvettenelektrodenabstand von 0,2 cm wurden nachfolgende Elektroporationsparameter eingestellt: $V = 2500 \text{ V}$, $C = 25 \text{ }\mu\text{F}$, $R = 700 \text{ }\Omega$, $t = \text{mind. } 4 \text{ sec}$. Nach dem Elektroimpuls wurden 800 μl LB-Medium zum Ansatz hinzugegeben, gut durchmischt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 30 °C und 200 rpm. Die Zellen wurden anschließend bei 6000 rpm für 5 min geerntet und auf LB-Agarplatten mit Selektion ausgebracht. Das Wachstum der transformierten *A. tumefaciens* Zellen erfolgte für 2 Tage bei 30 °C. Die Transformanten wurden anschließend mittels Kolonie PCR und Kontrollverdau überprüft.

4.3.3. Plasmid-Präparation

Plasmid Mini Präparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte über Säulen gemäß den Herstellerangaben des Kits „Plasmid DNA purification“ der Firma Macherey-Nagel. Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Plasmid DNA erfolgte mittels eines NanoDrops.

Plasmid Midi/ Maxi Präparation

Um größere Mengen an aufgereinigter Plasmid-DNA zu erhalten wurde das JETSTAR Midiprep bzw. Maxiprep Kit der Firma Genomed (Löhne, Deutschland) verwendet. Die Plasmid Midi/ Maxi Präparation erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die aufgereinigte DNA wurde in einem geeigneten Volumen von mQ H₂O aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das NanoDrop verwendet.

4.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, welche für die Klonierung benötigt wurden, erfolgte mit einer proofreading Polymerase (Phusion High Fidelity, Thermo Fisher bzw. *Pfu* DNA Polymerase, Promega). Zur Überprüfung von Transformanten wurde die GoTaq[®] Polymerase (Promega) oder die Phusion High Fidelity (Thermo Fisher), für DNA-Fragmente < 2 kb, verwendet. Die Überprüfung transgener Pflanzen erfolgte mit Hilfe des KAPA3G Plant Kits (Promega), welches das direkte Arbeiten mit kleinerem Pflanzenmaterial als Probe bzw. Template erlaubt. Die Zusammensetzung der durchgeführten PCRs ist den anschließenden Tabellen (Tab. 6 und Tab. 7) zu entnehmen.

Tab. 6 Allgemeiner Ansatz für Klonierungs- und Kolonie PCR

	20 µl Ansatz	Endkonzentration
5 x Phusion HF Puffer	4 µl	1 x
10 x <i>Pfu</i> DNA Polymerase Puffer	2 µl	1 x
5 x Grüner oder Weißer GoTaq [®] Puffer	4 µl	1 x
10 mM dNTPs	0,4 µl	200 µM
Template	X µl	1-20 ng
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl	0,02 U/ µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Variabel	1,25 U/ µl
GoTaq DNA Polymerase	0,1 µl	1,25 U/ µl
20 µM fw Primer	0,5 µl	0,5 µM
20 µM rev Primer	0,5 µl	0,5 µM
MnCl ₂ (wenn benötigt)	Variabel	< 10 mM
DMSO (wenn benötigt)	Variabel	2-3 %
mQ H ₂ O	ad ∑ 20µl	

Tab. 7 Allgemeiner PCR – Ansatz zur Überprüfung transgener Pflanzen

	20 µl Ansatz	Endkonzentration
2 x KAPA Plant PCR Puffer (enthält MgCl ₂ und dNTPs)	10 µl	1 x
20 µM fw Primer	0,3 µl	0,3 µM
20 µM rev Primer	0,3 µl	0,3 µM
KAPA3G Plant DNA Polymerase	0,18 µl	0,45 U/ 20 µl
Template	variabel	Probenmaterial oder 1-5 ng aufgereinigte DNA
100 x KAPA Plant PCR Enhancer	0,1 µl	0-1 x
mQ H ₂ O	ad Σ 20µl	

Die Klonierungs- und Kolonie PCRs wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

Tab. 8 Thermocycler Einstellung für PCR mit Phusion DNA Polymerase

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen Anzahl
Initialdenaturierung	98 °C	30 sec	1
Denaturierung	98 °C	5-10 sec	23-35*
Primer-Annealing	X °C	10-30 sec	
Elongation	72 °C	15-30 sec/ kb	
finale Elongation	72 °C	5-10 min	1
	4 °C	∞	

* 25 Zyklen für Klonierung bzw. 35 Zyklen zur Überprüfung von Transformanten

Tab. 9 Thermocycler Einstellung für PCR mit Pfu bzw. GoTaq[®] DNA Polymerase

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen Anzahl
Initialdenaturierung	95 °C	1-2 min	1
Denaturierung	95 °C	30-60 sec	25-35**
Primer-Annealing	X °C	30-60 sec*	
Elongation	72 °C	1-2 min/ kb*	
finale Elongation	72 °C	5-10 min	1
	4 °C	∞	

* abhängig von verwendeter DNA Polymerase

** 25 Zyklen für Klonierung bzw. 35 Zyklen zur Überprüfung von Transformanten

Tab. 10 Thermocycler Einstellung für PCR mit KAPA3G Plant DNA Polymerase

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen Anzahl
Initialdenaturierung	95 °C	3-10 min	1
Denaturierung	95 °C	20 sec	40
Primer-Annealing	X °C	15 sec	
Elongation	72 °C	30 sec/ kb	
finale Elongation	72 °C	30 sec/ kb	1
	4 °C	∞	

4.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der isolierten RNA sowie Plasmid -DNA und Auftrennung von Restriktions- bzw. Klonierungsprodukten, wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte nach ihrer Molekülgröße bei einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 1 % (w/ v) in 1 x TAE Puffer. Als Größenstandards wurden handelsübliche Marker verwendet. Zur Visualisierung der RNA- bzw. DNA-Fragmente unter UV-Licht wurde der auf ca. 60 °C abgekühlten Agarose 0,1 µg/ ml EtBr zugefügt. Nachdem das Agarosegel auspolymerisiert war, wurden die DNA bzw. RNA Proben mit 6 x bzw. 2 x Ladepuffer versetzt (1 x Endkonzentration) und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 1 x TAE Laufpuffer bei 200 V und 400 mA für ca. 24 min.

50 x TAE Puffer

Trisbase	2 mM
Eisessig	5,71 % (v/ v)
EDTA (pH = 8,0)	50 mM

EtBr-Stammlösung

EtBr	10 mg/ ml
------	-----------

6 x Ladepuffer (DNA/ RNA)

Glycerin	50 % (v/ v)
Orange G	0,25 % (w/ v)
EDTA (pH = 8,0)	1 mM

4.3.6. Standardmethoden der Klonierung

DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR Produkte sowie DNA-Fragmente welche aus einem Agarosegel unter UV Licht ausgeschnitten wurden, erfolgte gemäß den Herstellerangaben des Kits „NucleoSpin® and PCR Clean-up“ von Machery-Nagel.

Verdau von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA

Für den Verdau von Klonierungs-DNA und Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) und NEB (New England BioLabs, Ipswich, USA) verwendet. Ein Ansatz setzte sich aus 0,5 bis 1 µg zu verdauender DNA, 10 x Restriktionspuffer und 0,5 bis 1 U Restriktionsendonukleasen zusammen. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 1 h, wenn nicht anders erforderlich. Die verdauten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und analysiert. DNA-Fragmente die für eine weitere Klonierung benötigt wurden, wurden unter UV Licht ausgeschnitten und dem Kit „NucleoSpin® and PCR Clean-up“ von Machery-Nagel (Düren) aufgereinigt.

Dephosphorylierung geschnittener Vektor-DNA

Linearisierte Vektor-DNA wurde nach dem Verdau anschließend dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu minimieren. Die Dephosphorylierung erfolgte nach dem Protokoll von NEB (New England BioLabs, Ipswich, USA). Zum Vektor-Verdauansatz (1 bis 5 µg DNA) wurde 1/10 des Volumens an 10 x Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer und 1 µl Antarctic Phosphatase (5 Units) hinzugegeben und gemischt. Inkubation für 15 min bei 37 °C um die Phosphatgruppe am 5' Ende oder von den Blunt-Ends abzuspalten (60 min für 3' Ende). Hitzeinaktivierung für 5 min bei 65 °C und anschließende Aufreinigung der Vektorfragmente mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Machery-Nagel (Düren).

Ligation

Für die Ligation klonierter DNA-Fragmente wurde das pGEM-T Vektor System von Promega (Mannheim) verwendet. Der pGEM-T Vektor ist ein erwerbbarer, bereits linearisierter Vektor mit einem Thymidin an beiden 3'-Enden. Für die Ligation mit dem pGEM-T Vektor war es notwendig eine anschließende Polyadenylierung nach der Klonierung des Inserts durchzuführen. Für diese Ligation wurde ein Verhältnis 3:1 von DNA-Fragment zu pGEM-T Vektor verwendet, außerdem der vom Hersteller bereitgestellte 2 x Rapid Ligase Puffer sowie 1 µl der Promega T4 DNA Ligase (3 U/ µl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Der Ligationsansatz wurde für 1 bis 2 h bei RT inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* transformiert.

Nach Verdau und Aufreinigung von Inserts und Vektoren wurde für die Ligation ein Verhältnis von 5:1 an DNA-Fragment zum linearisierten Vektor angesetzt. Die Ligation erfolgte in einem 10 µl Gesamtansatz mit 0,3 µl T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) und 1 x Ligasepuffer. Es folgte eine Inkubation ÜN bei 4 °C mit anschließender Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen.

4.3.7. Zielgerichtete Mutagenese (SDM)

Die zielgerichtete Mutagenese, kurz SDM, ist eine Methode um Mutationen gezielt in einen bereits klonierten Vektor einzubringen. Dieser Austausch, Einbringen oder Löschen einzelner Nukleotide führt zur Änderung der Aminosäuresequenz des Inserts, wodurch wiederum die

Funktionalität des Proteins untersucht werden kann. Es wurden Primer generiert die mit mind. 12 Nukleotiden an der Sequenz des Inserts binden und die gewünschte Mutation beinhalteten. In einer PCR wurde mit verschiedenen Annealing-Temperaturen, den generierten Primern und der Phusion Polymerase Einzelstrangkopien des mutierten Plasmidvektors amplifiziert (Tab. 11 und Tab. 12). 5 µl eines jeden PCR-Ansatzes wurde mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt, um das beste PCR Produkt zu ermitteln, welches anschließend mit 1 µl DpnI über Nacht bei 37 °C verdaut wurde. DpnI ist ein Restriktionsenzym, welches nur methylierte DNA schneiden kann. Der neu amplifizierte und mutierte Plasmidvektor war, im Gegensatz zum eingesetzten Template, nicht methyliert und konnte somit nicht von DpnI verdaut werden. Die neu amplifizierten Einzelstränge des mutierten Plasmidvektors konnten sich an homologe Bereiche aneinanderlagern. Der DpnI-Verdauansatz wurde nach Protokoll in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (XL1blue) transformiert. Diese *E. coli* Zellen sind i. d. L. Einzelstrangbrüche in Plasmidvektoren zu reparieren, wodurch aus den homolog aneinandergelagerten Einzelsträngen wieder ein funktionsfähiger (mutierter) Plasmidvektor entstehen konnte. Um sicherzustellen dass die gewünschte Mutation vorhanden war, wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) überprüft.

Tab. 11 Allgemeiner PCR – Ansatz für SDM

	20 µl Ansatz	Endkonzentration
2 x Phusion HF Puffer	4 µl	1 x
100 µM fw Primer	0,1 µl	0,5 µM
100 µM rev Primer	0,1 µl	0,5 µM
Phusion Polymerase	0,1 µl	0,01 U/ µl
Template	100 ng	100 ng
10 mM dNTPs	2 µl	1 mM
25 mM MgCl ₂	0,5 µl	625 µM
DMSO	0,5 µl	2,50 %
mQ H ₂ O	ad ∑ 20µl	

Tab. 12 Thermocycler Einstellung für SDM PCR

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen Anzahl
Initialdenaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	98 °C	20 sec	18
Primer-Annealing	50-70 °C (Gradient)	20 sec	
Elongation	72 °C	20 sec/ kb	
finale Elongation	72 °C	5 min	1
	4 °C	∞	

4.3.8. DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung amplifizierter Fragmente, wurde die aus positiv getesteten Transformanten auf gereinigte Plasmid-DNA durch die Firma GATC Biotech, Konstanz, sequenziert (Plasmid-DNA 80 bis 100 ng/ μ l, Primerkonzentration 5 μ M). Die Auswertung erfolgte über das Alignment-Tool der Software GENTle (GENTle V 1.9.4, Autor Magnus Manske, Universität zu Köln).

4.3.9. RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Die Isolation der Gesamt-RNA aus 12 Tage alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen erfolgte mit dem innuPREP Plant RNA Kit der Firma Analytik Jena AG (Jena). Hierfür wurden 10 bis 20 mg Pflanzenmaterial geerntet und in flüssigem N₂ schockgefroren und mit einem gekühlten Glasstab zu feinem Pulver gemörsert. Die anschließende Isolierung der RNA erfolgte nach den Herstellerangaben. Nach der Aufreinigung wurde die Gesamt-RNA mit 30 bis 40 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoDrop. Zusätzlich wurden pro Probe 0,5 bis 1 μ g Gesamt-RNA, mit 2 x Loading Dye versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen um eine mögliche Degradierung der RNA auszuschließen.

4.3.10. cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific. 0,5 bis 1 µg RNA wurden zunächst mit 1 µl DNase (1 U/ µl) und 1 µl 10 x Reaktionspuffer in einem Gesamtansatz von 10 µl für 15 bis 30 min bei 37 °C inkubiert, um möglich Kontamination mit genomischer DNA zu eliminieren. Anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und einer Inkubation für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Für die eigentliche cDNA-Synthese wurde dem Ansatz der DNase-Behandlung 1 µl Oligo (dT) Nukleotide (100 µM) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation zuerst für 5 min bei 70 °C und anschließend auf Eis für mind. 1 min. Zu diesem Ansatz wurden 4 µl 5 x RT Puffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ µl) sowie 2 µl dNTP Mix (10 mM) hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 37 °C bevor 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ µl) hinzugefügt wurden und erneut bei 42 °C für 60 min inkubierte. Die cDNA-Synthese wird durch Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 5 min gestoppt. Die synthetisierte cDNA kann anschließend zur Analyse der Genexpression verwendet werden oder für eine Woche bei -20 °C gelagert werden oder bei -80 °C für einen längeren Zeitraum.

4.3.11. Quantitative Real-Time PCR (qReal-Time PCR)

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) durchgeführt, welches BRYT Green® beinhaltet. Die qReal-Time PCR wurde nach den Herstellerangaben von Promega durchgeführt und erfolgte mit Hilfe des Real-Time Thermal Cycler der Firma BioRAD (Tab. 13 und Tab. 14). Als Referenzgen wurde *Ubiquitin10* verwendet.

Tab. 13 Allgemeiner PCR – Ansatz für qReal-Time PCR

	10 µl Ansatz	Endkonzentration
2x GoTaq qPCR Master Mix	5 µl	1 x
10 µM fw Primer	0,25 µl	0,25 µM
10 µM rev Primer	0,25 µl	0,25 µM
cDNA 1:20 verdünnt	2 µl	1:200
Nukleasefreies Wasser	2,5 µl	

Tab. 14 Thermocycler Einstellung für qReal-Time PCR

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen Anzahl
Initialdenaturierung	95 °C	3min	1
Denaturierung	95 °C	10 sec	45
Primer-Annealing	60 °C	10 sec	
Plate Read			
Elongation	72 °C	20sec	
Denaturierung	95 °C	10 sec	

Alle Proben wurden als Triplikate analysiert und anschließend mit der BioRAD CFX Manager 3.1 Software ausgewertet. Die Ermittlung der Ct-Werte erfolgte über die verwendete Software. Der ΔCt Wert konnte mit folgender Gleichung ermittelt werden:

$$\Delta Ct = Ct_{Kandidatengen} - Ct_{Referenzgen} \quad (1)$$

Aus den ermittelten ΔCt -Werten konnte mit der folgenden Formel die relative Transkripthäufigkeit ($\Delta\Delta Ct$) ermittelt werden:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Kandidatengen} - \Delta Ct_{Kontrolle} \quad (2)$$

Die relative Veränderung der Transkriptmenge der analysierten Probe im Vergleich zur Kontrolle (Col-0) ergab sich aus folgender Berechnung:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

Um die relative Transkriptmenge der analysierten Proben im Vergleich zum Referenzgen darstellen zu können, wurde folgende Berechnung angewendet:

$$\text{Fold Change} = 2^{\Delta Ct} \quad (4)$$

4.3.12. Transformation von Hefezellen

Die Transformation von *S. cerevisiae* Zellen erfolgte abgeändert nach der LiAc Methode von Gietz und Woods (Gietz and Woods 2002). Eine einzelne Hefekolonie wurde zum Animpfen einer 5 ml Vorkultur mit SD Minimalmedium und entsprechender Selektion von Aminosäuren verwendet. Das Wachstum der Vorkultur erfolgte über Nacht bei 30 °C und 200 rpm. Die 50 ml Hauptkultur wurde am nächsten Tag auf eine OD₆₀₀ von 0,3 in SD Minimalmedium (mit Selektion) angeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 wurden die Hefezellen bei 1500 x g für 5 min bei RT geerntet. Das Pellet wurde mit 25 ml sterilem mQH₂O gewaschen und erneut bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 100 mM LiAc aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec bei 12.000 x g abzentrifugiert. Die Hefezellen wurden anschließend in 500 µl 100 mM LiAc aufgenommen (100 µl/ 10 ml Hauptkultur) und zu je 50 µl Aliquote aufgeteilt. Die Aliquoten wurden für 15 sec bei 12.000 x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Carrier DNA wurde für 5 min bei 95 °C gekocht und auf Eis gestellt. Für eine Hefetransformation wurden folgende Komponenten der Reihe nach zum Zellpellet hinzu pipettiert:

240 µl PEG 4000 (50 % w/v), steril

36 µl 1 M LiAc, steril

50 µl Carrier DNA (2 mg/ ml)

2 µl DNA (100 ng bis 1 µg)

32 µl mQ H₂O, steril

4.3.13. Yeast-two-Hybrid (Y2H) Interaktionsanalyse

Für die Y2H Analyse wurde der *S. cerevisiae* Stamm AH109 verwendet. Dieser Hefestamm wurde optimiert für Protein-Protein Interaktionsstudien (James et al. 1996).

Eine Einzelkolonie wurde in 2 ml selektivem SD Medium bei 30 °C und 200 rpm über Nacht angezogen. Eine 4 ml Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,3 mit der Vorkultur angeimpft. Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5-0,8 wurde das Verdünnungsvolumen kalkuliert, um die Zellzahl der AH109 Hefen auf eine OD₆₀₀ von $1 = 2 \times 10^7$ Zellen/ ml zu bestimmen. Entsprechend der Zelldichte wurde für jede Probe eine Verdünnungsreihe von 1000, 100 und 10 Zellen pro Hefe-Spot in einer 96 Wellplatte vorgelegt. Mit einer Mehrkanalpipette wurde anschließend 10 µl einer jeden Verdünnung auf selektive SD Platten ausgebracht. -L/ -W selektive Platten dienten als Positivkontrolle für die Erfolgreiche Doppeltransformation der AD (Aktivator Domäne) und BD (Bindedomäne) Plasmide. -L/ -W/ -H selektive Platten (+/- ABA) dienten zur Analyse potentieller Protein-Protein Interaktionen. Die Auswertung der Y2H Analyse erfolgte nach 5 Tagen Inkubation bei 30 °C.

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte mit einer 400 ml Hauptkultur (TB-Medium), welche mit einer 50 ml ÜN Vorkultur (LB-Medium) angeimpft wurde. Das LB-Medium wurde mit entsprechendem Antibiotikum (Tab. 4) versetzt. Die Hauptkultur wurde für 1,5 h bei 37°C und 200 rpm angezogen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1-1,4 wurde die Hauptkultur auf Eis abgekühlt und mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 18°C für ca. 18 h.

Die Hauptkultur wurde bei 17.000 x g, 4°C für 45 min abzentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden in ein 50 ml Falcon überführt, mit 35 ml Lysepuffer versetzt und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen oder bei -80°C gelagert.

IPTG Stammlösung

1 M IPTG in mQH₂O
sterilfiltriert
Lagerung bei -20°C

Lysepuffer

100 mM Tris/ HCl pH = 7,9
100 mM NaCl

4.4.2. Proteinextraktion

Die geernteten Zellen wurden mit Hilfe von Ultraschall (3 bis 4 x Sonode, 1 min, 100 %, 9 Cycles) bei 4 °C aufgeschlossen. Die Proteinextraktion wurde anschließend für 45 min bei 4 °C und max. Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, filtriert (0,45 µm) und mit Imidazol (Endkonzentration 20 mM) versetzt.

4.4.3. Proteinaufreinigung und Dialyse

Für die Aufreinigung der Proteine wurde eine Peristaltikpumpe verwendet. Zunächst wurden die Schläuche mit Waschpuffer geflutet (10 ml, 2,4 ml/ min), um die Luft vollständig zu entfernen. Nach der Equibrilierung der His-Trap Säulen (GE Healthcare Bio-Science, Upsala Schweden) mit 5 ml Waschpuffer (0,4 ml/ min) erfolgte die Beladung der Säulen mit der Proteinlösung (0,4 ml/ min) sowie das Waschen der Säulen mit 10 ml Waschpuffer (0,4 ml/ min). Die Proteine wurden mit einem geeigneten Volumen von Elutionspuffer eluiert (0,4 ml/ min). Die Dialyse erfolgt in Schläuchen (16 mm MWCO 12 – 14 kDa) gegen Lysepuffer mit 1 mM DTT über Nacht bei 4 °C und anschließend noch einmal für 4-5h bei 4 °C, jeweils unter leichtem Rühren. Die Proteine wurden aliquotiert, mit 10 % Glycerin (Endkonzentration) versetzt und bei -20 °C gelagert.

Waschpuffer

100 mM Tris/ HCl pH = 7,9
100 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer

100 mM Tris/ HCl pH = 7,9
100 mM NaCl
250 mM Imidazol

4.4.4. Säulenregeneration

Um die Säulen wiederverwenden zu können, wurden diese nach der Proteinaufreinigung regeneriert.

5 -10 x [Säulenvolumen]	0,1 M EDTA
5 x	100 mM Tris/ HCl pH = 7,9
	100 mM NaCl
	500 mM Imidazol
	5 mM GdmCl
5 x	mQ H ₂ O
3 x	100 mM NiSO ₄
10 x	mQ H ₂ O

4.4.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch nach dem Molekulargewicht. Für die Proteinauftrennung wurde ein 15 %-iges Trenngel und ein 4 %-iges Sammelgel verwendet. Die Proteinproben wurden mit 6 x SDS Ladepuffer bei 95 °C für 10 min denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde der PageRuler Plus Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden zusätzlich definierte Mengen eine BSA-Standards mit auf das Gel aufgetragen (Ramagli and Rodriguez 1985). Die Proteinauftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRAD) bei 120-200 V für 55 bis 60 min.

	15 % Trenngel	4 % Sammelgel
Acrylamidlösung	5,0 ml	390 µl
mQ H ₂ O	2,3 ml	2,3 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	255 µl
10 % SDS	100 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl
<u>APS</u>	<u>50 µl</u>	<u>15 µl</u>
Gesamtvolume	10 ml	3 ml

Lösungen

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

Trenngelpuffer: 2 M Tris/ HCl (pH = 8,8)

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

TEMED: unverdünnt

APS: 10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/ v)

1 x SDS Laufpuffer

25 mM Tris Base

192 mM Glycerin

0,1 % SDS (w/ v)

4.4.6. Coomassie-Färbung

Nach der Auftrennung der Proteine wurde das SDS-Gel in die Coomassie-Färbelösung gegeben, für 1 min bei 900 W in der Mikrowelle gekocht und inkubierte für 15 min bei RT unter kontinuierlichem Schütteln (Kurien and Scofield 1998). Anschließend wurde die Färbelösung entfernt, kurz mit VE Wasser gewaschen und mit Entfärbelösung für 1 min bei 900 W erneut in der Mikrowelle aufgeköcht. Das Entfärben des Gels erfolgte während des Schüttelns bei RT, ein zusätzliches Papiertuch sorgte für die Aufnahme des Farbstoffes. Nachdem die Proteinproben sichtbar geworden sind, konnte das SDS - Gel in mQH₂O gelagert werden.

Färbelösung

25 % Isopropanol (v/ v)

10 % Essigsäure (v/ v)

0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/ v)

Entfärbelösung

10 % Essigsäure (v/ v)

4.4.7. Phosphatase-Aktivitätstest

Die Aktivität der PP2Cs und deren Regulation durch die RCARs wurde durch die Messung des freigesetzten fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon bestimmt (Meinhard and Grill 2001). Hierbei wird das Substrat, 4-Methylumbelliferonphosphat (MUP), durch die Phosphatase dephosphoryliert und die Menge des freigesetzten Produktes kann in einem Plate Reader (Synergy 2, Biotek) gemessen werden. Dabei wurde das 4-Methylumbelliferon bei 360 nm angeregt und das emittierte Licht wurde bei 450 nm gemessen. Die Intensität des Signals ist proportional zur Stoffmenge des entstehenden Fluorophors. Diese Reaktion wurde über einen Zeitraum von insgesamt 20 min gemessen. Die Intensität wurde in RFU (Relative Fluorescence Units) angegeben und wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die daraus resultierende Steigung der Gerade entspricht der Phosphataseaktivität und wurde in mRFU/ min angegeben.

Für die Durchführung des Phosphatase-Aktivitätstest wurde zunächst die Enzymlösung angesetzt und inkubierte für 10 min bei 35 °C unter schütteln, damit RCAR und PP2C einen Komplex formen konnten. Anschließend wurden die Proben mit verschiedenen ABA – Konzentrationen versetzt und inkubierten erneut für 10 min unter den gleichen Bedingungen. Damit die Enzymlösung und die Substratlösung gleiche Bedingungen hatten, wurde die Substratlösung auch für 10 min bei 35 °C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden beiden Lösungen (jeweils 40 µl) in eine 96-Wellplatte pipettiert und im auf 30 °C vorgeheizten Plate Reader für 20 min gemessen. Jede Probe wurde als 4-fach Ansatz gemessen.

8 x Puffer

1 M Tris/ HCl (pH = 7,9)	1 ml
5 M NaCl	0,2 ml
1 M DTT	50 µl

Enzymlösung (Phosphatase-Test)

8 x Puffer	25 µl
20 mM MnCl ₂	3 µl
Phosphatase	x µg
RCAR	x µg
ABA Stocklösung	20 µl
ad mQ H ₂ O	Σ200 µl

Substratlösung

1 M Tris/ HCl (pH = 7,9)	100 µl
0,1 M MUP	50 µl
5 M NaCl	20 µl
20 mM MnCl ₂	15 µl
mQ H ₂ O	815 µl

4.5. Mikroskopie Methoden

4.5.1. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde mit Hilfe einer Olympus F1000 Einrichtung inklusive einer seitenverkehrten Objektivhalterung (IX81) und der FluoView Software (FV10-ASW Version 04.00.02.09) durchgeführt. Außerdem wurde ein 20x Objektiv bzw. ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Olympus) verwendet. Das GFP-Signal wurde bei 488 nm angeregt und bei 502-536 nm detektiert, wohingegen die Eigenfluoreszenz von Chlorophyll mit 561 nm angeregt und bei 570-675 nm detektiert wurde. Um schwache Fluoreszenzsignale, der endogenen RCARs, detektieren zu können, wurde zusätzlich ein hochsensitiver Detektor mit zwei Gallium-Arsenid-Phosphid-Elemente inklusive dem Filter „FV12-MHBY“ (Olympus) eingesetzt.

Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der FluoView Software (FV10-ASW Version 04.00.03.09) und Microsoft Office Picture Manager 2010 (© 2010 Microsoft Corporation).

5. Anhang

5.1. Verwendete Oligonukleotid Primer

Tab. 15 Verwendete Oligonukleotid Primer

#	Name	Locus	Sequenz
386	At4g17870-Eco-f	At4g17870	gagtcGAATTCATGCCTTCGGAGTTAACACCAGAAG
387	At4g17870-Bam-r	At4g17870	gactcGGATCCTCACGTACCTGAGAACCACTTCC
388	At5g05440-EcoRI-f	At5g05440	gagtcGAATTCATGAGGTCACCGGTGCAACTCC
389	At5g05440-Bam-r	At5g05440	gactcGGATCCTTATTGCCGTTGGTACTTCGAGC
394	At5g46790-Bam-f	At5g46790	gagtcGGATCCATGGCGAATTCAGAGTCCTCCTCC
395	At5g46790-BamSr	At5g46790	GactcGGATCCCCTAACCTGAGAAGAGTTGTTGTTG
411	RCAR10 nS-tg-Sall r	At2g38310	GATCGTCGACCACAGAGACATCTTCTTCTTGCTCTC
434	RCAR1-BamH1 f	At1g01360	gatcggatccatgatggacggcgttgaagg
435	RCAR1- HindIII b	At1g01360	GATCAAGCTTTCACTGAGTAATGTCCTGAGAAGCC
452	At2g40330_ecoRI	At2g40330	gatcgaattcAtgccaacgtcgatacagtttcagag
453	At2g40330_BamHI	At2g40330	GATCGGATCCTTACGAGAATTTAGAAGTGTCTCGGCG
468	RCAR5 BamH1r	At5g45860	GATCGGATCCTTACAACCTTAGATGAGCCACCTCTCCG
496	At5g45860_Sph1_f	At5g45860	GACTGCATGCTAATGGAACTTCTCAAAAATATCATACGTGC
591	RCAR4oT_Pstrev	At4g27920	tatactgcagtatcttcttccatagattc
595	RCAR6oT_Pstrev	At5g45870	tatactgcagagtgagctccatcatcttctc
599	RCAR7oT_Pstrev	At4g18620	tatactgcagcttcatcttttcttgtgagc
603	RCAR13oT_Pstrev	At1g73000	tatactgcagggtcggagaagccgtggaaatg
717	At5g53160	At5g53160	atg gaa gct aac ggg att gag
718	At5g53160	At5g53160	cta tag tct cgg ggt gaa gag
1051	RCAR4 EcoRI fw	At4g27920	ATAGAATTCATGAACGGTGACGAAACAAA
1052	RCAR6 EcoRI fw	At5g45870	GCGGAATTCATGAAAACATCTCAAGAACAGCA
1053	RCAR7 EcoRI fw	At4g18620	CGCGAATTCATGGAAAGTTCTAAGCAAA
1054	RCAR10 EcoRI fw	At2g38310	ATAGAATTCATGCTTGCCGTTACCGTCC
1055	RCAR13 Sall fw	At1g73000	CGCGTCGACATGAATCTTGCTCCAATCCA
1056	RCAR14 EcoRI fw	At2g26040	ATAGAATTCATGAGCTCATCCCCGGCCGT
1057	RCAR14 BamHI rev	At2g26040	GCGGGATCCTTCATCATCATGCATAGGTGCAGATG
1058	RCAR2 BamHI fw	At4g01026	GCGGGATCCATGGAGATGATCGGAGGAGA
1059	RCAR2 Sall rev	At4g01026	GCGGTCTGACTCAAAGGTTGGTTTCTGTATGATT
1099	endoR2_Xmal rev	At4g01026	ATAccgggTAATATAGATACTACCTAGCTCTGTT
1099	endoR3_BamHI rev	At5g53160	ATAggatccGACTCTCGATTCTGTCGTGTC

Anhang

1100	endoR5_BamHI rev	At5g45860	ATAggatccCAACTTTAGATGAGCCACCCT
1256	PromR1_SacII fw	At1g01360	ATAccgcggGTGTTTTAGACCTTTAGATTTTCG
1257	PromR1_BamHI rev	At1g01360	ATAggatccAACTTTTTACTTTTGTACCTAAACTC
1258	PromR2_SacII fw	At4g01026	ATAccgcggTGGACCCATGTATCTATATCC
1259	PromR2_SmaI rev	At4g01026	ATAcccggaag AAA ATC AAC GAA GAC ACC
1260	PromR3_SacII fw	At5g53160	ataCCGCGGctgagagtcgggtgcaaat
1261	PromR3_BamHI rev	At5g53160	GCGggatccCTTTTTTCTCTCTCTTTTTATAATAT
1262	PromR4_SacII fw	At4g27920	ATAccgcggACATTCAGAGTAAGAAAGTCTCCA
1263	PromR4_BamHI rev	At4g27920	ATAggatccCGTTATCTTAAATAGCAGCAATTTAA
1264	PromR5_SacII fw	At5g45860	ATAccgcggGTGCCGAAGGAAATACTGA
1265	PromR5_BamHI rev	At5g45860	ataGGATCCttgtgtattgctgttttttgacg
1266	PromR6_SacII fw	At5g45870	ATAccgcggTCCCTTTCTTTTCCCCTAATTTAGTT
1267	PromR6_BamHI rev	At5g45870	ATAggatccACGTGTTTGTGGTGTTCACAA
1268	PromR7_SacII fw	At4g18620	GCGccgcggCTAGTATACTATATGTTATTCATGAG
1269	PromR7_BamHI rev	At4g18620	GCGggatccTTTCTGTTTTGTTTTCTAATGGGTTTG
1270	PromR8_SacII fw	At5g05440	ATAccgcggGAAGGAACTCATTTTCGTTGGTTCTG
1271	PromR8_BamHI rev	At5g05440	GCGggatccGGTTGTCAAGTTGGTTTTGTTGAG
1272	PromR9_SacII fw	At2g40330	ATAccgcggCCAATGAATTGGTGGTATTGCAC
1273	PromR9_BamHI rev	At2g40330	GCGggatccATACAGAACTATATAAGGACAGAGTG
1274	PromR10_SacII fw	At2g38310	ATAccgcggGCTTCTCGTCACCACTCCTT
1275	PromR10_SmaI rev	At2g38310	ATAcccggaagagagatagagTTTTAATGCAG
1276	PromR11_SacII fw	At4g17870	ataCCGCGGgctgactcacacaaatcaaa
1277	PromR11_BamHI rev	At4g17870	ATAggatccTCTTTTATTTAGCGTTGAAATCTCT
1278	PromR12_SacII fw	At5g46790	ATAccgcggTGACAACCATAAACTATGTTTTAGC
1279	PromR12_BamHI rev	At5g46790	GCGggatccAGTTGAAAATTTGAAGGAAGAAG
1280	PromR13_SacII fw	At1g73000	ATAccgcggGGCGCCTTTTTCTTGCTAGT
1281	PromR13_SmaI rev	At1g73000	ATAcccggaactaatTTTGGAGTTGGGCTGCAC
1282	PromR14_SacII fw	At2g26040	ataCCGCGGgctcatggcctctctacaa
1283	PromR14 rev_BamHI	At2g26040	ataGGATCCggtgatgaatcagtcacacgag
1337	CherrySOG_AscI fw		ATAggcgcgccGCTAGCGCTACCGACTCAG
1338	CherrySOG_AscI rev		ggcgcgccTTAGCCGTCCAGCTGCAC
1458	endoR1_BamHI rev	At1g01360	ATAggatccCTGAGTAATGTCCTGAGAAGCCAAT
1465	endoR6_BamHI rev	At5g45870	ATAggatccAGTGAGCTCCATCATCTTCTCC
1466	endoR7_BamHI rev	At4g18620	ATAggatccCTTCATCATTTTCTTTGTGAGCTT
1481	endoR8_BamHI rev	At5g05440	ATAggatccTTGCCGTTGGTACTTCG

1482	endoR9_PstI fw	At2g40330	ATActgcagCCAATGAATTGGTGGGTATTG
1483	endoR9_BamHI rev	At2g40330	ATAggatccCGAGAATTTAGAAGTGTTC
1484	endoR10_SmaI rev	At2g38310	ATAcccgggCAGAGACATCTTCTTCTGCTCTC
1485	endoR11_BamHI rev	At4g17870	ATAggatccCGTCACCTGAGAACCACTTC
1486	endoR12_BamHI rev	At5g46790	ATAggatccCCTAACCTGAGAAGAGTTGTTGTT
1487	endoR13_SmaI rev	At1g73000	ATAcccgggGGTCGGAGAAGCCGTGGA
1488	endoR14_BamHI rev	At2g26040	ATAggatccTTCATCATCATGCATAGGTGCAG
1489	endoR4_BamHI rev	At4g27920	ATAggatccTATCTTCTTCTCCATAGATTCTGCTTG
1861	Oligo Ascl-FseI fw		CGCGCCattGGCCGG
1862	Oligo Ascl-FseI rev		CCaatGGCGCGCCGG
1866	RT RCAR1 fw	At1g01360	AGTTCAGCCGAGAGAGATTAGATG
1867	RT RCAR1 rev	At1g01360	CGATGATCACACCTATAATGCTA
1868	RT RCAR2 fw	At4g01026	GAAGACAGTGGTTGTGGAGAGTTA
1869	RT RCAR2 rev	At4g01026	CCAACGATAGTATCAGCAAACAAC
1870	RT RCAR3 fw	At5g53160	TAGTTCCTTCCGGCACATCC
1871	RT RCAR3 rev	At5g53160	TGGCGGTAACCATAGGCTTG
1872	RT RCAR4 fw	At4g27920	GACCACAGGCTCAAGAACTACC
1873	RT RCAR4 rev	At4g27920	CACATCAACGATGTAAGACTCCAC
1874	RT RCAR5 fw	At5g45860	GCCACGTCATCAGTTTCAGC
1875	RT RCAR5 rev	At5g45860	AGTCCTCCTCCGACTCATGC
1876	RT RCAR6 fw	At5g45870	TACGATGCAATCTTCAATCTCTTG
1877	RT RCAR6 rev	At5g45870	TCACAGAGACATCTTCTTCTTGCT
1878	RT RCAR7 fw	At4g18620	GAACATAGGCTGACGAATTACAAA
1879	RT RCAR7 rev	At4g18620	TATCAACGACGTAAGATTCCAAAA
1880	RT RCAR8 fw	At5g05440	GGTTTAGTATAACCGGTGGTGAAC
1881	RT RCAR8 rev	At5g05440	TCTCAAATCTATGAACCGTCGTAA
1882	RT RCAR9 fw	At2g40330	CAACGAGTTCGTCGTCTTGG
1883	RT RCAR9 rev	At2g40330	CGACCGTATCCACAAACATCC
1884	RT RCAR10 fw	At2g38310	TTACACGGTGGTTCTTGAATCTTA
1885	RT RCAR10 rev	At2g38310	TCCACAAACATTTTAGTGTCTTCC
1886	RT RCAR11 fw	At4g17870	ACTTCACAGGCTACAACACCAA
1887	RT RCAR11 rev	At4g17870	TCGTTAGTTAGTCACATTCTTTCTTT
1888	RT RCAR12 fw	At5g46790	AAATTTTAAACAATAACAGCAACA
1889	RT RCAR12 rev	At5g46790	GCATCACTTAAAATGAACTTTTTG
1890	RT RCAR13 fw	At1g73000	ATActgcagATGGAAAGTTCTAAGCAAAAACGA

Anhang

1891	RT RCAR13 rev	At1g73000	ATAggatccTACTTCATCATTTTCTTTGTGAGC
1892	RT RCAR14 fw	At2g26040	gtgctgcaaggcgattaagt
1893	RT RCAR14 rev	At2g26040	cgatgggtgtagtcctcgttg
2447	R1 D156E fw	At1g01360	gcgcAGGTAACACAAAGGAGGAGACT
2448	R1 D156E rev	At1g01360	gcgcAAAGTAGCAAGTCTCCTCCTTT
2449	R1 Y160F fw	At1g01360	gcgcAGGATGAGACTTGCTTCTTTGT
2450	R1 Y160F rev	At1g01360	gcgcAGTGCTTCAACAAAGAAGCAAG
2451	R4 E150D fw	At4g27920	gcgcAGGTAACACAAAGGATGAGACA
2452	R4 E150D rev	At4g27920	gcgcGAAGAAGCATGTCTCATCCTTT
2453	R4 F154Y fw	At4g27920	gcgcAGGAGGAGACATGCTACTTCGT
2454	R4 F154Y rev	At4g27920	gcgcAAAGCCTCCACGAAGTAGCATG
2455	R1 K171N fw	At1g01360	gcgcCAGATGTAATCTCAATTCA
2456	R1 K171N rev	At1g01360	gcgcAACATCTGCTAGTGAATTG
2457	R4 N165K fw	At4g27920	gcgcTCAATGCAATCTCAAGTCT
2458	R4 N165K rev	At4g27920	gcgcAACATCTGCTAAAGACTTG
2459	R4 E150 F154 fw	At4g27920	gcgcAGGTAACACAAAGGATGAG
2460	R4 E150 F154 rev	At4g27920	gcgcGAAGTAGCATGTCTCATCC
2461	R1 D156 Y160 fw	At1g01360	gcgcAGGTAACACAAAGGAGGAGACTTGCTTCTTT
2462	R1 D156 Y160 rev	At1g01360	gcgcAAAGAAGCAAGTCTCCTCCTTTGTGTTACCT

5.2. Verwendete Plasmide

Tab. 16 Verwendete Plasmide für transiente Analyse in Protoplasten

#	Organismus	Stamm	Plasmid	Resistenz
883	EC	DH5 α	pSK 35S Ω GUS	Amp
1191	EC	DH5a	pSKAscl35SS1GFP327ter	Amp
3041	EC	DH5 α	pSK pRD29B::LUC new	Amp
4063	EC	DH5a	pSK Ascl 35S PP2CA	Amp
4064	EC	DH5a	pSK Ascl 35S HAI3	Amp
4065	EC	DH5a	pSK 35S empty MCS Ter	Amp
4072	EC	DH5a	pSK Ascl 35S RCAR5	Amp
4073	EC	DH5a	pSK Ascl 35S RCAR8	Amp
4074	EC	DH5a	pSK Ascl 35S RCAR12	Amp
4075	EC	DH5a	pSK Ascl 35S HAI1	Amp
4076	EC	DH5a	pSK Ascl 35S HAI2	Amp
4095	EC	DH5a	pSK Ascl 35S ABI1	Amp
4096	EC	DH5a	pSK Ascl 35S ABI2	Amp
4097	EC	DH5a	pSK Ascl 35S RCAR1	Amp
4098	EC	DH5a	pSK Ascl 35S RCAR3	Amp
4099	EC	DH5a	pSK Ascl 35S RCAR11	Amp
4388	EC	DH5 α	pSK35S RCAR2	Amp
4389	EC	DH5 α	pSK35S RCAR4	Amp
4390	EC	DH5 α	pSK35S RCAR6	Amp
4391	EC	DH5 α	pSK35S RCAR7	Amp
4392	EC	DH5 α	pSK35S RCAR9	Amp
4393	EC	DH5 α	pSK35S RCAR10	Amp
4394	EC	DH5 α	pSK35S RCAR13	Amp
4395	EC	XL1blue	pSK35S RCAR14	Amp
4530	EC	DH5 α	pSK Ascl 35S HAB1	Amp
4531	EC	DH5 α	pSK Ascl 35S HAB2	Amp
4654	EC	DH5 α	pSK Ascl 35S AHG1 genom	Amp
5465	EC	XL1blue	pSK Ascl ProRCAR1::RCAR1 ::eGFP::miniSOG	Amp
5567	EC	XL1blue	pSK Ascl ProRCAR8::RCAR8 ::eGFP::miniSOG	Amp
5568	EC	XL1blue	pSK Ascl ProRCAR12::RCAR12 ::eGFP::miniSOG	Amp
7218	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR1 D156E	Amp
7219	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR1 Y160F	Amp
7220	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR1 K171N	Amp
7221	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR1 D156E Y160F	Amp
7222	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR1 D156E K171N	Amp

7223	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR1 Y160F K171N	Amp
7224	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR1 D156E Y160F K171N	Amp
7225	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR4 E150D	Amp
7226	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR4 F154Y	Amp
7227	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR4 N165K	Amp
7228	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR4 E150D F154Y	Amp
7229	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR4 E150D N165K	Amp
7230	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR4 F154Y N165K	Amp
7231	EC	XL1 blue	pSK35S::RCAR4 E150D F154Y N165K	Amp

Tab. 17 Verwendete Plasmide für Hefe Trafo

#	Organismus	Stamm	Plasmid	Resistenz
1864	EC	DH5 α	pGAD424 empty	Amp
2165	EC	DH5a	pBridge ABR9 (RCAR1)	Amp
3844	EC	XL1 blue	pBridge RCAR4	Amp
4880	EC	DH5 α	pGAD AHG1	Amp
5379	EC	XL1 Blue	pBridge RCAR1 K171N	Amp
5888	EC	XL1blue	pBridge RCAR1 D156E	Amp
6650	EC	XL1blue	pBridge RCAR1 Y160F	Amp
6760	EC	XL1blue	pBridge RCAR1 D156E Y160F	Amp
6761	EC	XL1blue	pBridge RCAR1 D156E K171N	Amp
6762	EC	XL1blue	pBridge RCAR1 Y160F K171N	Amp
6763	EC	XL1blue	pBridge RCAR3 K169N	Amp
6764	EC	XL1blue	pBridge RCAR3 Y158F	Amp
6765	EC	XL1blue	pBridge RCAR4 E150D	Amp
6766	EC	XL1blue	pBridge RCAR4 F154Y	Amp
6795	EC	xl1blue	pBridge RCAR1 D156E Y160F K171N	Amp
6796	EC	xl1blue	pBridge RCAR4 N165K	Amp
6797	EC	xl1blue	pBridge RCAR4 E150D F154Y	Amp
6798	EC	xl1blue	pBridge RCAR4 E150D N165K	Amp
6799	EC	xl1blue	pBridge RCAR4 F154Y N165K	Amp
6800	EC	xl1blue	pBridge RCAR4 E150D F154Y N165K	Amp

Tab. 18 Verwendete Plasmide für Phosphataseaktivitäts-Assay

#	Organismus	Stamm	Plasmid	Resistenz
7232	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1 D156E	Amp
7233	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1 Y160F	Amp
7234	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1 K171N	Amp
7235	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1 D156E Y160F	Amp
7236	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1 D156E K171N	Amp
7237	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1 Y160F K171N	Amp
7238	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1 D156E Y160F K171N	Amp
7239	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4 E150D	Amp
7240	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4 F154Y	Amp
7241	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4 N165K	Amp
7242	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4 E150D F154Y	Amp
7243	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4 E150D N165K	Amp
7244	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4 F154Y N165K	Amp
7245	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4 E150D F154Y N165K	Amp
7246	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR1	Amp
7247	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):RCAR4	Amp
7250	EC	Rosetta pLYS	pET21a(+):AHG1	Amp

Tab. 19 Verwendete Plasmide für stabile Transformation in *A. thaliana* bzw. Infiltration in *N. benthamiana*

#	Organismus	Stamm	Plasmid	Resistenz
690	EC	DH5 α	pBIAsclBar	Kann
4550	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR6	kan-rif
4551	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR7	kan-rif
4553	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR10	kan-rif
4888	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR1	Kan+Rif
4889	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR4	Kan+Rif
4915	AT	GV3101	pGreen Ascl BAR 35S RCAR2	Kan+Rif+Tet
4916	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR3	Kan+Rif
4917	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR5	Kan+Rif
4918	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR8	Kan+Rif
4919	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR9	Kan+Rif
4920	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR11	Kan+Rif
4921	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR12	Kan+Rif
4932	AT	GV3101	pGreen Ascl BAR 35S RCAR13	Kan+Rif+Tet
4933	AT	GV3101	pBI121 35S RCAR14	Kan+Rif
5238	EC	Xl1blue	pGreen pG0229 Ascl BASTA	Kan
5476	AT	GV3101 pSOUP	pBGreen Ascl BAR ProRCAR1::RCAR1:eGFP:miniSOG	Kan + Rif + Tetra
5477	AT	GV3101	pBI Ascl Bar ProRCAR7::RCAR7:eGFP:miniSOG	Rif Kan

Anhang

5478	AT	GV3101 pSOUP	pBGreen Ascl BAR ProRCAR10::RCAR10:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5570	AT	GV3101	pBI Ascii BAR ProRCAR11::RCAR11:eGFP:miniSOG	Rif Kan
5571	AT	GV3101 pSOUP	pGreen Ascl BAR ProRCAR14::RCAR14:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5608	AT	GV3101 pSOUP	pGreen Ascl Bar ProRCAR2::RCAR2:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5609	AT	GV3101 pSOUP	pGreen Ascl BAR ProRCAR3::RCAR3:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5610	AT	GV3101 pSOUP	pGrenn Ascl Bar ProRCAR4::RCAR4:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5611	AT	GV3101	pBI Ascl Bar ProRCAR5::RCAR5:eGFP:miniSOG	Rif Kan
5612	AT	GV3101 pSOUP	pGreen Ascl Bar ProRCAR6::RCAR6:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5613	AT	GV3101 pSOUP	pGrenn Ascl Bar ProRCAR8::RCAR8:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5614	AT	GV3101 pSOUP	pGreen Ascl Bar ProRCAR9::RCAR9:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5615	AT	GV3101 pSOUP	pGreen Ascl Bar ProRCAR12::RCAR12:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
5616	AT	GV3101 pSOUP	pGreen Ascl Bar ProRCAR13::RCAR13:eGFP:miniSOG	Rif Kan Tetra
6645	AT	GV3101	pBI121 35S::eGFP	Rif, Kan

5.3. Putative Promotorregionen und gDNA der RCARs

Nukleotidsequenzen der 2-3 kb Promotorregion vor dem Start-Codon mit anschließender gDNA aller 14 RCARs aus Arabidopsis Col-0. Schwarz markiert ist die Promotorregion, rot die 5'UTR, blau der Start bzw. Stopp der Translation und orange die gDNA. Die hier dargestellten Sequenzen wurden von www.arabidopsis.org bezogen.

ProRCAR1::RCAR1

```

gtgtttcagacctttagatttcgcaaagcccaccagaaacaatggttgcaaatacttcttcttctcagttctagtaaactataagcc
gaagctgttttgccttgattcgtttgcccatattgtgatggctttaaagattgggccttcttggttcatctaaattgaagcttttctt
ttgtaagtttgtgaacagtcaaagtagattaaccaggacaaatgaatgaacgataaattcataacttttactgccagcatt
atcagaagaatgctgtaaatgttgcctttttcttctcactccgtctgttttttgggtattgggtaattcgaaaagattcggaacat
tggccggcaaaaaagtatccaaatgaacaaaaagaagaattcacgtgtcaagttcacgagaaacgacataatacgtgaacatg
aaaatgacagacaataaaccaatgaaaatgacacgtatattggttcttattttaaccgtatttagctcattgtcgtctcacta
aaaaggctcctgttttctgaagcagttaataattacgccaaagctgtcttttgcgttaagttcgcgatgcctagctagtgccaa
aggtgatcctatccgataagcttgttttgggtaaattttctgataaggttactgtaattatcgtcaattaccgctctttaagtacta
tattatcacttaacatttttaaaaaatgattgcagaaaatgttatataaaactaaatccctattttatcataacgtcaatttcagac
aattaatgagatatgtaagcataaacatattcatattgaacaagaaaacctccggttacaattatgtgttgttaaaatggttaca
aatcggaagattgttcgttatgaaaacctaaaccataattaacatattgtagaagataattagataagtaacatttaactaga
ttatctaaaaagtgattatgttgttttggtagaaaaccaagtaaaaggtgagcttttctccttgggaaaaacaaaagtagaattc
aaaaaagaaagaaatagaattcactaattatagtaatccattaatattactggttagaaagcgttaattagcggcggtggttatca
aaagtgactccaccatattgttcgaaagcttgagttcacgaagaagatggaggaggggcaacttagactagtgagatgaatcg
aatgatgattattgtagattcttgtggtatctcatcttctcgtatgaggtgtgattcacaacaatacaatttaacaaaaactagt
ttgtctacattcggtatgatataattaaggactttgtctcaacagattaaagttctgtttcatgatttttagattgtggatgcctgtacc
aatcttctgtagaaatgccttctcctcctagaagagaaattcaccttacgtgtcgtacatgactacatggaacagtcaatttcgaga
taggatattggttagacatttagcttgatacaattaattaatgttaacaacaagggttaaaggcaacgagagctatatctaataag
atgtggtctaagacatatgagacctgatacatggagaatcactcattataaatttctggtatattaacgacattttgtgtctaaaaa
ttagctattataatgaatatggtctaaaattgaatttaataacaaaactatctataaagttgaaacgatcttacctaatcaaaaca
aataattatctaagcaatctgttttgttgcggattataggtcccaaaacgtcacaataaaaactgcttaaatattttgtttt
ttgttacataaaaaattagatcttgttgttttggtttgaagctgaaaatgtgtgaaggagaagaaggaagctataaaa
aagagtttaggtacaaaagtaaaaagttattatgctgggtgggtcattaaaagaacccaaaaacataacaagtaattttgtttt
gcataacgaagcatcttcttcttcttctgtatttattatccatttccagagattctccttgtgagataacaacgaagaacgaaagag
agagagagagagagaga ATGATGGACGGCGTTGAAGGCGGCACGGCGATGTACGGTGGTCTCGAGACG
GTGCAATACGTACGGACGCATCATCAACATCTGTGCAGAGAAAACCAGTGTACCTCTGCTCTGTCAA
ACACATCAAAGCTCCTTTCATCTCgtaagcttctccaatctaccactaatttcacccttttctgaccattttctccatgatcc
gtcaattttgatcccaacctcgtatttagggtttttccccaaatctctgtttaacgattgattataattgatttttttagGTTGGT
CACTTGTACGGAGATTTGATCAGCCGAGAAATACAAACCGTTTGTGAGCAGATGTACAGTAATCGG
TGATCCTGAAATCGGCAGTCTTAGAGAAGTCAATGTTAAATCTGGTCTTCTGCAACAACATCTACTG
AGAGATTAGAACTTCTTGATGATGAAGAACACATCCTCGGTATCAAATCATCGGTGGTGATCACAG
ACTTAAGgtacagcgagagaaatcaaatctcattgatgtttgtttatgagattctcattgattgtttgttgcagAATTACTC
GTCGATTTTGACGGTTCATCCGGAGATAATCGAGGGAAGAGCAGGAACGATGGTGATTGAATCGTT
TGTAGTTGATGTTCTCAAGGTAACACAAAGGATGAGACTTGCTACTTTGTTGAAGCACTTATCAGAT
GTAATCTCAAGTCACTAGCAGATGTTTCTGAAAGATTGGCTTCTCAGGACACTACTCAGTGA

```

ProRCAR2::RCAR2

tggacccatgtatctatatcctgtaacatctggttggcttaatgtgtacatatatgtgaacatagtgtagttcgggtatagcttcttta
accaattgaatgaaccgatcatattctaaccggatgccaaataaactaaagattgttgtaaatgaaagacttgggacttgactcgct
acatcactgattacgcgtaaagtctacagagagtttactaagttgaaagaaaactacttctaacatacagagacatcgccattaat
ggccttaacttaagagtcaaaaaacatttgatgggcctacccttaataaaagccaattcgatattcgaatcgaaccaccggcct
aactaaactgttcagtgccccaaatcttttgaacttctttcttcatattcttctaccgtgaaggcgtcgtcaccgccgatgttat
tatctccggcgatgtttctgatcatcactgcttactcttactgaggttggtattttcaaacttcttctcctcgttctttcttgaag
tcagaaactttgccccatttcagtaaaaggggtgattctacattcctagaatcatctaataactagggtttcattaggttacgtatt
ggttaaaattagttgaaatcatgtttcttatttcttttgaactaaattggtaatcagatcttagagtgtatgattgtcataacatc
taatcgaaattagaatccgtatatgtttcattcagagaataaatcctgactgttaatttgatatagaATGTCAGATTCTGATG
AAGCTAAAACGTCGGAGGAAGAATCTCAACTTGCTGAGCAAGAAACAGAGACTCAAGAAGGTGAAA
TGACTAAAACTTAAAGAAAAGAGATCTTGATGCAGTAGAAGATGAAGATTGAATAACGAAAAGCT
CCAGATTAGAGAACTAGAGAAGAAGATAAAAAAGAAACAGCGAGGAAGCTTGAACCTGACTTTG
TGCTAACAGGGGAAGAGGATGATGATGCATTGCCCTTAGCCTGTTCCATTTGCCAAAACCCATTCTTG
GATCCTGTTGTCACCAACTGCAACCATTACTTCTGCGACAAGTGTGCTCTAAAGgtaaatctttccttacaac
aagtttctgaatttctgaaaacacactcaaaacagatttctgttattttttcataatgcagCATCACACTGAGAACGATA
CTTGTTTTGTGTGTAACGAGCCAACCTAGGGCTTTTCGACACAGCCGTGGAGATCAAGGAAAAGAAAT
AGAGGAAGAACGTGAGAAAGCCAGAGgtttgttaaaaacgaaaactctctgttttgacacaaaaacactactttaca
aaactcgctcggatgtctcttttagCCATGGTAAAGGAAGTGACAGCAATGTTAGAAAAGGCATCGACAAT
GGCGGATGACGCCAAGGGCGTAGCGCAAAGGTTGTAAAATGGTGGAGGAGATTGAAACAATGG
TGAAAAAGTGGCGGCTATGGCCACAAAGGCGGGAGAAACGGCGACAATGGCGGCAGATATGGTG
AAAGAAGCTGAGGAGACGATGGAACAGCTAAAGCTAATATGTCCAAAGCCTTTGTGGTAATGAAG
TCGGTGAATTGGAACGTGTAAtcgggtcaaacagagttttattgtgatctcatgctgacatcagctacaatcttatctaa
taagatagattctcacaagattctttatctatctacttttagagaagatgagatcatactcggagatagataggtgtcgtaaaatt
gggaagcttactggcaggagaagagagatatacacacgtgctaaagtcaacagctaatccaaaaggtagacgacaaaccagt
taaactaagacagtaatctatctaaagatttgcggtcatgtaaatccgttgggtgattaatatgtcgggtcttctgtgattt
cttagcctaaccaaccaataaataaaaaatcgaagcttactttgttcttattatccactccaacaagattcctcaaaag
gaaagaagagaagaagataagagatatctggttggcggagATGAGATGATCGGAGGAGACGATACAGATAC
AGAGATGTACGGAGCTCTAGTGACGGCACAGTCCTAAGGTTGCGTCATCTTCAACTGCAGAGAG
AACCAGTGTACCTCTGTTCTCGTCAAATACATTCAAGCTCCTGTTTCATCTTgtacgctcttctattctctcatctc
tgttttcttctctgtttctttatgtactttgtgaagtaattctgtctgattcaccgggaaaatgaaatttcgccgatttagggttccc
gatctttctattttgttgcattctcgttttttttagtttacttgttggctctcttagtcttaaagctaaggatagtgatatacatat
atgattcagGTTTGGTCACTGGTGCGGAGATTTGATCAGCCGCAGAAATACAAACCATTTATAAGCAGA
TGCACTGTAAATGGTGATCCTGAGATCGGTTGTCTCAGAGAAGTAAATGTCAAATCTGGTCTTCCAG
CAACCACCAGTACAGAGAGATTGGAACAGCTTGATGATGAAGAACACATCCTCGGTATCAACATCAT
TGGTGGTGTATCATAGACTTAAAGgtgactaaatccaaatctcatagatttcagaaacattagcgggtgctataatgggttattg
tttctgcagAATTACTCTTCGATCTTACTGTGCATCCGGAGATGATTGATGGAAGGTCAGGAACTATG
GTGATGGAGTCTTTGTTGTGGATGTTCTCAAGGCAACACCAAAGATGATACATGTTACTTCGTGGA
ATCACTCATAAAGTGTAACCTCAAATCCTGGCTTGTGTCTCTGAAAGATTGGCTGCTCAAGACATTA
CCAATTCCATCGCAACTTTCTGTAACGCTTCCAATGGATACAGAGAGAAGAATCATACAGAAACCAAC
CTTTGAagatttggctagatttagtcccacgaacaaactcagtgaggaaatttagattcatagaagcagctgtgatcatgcttctct

gctgctttactcagatcagctccatgggccatcttcgagcatgcagctcaaagtttgatgtaattgtttctgggtttgtggacagtgt
ctgtatttacgcaccattgttagaaaaaacagagctaggtatctatattaTCA

ProRCAR3::RCAR3

caaccagcaagcaacaagagcatatacataaagttatttagcagagagcttctatttgctcagagagtcacagctttacatg
ccaatgatgtcaggcactgagagtcgggtgcaaatggaaggcaaactcaacaccttcttgaccacactcaaaatctccgataac
attctgagagcccactgcaagctccaagccaatcttaaaaaaagaactatgggtatccaatTTTTTTTTTgtgtactttaatctga
ggtagtagtatttgcagaatactttgacaggttacaagttagcaacgaattttcttttctagatatgacttataagagccaaacctt
tttatgttatagaatctttgtcactttgagatacttttattcaggatttaataaagagtgttgataaagcacgtgggaccttttgcct
ctcgagattggctcttcgagtcaggaaaagttaagactgtgaagcaaaccctatatatgatactgtatacaatatatttttgataaa
ggattgtgtaaatgaatgatcaactatatacttactattctggccttagtggtataagatactaataataactgtaaatgatcaaa
acaagatactattgtcagaatcgaaaaataaagcgaagccaacttaatagtttacgaacttttacttcatattatgagtcgaatg
agagtgaatactggaattggtagatgcagaaaaccggattagacgaaacaaagagaacataatacaaatcattggtaggaac
tgacaaaacgtacgaaacaatcgatgtaaatggtagaataaaattggtagataaccataataactgcagtcgatgataatcat
taaatttagctattttaacttgaataatagatgttactattttatcatatacctaaagaagttctgtaattgtacttagtacct
gattgtcgttctaatactaaaaaagatttggcctttgtagtttcttcaaaggccccgaatctgcattgatcatggctggctcggg
ggtgtaagcacacttttaactagtgattatgtctaattgggacatcaatatacctccatgcacctagtaatgtgacatccgtataa
tatgtgactatcttcttcagctaaaggtaacgagcataatctggtaagccctatgttggttgcattataacaatctctctgaaa
ttttgtagtatttcatcaatttaattagatatttgcacaattggaattgctttgagtcgatcacagtcagtaacacgaactatat
gctgatctgatcgaattcattctactatatacacacacatacacaacattttacagtcaccactaataactataatccaataaca
gaaaacctaaaatataagtacacattaacaaaagaaaacagttgcaagttattaagtggttttggattggttatagtttttagat
ttttgattaattatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataat
gtaaaaaagtgaaaaaccaatgaacatagatttttagatttctttaaatactagattccttattttataaggaaaaccatttctccc
aatcttaattggctataaagtagattttggaaaaaacttaagccataaacaatttcaaaaaatctataaccatttcaaaatctta
cctttttttttgtcaaaaagcttttatccaatgaaaaagcacccaagaaaaaaaaaaaaaaaaactatccaataattgagtc
agctctcataggcttaacaatactttaaggatcaacattaataattaccacacttgagggtaaaactaaaaacggtaataaaa
cacagaaaaacgacaacgaggggcaaaatcgaaaataaagagaaaatagtgggataatagaagaaagcatccaatgagagtag
tgaatcagagaaagaccttactccttagccaataccatccaatcaatcttttctttttataaaaaatctctcactgagcttttt
atthaatattataaaaaaggagagagaaaaaagtgttgaggattcgtctctctctctctctctctctctctctctctctctct
tctccctcaaagacggcgactgtataatctatcttcttcacagtaacgctttcatcggaagatctcgccgaaaaaacttctct
gagatcagatctcttacgattctcagctcaatcttatctttcttggttgctgcttttactctctctctcgcgacgaattggccttgt
ttttgtttgttcgatccgacgaggattgagaaaccgtggcttaagacggaggaagaagATGGAAGCTAACGGGA
TTGAGAAGTTGACGAATCCGAATCAGGAAAGAGAGTTTATAAGGAGACATCATAAGCATGAGCTTGT
GGATAATCAGTGTAGCTCTACGCTTGTAAACATATCAACGCTCCTGTTTATTGtaagcttctccctcttc
ttctcctcatgcgctctgattttctgtttaagttaatcggttcttcttattgttgattcaatccagaatttgaatctctctctatttca
tcgattgtgatcttactgatgaagaatcgattggttctaattattgaaagcttcatagcatttgtgtaatccaatctgagttgtttg
atctggttttgcttattggaaaaaaagctccaaaaacgcttatggattagttgaaatctctctggtgaatagGTGTGGTCACT
TGTGAGAAGATTTGATCAGCCACAGAAGTATAAGCCGTTTATCAGTAGATGTGTGGTGAAGGAAA
CATGGAGATTGGTACAGTAAGAGAAGTTGATGTGAAATCTGGACTACCAGCAACTAGAAGCACTGA
GAGATTGGAGTTACTTGATGACAATGAGCATATTCTCAGTATCAGAATCGTTGGTGGTGATCATAGA

CTTAAgtaatcaatgaatcaaaagggttcgttttctgtttacagtgaaatcaaaagacttatatgttctatattgttttggatttagAA
CTATTCTTCAATCATCTCTCTTACCCCGAGACTATAGAAGGAAGAATAGGAACACTTGTGATTGAGT
CATTTGTGGTTGATGTACCAGAAGGAAACACAAAGGATGAGACTTGTTACTTTGTTGAAGCTTTAATC
AAATGCAATCTTAAATCTTAGCTGATATCTCTGAACGTCTTGCGGTTCAAGACACGACAGAATCGAG
AGTCTAA

ProRCAR4::RCAR4

AGAAGAAGCCATTCTCACACACAAGGGGACCACGCCATCATGCATCAGCAGCAATCCAACTTTA
AACACATTCAAGtaagaaagtctcatgcagttcttactccgttttactattatTTTTGGATctgacatttctgggttgatt
atgtgtagCATGTGCCAGAAGAACCCAAATCGTTTTCTTCTTTCAGGGAACGACTTCACTACTTGCAGgc
aagaattctctgatgtttgaacgagattggaatgttcaggttttattttgatattatcggctgtaacatgtgatgtttaatgtaacg
AGGACAGAAATGGATCGGGTCTGCTTTGGGCGATCTGGAATTCATGGATGGGGTCTTTTTGCAAGA
AGAAATATCCAAGAAGGAGAAATGgtatgtcagcagaccatttgtgatattgtgttggctatttgggatgaggggagt
gtttattgtcagaggtgctattgtatttcagGTTCTTGAATACAGAGGGGAACAGGTGAGAGGTAGCATTGCAG
ACTTGAGAGAAGCACGTTATCGCAGAGTAGGAAAGGATTGCTATgtgagttgaaaaagttccattttatcttca
caaattgtctcttctctctatctctcttaacaaaagaaggatttatgttgagCTTTTCAAGATCAGTGAAGAAGTAGT
GGTTGATGCTACAGATAAAGGGAATATAGCTCGGCTCATCAATCATTGgtaagctgcttggcatggactttt
acgtacaagaaattgacagactgttaaagcctaaatcaaaatcgtggtgtgtagGTACACCAAAGTCTATGCGAGG
ATTATGAGTGTAGGAGATGAGGAAAGCAGGATTGCTCTGATAGCCAAGGCCAATGTAGCTGTGGGA
GAGGAGTTAACgtacacaacgcatttctatataaccattctcaatctaaagctgattgattgtcatagtttaagaaatgttg
tggtgtttggcagGTATGATTACTTATTTGATCCAGACGAGGCAGAGGAACTCAAGGTGCCATGCTTATG
TAAAGCCCCTAACTGCAGGAAATTCATGAATTAGaatagaaaggtatagatcctctaagttacttcacaggctaca
accaagaagaaaaggccaaagcaagattgtctcttttctcctcaaaaacaatagatttataggttagagagaaaagctaagtgatc
caagtctgatctcttctgctctctgtatagacaaactcgttgtgcaccattatcctcaaaagaattcaatttcatttttctt
caacgagacttgagcagaaaacttgggataattccaactgttgtgaccgttttaccctataaccatcggttactacggttataccg
aaggtgatgagcaattcaattgggaattgatttcttctcgcgctgttgaatcgtgcttctgcaagtgcatgtcagacgaatt
gtagtttctgctgataaaagatctcgaatgggtttcttaaaacacttttaagcgttttgcgccaattgatgcaaatatggattg
actcttatactttagatattgtcaaagccacacaaggtaaatgcataacggataacaattcccataagaaaaaatgttctggt
gtcaaactgtatatgagcaattctgaaacattctaaagatttctggttatgtgttaacttaagcatttgatagagagatattttca
aagaaatagaaaaaataatgttacaatcctccacattaatgtttacaatccgtccatctgtacttgacatgtcggatcataatcaa
gataatgggaatacagatataagttaaaaatgaattcactcatagaaaacttggaggctatattcgtcaatataaaagagcatcct
taaatagctgcacactggtacagtggttctactattgagtgaaaaaaaaaaaaaactaaaggcagcaataattttgtctaatcaa
attattaaattgctgctatttaagataacgATGAACGGTGACGAAACAAAGAAGGTGGAGAGCGAGTACATCA
AGAAACACCATAGACACGAGCTTGTAGAGTCTCAATGTAGCTCTACGCTCGTTAAGCACATCAAAGC
TCCTCTGCATCTCgtaagctttgcttctgttttcaagtgtaaaagataacgattttgagatgttaaatgattgtttgtttg
gaaaagGTGTGGTCAATTGTGAGGAGATTCGATGAACCACAAAATACAAACCATTTATCAGTAGGTG
TGTGGTACAAGGTAAGAAGCTGGAGGTTGGTAGCGTAAGAGAAGTGGATTGAAATCTGGATTACC
AGCTACTAAAAGCACTGAGGTATTAGAGATTCTTGACGACAATGAGCATATTCTCGGCATCAGAATA
GTTGGTGGTGTATAGACTCAAGgtaaatgaaatttcttaaatgtaccattcattccgacaagattattgttttttag
agcttaattgttattgtccaatcagAATTATTCTTCAACCATTTGTTACATTGGAGACGATAGACGGAAAA

ACAGGGACATTGGCTATAGAATCGTTCGTGGTGGATGTGCCGGAAGGTAACACAAAGGAGGAGAC
 ATGCTTCTTCGTGGAGGCTTTGATTCAATGCAATCTCAATTCTTTAGCAGATGTTACCGAGCGTCTACA
 AGCAGAATCTATGGAGAAGAAGATA**TGA**

ProRCAR5::RCAR5

GTGCCGGAAGGAAATACTGAGGAAGAACTACGTTGTTGCTGATACTATCGTTGGGTGTAATCTTA
 GGTCATTGGCTAAGTTATCGGAGAAGATGATGGAGCTCACTTAAggtgtaaagtcgtgggattgtaataa
 gtattagttttagaattaaaagtaaaactctacatttttacgaggttttgatatagcaactagcaaatatgcttattcaactg
 ggaataataggtataattatgtatttatgtcttgtaaataaaaataattgtttaagtttcttctaaatgcttattctgtttgc
 caaaagtatatacaattttagttgagtcatttctaaactctcttggtaaattgattgatataagccaaatgtgaaatcattcaagt
 taaaagttaaatcatttttttcttttgattaaaactctgttggtaacaggaattgactgtgagtactaacgtgtccagcgaaa
 tagcttctaaagcagactctgatcgttcagtgcttataccttctcagttgaaactgatgccaaagagcgtcttttagcatgtgcaag
 tgaagaaattaacatagttcgcttataaaaataaaaagtatatttatgattcattttttctgcacaaaaaaaaatacaaaaagtt
 gaaatacaatggtaattaatgtaattaaccctctcctcaacagcttcttttaagaggaaaaatagtttaaattctgttatattgg
 ctgtagctcaattgttcaacttctactatttttacactttttctcaagaactaattacatactagtagaatgaagagccatttcaaa
 ctattttactgaaagtaataatataaaaacattttgctaataatggtgtaacaataaaaaaaaaataaactcattatacatatt
 tacttaagattttcttaacaaaattaggattgttcgattatcctactacatagctaaaatacggcctgaaatcttgatagattgcatg
 caaagcttaccgaaattattttcatctcaatcatattgatcgaactgaaacggtttattctgtttaactttattttattgtgtg
 tctattttattttgatcagataaaaataagagtttgaaaatgtgagattcgattacgatcgaaggttcaattatttggctctttc
 aaattgtaacaaaagaaaaggaccataaaaagtaaacagaaatacaatttggttaagcttatcggttccggttcaattatct
 ttaccttgaaggagtaagtgtatgtttgggtcctcaaatggtatcttaaatctgtaggctcattgggctgttctcaacttggcgtt
 aaagatagtccttccctctcatctgttctgtttgtttttttgtttgtttttttcatttagtcaagttttatcacaaaaacaatgct
 tataaatgtgtgtaataaagtgtggttcgatgaacgaaatcgaaacgtggatctattacatgccactagttttccacaatccatg
 tcataaccctcaaatttaaccgaaatacattcttcattacaatgacgttacaaaacaatgtgcattctaaagtttacaattatttaa
 atatatttacggacaaatagtagccatagcctatatattgtcacatagctacacatcctacactgattaatcagcttttctttaa
 agcattttttggtttatgtgcatattacaatgtattcttttaaatatatacactttaaacttcttttatcatcttatgttatacaaat
 caacaaagttttcttactgattacattcatattttgcgaaaaacacaaaaaatgacaactcatatttttttagtcggcattgtt
 cttagatatttctgtataaatactgaaactaatgcatggaagcttcaaaaaggttgaagatactgtcacacaaaacaacggctg
 ataaaaggacaatttctcaaaaaacagcaatacaaa**ATG**GAAACTTCTCAAAAATATCATACGTGCGGTTCC
 ACACTAGTACAAACTATAGATGCTCCACTATCTCTAGTTTGGTCAATTCTACGTGCGGTTTGATAACCCT
 CAAGCCTACAAACAATTTCGTGAAAACGTGCAATCTAAGCTCCGGCGATGGAGGAGAAGGCTCCGTC
 CGTGAAGTGACGGTGGTTCCGGTCTTCCAGCGGAGTTACGCCGAGAGAGATTAGATGAACTTGAC
 GATGAGTCTCATGTGATGATGATTAGCATTATAGGTGGTATCATCGTTTGGTTAATTACCGGTCGAA
 AACGATGGCGTTTGTGGCGCGGATACGGAGGAGAAGACGGTGGTGGTGGAGAGTTATGTGGTGG
 ATGTGCCGGAAGGAAATAGTGAGGAGGAAACGACGTCTTTTGTGATACAATCGTTGGGTTAATCT
 TAAGTCATTGGCTAAGCTCTCGGAGAGGGTGGCTCATCTAAAGTTG**TAA**

ProRCAR6::RCAR6

tccttttctttcccctaatttagtttaataactattttgggtgtgggcagttccgttaaagagaagtaacacacttgttacaagaga
gaggtacaagacagtagcttttaccattttggtaaatacATGAAGTCTACTACCTTGTTTCATGGTTTCTTGTGTTCT
CATATTTTGTGTTCTTAGTACGTGAGAGgtacgtaatgtacactattgttctttcgatttagattagatcctcggtttaa
aagacaaaaaaaaacttactgcattatcaattttatataataataatcattttattacaatttgacattattttgggtgtgtatgt
atgattgataaaaaataaaaaacgaatagAGGTGAAATCGGTGGAGACTAAGGCCAAGAGAGTGAAGAAGGT
GTGCGAAAAGGCACAAGTATTCGAACAAAATTGTGGGTGGGACGGAAACAAAATTGCATAAGAG
GCTTTAATAAAAATCAAAGAATACCCTTTTCATTGCGAGTGTGGCATTATGATGCACCCAATAGCAGA
CGTATTTGCAAATGTAAATTTCCATATTCTCCTTGCTAAattttcatgtagtttttttaaatgttaaaaaaaatcat
gtagttccagaacctagttatctatctagaaattaataaataatgtatttaaggtttaactaaccagtaagatgaaccttttac
ttccttccatgttattgtgaacatgtctgaaggagttaatctccaacgcatgaattaatcattcccgttactccatttctaaaactct
ttataaatatgtattgatataagccaaattatatgtcgtacgatctttagtctttatcatacattcagaaaaatataactatagatt
aaaacctagctagccggaatagtttttaactataacattcgatttaatttaactattcaaacctcctcttttctttacattatctctcat
aagaactcaatagtagattgaattaaaagtcttggctgaaccaacttaatttcttattgactaaactcgtaaatgtctccttgatta
attttgcataattttttttctttgactaaagaaacaaaatcgctcagagattttagaatgtgagattgtgattgtgatttggctctttt
tgctagtctatatccgtgaatttaaatggagatggaaaaagaaaagtatattaacagaaatcacatttggtttaatttttatatcg
gttttggctgattatcggtaccctgaaggtaaaaaactaatgtaaagagtgatgctagttgggcttaaaatggatctataaattt
aggctcatctggcctctttctgagcttgccattttgattaagtctaagttctaactctcatctctgttcttatttggctctttc
cttttgtctactttctttttaaactctgtcaactatttgggtcttataatacactataaatgtgtgattaataagtgtgattcgtgtaa
accaactggaaccattatttgcactattttaacacagtcctatgtcatataaccgccaaccaaccgcaaattgttcttacagt
atttgtatacaatttgcctatgtacactgtttgatacttactcaggccgttaagatatttggatttatgtgcatgtataaaatatcaca
atggactaaactaaatattttattccaaagttaaatgtcatatagaatataataaaatttcgttgttacttgttatgcgttcagaat
ttcataattttagtatttctttcagtcggcctgttctaaagatatttctcatcttttgcgacctatagatttttctcatataaaacta
aaaaaaactgccactacgtaaaatatttgaagacaacaaccacaactgtcggtaggaaaacaaaattgtgaacaccaacaaa
cacgtATGAAAACATCTCAAGAACAGCATGTATGCGGTTTCGACAGTAGTACAACTATCAATGCTCCGT
TACCTCTAGTATGGTCGATCCTACGTCGATTTGATAACCCAAAAACATTTAAACATTTTCGTAAAACTT
GTAACTACGCTCCGGCGATGGAGGAGAAGGCTCTGTCCGTGAAGTCACGGTGGTTTCCGATCTTCC
GGCGAGTTTTAGCCTAGAAAGATTAGATGAACTTGACGATGAGTCTCATGTGATGGTGATCAGCATT
ATTGGTGGTGATCATCGTTTGGTTAATTACCAGTCGAAAACACTACGGTGTGGTGGCGGCGGAGGAGG
AGAAGACAGTGGTTGTGGAGAGTTATGTGGTGGATGTGCCGGAAGGAAATACTGAGGAAGAACT
ACGTTGTTTGTGATACTATCGTTGGGTGTAATCTTAGGTCATTGGCTAAGTTATCGGAGAAGATGAT
GGAGCTCACTTAA

ProRCAR7::RCAR7

ctagtatactatatgttattcatgagtttggaaagtatcggtttgttacaatcggaagttttgatctatcatatctactgtagttgctaatt
aactcggcttacttgcgccgtctatcttttctttgagtgtaaaaatttggatcatcaataaataatcttactgatagagataaaaaa
aataaaaaatgtgactattcttttctgttagaccggataaatagacattcaatcaaaggttttttttataacctacaaggtagtga
actccatttgttagaacaacttccattaccttgaacttttttattcttaataacacagaaagttgtgatacgggtgcaaaaacttat
caatgggtccgataagattgttcagagggtggcaatgggcttggcttaccataaagaaagcaagtttgagaaatacc

aaaattgcgattctgttttgattgtgacttgtgagccccaacaatatatgtatatatttcagcttgagctcaattcccatatatgctaca
actctaagacgcaatztatgaaaattggattttaaatagtcacatgcatgcatggttctcgagatggatatctaagagaagaataattt
gaattttataagtttattaagtcataattttaataacttaaatccaaatataatgttccatgtattttattttattcttataatacacttat
ggaaatctattctattttacttcatatctttaccatttttaattgcaattacctttataatccacttataaatatataaaaaaatcta
ttacattttatctcatgtctttacagattacacattggaattgagttttttttcatctaaaacttttgtttttataacatggagggtg
acacaatgccggccgttaacatgatcttagtctaggaaggctaaacataaaaccaaagccaagaaaaggactaacaacggact
ggatagtttgaaacccaaaacaaaacagaatggattttgtgctgtgtgggggtgaagcataaatgtataaatggaaaatatcatcat
taaagtttgggcttatacgggccttatttctaataaggcaatagactgatggaacattgaatatgctaccctggatatgtagaacttgc
atggctctcggattggatacgtagaacattacacttatgaaggaaaaagattggattctttttttctggcggcaaccaattaaga
gaaacactgttatgtttgtaacaagtgtgtgtttcgtaaaattccattgtgtgctttccggttaaatgacatctgtatttacctcgtgg
gcaatgacacatctatctatatttagctccaaaacattgctgcagcaaatttccaaaatagaccgactagatttataataatattggt
aattttatcagttggaagatattaattcttctgtaaaagatactcgtatatctctcttctgtttaaattggtgatagtagcaaaaga
aaaaccttcaaagagggtttgtaaaacatattccctatcactcttgcagaatacccttcaagatggttttgaatcttttgataa
aaccaagttccagaatatgcaagcctttatcaaaaagcaaaagaaagtttctaaatgccaacaagattgtgaatcttctactat
acaaggcagtcaataacttgtgtaagaatttatattgtaaaatgtttttggttagtatatagtaagaagaattcgaatcgaactctaa
gtttaaataattacatgaagaattcgtaaataaattaacaatataaaacactataaaaaatatttagcggggcttgccttcatttatat
gtacgtagattcgttcgatatgctttaaacaagtgaatacgaaaattctaaagtaagacacgaaaatacacgtcgataaaagaca
aaccattagaaaaacaaaacagaaa**ATG**GAAAGTTCTAAGCAAAAACGATGTCGCTCTAGCGTAGTCGAG
ACCATTGAAGCACCATTACCACTAGTGTGGTCCATCCTACGTAGTTTCGACAAACCACAAGCTTATCA
ACGTTTCGTCAAAAGTTGCACCATGCGCTCTGGCGGCGGCGGCGGCAAAGGAGGAGAAGGAAAAG
GCTCCGTCCGGGACGTGACGTTAGTCTCCGGCTTCCCGCGGATTTCAGCACGGAGAGGCTCGAAG
AGCTAGATGATGAGTCTCACGTGATGGTGGTAAGTATTATTGGCGGTAACCATAGGCTTGTTAATTA
CAAATCGAAAACGAAGGTGGTCCGCTCGCCGAGGATATGGCAAAGAAGACGGTGGTGGTGGAGA
GTTACGTGGTGGATGTGCCGGAAGGAAGTACGAGGAAGATACAATATTTTTTTGTTGATAACATTAT
TCGGTATAACCTTACTTCACTTGCTAAGCTCACAAAGAAAATGATGAAG**TAA**

ProRCAR8::RCAR8

GAAGGAACTCATTTTCGTTGGTTCTGCTCTTCTAAGTGAAGAGGGCTTACAAGCTTGAAAGgtgatgg
ccatgtgttagattgttggtgcatctatgtactttccatagatcttctttgcaatcatttagtggggaacctgatatgttgttatttctg
cagCAAGTTTCCAACAGAGTAATATCATGTCTGACCGGAACCATAACAACGGAACATTCCACATATCGT
TTTACATTTCTATTGACCTTGACCTTTATGTTTTAATTTGTCAAGAAGTCTACTGCATTTCTATTCTCTCC
TATCTCATTCTCTTTATTTACTTGCTTTACATGGTAAGGAATTGTGAATATATGGTCTCAGCCTCTCA
TGTTAGACATTTCTTCTATGATTCTCATTTTTTCTAttgtgaataatTTTTTccagacaactctttaaagagacttac
cattggactatgaaaaatcttcaaaaaaatcagaagctctcatcttacaattcaaaagattataacttaaaaaatggtagatccc
attaggaggctctcaccattggagatgggtcttatgagtccgtgaagctctctcgttattcttacagggcatgattcgtataatTTTT
aaaaaacaaacgattgggccttgaatTTtaattagaaagttaaacaattcaaaaaccacatggtgctctgtTTTTtttggg
tgatggctgaatatttcaaaaaccacaagatttattaactagtcttacaattacgattacTTTTTTTTacgttttatctcattgac
agggtataattataaccgtataaatatttttcttgagatcagcttttcaaaaaatgtagtgggactgaatgattcctctataat
taattacgacaattatcatagttggtttagaaaaaatagtaaaatgcacgtttgcatgcctatacaattcgagtgtacatgaaactt
gatgtagagtaccataccatgtcgaataatattatttttgaaaaaattacaaagtcgcatgcaacaaccttgtactatatga
tgagaatataataaaaaatgggcaacaagaacaaaagaaaatagagaaaaaaggaaaggataatctccacctaacaagtc
caaagaagattgcaagttgcaacatccacttgcttccgtaagctcttggataaggtctctaccgtcctccgactttctctc
catacataccacatttacatacgcatttacacatatgacaaacctcaacatctgtgcatgcacgtgtgctcatgcatgatg
tagttttacttcgcatgatgaccatgtctatctaaaattaccacaatcaatcaatcatgcgcttacagctggtgatattcaaaa
attgtacatgttatttctcataactatcacttttagtagattaagatcagaatgtgcatataataagtaaatttaacaataacagcaac
atattttactataactaatgatttatttaaaaaaaaagataaaaactaatctgaaatttcagtttttctatgaacaatttataacagt
attcatatgtagataaacctttagattctataataataaaattatcaagatggaaatgagggatctatagaatacaattaatttggg
gatataattcaagataatgaaggaggctctgaggaaagaaatcatgggggcataagatggtacaatgtatcatacatggtcaca
cacatctatgatgatacaaatgctctatatacacaactgtttctatatacacaacacaaaagccttcacatcccagctatctctat
ccatctatcttcaaatatataatttttaaaaacacacaatgttcatacttattgttattgttataaaaataaaagatgatcatacttttaa
atttctcaaaaaccaacttgacaaccgacagcgaacaagatcaaaaagctagctctctcttttctcatcaactatttctctc
cgatcgcaatatatacgattccataaattctccaaaaacaaattaagagatagaggagagatcATGAGGTCACCGGTGCA
ACTCCAACACGGCTCAGACGCCACTAACGGTTTCCACACGCTGCAGCCTCACGATCAGACCGATGGT
CCGATCAAGAGAGTGTGTCTCACGCGCGGTATGCATGTCCCTGAACACGTTGCGATGCACCACACAC
ACGACGTTGGTCCGGACCAGTGTGCTCCTCGGTGGTGCAGATGATCCACGCGCCGCTGAGTCCGT
GTGGGCTCTTGTGCGGCGTTTCGATAATCCGAAGGTTTACAAGAACTTCATCAGACAGTGCCGTATC
GTCCAAGGCGATGGACTACACGTCGCGCATCTCCGGGAGGTCATGGTGGTCTCTGGACTCCCGGCG
GTCTCGAGCACCGAGAGGCTCGAGATCTTGACGAGGAGCGTCACGTGATAAGCTTTAGTGTGCTT
GGTGGGGACCACAGGCTCAAGAACTACCGATCGGTGACGACACTACACGCGTCGGACGACGAAGGT
ACCGTGGTGGTGGAGTCTTACATCGTTGATGTGCCGCCGGGAAACACGGAGGAGGAACTCTAAGC
TTCGTTGATACTATCGTCCGGTGCAACCTTCAGTCTCTGGCTCGAAGTACCAACCGGCAAATAA

ProRCAR9::RCAR9

ccaatgaattggtgggtattgcacctccacaagttccctttgacaatgtgcctcttccgcaagaatgagatgcaactatttggac
aatttccttttaattacttttgatcgataatcttctttaatcacgttgtaatctgattcattcaaatatctatcgaaatthaagctt
atctttgatttttcgatactattttgaatthaagtcattttgtttataatcatagttggggatttaataatthtagtggaataata
ttttatgcatattggagatttttctcgagaaatattcacaacaaacaaacaaccggctttgcacaaaaataataatgacatgga
gtcgagttgtttataactaatgtttgcactatctcaccattggaattaaatcttgatatataatacatgtttgacaaaaaaaaaagt
tggcacaattatgttgttgaacaaatacgtctgatgcattgattgagattgactctttgaacccaaaaatgatcaccgtaatt
aatacattttccacatcaactgtaactattgtgttcagtaatatattggtgagtgattatgtcacctaaccgaaagcttataagat
gagcaatctttatctcgaggatggtgcaaaaaatagcaattgtaactttttgccttcttattctataaaatgtcagatataatagta
ctgcaaatgctcgcttattcgtattaatcttaacaactagggctacttgggaatatgtatagttgttggaaaaactaatgcatagata
accctttattttttccaattgtgtttgttattatgccaccactcaaatccaagagtccaatatattcatatgattgaaatatacgttt
gtggaagaaaacacaccaagaaatattgtccaattcgtaaattccctgactttacgttggttacttttagcaaaactgcttagttgat
tttcttcaattcgtcttattaatattctgttctttcttgttgaaggaatttgattaatacttttttagtatcgtcgaaggctcaagt
tgattacaagatgaggaaagattattatgatggaccatgacatgatattctcacaacttgaacattgaaagtcctatggagttat
ttttgaaatthttaccttagtcagaaggtccaacaaaataaaaaatccacaaaaacgcatccaagaatagtaaccaactgaaaata
gatcggcaatcacaagacaaaggtcggctctccaacaaatgtttcaagaatthttcaaactatgcataaattaagtatagctc
ttaaccaatataatagcttaaccaactcgacacatagtgatcatgttcttataatcttataaacgttttagagttagctatatata
gcctcgagacagtagaagattgaaatattctatgcaaacctcaagataatgttcaatgttttatattctgaaatattgatataatcgg
tgagatagagatgagttcagaatthtttctcggtatcttaaatgatattgatttcttcaacttctcattcaagagtttttggtaa
aacataaaaacgtccattcaattatagtaatgcttgtgtggttacgacaacatgctcattcattgtaataaaactggtgaaatataag
caccattgacaaatagacagcctcagtaacaaagcaaggaaaaacaaaatthaataaccggttatattaatatcgagaa
ccagtccgtagaattcatgggaaaccgggcccgtccttgatataaagaaagagagagacgtttcttaactgaagcagtacacaaa
ctcaacaaatccaagtggacaaccgaagaaccacacaaactaactcttttctaatccacatacttgcatthttatataaaa
cactctgtccttatatagttctgtatattacatgtaaatctctcattaatacaacctcagaagaaaaccatttgtttcttagagaga
gccaagaatattaagagatatagagaaaagatttgcttataATGCCAACGTCGATACAGTTTCAGAGATCCTC
CACCGCCGAGAAGCAGCCAACGCCACCGTAAGAACTATCCCCACCACCATCAGAAACAGGTTCAA
AAAGTGAGCCTCACGCGCGGGATGGCTGATGTGCCGAGCACGTGGAGCTTTCCACACGCACGTG
GTTGGTCTTCTCAGTGCTTCTCCGTCGTGGTACAAGACGTGGAGGCTCCGGTTCCACAGTCTGGTC
GATCCTAAGCCGTTTGAACACCCTCAAGCGTACAAACACTTCGTGAAAAGCTGCCACGTGGTTATC
GGAGACGGTCGAGAGGTTGGGTCCGGTGAGAGAGGTCAGAGTCGTCTCTGGTCTCCCCGCGGCGTTT
AGCTTAGAGCGGCTTGAATCATGGACGATGATCGCCACGTATCAGTTTCAGCGTCGTTGGTGGGG
ACCACAGACTCATGAACTACAAGTCGGTGACGACGGTGCATGAGTCGGAGGAGGACTCCGACGGCA
AGAAGAGGACACGTGTCTTGAATCATACTGTCGTTGACGTACCGGCGGGTAACGATAAGGAAGAGA
CTTGTAGCTTTGCTGATACTATAGTACGGTGCAACTGCAATCGCTGGCTAAACTCGCCGAGAACT
TCTAAATTCTCGTAA

ProRCAR10::RCAR10

GCTTCTCGTCACCACTCCTTTCTTCTTTACTTAATTTCCATCTTCCTTCTGCTTCTACACGTCCACATgc
aatTTgcaccgagaatcctaatttgtccttcattttaaggTTtaaaaagcatgTTtataaaaacatggaactggatgTTtTgtgag
atagccatcaaattagacaaaagggtccattaagcctgtgaaaaaaaaagaaaaaaaaaactaagagacgatcataagagtta
ggtgtgacctgacaagattctgtacaccgaaaccgactgtgaactgtgaagTcaacctctaattaacagttatTTTTtattcctaca
aatacggatccaacattattctcaattagtgaagTaatgtctgtctattTgcacattTcaaacccataatcaacaaaagttacatat
cctgaccgctgacatattatacactcatctgtgtatatctcaaTctcactTgcaggaattctctctagtactTTtattgtagatata
agatattagtagaatgTtagcaagaaaagatgTaaaacatatatacactatattagaaccgTcctTgtgagTTtTgattTt
atgataattTtaagTtaacaaaactgaattaattTgctTtatattaagatgTgtgtgaagTcaatacacaaatattaatctattctt
atcaaaaaaatttatattcaaaatttacagcaattataaagaactaatagcattgtattatgacttatcattaagatgggTtTgtgTc
catgtccggagTgtTaaaggTtTgaaaaccgagTtatgaatgTaaagaaacaagacagaatgctTgaaaacagagcatcaagt
aaatgTtTgtTtattattatgCagctaaaatggaaccggtgacggcattccaactTggccaatggatgtctagactcgctatatt
cttcaaggcagacgacacattctcccaacctcgaaatTgaattctcTgacggcaacaaaaatatactTcgaacTtTgtTgtgTc
tgatcagccaactccacatctTtagTtaaactctaatacctagagaataatagaatctataataactagttacaatgtagaagaaga
gacaacctataacgaagtagatactatagccaacgTaaaccaaaccaacaaagatgTgtgtagagaccagTtTtctTtcc
aaaatacggccaattaaaagTtTgTtctaaaaacaattTggccttagTtTgtatagTtTaaatgTtTcttagTgaggatTgTt
tTtcatgcccTtTgtTgtgTcctTtTtTgtatattgaagatcatatcaaagcaaaagcaatacattTtTcattcaaaaagTtC
ctcctTgctTgtcatcaaTctcTcaggaatTaaatataTgTtTgtaccTtTtagTtTgtTgTtattcggctctgatTtTgaatac
tcaaatatctagattTgcatctgatgcaattgaaaactTtTtTtTgcaattgaaaactcatatataTagtTggctagatataTgc
aattgaaaactcatatactagccatactatgaaataacaattgaaagactTtaagTtTgaaagaattctcactTtTgtatgTtTgtg
aattTgatctTcattccaatcgtTcaaaatcTgaaactTtaagcgtattcaatcaaacgaatctcTcctagatatacctTgTca
tTtcaagaagaagagaaaaagTtatgTtcaagaaactaaaagTctaaacctatTataattctagTtTgatatacagagaattat
atattgTcactTgccaattaaaaatcTgtgtatagaaaacagTcaagTcaacaactatagcaaggggcaaacgTaatTcac
aacaagcaactTgctcgTtTtTcgttatcaccactcacatgaactTgcattaaaaactctatctcTcaaatcgaaggcagc
ccaactTtTcgaagTcgtTgaaagTtTgattTgctTtTtTatatacacacatactTctcctccatacactTtctctTcaatcctcagT
tTtTtTcTaaagcctaataccatctcaagaagagatcaagattTgaaatcaagaagacaccattactcagatcaacATGCTTGC
CGTTCACCGTCCTTCTTCCGCCGTATCAGACGGAGATTCCGTTCCAGATTCCGATGATGATCGCGTCGT
TTCAAAAACGTTTTCTTCTCTCACGCGACTCCACGGCCGCTCGTTTTCCACACACGAGGTTGGTC
CTAATCAGTGTTGCTCCGCCGTTATTCAAGAGATCTCCGCTCCAATCTCCACCGTTTTGGTCCGTCGTAC
GCCGTTTTGATAACCCACAAGCTTACAACACTTTCTCAAAGCTGTAGCGTCATCGGCGGAGACGG
CGATAACGTTGGTAGCCTCCGTCAAGTCCACGTCGTCTCTGGTCTCCCCGCCGCTAGCTCCACCGAGA
GACTCGATATCCTCGACGACGAACGCCACGTCATCAGCTTCCAGCGTTGTTGGTGGTGACCACCGGCT
CTCTAACTACCGATCCGTAACGACCCTTACCCTTCTCCGATCTCCGGACCGTCGTTGTGAGTCTTA
CGTCGTTGATGTTCTCCAGGCAACACAAAGGAAGAGACTTGTGACTTCGTTGACGTTATCGTACGA
TGCAATCTTCAATCTCTTGCGAAAATAGCCGAGAATACTGCGGCTGAGAGCAAGAAGAAGATGTCTC
TGTA

ProRCAR11::RCAR11

tgcattgactcacacaaatcaaaataaaacgtaatatatatagttattatacatgtttccaaacgttatttttaacatttttagtttaaat
 gtattagtagtttagtatatacgcattgatttagatactaattggagatactattacatttaataatattttacctttttttttttgtta
 ataaaaataaaactgcatactaataatattttataacatgaaacagcatagaattttttaattaaaattcatcaatgggtctcccaa
 gaaatgggcaaagcattgggctcctacacatggcaacaattccaaaaaggagataaaaaacaaaaatgaagccttcaccaaattg
 ggaggatcagatcttgttgaagaccactagcaatgattcgaagcaataataccagcaatacatgacctacggcgttgccggcagtg
 gcaactgaaccggaaccatcgacggaagtattcgggtcacatctccgctccctttccgacgaccaccatacccgcaacaagtctcac
 acaatgtttaagctcaattccgacaaaattgtagtatacatatacttatagaccaagtggattggatcgtagttagtcacattct
 tttctttatgattaagccaaacgcaagcttgactaaactaatcattctctacttttactaaacacagcttgcgctccagccccaccat
 ttgttgagttcaaacctgaaatctttcttctccctacataatgtatatacatgtaaattgtttaccaattctttgattctttcagta
 caacaagtgttataaactcaataacaagggtttgctgaataaataatataaaaaataattttactacttttaacttcaaaataaaa
 ggcatccttatgaagggtcttctctgtcaaactgttcatgcctttttctatcaatctgttctcggagcattttctctgagttttctct
 tgaagtcttccctaccaccttgctaaaagattcctctccactgtttgttcttagtaaatctgtactgtataaagggtctctctcgga
 tgcctcttccaccgtttctctccaaaattttctccctacaacttttttaagaacaagtgtgaatcaagtccaaaaagttgatcttt
 atatcatcttttaaaaactcctctaaaatgttatttttaattgtttattaataataatattttctcttttttttttttaattttttttg
 aataacaggaggttctggaccgaagtccgtaatccctctagaccgaaaccacataatgtaatatagtttctctcaagcgtcactc
 gaactggcgaccttaaggttcgctaaaatctttaccaattgagctaacgacacttaatttttttaataatcacaactcctttgc
 atatatatttttttagttataaaaaaatcttt
 ttcttagattgtcactaaatataataaccaaccaaattgatatacctaaagaattaatgaaacgtgagtatattgttttcaacgact
 aaagaaacataataacaaaacttataaaaaatgaaattgtttttgataatttcaaatgacaaaataaaaaactacaacaattttc
 atcttaagatttcttttttccacaaataaaacctacgaatatgagttcttaacaataaaaaataaaatcaccacactctttaaaaa
 aaagaaacttatacgaataaagacttattcttgaataagtaacaaatccaatagtttataacagaaactccaggtcatctttctt
 aaataaacagattccattttttgattatacaccttccactctcacgtatatattttctactttacccttactatttaataataattcc
 atgtttacccttcatcttccctctaaaatccaacacagagagattcaacgctaaataaagagagagagagctctaaaagctcgtcgtc
 gcttcaatggtgaatctcaaccaattggataaataaaacaaaaacaaaaaaacttcacaaaaaaagagatccaaatta
 caaccATGCCTTCGGAGTTAACACCAGAAGAACGATCGGAACTAAAAACTCAATCGCCGAGTTCCAC
 ACATACCAACTCGATCCAGGAAGCTGTTTCATCACTCCACGCGCAACGAATCCACGCGCCTCCGGA
 CGTCTGGTCAATCGTACGACGATTTCGACAAACCACAAACATACAAACACTTCATCAAATCCTGCTCCG
 TCGAACAAAACCTTCGAGATGCGCGTCGGATGCACGCGGACGTGATCGTCATCAGTGGATTACCGG
 CGAACACATCAACGGAAAGACTCGATATACTCGACGACGAACGGAGAGTTACCGGATTAGTATCAT
 CGGAGGCGAACATAGGCTGACGAATTACAAATCCGTTACGACGGTGCATCGGTTTCGAGAAAGAGAA
 TCGGATCTGGACGGTGGTTTTGGAATCTTACGTCGTTGATATGCCGGAAGGTAACCTCGGAGGATGAT
 ACTCGTATGTTTGTGATACGGTTGTGAAGCTAATTTGCAGAAACTCGCGACGGTTGCTGAAGCTAT
 GGCTCGTAACTCCGGTGACGGAAGTGGTTCTCAGGTGACGTGA

ProRCAR12::RCAR12

tgacaaccataaactatgttttagcatatatatgctcttgaaaaagacaaaagaatatatgctctgcttatcgaaactccaaagca
atgtagcctaaatctactatataatgataaaaaaaaaatctgtgttataactaaattaggctggactattaaagcaaccactctcc
aaaaaaaaatgcaaatgtgtggatgtagagatatgtatcactcactgtatattccactactctttttttttaaataatgtacattccatta
taacatggtgagtgattcttgaaaaatattatattgaaaaatctttcaagccttttagaataaaaaaaaaatcgcaatgatcagaatcaa
tattattccaccaaatggacttttgatactttattatctctataatgctaaagaatatatagcaatctatctattcataaatatatta
attattttctaactttaacttttaggaaaaatcaatcataccagtttgagagcactattgtcctttcatttaaaatggaaaaattaatt
tagcgtaatgataaaatttatagaaaaatcgtttaggtataggttttagcaatataatttacactctggatattaactaaatcattg
ttataatcatcaaatttgatatacaagtgcaatgtgcaagtatatacttgacataaaaaatgaatgtctacaagacgcaaaaaaaaa
cagctggagactacttttatgattataactgtacctaccgtatctctggattctactcttacgtaccaatataatctttgtaacaa
aaaataaactatttactgtaatgatttttatattttttggacaaaagtataatgatttataggctggaatggtagcaaaaaccgc
acttaaaaccgtatcgcaacagtgctgattttcattactatttgaaccgcaccgcacttttgcgtaccgcaaaacgcagtcaccattc
acagccataatataaaaaataatttaatagaaaaacaaaagtcaaggtgataagagaaaaaagtaattgccattcggttgc
agataaataaactggcaaaaactagtaagatatgacacggaggctcatgctcagttgctcacatttaattatcacttgataaaaa
ttctctagtacaagtaaaatgttttaactttacaagtatattttttatgtaactgaaaatgttttaactttacaattatttagtttcg
agagaaatgggagttatagattaagataagtaatataggtataggcttataatagcttcacgaacaaaggctaaggctaaccttt
aatgcattcgaataaataatgattctatatttgagcatctaatcaaaatctacggttccaacaaaaaataattcaactcccgt
aataatttttattttataatttaattgcatttctattcagagttgaccaattcatttgtaatatattaccaagtgatgattaataa
aatagtaggaattcatgaagaatatgataaaatgagttattctaatttaactatatagtttaactcgtcaagatatttttaattagta
tcatatatataattttaactatagtttatacattcaatcagaatatagatggatgaataatatgataagtctaactaaactgtg
gttattgtcattaaatcaatcagattttcgaattcagcaaaataattccatctattataatgaacggatatatattttttgtagat
tattttagaatctacaaaaatattacgtaaattgtaatagttactaattttgatgtacgtgtctacaaatatagtaattatcaactaaa
agtagaaagattcagtgccaatgacatttatgtgatagccataaaaaaactcaagtctattaaatccaaatataaccttctctc
tttcttctctcaaattttcaactctctcttcaagttcaacaacaatatcaATGGCGAATTCAGAGTCTCCTCCTCA
CCAGTAAACGAAGAAGAGAACAGCCAGAGAATCTCAACTCCATCACCAACCATGCCTTCCGATT
TAACTCAAGACGAATTCACCCAACCTCCCAATCAATCGCCGAGTTCCACACGTACCAACTCGGTAAC
GGCCGTTGCTCATCTCTCCTAGCTCAGCGAATCCACGCGCCGCCGAAACAGTATGGTCCGTGGTGA
GACGTTTCGATAGGCCACAGATTTACAAACTTTCATCAAAAGCTGTAACGTGAGTGAAGATTTGGA
GATGCGAGTGGGATGCACGCGGACGTGAACGTGATAAGTGGATTACCGGCGAATACGTCTCGAGA
GAGATTAGATCTGTTGGACGATGATCGGAGAGTGACTGGGTTTAGTATAACCGGTGGTGAACATAG
GCTGAGGAATTATAAATCGGTTACGACGTTTCATAGATTTGAGAAAGAAGAAGAAGAAGGAT
CTGGACCGTTGTTTTGGAATCTTATGTTGTTGATGTACCGGAAGGTAATTCGGAGGAAGATACGAGA
TTGTTTCTGATACGGTTATTAGATTGAATCTTCAGAACTTGCTTCGATCACTGAAGCTATGAACCG
GAACAACAACAACAACCTTCTCAGGTTAGGTAA

ProRCAR13::RCAR13

ggcgcttttcttgctagtttgcataagaacagcctttctctttcacaattatgcaaaagtaataataattctaccattctccacag
 accattacattttgcttcttaattttcacaagatacttgagaactcaggcctgtagcatcatggtgattctaaacgacaacttaaga
 ggcaaacatggaactatgaatgtgtatatacttagattaataatgcacactgcaagctgattaactgcaactccaactatctatctac
 tacttacttcatthaactgataacttacCAACTAAGATATACAGGATCTGATGTCCTTAGTTGGAGACGTGGTT
 TCACAGCAAGTAACCAAGCAGGAAAGCCTCCCAAATCCCATTctgtcatggagatgggaacatgtatcagaactt
 tttccgtgtataagcaaatctccacataatgtggtaaaaaacattggtatcaactcaataagaatcacaacaacacagacCTCC
 ACAGATATAAGGTCCAGCACGTAGCATAACCAGAAAATCTAGTTTCTCACACAGCTTGAGAAAGGAG
 ACAAGATACCAATACCCTCAAAAACCATCTTCCAGGCTTTGGTTCATGCAGATTCCAAGGAACGTA
 TACTTGAATAGTATTCAAGCCTAAAGCATTGGCTCTTAAAAGCCGATCCTCCAGTActgcatccataatct
 ggcatthaattcatcaaatcatatataataacataacataatgatggttaacagcagaaaaattgaagatttcttacttagcaatc
 atatggattacttgtataaagacacatgtacCTCTGGAAGAACACGAAAGTAATGCAAATCACCAATGATC
 TGAAAACGATTCCCATCTTCCAGAAATTGTCATCCTTGATATAAACTTGCGAGATATCATctgcatctc
 ttaaaactgaaagtttagaacgtttacattgatttcggtccaactaaaacgaagcaattagtagaaagcactgaagatgaatcatg
 cttacCTTCTCGTCTGAGGTATAGCAGAAGGTAGAGACTGAGGAGTATATGACAGTGAAGGGAGAA
 GAGCGAAGACAGGAACATAGATTCCGACAACACTACAAGAACCAGGAGCAACATGGAAGCCAATTGAT
 GTCTTCTTTGTCTTCCCGTTGATGGCCAGCTTGTATCGCCATcgtccctcttctgcaatagtagccttgccaaatt
 gcgcacttttagccggttttagcaaaattcaactcctaaaccgggagacatcggttcggtgaactaatgccgggttcgatactgta
 tcatagaaacctgacggatacaatcaccacatcagagacagactgcaacaagaagaagttgaagtataccaatcaatttcctaact
 tgatgttccttaacaagcccagatttgaaaaggacaagctaccaaaaactcaaatgggttaagaagctatcgctatcgtagccgc
 aaattcaagccccatggccgaaaagtaaacggctcgatttgacgacaacatcactacttctgtatcacgtgcacatcacgtgtg
 attagagtaggactaaagcaaaaaataaaattacataattgtgtgtagtgtattggacatgggctcaactcaaagttacactaat
 ctgattgtttttcttgaatacacgcaacttgcatcaaaaccaatgccatacgaagctctaaatcagaacaactcttctccac
 catatacaccttaatggggcggtgatcttctctacgtcttgcatacatattcaatttaacaaatttagtttagattccattttgatg
 cttcattttcgattgtttatccaaaagttgatctataggttagcttctgaaggatccaatgagtcatacaataatgagatttgatgtca
 cgttcacactgtacaccaatcttctaaaagccaaatgacaaaggcattttcgtgcagcccaactccaaatattagtcataacaca
 ttatatatctatatatacgtatgtcaagagaattagtcctagtttcgtacacaattttcttctcaaaattaaagtagcaccctaaaccA
 TG AATCTTGCTCCAATCCATGATCCATCATCATCAACAACAACAACATCATCGTCAACACCATACG
 GATTAACAAAGGACGAGTTCTCAACACTAGACTCCATCATCCGAACACACCACAGTTCCCAAGATCG
 CCAAACACGTGCACATCACTCATAGCACACCGTGTAGACGCACCGGCACATGCCATATGGAGATTG
 TCCGCGACTTCGCAATCCAAACAAATACAAACACTTCAAGAGTTGCACCATCAGAGTTAACGGT
 AACGGCATCAAAGAGATTAAAGTTGGGACTATAAGGGAAGTTAGCGTGGTCTCTGGTCTTCCAGCGT
 CAACAAGCGTTGAGATACTCGAAGTTCTTGACGAAGAGAAACGAATCTTGAGTTTTCTGTGTTCTGG
 AGGAGAACACCGGTTAAATAATTACCGGTTCGTTACATCGGTCAACGAGTTCGTGCTTGGAAAAG
 GATAAGAAGAAGAGAGTGTATAGTGTGGTATTGGAGTCTTACATTGTTGATATAACCACAAGGTAACA
 CGGAAGAAGATAAAGGATGTTTGTGGATACGGTCGTTAAGTCGAATCTACAGAATCTCGCCGTCAT
 TTCCACGGCTTCTCCGACCTGA

ProRCAR14::RCAR14

ggctcatggcctctctacaaataaaaccttaaaggctaaaacaactaatatttgataaaataatggtctaattaatagttattctaattattatttgctacatttgatcaaagtagataattcagattataatTTTTTTTaatataataccaaaactttaaacatcaattactaaaacttaattaatcacttacaaaacaattatgtatacaaccactttaaacatcacttacattgaaagagagttctacaatattgttgca tttgctctaattcgttacgtaagatttgacttagataattaatcacctcgtaacgacaaatggcatagtctcattaataattgtagaa ccaacttattaaagcactattcaactaataaaaagacctatggcagaaagaattactccttattgaataacttaactattattgcatt aatgaataaaatatcaaataaaacgagacaataactgtttctaataatatcactaattatgaaatagagagagtagtgatgtttta agattttgtaaaaatactaactgactactttttgtaatcaacaagctttatcttagttaagagcaatgttatatagcttcacctctatc accagtcggattctaagcattgtatagcttctcatattttgtttaagaacataaacttatcgaactggaattgccctcgataagttt ctttttagaaaataagcaactttctatgattatatcatctctctcatagaattctgttagctaccgaaaaatgattaaatcactcc ttattacaaaacatattacattggatctataactgtgaattgataaattctattaaattcaagaaacaaggatcttaagacataa gaaaaacaattgtaaagaaataaaaataaacgataataagtttatatcataaattttatttttacattgaaatgaaaacatgaa ataaaataaatttctgaaatattacttattatggaaggagaagatatttagttcacattttatattgggtagctgtatcaaagttata cccgaatcgggttggctcggctcgttgtcaagaaccataaccgtaaataagacaaaatagtttttaggtagttaaattaggtgc tttctaaaaatgatcaagcatcgaacatctattatggaagacctaattattaatacatgtgcaatacagtgtaaccgtcccactaaa tcaaggaataatacagagaattttgttaactacaagacaaaataaccagctcagaccacccttctttctttttctttcgagacc caaaagagtggtagccgatatttattaatattttgtcatttcccacagttttatttaaattataaaaataaaatattggagtaggtc catcaatttagttattggattttgggaggtggtggaccaagtcttaatgtgtagtgactgttcattgaaaacataattatagccaatg ttaacattatgtattaactgatttaaagtttactaaaccactttacaataaataaaatttcaacttctagaataaagattgtttcac ctataggttaaagatattgagttcaatttacgccaatgtataaatcctctacataaataagaagatggaaactcttgacaaaatgg gctataaataagaaatgatctagttttgtattccctctgtttaatattttaccacaaattaagaaagcataaaaatattcattaat tgttctctttacataaaaaaacattattaataaactgaattcaactaatataaaaaatgattgtaaaatataattggtataaaaaatgc attaatttgataaaaaatgaaagcatcacttaaatgaaactttttgttttgctaaaacatcacttaaatgatacgggaagagt ataagttagaacaagagttaatatatggacaataaacaacagaaaggataaatccgtccaaagaacaacacccatagatttgt agtaatatataaaaaaacactcatagctccaaaaaaagaactgtcttttattctcatctttcacaaccccccaacctccaaca gaagacctctttcataaaaccctcacagtggtgactgattcatcaccATGAGCTCATCCCCGGCCGTGAAAGGCCTA ACCGATGAAGAGCAGAAAACCTCGAACCGGTTATCAAAACGTACCACCAGTTCGAACCAGACCCAA CCACGTGCACTTCTCTCATAACCCAACGCATCCACGCTCCGGCCTCCGTGGTTTGGCCTTTATCCGCC GCTTCGACAACCCGAACGCTACAAACACTTTGTAAAAAGGTGCCGTCTCATCTCCGGTGATGGTGA CGTCGGAAGCGTCAGAGAAGTGACCGTAATCTCCGGCCTCCAGCCTCAACCAGTACCGAGCGGCTT GAGTTCGTGATGACGACCACCGTGTCTAAGCTTCAGGGTCGTCCGGCAGAGACCCGACTCAAG AACTACAAATCAGTGACGTCGGTCAATGAGTTCTTGAATCAAGATTCCGGCAAGGTTTACACGGTGG TTCTTGAATCTTACACCGTTGATATTCCCGAGGGAAACACAGAGGAAGACACTAAAATGTTTGTGGA CACTGTCGTCAAACCTCAACCTTCAGAAACTCGGAGTTGCCGCCACATCTGCACCTATGCATGATGATG AATAA

5.4. Protein-Alignment für RCARs und PP2Cs Gruppe A

5.4.1. RCAR Aminosäuresequenz-Alignment

RCAR1	-----MMDGVEGGTAMYGGLQTV-----QYVRTHHQH	27
RCAR2	-----MEMIGDDTDTEMYGALVTA-----QSLRLRHLH	29
RCAR3	-----MEANGIEN---LTNPNQER-----EFIRRHKKH	25
RCAR4	-----MNGDE-----TKKVES-----EYIKKHHRH	20
RCAR8	-----MRSPVQLQHGS DATNGF-HTLQPHDQTDGPIKRV-CLTRGMH-VPEHVMHHHTH	51
RCAR10	-----MLAVHRPSSAVSDG-DSVQIPMMIASFQKRFP SLSR-----DSTAARFHHTH	45
RCAR9	-----MPTSIQFQRSSTAAEAANATVRNYPHHQKQVQKVSLTRGMADVPEHVELSHHTH	54
RCAR5	-----MET	3
RCAR6	-----MKT	3
RCAR7	-----MES	3
RCAR11	-----MPSELTPEERSE-----LKN SIAEFHTY	23
RCAR12	MANSESSSPVNEEENSQRISTLHHQTMP S DLTQDEFTQ-----LSQSIAEFHTY	50
RCAR13	-----MNLAPIHDPSSSSTTTTSSSTPYGLTKDEFST-----LDSIIRTHHTF	43
RCAR14	-----MSSSPAVKGLTDEEQKT-----LEPVIKTYHQF	28
RCAR1	LCRENQCTSALVKHIKAPLHLVWVSLVRRFDQPQKYKPFVSRCTVIG-DPEIG-----SL	80
RCAR2	HCRENQCTSVLVKYIQAPVHLVWVSLVRRFDQPQKYKPFISRCTVNG-DPEIG-----CL	82
RCAR3	ELVDNQCSTLVKHIKAPVHLVWVSLVRRFDQPQKYKPFISRCTVNG-NMEIG-----TV	78
RCAR4	ELVESQCSSTLVKHIKAPLHLVWVSLVRRFDQPQKYKPFISRCTVNG-NMEIG-----SV	74
RCAR8	DVGPDQCCSSVVQMIHAPPEVSWALVRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----VGDL	106
RCAR10	EVGPNQCCSAVIQEI SAPISTVWVRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----VGSL	100
RCAR9	VVGPSQCFVSVVQDVEAPVSTVWVILSRFEHPQAYKHFVK SCHV VIGD GRE-----VGSV	109
RCAR5	SQKYHTCGSTLVQTI DAPLSLVWVILRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----EGSV	57
RCAR6	SQEQHVCGSTLVQTI DAPLSLVWVILRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----EGSV	57
RCAR7	S-KQKRCRSSV VETIEAPLPLVWVILRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----EGSV	62
RCAR11	QLDPGSCSSLHAQRIHAPPELWVIVRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----RVGCT	78
RCAR12	QLGNGRCSSLLA QRIHAPPELWVIVRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----RVGCT	105
RCAR13	PRSPNTCTSLIAHRVDAPAHAIWRFRVDFANPNKYKHFIRQCRIVQGDGLH-----IKVGTI	102
RCAR14	EPDPTTCTSLITQRIHAPASVVWPLIRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLH-----DVGSV	82
* * . : ** : * . : * . : * : * : * :		
RCAR1	RENVKSGLPATTSTERLELLDDEEHLGKIKIIGGDHRLKNYSSILTVHPEIEG-----	135
RCAR2	RENVKSGLPATTSTERLEQLDDEEHLGINIIGGDHRLKNYSSILTVHPEMIDG-----	137
RCAR3	REVDVKSGLPATRSTERLELLDDNEHILSIRIVGGDHRLKNYSSISLHPETIEG-----	133
RCAR4	REVDLKSGLPATKSTEVLEILDDNEHILGIRIVGGDHRLKNYSSISLHSETIDG-----	129
RCAR8	REVMVVSGLPAVSSTERLEILDEERHVISFVSVGGDHRLKNYRSVTTLHASDDEG-----	161
RCAR10	RQVHVVSGLPAASSTERLDILDDERHVISFVSVGGDHRLSNYRSVTTLHPSPIG-----	155
RCAR9	REVRVVSGLPAFSLERLEIMDDDRHVISFVSVGGDHRLMNYRSVTTLHSEEDSDG---	166
RCAR5	REVTVVSGLPAEFSRERLDELDDESHVMVISIIGGDHRLVNYRSKTMFAVAADT-----	111
RCAR6	REVTVVSGLPAFSLERLDELDDESHVMVISIIGGDHRLVNYRSKTMFAVAADT-----	110
RCAR7	RDVTLVSGFPADPSTERLEELDDESHVMVISIIGGDHRLVNYRSKTMFAVAADT-----	117
RCAR11	RDVIVISGLPANTSTERLDILDDERRVTGFSIIGGEHRLTNYKSVTTVHREFEKEN-----	133
RCAR12	RDVNVISGLPANTSRELRDLDDDRRVGTGFSITGGEHRLTNYKSVTTVHREFEKEEEEE--	163
RCAR13	REVSVVSGLPASTSVEILEVLDEEKRIISFRVLGGEHRLNNYRSVTSVNEFVLEKDKKK	162
RCAR14	REVTVISGLPASTSTERLEFVDDDRVLSFRVVGGEHRLKNYKSVTSVNEFVLEKDKKK--	140
: : *.:** * * * : * : * : * : * : * : * : *		
RCAR1	RAGTMVIESFVVDVPQNTKDETCYFVEALIRCNLKLADVSRERLASQDITQ-----	187
RCAR2	RSGTMVMESFVVDVPQNTKDDTCYFVESLIKCNLKLACVSRERLAAQDITNSIATFCNA	197
RCAR3	RIGTLVIESFVVDVPEGNTKDETCYFVEALIKCNLKLADISERLAVQDITTESRV-----	188
RCAR4	KTGTLAIESFVVDVPEGNTKEETCFVEALIQCNLKLADVTERLQAES-MEKKI-----	183
RCAR8	---TVVVS YIYVDVPPGNTKEETLSFVDIVRCNLQSLARSTNRQ-----	203
RCAR10	---TVVVS YVVDVPPGNTKEETCFVDIVRCNLQSLAKIAENTA AESKKKMSL-----	207
RCAR9	KKRTRVVS YVVDVPPGNTKEETCSFADTIVRCNLQSLAKLAENTS KFS-----	215
RCAR5	EETVVS YVVDVPEGNSEETTSFADTIVRCNLQSLAKLSEKMMELT-----	161
RCAR6	EETVVS YVVDVPEGNSEETTLFADTIVRCNLQSLAKLSEKMMELT-----	159
RCAR7	AKKTVVS YVVDVPEGTSEEDTIFVVDNIIRYNLQSLAKLTKKMMK-----	164
RCAR11	RIWTVVLESYVVDMPGNS EDDTRMFADTVVKNLQKLATVAEAMARNSGDGSGSQVT--	191
RCAR12	RIWTVVLESYVVDMPGNS EEDTRLFADTVVKNLQKLASIT EAMNRNNNNNNSSQVR--	221

RCAR13	RVYSVVLESYIVDIPQGNTEEE	EDTRMFVDTVVKSNLQ	ONLAVISTASPT-----	209
RCAR14	-VYTVVLESYTVDIPEGNTEEE	EDTKMFVDTVVKLNLO	QKLGVAATSAPMHDD-----	190
	: .:***: **:* *. :::* *.: :: ** .*. :			
RCAR1	-----			
RCAR2	SNGYREKNHTETNL	211		
RCAR3	-----			
RCAR4	-----			
RCAR8	-----			
RCAR10	-----			
RCAR9	-----			
RCAR5	-----			
RCAR6	-----			
RCAR7	-----			
RCAR11	-----			
RCAR12	-----			
RCAR13	-----			
RCAR14	-----			

Abb. 5-1 Alignment aller 14 RCAR.

Dargestellt ist das komplette Alignment der Primärstruktur aller 14 RCARs. Gelb hervorgehoben sind jene Aminosäuren, wo sich RCAR1-3 von den RCARs 4-14 unterscheiden.

5.4.2. PP2C Gruppe A Aminosäuresequenz-Alignment

HAB1	MEEMTPAVAMTLSLAANTMCES---	SPVEITQLKNVTDAAADLLSDSENQSF	CNGGTECTM
HAB2	MEEISPAVALTLGLA-NTMCDSGISSTFDISE	LENVTDAAADMLCNQKRQRY	SNGVVDCIM
ABI1	MEEVSPAIAAGPFRPFSETQ-----	MDFTGIRLGKGYC	NNQYSNQD
ABI2	MDEVSPAVAVPFRPFTDPH-----	AGLR-----	GYCNGES----
AHG1	MTEIYRTISTG-----RG-----	DDVSPTKC-----	RERRRRRI-----
PP2CA	MAGICCGVVGE-----TEPA---	APVDSTSRASLRRR-----	LD-----
HAI1	MAEICYENETM-----MIET---	TATVVKKATTTTRRRRERS	SSSQAARRRRM-----
HAI2	MADICYEDETS-----ACES---	RPLWSSR-----	KWRI-----
HAI3	MAEICYEVVTD-----ACPS---	SVYESTP-----	AHSR-----
	* :		
HAB1	EDVSELEEVEGEQDLLKTLSD--	TRSGSSNVFDEDDVLSVVEDNS	AVISEGLLVVDAGSEL
HAB2	GSVSEKTLSEVRSLSS-----	DFSVTVQESEEDEPLVSDATI	I SEGLIVVDARSEI
ABI1	SE-----NG--DLMVSLPE--	TSSCSVSGSHGSESRK-----	
ABI2	-----RVTLPE--S-SCSGDGAMK	DSSFE-----	
AHG1	-----EMRRQAAVFG--	EPSSS-----	RNRDRT----
PP2CA	-----LLPSIKIVADSAVAPPLE-	-----	NCRKRQ----
HAI1	-----EIRRFKFSVSG-EQEPVFV-	-----	DGDIQRRR----
HAI2	-----GVQRFMRMSPS-EMNPTAST	TTEEDKS-----	EGIYNKRN----
HAI3	-----RRPRFQTV-----	MHEDWE-----	K--NCKRS----
HAB1	SLSNTAMEIDNGRVLATAIIVGESSIEQVPT	AEVLIAGVNQDT----	NTSEVV----IRL
HAB2	SLPDT-VETDNGRVLATAIILNETTIEQVPT	AEVLIASLNHDVNMEVATSEVV----	IRL
ABI1	-----VLISRI--NSPNLNMKESAAADIV	VVDISAGDEINGSDI-----	T
ABI2	-----I--NTRQ-DSLTSSSSAMAGVDI	SAGDEINGSDEFDPRSMNQ	
AHG1	-----DME-----VYSSFD---	VPLRKQ-ARRSEIGGLPADIGG	FLAPPAAS-----
PP2CA	-----KRE-----TVVLSTLPGNLDL	DSN-VRSENK-----	KARSAVT-----
HAI1	-----RRE-----	STVAASTSTVFYETAKEVVV-	-----
HAI2	-----KQE-----EYDFMNCASS	SPSQSS-PEEESVLSLESDSV	SISDGNSSVN-----
HAI3	-----KQE-----ALA--TRYSSI-	-----PRSSRED-----	FS-----
HAB1	PDENS NHLVKGRSVYELDCIPLWGT	VS IQGNRSEMEDAF	AVSPHFLKLP I KMLMGDHEGM
HAB2	PEENPNVARGRSRVSYLECIPLWGT	ISICGGRSEMEDAVRALPHFLK	IP I KMLMGDHEGM
ABI1	SEKKMISRTE SRSLFEFKSVPLYGFTS	ICGRRPEMEDAVSTI	PRFLQSSSGSMLDGR---
ABI2	SEKKVLSRTE SRSLFEFKCVPLYGVTS	ICGRRPEMEDSVSTI	PRFLQVSSSSLLDGR-VT
AHG1	SCQK--SEAPVWKGEETEDEPLYGIV	SVMGRSRKMEDSVTVKPNLCK	PEVN-----
PP2CA	NSN-----SVTEAESFFSDVPKIGT	T SVCRRRDMEDAVSIHPS	FLQRNS-----
HAI1	LCES--LSSTVVALPDPEAYPKYGVAS	VCGRRREMEDAVAVHPFFSR	HQTE-----

```

HAI2      -DVA--VIPSKKTVKETDLRPRYGVASVCGRRRDMEDAVALHPSFVRKQTE-----
HAI3      -----DQNVDVSSPRYGVSSVCGRRRREMEDAVALHPSFSSPKN-----
              * * * : * .***: . * :
HAB1      SPSSLTHLTGHFFGVYDGHGGHKVADYCRDRLHFAALAEIERIKDELCKRNTGEGRQVQWD
HAB2      SPSSLPYLTSHFFGVYDGHGGAQVADYCHDRIHSALAEIERIKEELCRRNTGEGRQVQWE
ABI1      --FDPQSAAHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALAEIAKEKPMLCDG---DTWLEKWK
ABI2      NGFNPHLSAHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALTEEIVKEKPEFCDG---DTWQEKWK
AHG1      ----RQRPVHFFAVYDGHGGSQVSTLCSTTMHTFVKEELEQNLEEEEEEGSENDVVERKWR
PP2CA     ----ENHHFYGVFDGHGCSHVAEKCRERLHDIVKKEVEV--MA-----SDEWT
HAI1      ---YSSTGFHYCGVYDGHGCSHVAEKCRERLHELVRREEFE----A-----DADWE
HAI2      ---FSRTRWHYFGVYDGHGCSHVAARCKERLHELIVQEEALS--K-----KEEWK
HAI3      ----SEFPQHYFGVYDGHGCSHVAARCRERLHKLIVQEEELSSDMED-----EEEWK
              *: .*:**** *: * :* : :*
HAB1      KVFTSCFLTVDGEIEGKIGRAVVGSSDK-----VL-----EAVASETVGSTAVVA
HAB2      KVFVDCYLKVDDEVKGINRPVVGSSDR-----MVL-----EAVSPETVGSTAVVA
ABI1      KALFNSFLRVDSEIES-----V--APETVGSTSVVA
ABI2      KALFNSFMRVDSEIET-----VAHAPETVGSTSVVA
AHG1      GVMKRSFKRMDEMA-----TSTCVCGTSVPLCNCDPREAAISGSTAVTA
PP2CA     ETMVKSQFQKMDKEVSQRECNLVVNGATRSMKNSCRCELQSPQC-----DAVGSTAVVS
HAI1      KSMARSFTRMDMEVVALN-----AD-GAAKCRCELQRPDC-----DAVGSTAVVS
HAI2      KMMERSFTRMDKEVVWVG-----ETVMSANCRCELQTPDC-----DAVGSTAVVS
HAI3      TTMERSFTRMDKEVVSWG-----DSVVTANCKCDLQTPAC-----DSVGSTAVVS
              : .: :*
HAB1      LVCSSHIVVSNCGDSRAVLFRGKEAMPLSVDHDKPDREDEYARIENAGGKVIQWQGARVFG
HAB2      LVCSSHIVSNCGDSRAVLLRGKDSMPLSVDHDKPDREDEYARIEKAGGKVIQWQGARVSG
ABI1      VVFPSHIFVANCGDSRAVLCRGKTALPLSVDHDKPDREDEAARIEAAGGKVIQWNGARVFG
ABI2      VVFPPTHIFVANCGDSRAVLCRGKTALPLSVDHDKPDRDDEAARIEAAGGKVIQWNGARVFG
AHG1      VLTHDHIIVANTGDSRAVLCRNGMAIPLSNDHDKPDRPDERARIEAAGGRVIVVDGARVEG
PP2CA     VVTPEKIIVSNCGDSRAVLCRNGVAIPLSVDHDKPDRPDELIRIQQAGGRVIVVDGARVLG
HAI1      VLTPEKIIVANCGDSRAVLCRNGKAIALSSDHPDRPDELDRIQQAGGRVIVVDGPRVLG
HAI2      VITPEKIIVANCGDSRAVLCRNGKAVPLSTDHPDRPDELDRIQEAGGRVIVVDGARVLG
HAI3      VITPDKIVVANCGDSRAVLCRNGKVPPLSTDHPDRPDELDRIEGAGGRVIVVDCPRVLG
              :: :*.*: * ***** * : ** ***** ** *: ***: : ** *
HAB1      VLAMRSRIGDRYLKPYVIPEPEVTFMPRSREDECLILASDGLWDVMNQEVCEIARRRIL
HAB2      VLAMRSRIGDQYLEPFVVPDPEVTFMPRAREDECLILASDGLWDVMSNQEACDFARRRIL
ABI1      VLAMRSRIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVKEDDCLILASDGLWDVMTDEEACEMARKRIL
ABI2      VLAMRSRIGDRYLKPSVIPDPEVTSVRRVKEDDCLILASDGLWDVMTNEEVCDLARKRIL
AHG1      ILATSRAIGDRYLKPMVAWEPEVTFMRRESGDECLVLASDGLWDVLSQLACDIARFCLR
PP2CA     VLAMRSRAIGDNYLKPYVIPDPEVTVTDRTEDECLILASDGLWDVVPNETACGVARMCLR
HAI1      VLAMRSRAIGDNYLKPYVISRPEVTVTDRANGDDFLILASDGLWDVVSNETACSVVRMCLR
HAI2      VLAMRSRAIGDNYLKPYVTSEPEVTVTDRTEEDEFLLATDGLWDVVTNEAACTMVRMCLN
HAI3      VLAMRSRAIGDNYLKPYVSCEPEVTTDRRD--DDCLILASDGLWDVVSNETACSVARMCLR
              **: ***:***.***:* : ***** * *: ***:***.***: .: .* ..* :
HAB1      MWHKKNGA-----PPLAERGKIDPACQAAADYLSMLALQ
HAB2      AWHKKNGA-----LPLAERGVGEDQACQAAAAYLSKLAIQ
ABI1      LWHKKNVAVAGDAS-----LLADERRKEGKDPAAMSAAEYLSKLAIQ
ABI2      LWHKKNAMAGEAL-----LPAEKRGEGKDPAAMSAAEYLSKMLAQ
AHG1      EETPSSLDLNRMA-----QEDDNDGEQNPSRSVLAATLLTRLALG
PP2CA     GAGAGD-----DSDAAHNACSDAALLLTKLALA
HAI1      GKVNGQVSS----SPERE--MTGVGAG-----NVVVGGDLDPKACEEASLLLTRLALA
HAI2      RKSGRGRRRGETQTPGRSEEEGKEEEEKVVGSRKNGKRGEITDKACTEASVLLTKLALA
HAI3      GGGR-----RQDNEDPAISDKACTEASVLLTKLALA
              . * : * : :*

```

```
HAB1      KGSKDNISIIVIDLKAQRKFKTRT--
HAB2      MGSKDNISIIVIDLKAQRKFKTRS--
ABI1      RGSKDNISVVVVDLKPRRKLKSKPLN
ABI2      KGSKDNISVVVVDLKGIRKFKSKSLN
AHG1      RQSSDNISVVVIDLKNSSQ-----
PP2CA     RQSSDNVSVVVVDLRKRRNNQASS--
HAI1      RQSSDNVSVVVVDLRRDT-----
HAI2      KHSSDNVSVVVVIDLRRRRKRHVA---
HAI3      RNSSDNVSVVVVIDLRR-----
          *.**:*:*:*:**:
```

Abb. 5-2 Alignment aller 9 PP2Cs der Gruppe A.

Dargestellt ist das komplette Alignment der Primärstruktur aller 9 Gruppe A PP2Cs. Gelb hervorgehoben ist jenes Threonin, welches in allen PP2C der Gruppe A konserviert ist und für die Komplexförmierung mit den RCARs als essentiell angesehen wird, mit Ausnahme von AHG1.

5.5. Physiologische Untersuchungen verschiedener RCAR Linien

5.5.1. Relative Keimung und Wurzelwachstum von RCAR Knockout Linien

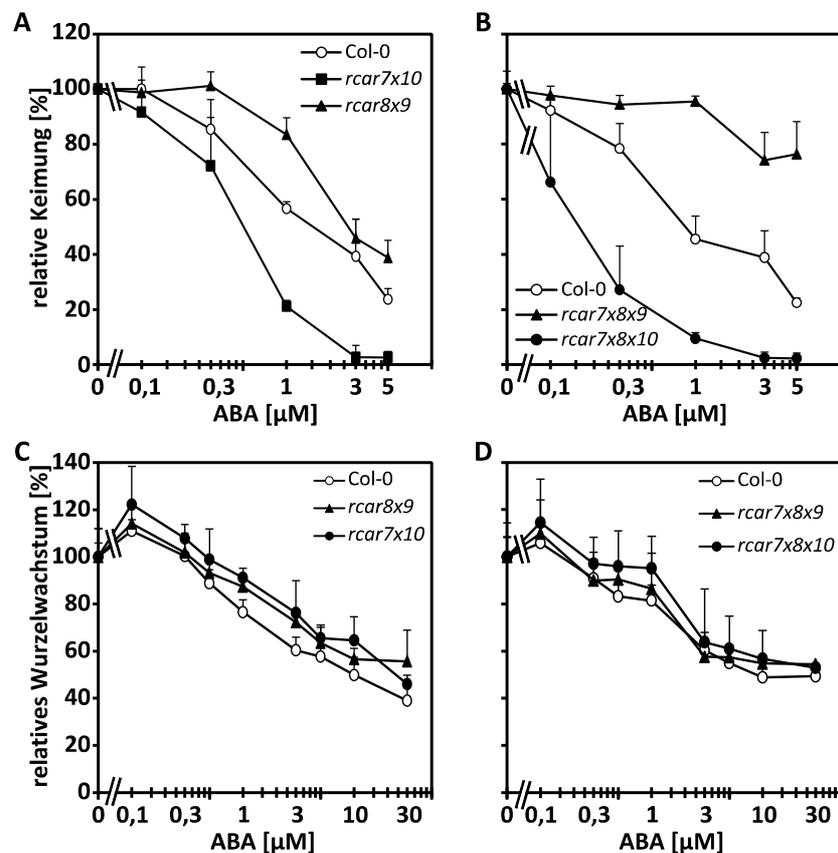
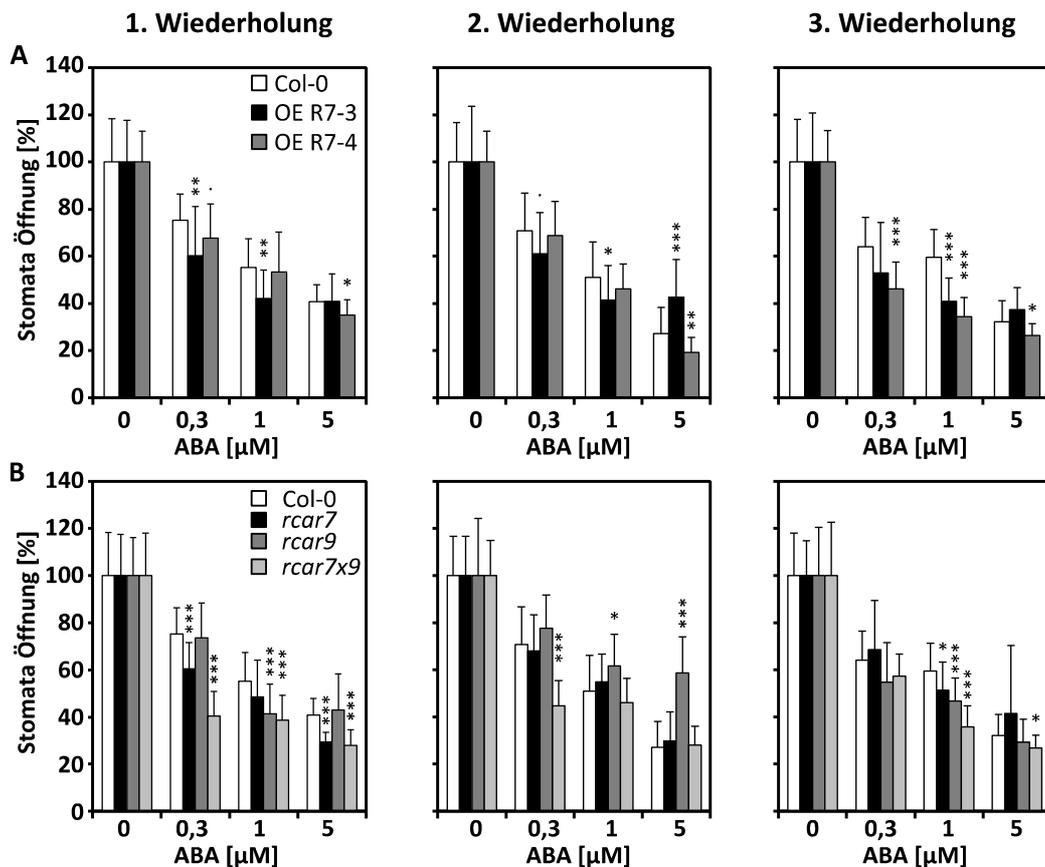


Abb. 5-3 Relative Keimung und Wurzelwachstum verschiedener RCAR Knockout Linien.

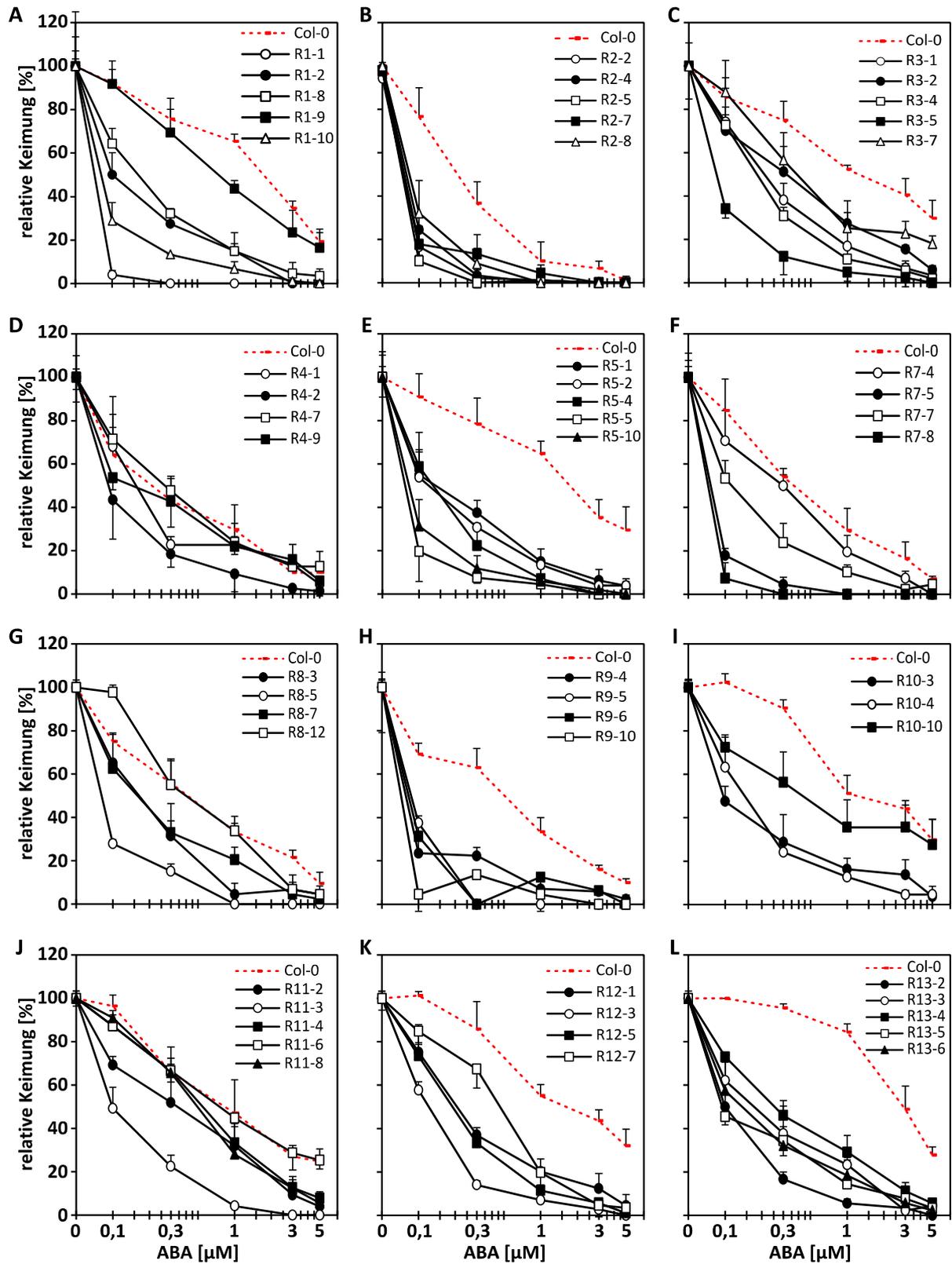
(A und B) Inhibierung der Samenkeimung von RCAR Knockoutlinien im Vergleich zu Col-0 WT nach insgesamt 5 Tagen auf MS-Medium in Gegenwart verschiedener ABA Konzentrationen. Die Samen wurden zunächst für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert und keimten anschließend für 3 weitere Tage unter Dauerlicht bei 22°C. Die relative Keimung wurde in Prozent dargestellt und bezieht sich mit dem Wert 100 % auf die absolute Keimung (85-100 %) der Samen auf MS-Medium ohne ABA. Pro Datenpunkt wurden $n=90$ ($\pm\text{SD}$) Samen untersucht. Die Keimungsversuche wurden für jede transgene RCAR Linie insgesamt zwei Mal durchgeführt, mit ähnlichen Ergebnissen. (C und D) Relative Inhibierung des Wurzelwachstums von 9 Tage alten RCAR Knockout Keimlingen im Vergleich zu Col-0 in Anwesenheit verschiedener ABA-Konzentrationen. Die Samen wurden zunächst für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert, keimten für 4 Tage bei 22 °C und Dauerlicht und wurden anschließend auf MS Platten transferiert (pro Linie und ABA Konzentration 10 Keimlinge). Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen erneuter Inkubation bei 22 °C im Dauerlicht relativ zum absoluten Wurzelwachstum unter Kontrollbedingungen, MS Platten ohne ABA. Das absolute Wurzelwachstum in 72 h, ohne ABA wurde hierbei auf 100 % gesetzt und betrug für die einzelnen Linien bei (C) $14,18 \pm 1,65$ mm (Col-0); $15,22 \pm 1,56$ mm (*rcar8x9*) und $13,97 \pm 1,33$ mm (*rcar7x10*). (D) $16,67 \pm 0,69$ mm (Col-0); $14,75 \pm 1,04$ mm (*rcar7x8x9*) und $14,99 \pm 3,56$ mm (*rcar7x8x10*). Jeder dargestellte Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus $n \geq 6$ Keimlingen ($\pm\text{SD}$). Der Wurzelwachstumsversuch wurde für jede transgene RCAR Linie insgesamt zwei Mal durchgeführt, mit ähnlichen Ergebnissen.

5.5.2. Regulierung der Stomata in RCAR7 OE bzw. Knockouts

**Abb. 5-4** Regulierung der Stomata in RCAR7 OE- bzw. Knockoutlinien.

Relative Stomata Öffnung von (A) RCAR7 Überexpressions- (OE R7) bzw. (B) Knockoutlinien für RCAR7 und RCAR9 im Vergleich zum Col-0 WT in Gegenwart verschiedener ABA Konzentrationen. Analysiert wurden Blätter von 2-3 Wochen alten Arabidopsis Pflanzen in 3 Wiederholungen. Die Blätter inkubierten zunächst für 2,5 h in Inkubationsmedium mit Weißlichtbelichtung, um die Stomata Öffnung anzuregen. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation der Blätter im Inkubationsmedium mit verschiedener ABA Konzentrationen für 2 h und Weißlichtbelichtung. Nach dem Abfotografieren der Stomata unter einem Lichtmikroskop erfolgte die *in silico* Auswertung der Stomata Apertur. Die Größe der Spaltöffnungen wurde dabei als Verhältnis von Breite zu Länge ausgemessen. Unter Kontrollbedingungen bezieht sich dieses Verhältnis auf 100 %. Pro Linie und ABA Konzentration wurden $n=20$ Spaltöffnungen analysiert. Dargestellt wurde der jeweilige Mittelwert (\pm SD), *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ und * $P < 0,05$, „“ $P < 0,1$ und „ “ $P \leq 1$ geben den signifikanten Unterschied zur Wildtyp Kontrolle an (Zweistichproben t-Test mit unterschiedlicher Varianz).

5.5.3. Relative Keimung aller OE RCAR Linien



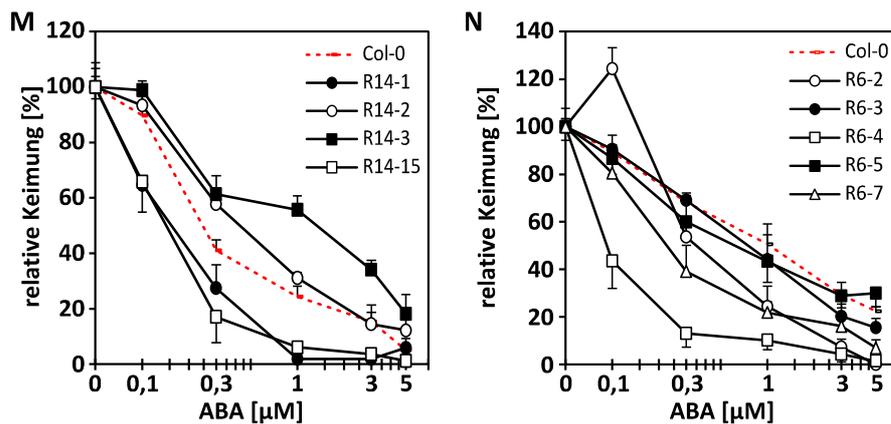
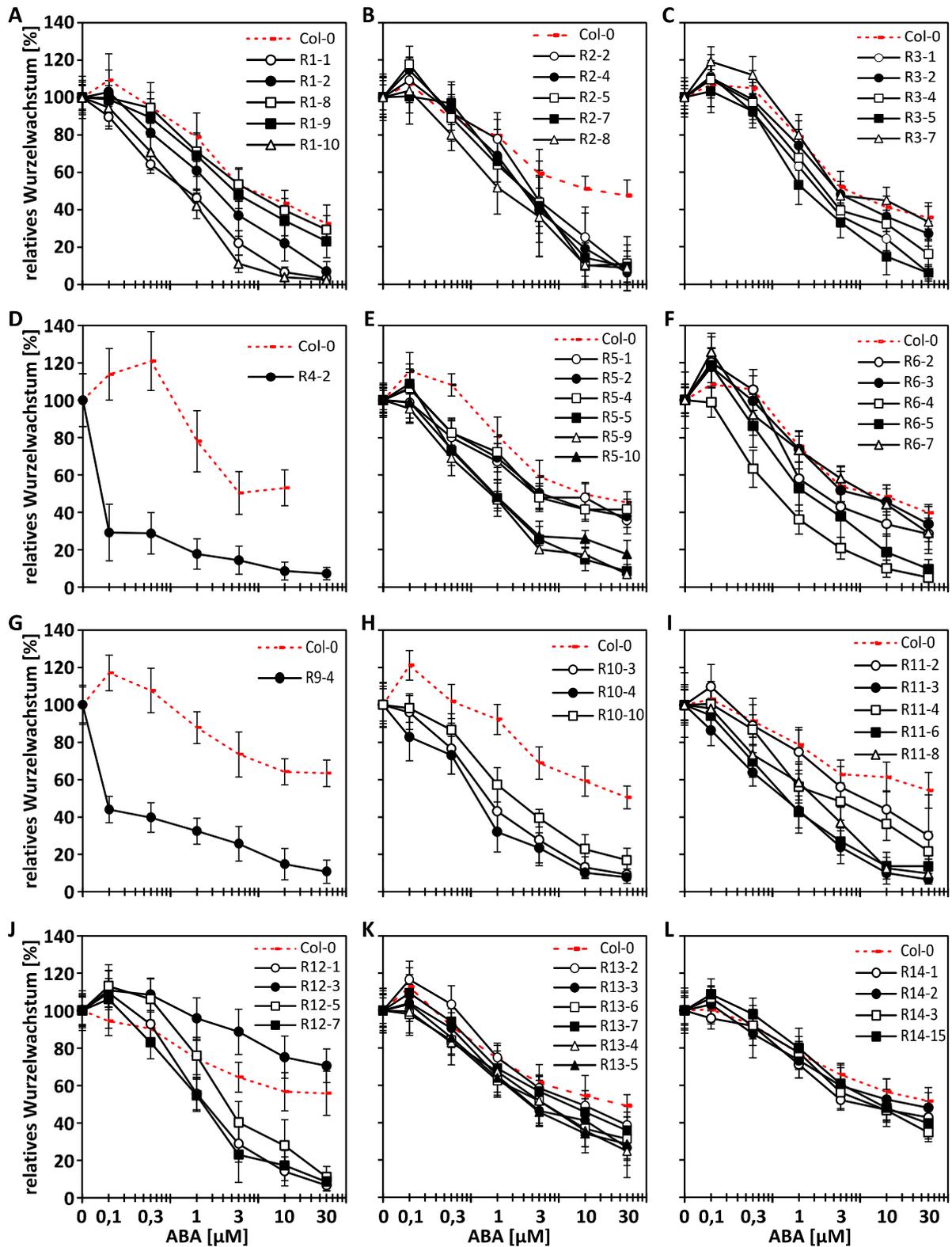


Abb. 5-5 Relative Keimung aller genierten OE RCAR Linien

Inhibierung der Samenkeimung von Linien, in denen verschiedene RCARs überexprimiert werden, im Vergleich zu Col-0 WT nach insgesamt 5 Tagen auf MS-Medium in Gegenwart verschiedener ABA Konzentrationen. Die Samen wurden zunächst für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert und keimten anschließend für 3 weitere Tage unter Dauerlicht bei 22°C. (A) Relative Keimung der OE RCAR1 Linien („R1“), absolute Keimung lag bei 90-100 % mit Ausnahme von OE R1-1 (28%) und OE R1-2 (45%, anderes Experimente als in Abb. 2-17 dargestellt). (B) Relative Keimung der OE RCAR2 Linien („R2“), absolute Keimung lag bei 94-100 %, mit Ausnahme von OE R2-1 (79%) und OE R2-3 (75 %). (C) Relative Keimung der OE RCAR3 Linien („R3“), absolute Keimung lag bei 92-99 %, mit Ausnahme von OE R3-4 (61 %) und OE R3-5 (46 %). (D) Relative Keimung der OE RCAR4 Linien („R4“), absolute Keimung lag bei 70-92 %, mit Ausnahme von OE R4-1 (24 %). (E) Relative Keimung der OE RCAR5 Linien („R5“), absolute Keimung lag bei 74-98 %, mit Ausnahme von OE R5-2 und OE R5-10 (57 %). (F) Relative Keimung der OE RCAR7 Linien („R7“), absolute Keimung lag ca. 95 %, mit Ausnahme von OE R7-5 (74 %) und OE R7-8 (46 %). (G) Relative Keimung der OE RCAR8 Linien („R8“), absolute Keimung lag bei 88-99 %. (H) Relative Keimung der OE RCAR9 Linien („R9“), absolute Keimung lag bei ca. 92 %, mit Ausnahme von OE R9-5 (9 %), OE R9-6 (18 %) und OE R9-10 (24 %). (I) Relative Keimung für OE RCAR10 Linien („R10“), absolute Keimung lag bei 89-97 %. (J) Relative Keimung der OE RCAR11 Linien („R11“), absolute Keimung lag bei 80-99 %, mit Ausnahme von OE R11-3 und OE R11-4 (ca. 75 %). (K) Relative Keimung der OE RCAR12 Linien („R12“), absolute Keimung lag bei 88-99 %, mit Ausnahme von OE R12-3 (79 %). (L) Relative Keimung der OE RCAR13 Linien („R13“), absolute Keimung lag bei 97-100 %. (M) Relative Keimung der OE RCAR14 Linien („R14“), absolute Keimung lag bei 90-100 %, mit Ausnahme von OE R14-1 (57 %). (N) Relative Keimung der OE RCAR6 Linien („R6“), absolute Keimung lag bei 93-100 %, mit Ausnahme von OE R6-2 (46 %) und OE R6-4 (77 %). Die relative Keimung wurde in Prozent dargestellt und bezieht sich mit dem Wert 100 % auf die absolute Keimung der Samen auf MS-Medium ohne ABA. Pro Datenpunkt wurden n=90 (\pm SD).

5.5.4. Relatives Wurzelwachstum aller OE RCAR Linien



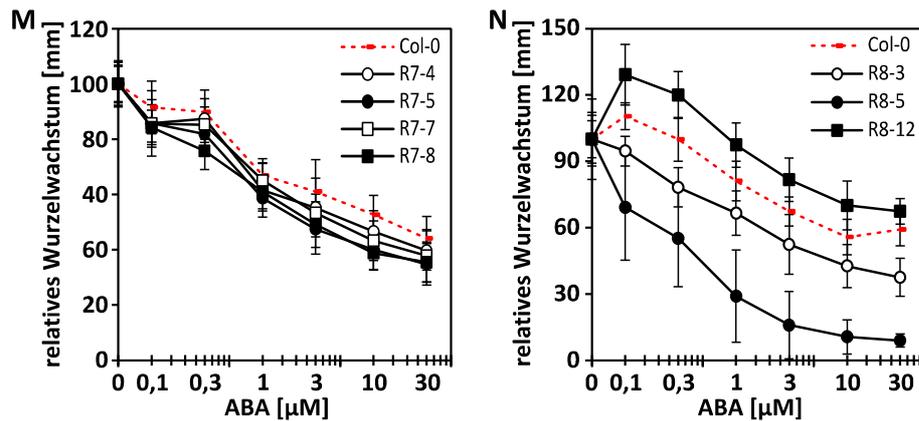


Abb. 5-6 Relatives Wurzelwachstum aller generierter OE RCAR Linien.

Relative Inhibition des Wurzelwachstums von 9 Tage alten RCAR überexprimierenden Keimlingen (R) im Vergleich zu Col-0 in Anwesenheit verschiedener ABA-Konzentrationen. Die Samen wurden zunächst für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert, keimten für 4 Tage bei 22 °C und Dauerlicht und wurden anschließend auf MS Platten transferiert (pro Linie und ABA Konzentration 30 Keimlinge). Die Keimlinge von OE RCAR4-1 und OE RCAR9-4 wurden auf Grund ihres verzögerten Wachstums erst nach 7 bzw. 5 Tagen auf MS Platten transferiert. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen erneuter Inkubation bei 22 °C im Dauerlicht relativ zum absoluten Wurzelwachstum unter Kontrollbedingungen, MS Platten ohne ABA. Das absolute Wurzelwachstum in 72 h, ohne ABA wurde hierbei auf 100 % gesetzt und betrug für die einzelnen Linien: (A) 15,88 ± 1,78 mm (Col-0); 17,99 ± 1,65 mm (R1-1); 17,83 ± 1,23 mm (R1-2); 16,19 ± 1,12 mm (R1-8); 16,52 ± 1,04 mm (R1-9) und 16,69 ± 1,37 mm (R1-10). (B) 15,48 ± 1,75 mm (Col-0); 14,3 ± 1,48 mm (R2-2); 13,76 ± 1,23 mm (R2-4); 15,73 ± 1,69 mm (R2-5); 15,86 ± 1,97 mm (R2-7 und 16,28 ± 1,1 mm (R2-8). (C) 19,72 ± 1,26 mm (R3-1); 17,89 ± 1,89 mm (R3-2); 19,86 ± 1,26 mm (R3-4); 20,12 ± 1,77 mm (R3-5) und 17,98 ± 0,83 mm (R3-7). Für (D) 16,55 ± 2,33 mm (R4-2). Für (E) 15,73 ± 0,98 mm (Col-0); 18,32 ± 1,47 mm (R5-1); 18,36 ± 0,95 mm (R5-2); 19,06 ± 1,76 mm (R5-4); 17,82 ± 1,22 mm (R5-5); 18,58 ± 1,27 mm (R5-9) und 16,43 ± 1,36 mm (R5-10). Für (F) 18,32 ± 1,29 mm (Col-0); 18,61 ± 2,82 mm (R6-2); 19,38 ± 1,31 mm (R6-3); 19,26 ± 1,65 mm (R6-4); 15,95 ± 1,11 mm (R6-5) und 16,05 ± 1,38 mm (R6-7). Für (G) 17,22 ± 1,81 mm (Col-0) und 18,74 ± 1,81 mm (R9-4). Für (H) 19,91 ± 1,72 mm (Col-0); 21,19 ± 2,11 mm (R10-3); 22,59 ± 2,64 mm (R10-4) und 20,52 ± 2,67 mm (R10-10). Für (I) 16,9 ± 1,63 mm (Col-0); 16,7 ± 2,87 mm (R11-2); 19,72 ± 1,65 mm (R11-3); 18,27 ± 1,99 mm (R11-4); 19,29 ± 1,59 mm (R11-6) und 16,79 ± 1,34 mm (R11-8). Für (J) 18,73 ± 1,47 mm (Col-0); 18,52 ± 1,97 mm (R12-1); 17,86 ± 1,61 mm (R12-3); 17,75 ± 1,14 mm (R12-5) und 17,65 ± 1,73 mm (R12-7). Für (K) 17,81 ± 2,13 mm (Col-0); 19,14 ± 2,25 mm (R13-2), 18,48 ± 1,96 mm (R13-3); 19,95 ± 1,78 mm (R13-6); 19,86 ± 1,36 mm (R13-7); 17,71 ± 1,58 mm (R13-4) und 19,23 ± 1,62 mm (R13-5). Für (L) 18,99 ± 1,34 mm (Col-0); 21,35 ± 2,03 mm (R14-1); 19,96 ± 2,08 mm (R14-2) und 18,65 ± 1,47 mm (R14-3) und 16,91 ± 2,05 mm (R14-15). Für (M) 18,33 ± 1,24 mm (Col-0); 19,34 ± 1,52 mm (R7-4); 19,45 ± 1,63 mm (R7-5); 19,33 ± 1,24 mm (R7-7) und 19,49 ± 1,52 mm (R7-8). Für (N) 17,08 ± 2,09 mm (Col-0); 19,52 ± 1,63 mm (R8-3); 16,53 ± 3 mm (R8-5) und 15,29 ± 1,66 mm (R8-12). Jeder dargestellte Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus n ≥ 15 Keimlingen (±SD).

6. Literaturverzeichnis

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K** (1997) Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9** (10):1859-1868.
- Abel S, Theologis A** (1994) Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *The Plant Journal* **5** (3):421-427.
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF** (1968) Abscisic acid: a new name for abscisin II (dormin). *Science* **159** (3822):1493.
- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, 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** (5):1665-1681.
- Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, 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** (12):3460-3479.
- Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Peirats-Llobet M, Pizzio GA, Fernandez MA, De Winne N, De Jaeger G, Dietrich D, Bennett MJ, Rodriguez PL** (2013) PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiol* **161** (2):931-941.
- Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Rodrigues A, Pizzio GA, Rodriguez PL** (2012) Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiol* **158** (2):970-980.
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A** (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* **4**:63.
- Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Baumler W** (2006) Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophys J* **91** (4):1452-1459.
- Barrero JM, Piqueras P, Gonzalez-Guzman M, Serrano R, Rodriguez PL, Ponce MR, Micol JL** (2005) A mutational analysis of the ABA1 gene of Arabidopsis thaliana highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* **56** (418):2071-2083.
- Belin C, de Franco PO, Bourbousse C, Chaignepain S, Schmitter JM, Vavasseur A, Giraudat J, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2006) Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol* **141** (4):1316-1327.
- Benfey PN, Chua NH** (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* **250** (4983):959-966.
- Bensmihen S, Rippha S, Lambert G, Jublot D, Pautot V, Granier F, Giraudat J, Parcy F** (2002) The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* **14** (6):1391-1403.

- Bertauche N, Leung J, Giraudat J** (1996) Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* **241** (1):193-200
- Bewley JD** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9** (7):1055-1066.
- Bhaskara GB, Nguyen TT, Verslues PE** (2012) Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* **160** (1):379-395.
- Bittner F, Oreb M, Mendel RR** (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276** (44):40381-40384.
- 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** (40):41758-41766.
- Boudsocq M, Droillard MJ, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2007) Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **63** (4):491-503.
- Bouvier F, d'Harlingue A, Hugueney P, Marin E, Marion-Poll A, Camara B** (1996) Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J Biol Chem* **271** (46):28861-28867.
- Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjarvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI** (2012) Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (26):10593-10598.
- Bray EA, Zeevaart JA** (1985) The Compartmentation of Abscisic Acid and beta-D-Glucopyranosyl Abscisate in Mesophyll Cells. *Plant Physiol* **79** (3):719-722.
- Bruzzone 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** (14):5759-5764.
- Busk PK, Pages M** (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* **37** (3):425-435.
- Carles C, Bies-Etheve N, Aspart L, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Echeverria M, Delseny M** (2002) Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes: role of ABI5. *Plant J* **30** (3):373-383.
- Chandler PM, Robertson M** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual review of plant biology* **45** (1):113-141.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* **275** (3):1723-1730.
- Christie JM, Hitomi K, Arvai AS, Hartfield KA, Mettlen M, Pratt AJ, Tainer JA, Getzoff ED** (2012) Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability. *J Biol Chem* **287** (26):22295-22304.
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Muller A** (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137** (1):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** (3):314-325.
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E** (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* **52** (1):167-174.
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16** (6):735-743.
- Cornforth J, Milborrow B, Ryback G** (1965) Chemistry and Physiology of Dormins' In Sycamore: Identity of Sycamore Dormin'with Abscisin II. *Nature* **205**:1269-1270.
- Crosson S, Moffat K** (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (6):2995-3000.
- Cutler AJ, Krochko JE** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci* **4** (12):472-478.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Reviews Plant Biology* **61**:651-679.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139** (1):5-17.
- Dickinson CD, Evans RP, Nielsen NC** (1988) RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nucleic Acids Res* **16** (1):371.
- Dietz KJ, 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** (346):937-944.
- Dupeux F, Antoni R, Betz K, Santiago J, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Rubio S, Park SY, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA** (2011a) Modulation of abscisic acid signaling in vivo by an engineered receptor-insensitive protein phosphatase type 2C allele. *Plant Physiol* **156** (1):106-116.
- Dupeux F, Santiago J, Betz K, Twycross J, Park SY, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Jensen MR, Krasnogor N, Blackledge M, Holdsworth M, Cutler SR, Rodriguez PL, Márquez JA** (2011b) A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *The EMBO Journal* **30** (20):4171-4184.
- Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F** (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci* **61** (12):1401-1426.
- Fields S, Song O** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340** (6230):245-246.
- FINKELSTEIN R** (2013) Abscisic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* **11**:e0166.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14** Suppl:S15-45.
- Finkelstein RR, Lynch TJ** (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12** (4):599-609.

- Finkelstein RR, Somerville CR** (1990) Three Classes of Abscisic Acid (ABA)-Insensitive Mutations of Arabidopsis Define Genes that Control Overlapping Subsets of ABA Responses. *Plant Physiol* **94** (3):1172-1179.
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM** (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* **10** (6):1043-1054.
- Fuchs S** (2013) Protein Phosphatases 2C of Arabidopsis thaliana in Stress Signaling. Technische Universität München
- Fuchs S, Grill E, Meskiene I, Schweighofer A** (2013) Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J* **280** (2):681-693.
- Fuchs S, Tischer SV, Wunschel C, Christmann A, Grill E** (2014) Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111** (15):5741-5746.
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park S-Y, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu J-K** (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462** (7273):660-664.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK** (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **19** (2):485-494.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK** (2011) Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (4):1717-1722.
- Fujii H, Zhu JK** (2009) Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (20):8380-8385.
- Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (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** (12):2123-2132.
- 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* **103** (6):1988-1993.
- Gehring CA, Irving HR, Parish RW** (1990) Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (24):9645-9649.
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R** (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** (50):21425-21430.
- Gietz RD, Triggs-Raine B, Robbins A, Graham KC, Woods RA** (1997) Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol Cell Biochem* **172** (1-2):67-79.

- Gietz RD, Woods RA** (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In: Christine G, Gerald RF (eds) *Methods in Enzymology*, vol Volume **350**. Academic Press, pp 87-96.
- Gonzalez-Guzman M, Apostolova N, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodriguez PL** (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14** (8):1833-1846.
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernandez MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, Rodriguez PL** (2012) Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* **24** (6):2483-2496.
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J** (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* **11** (10):1897-1910.
- Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV** (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol* **8** (2):183-187.
- Hao Q, Yin P, Li W, Wang L, Yan C, Lin Z, Wu Jim Z, Wang J, Yan SF, Yan N** (2011) The Molecular Basis of ABA-Independent Inhibition of PP2Cs by a Subclass of PYL Proteins. *Molecular Cell* **42** (5):662-672.
- Hellens R, Edwards EA, Leyland N, Bean S, Mullineaux P** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42** (6):819-832.
- 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** (12):3029-3038.
- Himmelbach A, Iten M, Grill E** (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353** (1374):1439-1444.
- 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** (7):1448-1458.
- Hirayama T, Shinozaki K** (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* **12** (8):343-351.
- Hoffmann T** (2001) Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. Technische Universität München
- Holdsworth M, Kurup S, McKibbin R** (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends in Plant Science* **4** (7):275-280.
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC** (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132** (2):666-680.
- Huang C-N, Cornejo M, Bush D, Jones R** (1986) Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma* **135** (2-3):80-87.

- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF** (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep* **39** (2):969-987.
- Iyer LM, Koonin EV, Aravind L** (2001) Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins* **43** (2):134-144.
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144** (4):1425-1436.
- Jarillo JA, Gabrys H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410** (6831):952-954.
- Jefferson R** (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* **5** (4):387-405.
- Jiang F, Hartung W** (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot* **59** (1):37-43.
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M** (2001) Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291** (5511):2138-2141.
- Karszen CM, Brinkhorst-van der Swan DL, Breekland AE, Koornneef M** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157** (2):158-165.
- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H** (2004) Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **279** (14):14049-14054.
- Kepka M, Benson CL, Gonugunta VK, Nelson KM, Christmann A, Grill E, Abrams SR** (2011) Action of Natural Abscisic Acid Precursors and Catabolites on Abscisic Acid Receptor Complexes. *Plant Physiology* **157** (4):2108-2119.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* **50** (2):347-363.
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI** (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**:561-591.
- Kim W, Lee Y, Park J, Lee N, Choi G** (2013) HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **54** (4):555-572.
- Koornneef M, Hanhart CJ, Hilhorst HW, Karszen CM** (1989) In Vivo Inhibition of Seed Development and Reserve Protein Accumulation in Recombinants of Abscisic Acid Biosynthesis and Responsiveness Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **90** (2):463-469.

- Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DLC, Karssen CM** (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theoret Appl Genetics* **61** (4):385-393.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen C** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **61** (3):377-383.
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ** (1998) (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol* **118** (3):849-860.
- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI** (2006) The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol* **140** (1):127-139.
- Kurien BT, Scofield RH** (1998) Heat mediated quick Coomassie blue protein staining and destaining of SDS-PAGE gels. *Indian J Biochem Biophys* **35** (6):385-389.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E** (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* **23** (7):1647-1656.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I** (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126** (6):1109-1120.
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, 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** (50):21419-21424.
- Leon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M** (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* **10** (4):655-661.
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J** (1994) *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264** (5164):1448-1452.
- 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** (5):759-771.
- Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R** (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca^{2+} signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (11):4203-4208.
- Lichtenthaler HK** (1999) THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**:47-65.
- Lim CW, Kim JH, Baek W, Kim BS, Lee SC** (2012) Functional roles of the protein phosphatase 2C, AtAIP1, in abscisic acid signaling and sugar tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Sci* **187**:83-88.
- Lim CW, Lee SC** (2015) *Arabidopsis* abscisic acid receptors play an important role in disease resistance. *Plant Mol Biol* **88** (3):313-324.

- Lim E-K, Doucet CJ, Hou B, Jackson RG, Abrams SR, Bowles DJ** (2005) Resolution of (+)-abscisic acid using an Arabidopsis glycosyltransferase. *Tetrahedron: Asymmetry* **16** (1):143-147.
- Liu L, Zhang Y, Tang S, Zhao Q, Zhang Z, Zhang H, Dong L, Guo H, Xie Q** (2010) An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* **61** (5):893-903.
- Liu Z, Yan JP, Li DK, Luo Q, Yan Q, Liu ZB, Ye LM, Wang JM, Li XF, Yang Y** (2015) UDP-glucosyltransferase71c5, a major glucosyltransferase, mediates abscisic acid homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **167** (4):1659-1670.
- Lopez-Molina L, Chua NH** (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **41** (5):541-547
- Luehrsen KR, de Wet JR, Walbot V** (1992) Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol* **216**:397-414.
- 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** (5930):1064-1068.
- MacRobbie EA** (1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353** (1374):1475-1488.
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Marion-Poll A** (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana. *EMBO J* **15** (10):2331-2342.
- Massey V** (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions* **28** (4):283-296
- Meinhard M, Grill E** (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *FEBS Letters* **508** (3):443-446.
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE** (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462** (7273):602-608.
- Melotto M, Underwood W, He SY** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* **46**:101-122.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126** (5):969-980.
- Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosche M, Kollist H** (2013) PYR/RCAR receptors contribute to ozone-, reduced air humidity-, darkness-, and CO₂-induced stomatal regulation. *Plant Physiol* **162** (3):1652-1668.
- 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. *The Plant Journal* **25** (3):295-303.

- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264** (5164):1452-1455.
- Milborrow B, Carrington N, Vaughan G** (1988) The cyclization of 8'-hydroxy abscisic acid to phaseic acid in vivo. *Phytochemistry* **27** (3):757-759
- Milborrow B, Lee H-S** (1998) Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI. Carotenoids and ABA are formed by the 'non-mevalonate' triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Functional Plant Biology* **25** (5):507-512.
- Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M** (2013) Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends Plant Sci* **18** (5):259-266.
- Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang HJ, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira KS, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M** (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462** (7273):609-614.
- Monke G, Altschmied L, Tewes A, Reidt W, Mock HP, Baumlein H, Conrad U** (2004) Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* **219** (1):158-166.
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456** (7221):459-463.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15** (3):473-497.
- Mustilli AC, 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** (12):3089-3099.
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E** (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J* **41** (5):697-709.
- Nakagawa M, Kagiya M, Shibata N, Hirano Y, Hakoshima T** (2014) Mechanism of high-affinity abscisic acid binding to PYL9/RCAR1. *Genes Cells* **19** (5):386-404.
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I** (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* **46** (5):880-889.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50** (7):1345-1363.
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **60** (1):51-68.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**:165-185.

- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED** (2009) Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* **326** (5958):1373-1379.
- Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park S-Y, Wang A, Carvalho PC, Lee S, Caddell DF, Cutler SR, Chory J, Yates JR, Schroeder JI** (2010) PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* **61** (2):290-299.
- 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. *The Plant Journal* **50** (6):935-949.
- Nishimura N, Yoshida T, Murayama M, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2004) Isolation and characterization of novel mutants affecting the abscisic acid sensitivity of Arabidopsis germination and seedling growth. *Plant Cell Physiol* **45** (10):1485-1499.
- Niyogi KK, Grossman AR, Bjorkman O** (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **10** (7):1121-1134.
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, 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** (5):810-824.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313** (6005):810-812.
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE** (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142** (3599):1592-1593.
- Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiha 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** (1):97-107.
- Okamoto M, Peterson FC, Defries A, Park SY, Endo A, Nambara E, Volkman BF, Cutler SR** (2013) Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (29):12132-12137.
- Okamoto M, Tatematsu K, Matsui A, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M, Endo TA, Mochizuki Y, Toyoda T, Kamiya Y, Shinozaki K, Nambara E, Seki M** (2010) Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in dry and imbibed seeds of Arabidopsis using tiling arrays. *Plant J* **62** (1):39-51.
- Ou HD, Deerinck TJ, Bushong E, Ellisman MH, O'Shea CC** (2015) Visualizing viral protein structures in cells using genetic probes for correlated light and electron microscopy. *Methods* **90**:39-48.
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J** (1994) Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6** (11):1567-1582.

- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T-fF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu J-K, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR** (2009) Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* **324** (5930):1068-1071.
- Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L** (2008) The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20** (10):2729-2745.
- Pizzio GA, Rodriguez L, Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Yunta C, Merilo E, Kollist H, Albert A, Rodriguez PL** (2013) The PYL4 A194T mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for abscisic acid signaling and plant drought resistance. *Plant Physiol* **163** (1):441-455.
- Priest DM, Ambrose SJ, Vaistij FE, Elias L, Higgins GS, Ross AR, Abrams SR, Bowles DJ** (2006) Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **46** (3):492-502.
- Radauer C, Lackner P, Breiteneder H** (2008) The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol Biol* **8**:286.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E** (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* **15** (7):395-401.
- Ramagli LS, Rodriguez LV** (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *ELECTROPHORESIS* **6** (11):559-563.
- Ratushny V, Golemis E** (2008) Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system. *Biotechniques* **44** (5):655-662.
- Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Saez A, Osmont KS, Gadea J, Hardtke CS, Rodriguez PL** (2009) The short-rooted phenotype of the brevis radix mutant partly reflects root abscisic acid hypersensitivity. *Plant Physiol* **149** (4):1917-1928.
- Rodriguez-Concepcion M, Boronat A** (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130** (3):1079-1089.
- Rodriguez PL, Benning G, Grill E** (1998a) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Lett* **421** (3):185-190.
- Rodriguez PL, Leube MP, 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** (5):879-883.
- Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim TH, Santiago J, Flexas J, Schroeder JI, Rodriguez PL** (2009) Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* **150** (3):1345-1355.
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez PL** (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37** (3):354-369.

- Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodriguez PL** (2006) Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* **141** (4):1389-1399.
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,
- Santiago J, Dupeux F, Betz K, Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Marquez JA, Rodriguez PL** (2012) Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs. *Plant Sci* **182**:3-11.
- Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA** (2009a) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462** (7273):665-668.
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Marquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL** (2009b) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* **60** (4):575-588.
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake H, Goto DB, Uozumi N** (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* **424** (3):439-448.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37** (5):501-506.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:627-658.
- Schroeder JI, Nambara E** (2006) A quick release mechanism for abscisic acid. *Cell* **126** (6):1023-1025.
- Schwartz SH, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Zeevaart JA** (1997) Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114** (1):161-166.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA** (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* **131** (4):1591-1601.
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E** (2006) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J* **48** (3):354-366.
- Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba 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** (23):12908-12913.
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY** (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2** (12):905-909.

- Sheen J** (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (3):975-980.
- Sheen J** (2001) Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* **127** (4):1466-1475.
- Shi Y** (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139** (3):468-484.
- 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** (7221):520-523.
- Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S, Liu C, Feng Y, Cao X, Xie Q** (2013) *ABI4* regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in arabidopsis. *PLoS Genet* **9** (6):e1003577.
- Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, Jin Y, Ellisman MH, Tsien RY** (2011) A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol* **9** (4):e1001041.
- Skriver K, Mundy J** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **2** (6):503-512.
- Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2000) Regulation and function of the Arabidopsis ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol* **124** (4):1752-1765
- Soon FF, Ng LM, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MH, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang H, Yang H, Jiang H, Li J, Yong EL, Cutler S, Zhu JK, Griffin PR, Melcher K, Xu HE** (2012) Molecular mimicry regulates ABA signaling by *SnRK2* kinases and *PP2C* phosphatases. *Science* **335** (6064):85-88.
- Spollen WG, LeNoble ME, Samuels TD, Bernstein N, Sharp RE** (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* **122** (3):967-976.
- Stynen B, Tourneau H, Tavernier J, Van Dijck P** (2012) Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **76** (2):331-382.
- Sun TP** (2010) Gibberellin-*GID1*-*DELLA*: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* **154** (2):567-570.
- Swartz TE, Corchony SB, Christie JM, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR, Bogomolni RA** (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *Journal of Biological Chemistry* **276** (39):36493-36500.
- Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E** (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *The Plant Journal* **61** (1):25-35.
- Tossi V, Lamattina L, Cassia R** (2009) An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *New Phytol* **181** (4):871-879.

- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437** (7059):693-698.
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* **51** (11):1821-1839.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** (41):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** (21):11632-11637.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K** (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5** (11):1529-1539.
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452** (7186):487-491.
- Vartanian N, Marcotte L, Giraudat J** (1994) Drought Rhizogenesis in Arabidopsis thaliana (Differential Responses of Hormonal Mutants). *Plant Physiol* **104** (2):761-767.
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Lauriere C, Merlot S** (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* **21** (10):3170-3184.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33** (5):949-956.
- Wall GW, Brooks TJ, Adam NR, Cousins AB, Kimball BA, Pinter PJ, LaMorte RL, Triggs J, Ottman MJ, Leavitt SW, Matthias AD, Williams DG, Webber AN** (2001) Elevated atmospheric CO₂ improved Sorghum plant water status by ameliorating the adverse effects of drought. *New Phytologist* **152** (2):231-248.
- Walton DC, Yi L** (1995) Abscisic acid biosynthesis and metabolism. *Plant hormones*. Springer, pp 140-157.
- Wareing P, Eagles C, Robinson P** (1964) Natural inhibitors as dormancy agents. *Coll Int Centr Natl Rech Sci* **123**:377-386.
- 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** (2):198-217.
- Widholm JM** (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* **47** (4):189-194.

- Wilkinson S, Davies WJ** (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* **25** (2):195-210.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2** (8):e718.
- Wydro M, Kozubek E, Lehmann P** (2006) Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION* **53** (2):289.
- Xie T, Ren R, Zhang YY, Pang Y, Yan C, Gong X, He Y, Li W, Miao D, Hao Q, Deng H, Wang Z, Wu JW, Yan N** (2012) Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the *Arabidopsis thaliana* abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. *J Biol Chem* **287** (1):794-802.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK** (2001) The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13** (9):2063-2083.
- Xu ZY, Lee KH, Dong T, Jeong JC, Jin JB, Kanno Y, Kim DH, Kim SY, Seo M, Bressan RA, Yun DJ, Hwang I** (2012) A vacuolar beta-glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24** (5):2184-2199.
- Xue T, Wang D, Zhang S, Ehling 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.
- Yaish MW, El-Kereamy A, Zhu T, Beatty PH, Good AG, Bi YM, Rothstein SJ** (2010) The APETALA-2-like transcription factor OsAP2-39 controls key interactions between abscisic acid and gibberellin in rice. *PLoS Genet* **6** (9):e1001098.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1993) *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. *Plant Physiol* **101** (3):1119-1120.
- 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.
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI** (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* **4**:6.
- 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** (15):6061-6066.
- Yano R, Kanno Y, Jikumaru Y, Nakabayashi K, Kamiya Y, Nambara E** (2009) CHOTTO1, a putative double APETALA2 repeat transcription factor, is involved in abscisic acid-mediated repression of gibberellin biosynthesis during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151** (2):641-654.
- 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** (12):1230-1236.

- Yin Y, Adachi Y, Ye W, Hayashi M, Nakamura Y, Kinoshita T, Mori IC, Murata Y** (2013) Difference in abscisic acid perception mechanisms between closure induction and opening inhibition of stomata. *Plant Physiol* **163** (2):600-610.
- Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J** (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protocols* **2** (7):1565-1572
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K** (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **43** (12):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** (8):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** (1):115-126.
- Zeevaert J, Creelman R** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **39** (1):439-473
- Zhang H, Han W, De Smet I, Talboys P, Loya R, Hassan A, Rong H, Jurgens G, Paul Knox J, Wang MH** (2010) ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *Plant J* **64** (5):764-747.
- Zhang K, Xia X, Zhang Y, Gan SS** (2012a) An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant J* **69** (4):667-678.
- Zhang X, Henriques R, Lin S-S, Niu Q-W, Chua N-H** (2006) Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat Protocols* **1** (2):641-646.
- Zhang X, Jiang L, Wang G, Yu L, Zhang Q, Xin Q, Wu W, Gong Z, Chen Z** (2013) Structural insights into the abscisic acid stereospecificity by the ABA receptors PYR/PYL/RCAR. *PLoS One* **8** (7):e67477.
- Zhang X, Zhang Q, Xin Q, Yu L, Wang Z, Wu W, Jiang L, Wang G, Tian W, Deng Z, Wang Y, Liu Z, Long J, Gong Z, Chen Z** (2012b) Complex Structures of the Abscisic Acid Receptor PYL3/RCAR13 Reveal a Unique Regulatory Mechanism. *Structure* **20** (5):780-790.
- Zhang XL, Jiang L, Xin Q, Liu Y, Tan JX, Chen ZZ** (2015) Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Frontiers in Plant Science* **6**:88.
- Zhao Y, Chan Z, Xing L, Liu X, Hou Y-J, Chinnusamy V, Wang P, Duan C, Zhu J-K** (2013) The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell Res* **23** (12):1380-1395.
- Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Loewen MK, Jadhav AS, Ross AR, Taylor DC, Abrams SR** (2004) A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiol* **134** (1):361-369.

Zhou XE, Soon FF, Ng LM, Kovach A, Suino-Powell KM, Li J, Yong EL, Zhu JK, Xu HE, Melcher K (2012) Catalytic mechanism and kinase interactions of ABA-signaling PP2C phosphatases. *Plant Signal Behav* 7 (5):581-588.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name: Stefanie Viola Tischer
Geburtstag: 23 Dezember 1984
Geburtsort: Räckelwitz
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

seit 03/11 Promotion
Wissenschaftlicher Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Botanik
Technische Universität München

10/08 - 02/11 Universität Bayreuth, Molekulare Ökologie
Abschluss: Master of Science
Thema der Abschlussarbeit: "Charakterisierung von Metallhypertoleranz
Kandidatengenenen aus *Arabidopsis halleri* durch heterologe Expression in
Hefe

10/05 - 11/08 Universität Bayreuth, Biologie
Abschluss: Bachelor of Science
Thema der Abschlussarbeit: "Analyse der Mikronährstoffprofile extremer
Gerste-Genotypen

2001 - 2004 Berufliches Gymnasium Kamenz
Fachrichtung: Informations- und Kommunikationstechnologie
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1991 - 2001 Grundschule Lückersdorf-Gelenau und 1. Mittelschule Kamenz
Abschluss: Mittlere Reife

Publikation

Fuchs S, Tischer SV, Wunschel C, Christmann A, Grill E (2014). Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *PNAS* 111 (15): 5741-5746.

Yang Z, Liu J, Tischer SV, Christmann A, Windisch W, Schnyder H, Grill E (2016). Leveraging abscisic acid receptors for water productivity in *Arabidopsis*. *PNAS* 113 (24): 6791-6796.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Erwin Grill bedanken, für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen und das damit verbundenen Projekt zu bearbeiten. Trotz vollen Terminkalenders und meiner für ihn ab und zu schwer zu ertragenden Stimme, hatte er immer ein offenes Ohr für mich.

Dr. Farhah Assaad und Dr. Alexander Christmann danke ich für das kritische Lesen von Teilen dieser Arbeit und dass sie immer Zeit für meine Fragen hatten.

Ich möchte mich auch bei meinen lieben Kollegen/Freunden bedanken, für ihre Unterstützung in den letzten Jahren. Egal ob bei Klonierungen, der Pflege meiner unzähligen Pflanzen, im allgemeinen Laboralltag, in der Freizeitgestaltung oder als Taxifahrer, weil mal wieder was passiert ist. Christian und Michel, trotz unverständlichen Protokolls habt ihr mir das Mysterium „Protein“ erfolgreich nahe gebracht. Vielen Dank auch an meine Kicktipp Runde für das EM Trikot der Deutschen Fußballnationalmannschaft, die Letzten werden die Ersten sein.

Bei Carolin, Marcel, Nicole und Theresa möchte ich mich für das Beseitigen von Fehlern bedanken, auch wenn sie max. 15 % verstanden haben.

Und zum Schluss bei meiner Eltern. Danke für eure große Unterstützung in den letzten Jahren, egal auf welche Art und Weise.