



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

**Charakterisierung der Rezeptoren für Abscisinsäure
in Pappeln (*Populus spec.*)**

Michael Papacek

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. Brigitte Poppenberger-Sieberer

Die Dissertation wurde am 15.01.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.03.2018 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1. Biotischer und abiotischer Stress	5
1.2. Trockenheit und Wassernutzeffizienz	5
1.3. Pflanzenhormone	6
1.4. Abscisinsäure	8
1.5. ABA-Signaltransduktion	10
1.5.1. ABA Rezeptoren	12
1.5.2. Proteinphosphatasen	14
1.5.3. Proteinkinasen	15
1.5.4. Ionenkanäle	16
1.5.5. Transkriptionsfaktoren	16
1.6. Die Pappel als Modellorganismus	17
1.7. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Ergebnisse	20
2.1. Phylogenetische Analysen	20
2.1.1. RCAR Homologe in <i>Populus trichocarpa</i>	20
2.1.2. PP2C Homologe in <i>Populus trichocarpa</i>	23
2.2. Arabidopsis Reporter in <i>Populus canescens</i>	26
2.2.1. Stabile Transformation der Pappel	26
2.2.2. Transiente Expression	28

2.2.3.	Transformation und Nachweis von eGFP	30
2.3.	Charakterisierung von Pappel RCARs	33
2.4.	Charakterisierung von Pappel Proteinphosphatasen.....	37
2.5.	Speziesübergreifende Rezeptorinteraktionen.....	40
2.6.	Regulatorische Kombinationen des Holorezeptorkomplexes	44
2.7.	ABA Rezeptoren von <i>Marchantia polymorpha</i>	50
2.8.	Physiologische Rolle der Pappel PcRCARs	56
2.8.1.	Keimung.....	56
2.8.2.	Wurzelwachstum.....	60
2.8.3.	Fortschreitender Trockenstress	61
2.9.	Analyse transgener Pappeln	71
2.9.1.	Etablierung von transgenen Pappeln	71
2.9.2.	Gas-Wechsel-Messungen.....	73
3.	Diskussion	76
3.1.	ABA Signalkaskade in Bäumen	78
3.1.1.	Artfremde Reporterexpression	78
3.1.2.	Kernkomponenten der ABA Signalkaskade in Pappel	79
3.1.3.	Rezeptorkomplex-Kombinationen	84
3.2.	Ein ABA Rezeptor als LA Rezeptor	89
3.3.	Physiologische Funktion von Pappel RCARs	93
3.3.1.	Samenkeimung und Wurzelwachstum.....	93
3.3.2.	Trockenresistenz.....	95
4.	Material und Methoden.....	100
4.1.	Materialien	100
4.1.1.	Chemikalien	100
4.1.2.	Kits.....	100
4.1.3.	Geräte	100
4.1.4.	Software.....	102

4.1.5.	Verwendete Organismen	103
4.1.6.	Pflanzenmaterial	105
4.1.7.	Enzyme	107
4.1.8.	Oligonukleotide	107
4.1.9.	Plasmide und Vektoren	109
4.2.	Physiologische Methoden.....	110
4.2.1.	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> Samen.....	110
4.2.2.	Keimungsversuche	111
4.2.3.	Wurzelwachstum.....	111
4.2.4.	<i>Floral Dip</i> von <i>Arabidopsis thaliana</i>	111
4.2.5.	Sterilisation von Pflanzenmaterial für die Mikropropagation	112
4.2.6.	Transformation von <i>Populus x canescens</i>	112
4.2.7.	β -D-Glucoronidase Färbung	113
4.2.8.	Isolierung von Protoplasten.....	113
4.2.9.	Transfektion von Protoplasten	114
4.2.10.	Messung der β -D-Glucoronidase Aktivität	115
4.2.11.	Messung der Luciferase Aktivität.....	115
4.3.	Molekularbiologische Methoden	116
4.3.1.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	116
4.3.2.	Hitzeschock Transformation von <i>E. coli</i>	116
4.3.3.	Herstellung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen.....	117
4.3.4.	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	117
4.3.5.	Plasmid Präparation.....	117
4.3.6.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	117
4.3.7.	Agarose Gelelektrophorese	119
4.3.8.	Klonierungsmethoden	119
4.3.9.	RNA Isolation	121
4.3.10.	cDNA Synthese	121

4.3.11.	Quantitative RealTime PCR (qRT-PCR).....	122
4.3.12.	Transformation von Hefezellen.....	122
4.3.13.	Yeast-two-Hybrid (Y2H) Interaktionsanalyse.....	123
4.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	123
4.4.1.	Proteinexpression.....	123
4.4.2.	Proteinextraktion aus <i>E. coli</i>	124
4.4.3.	Proteinaufreinigung und Dialyse.....	124
4.4.4.	Säulenregeneration.....	124
4.4.5.	Gesamtproteinextraktion aus Pappel.....	125
4.4.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	125
4.4.7.	Coomassie Färbung.....	126
4.4.8.	Western Blot.....	126
4.4.9.	Phosphatase Aktivitätsmessung.....	127
5.	Anhang.....	128
5.1.	Verwendete Oligonukleotide.....	128
5.2.	Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel RCARs.....	129
5.3.	Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel PP2Cs.....	131
5.4.	Stammbaum von Arabidopsis und <i>Marchantia</i> RCARs.....	133
5.5.	Interaktionsanalyse von Pappel RCAR und Pappel PP2Cs.....	133
6.	Literaturverzeichnis.....	134
	Lebenslauf.....	147

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Phytohormone und deren Zusammenspiel.	7
Abb. 1-2 ABA-Biosynthese.	9
Abb. 1-3 ABA-Katabolismus.	10
Abb. 1-4 ABA Signalkaskade.....	11
Abb. 1-5 Struktur von Abscisinsäure und Pyrabactin.....	12
Abb. 1-6 Stammbaum von Arabidopsis RCARs.	13
Abb. 1-7 Stammbaum von Arabidopsis Proteinphosphatasen.....	14
Abb. 1-8 Habitus von Schwarz- und Graupappel.....	17
Abb. 2-1 Stammbaum von Arabidopsis und Pappel RCARs.	21
Abb. 2-2 Matrix der RCAR Sequenzhomologien.	22
Abb. 2-3 3D-Struktur von RCAR1.	23
Abb. 2-4 Stammbaum von Arabidopsis ABA-Korezeptoren und Pappel Proteinphosphatasen 2C.	24
Abb. 2-5 Matrix der PP2C Sequenzhomologien.	25
Abb. 2-6 3D Struktur der PP2C HAB1.	26
Abb. 2-7 Regeneration transformierter Pappelinternodien.....	27
Abb. 2-8 Glucuronidase Färbearalyse möglicher transformierter Pappelregenerate.	28
Abb. 2-9 Reporteraktivitäten in Pappel.	29
Abb. 2-10 Induktionsraten des <i>pRD29B</i> Luciferase Konstrukts in Abhängigkeit von ABA.	30
Abb. 2-11 Zeit- und konzentrationsabhängige GFP Induktion.	32
Abb. 2-12 Induktion der ABA Antwort durch PcRCARs.	33
Abb. 2-13 Heterologe Expression von RCARs.	35
Abb. 2-14 Induktion der ABA Antwort in <i>aba2-1</i> Protoplasten durch PcRCARs.	36
Abb. 2-15 ABA Gehalt in Protoplasten	37
Abb. 2-16 Regulation der ABA Antwort durch PP2Cs.	39
Abb. 2-17 Interaktionen zwischen Pappel RCARs und Arabidopsis PP2Cs.	41
Abb. 2-18 Aufgereinigte Proteine.....	42
Abb. 2-19 Inhibierung der Phosphataseaktivität durch RCARs	44
Abb. 2-20 RCAR-abhängige Regulierung von Pappel PP2Cs.....	46
Abb. 2-21 RCAR-abhängige Regulierung von Arabidopsis PP2Cs.	47

Abb. 2-22 Regulation der ABA Antwort durch unterschiedliche ABA Rezeptor-Ko-Rezeptor Kombinationen.	49
Abb. 2-23 <i>GATE</i> und <i>LATCH</i> Domäne bei <i>Marchantia polymorpha</i>	50
Abb. 2-24 Induktion der ABA Antwort durch <i>Marchantia</i> RCARs.....	51
Abb. 2-25 Auswirkungen auf die ABA Antwort durch Lunularsäure und ABA Rezeptorexpression von Arabidopsis und <i>Marchantia</i>	52
Abb. 2-26 Abhängigkeit der LA-aktivierten ABA Antwort durch MpRCAR2 und LA..	53
Abb. 2-27 Regulation der PP2Cs durch <i>Marchantia</i> ABA Rezeptoren und LA.....	54
Abb. 2-28 Induktion der ABA Antwort durch MpRCAR2 Varianten.....	55
Abb. 2-29 Relative Samenkeimung der PcRCAR Linien.	57
Abb. 2-30 Relative Samenkeimung unterschiedlicher PcRCAR9 Linien.	57
Abb. 2-31 Genexpression von PcRCAR9 in Arabidopsis.....	58
Abb. 2-32 Genexpression von Arabidopsis RCARs in PcRCAR9 Linien.	59
Abb. 2-33 Relatives Wurzelwachstum von PcRCAR-Überexpressionslinien.....	60
Abb. 2-34 Wasserverbrauch und Blattflächenzuwachs der PcRCAR9 Überexpressionslinien im fortschreitenden Trockenstress.....	62
Abb. 2-35 Trockengewicht und Wassernutzeffizienz der PcRCAR9 Überexpressionslinien.	65
Abb. 2-36 Gaswechselformen der PcRCAR9-11 Überexpressionslinie.	66
Abb. 2-37 Wasserverbrauch und Blattflächenzuwachs der PcRCAR10 Überexpressionslinien im fortschreitenden Trockenstress.....	68
Abb. 2-38 Trockengewicht und Wassernutzeffizienz der PcRCAR10 Überexpressionslinien.	69
Abb. 2-39 Gaswechselformen der PcRCAR10 Überexpressionslinie.....	70
Abb. 2-40 Genexpression der Pappel RCARs in Pappel.....	72
Abb. 2-41 Gaswechselformen der PcRCAR Überexpressionslinien in Pappeln.74	
Abb. 3-1 Stammbaum von Arabidopsis, Pappel und Tomaten RCARs.	81
Abb. 3-2 Schematische Darstellung einer möglichen ABA Signaltransduktion.....	87
Abb. 3-3 Ausschnitt des Proteinalignments der Arabidopsis und Pappel RCARs. ...	88
Abb. 3-4 Strukturen von Abscisin- und Lunularsäure	90
Abb. 3-5 Vergleich der Bindetaschen von RCAR1 und MpRCAR2	91
Abb. 3-6 Schematische Darstellung einer möglichen ABA Signaltransduktion in Arabidopsis, <i>Populus</i> und <i>Marchantia</i>	92
Abb. 3-7 Entwicklung von Temperatur und Niederschlagsmenge.	96

Abb. 5-1 Multiples Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel RCARs.....	130
Abb. 5-2 Multiples Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel PP2Cs.....	132
Abb. 5-3 Stammbaum von Arabidopsis und <i>Marchantia</i> RCARs.....	133
Abb. 5-4 Interaktionsanalyse von Pappel RCARs und PP2Cs	133

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Konstrukte zur heterologen Expression	42
Tabelle 4-1 Verwendete Geräte.....	100
Tabelle 4-2 <i>Escherichia coli</i> Stämme	103
Tabelle 4-3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stamm.....	103
Tabelle 4-4 Antibiotika und ihre Konzentration im Nährmedium	104
Tabelle 4-5 Hefestamm	104
Tabelle 4-6 Oligonukleotide für Protoplastenvektoren	107
Tabelle 4-7 Oligonukleotide für Proteinexpression	108
Tabelle 4-8 Allgemeiner PCR Ansatz	118
Tabelle 4-9 Bedingungen für PCR mit „Phusion“ Polymerase	118
Tabelle 4-10 Bedingungen für PCR mit GoTaq [®] Polymerase.....	118
Tabelle 4-11 Restriktionsansatz für PCR Produkten	119
Tabelle 4-12 Restriktionsansatz für Plasmid DNA	119
Tabelle 4-13 Ligationsansatz.....	120
Tabelle 4-14 Ansatz für cDNA Synthese	121
Tabelle 4-15 Transfektionsansatz von Hefezellen	122
Tabelle 4-16 Protokoll zur Säulenregeneration.....	124
Tabelle 4-17 Trenn- und Sammelgel	125
Tabelle 5-1 Verwendete Oligonukleotide für quantitative RT-PCR	128

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUP	4-Methylumbelliferylphosphat
A	Netto-CO ₂ -Assimilationsrate
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Abscisinsäure
ABI	Abscisinsäure insensitiv
BAP	Benzylaminopurin
AAO	Aldehydoxidase
ABA1	Abscisinsäure Defizient 1
ABA2	Abscisinsäure Defizient 2
ABA-GE	Abscisinsäure Glucoseester
ABF	<i>abscisic acid responsive element-binding factor</i>
ABRE	<i>abscisic acid responsive element</i>
ACT2	Actin 2
AD	Aktivierungsdomäne
AHG	<i>abscisic acid hypersensitive germination 1</i>
AKT1	K ⁺ Transporter 1
AREB	<i>abscisic acid responsive element-binding protein</i>
BD	Bindedomäne
Bet v 1	<i>Major birch pollen allergen of Betula verrucosa 1</i>
BG1	Beta-1,3-Glucanase 1
BG2	Beta-1,3-Glucanase 2
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BLOSUM62	<i>Blocks Substitution Matrix</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bZIP	<i>basic region/ leucin Zipper</i>
CE	<i>coupling element</i>
CDC2	<i>cell division control protein 2</i>

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Col-0	Columbia 0
CPS	<i>counts per second</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
E	Transpirationsrate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g _s	stomatäre Leitfähigkeit
GAL4	Galaktose Metabolismus 4
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-D-Glucoronidase
HAB	<i>hypersensitive to abscisic acid</i>
HAI	<i>highly abscisic acid induced</i>
HB6	Homeobox Protein 6
HD-ZIP	<i>Homodomain-Leucin zipper</i>
H	Histidin
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
insWUE	<i>instantaneous water-use efficiency</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KAT1	<i>Potassium channel in Arabidopsis thaliana</i>
K _d	Dissoziationskonstante
L	Leucin
LA	Lunularsäure
LAR	<i>Luciferase assay reagent</i>
LB	Luria-Bertani Nährmedium
LUC	Luciferase
LV	Leervektor

M	mol/ l
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-Morpholineothansulfonsäure
MW	Mittelwert
mQ	MilliQ
Mp	<i>Marchantia polymorpha</i>
MS	Murashige & Skoog Nährmedium
NCED	<i>Carotenoid cleavage dioxygenases</i>
OD	optische Dichte
OST1	<i>open stomata 1</i>
Pc	<i>Populus canescens</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PP2C	Proteinphosphatase Typ 2C
Pt	<i>Populus trichocarpa</i>
PYL	<i>Pyrabactin resistant-like</i>
PYR	<i>Pyrabactin resistant</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
QUAC1	<i>quick activating anion channel 1</i>
RAB18	<i>responsive to abscisic acid 18</i>
RCAR	<i>regulatory component of abscisic acid receptor</i>
RD29B	<i>responsive to dessication 29B</i>
RFU	<i>relative fluorescent unit</i>
RT-qPCR	<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Synthetic Dropout</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Standardfehler
SLAC1	<i>slow anion channel-associated 1</i>
SnRK2	<i>sucrose non fermenting 1 related protein kinases 2</i>
START	<i>star-related lipid transfer domain</i>
T _E	Transpirationseffizienz
TB	Terrific Broth Nährmedium
TIP4-like	<i>tonoplast intrinsic protein 4 like</i>

U	Unit
UGT	UDP-Glycosyltransferase
ÜN	über Nacht
VDE	Violaxanthin-Deepoxidase
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
WUE	Wassernutzeffizienz
Y2H	Hefe-zwei-Hybrid-System
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

Zusammenfassung

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) ist ein wichtiges Signal der Pflanzen, um auf abiotischen Stress zu reagieren. Es reguliert neben dem Wasserhaushalt der Pflanzen auch Trockentoleranz, indem es den stomatären Gasaustausch, die Wasserleitfähigkeit und die Genexpression beeinflusst. Bei der Wahrnehmung und Weiterleitung von ABA sind zwei Hauptkomponenten beteiligt. Zum einen die „*Regulatory Component of ABA Receptors (RCARs)/PYR1/PYL (Pyrabactin Resistance 1/ PYR1-like)*“ Proteine und zum anderen Gruppe A Proteinphosphatasen des Typs 2C als Ko-Rezeptoren. In Gegenwart von ABA werden die RCARs in der Interaktion mit den Proteinphosphatasen stabilisiert. Letztere werden dadurch in ihrer Aktivität inhibiert, was wiederum die Aktivierung von *Sucrose non-fermenting* Proteinkinasen 2 (SnRK2s) ermöglicht. Die Proteinkinasen regulieren Ionenkanäle und ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Dieser zentrale Mechanismus zur ABA Wahrnehmung und Weiterleitung ist in Arabidopsis gut erforscht. Die Anzahl von ABA Rezeptoren und Ko-Rezeptoren und deren Zusammenspiel in einer Baumart wurde bisher noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde eine detaillierte Analyse von Rezeptorkomplexen der Graupappel (*Populus x canescens* [Ait.] Sm.) durchgeführt. Diese Studie verdeutlichte die starke Konservierung der ABA Rezeptoren zwischen einer einjährigen krautigen Pflanze und einem Baum. So waren RCAR und PP2C Proteine in ihrer Anzahl in Pappel und Arabidopsis identisch. Die Charakterisierung der ABA Rezeptoren und Ko-Rezeptoren der Graupappel zeigte eine große Anzahl an kombinatorischen, funktional aktiven Möglichkeiten zur Bildung des Holo-Rezeptorkomplexes in der Pappel, aber auch einige bevorzugte und selektive RCAR-PP2C Interaktionen. Die homologen ABA Rezeptoren von Arabidopsis und Pappel wiesen eine starke strukturelle und funktionelle Konservierung auf. Heterologe Rezeptorkomplexe aus Arabidopsis- und Pappelproteinen zeigten Aktivität *in vitro* und regulierten die ABA-abhängige Genexpression in beiden Arten. ABA-abhängige Promotoren aus Arabidopsis waren auch in Pappel aktiv, was durch generierte Pappelreporterlinien gezeigt wurde. So wurde ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), gekoppelt an den ABA induzierbaren Promotor RD29B, zeit- und konzentrationsabhängig zu ABA in Pappelzellen exprimiert.

Es wurden transgene Arabidopsis und Pappeln generiert, welche unterschiedliche ABA Rezeptoren überexprimierten. Die ektopische Expression eines Pappel ABA Rezeptors in Arabidopsis zeigte eine verbesserte Wassernutzeffizienz und Trockenresistenz der Pflanzen. Die photosynthetische Wassernutzeffizienz von transgenen Pappelblättern wurde durch Gaswechsellmessungen bestimmt. Die Ergebnisse belegten bei einigen Linien eine verbesserte CO₂-Fixierung, relativ zum Wasserverlust, was zu einer verbesserten Trockenresistenz führt. Pappel RCARs hatten somit in Arabidopsis, als auch in Pappel einen positiven Effekt auf die Wasserproduktivität.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob RCARs auch andere Liganden binden können. Hierfür wurden ABA Rezeptoren des Lebermooses *Marchantia polymorpha* untersucht. Die Lebermoose besitzen neben ABA auch Lunularsäure, welche zum Teil ABA ähnliche, physiologische Antworten auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass die RCARs aus dem Moos als ABA Rezeptoren dienen und PP2C Ko-Rezeptoren in ihrer Aktivität regulieren. Zudem konnte RCAR2, im Gegensatz zu den anderen MpRCARs und Arabidopsis Rezeptoren, neben ABA auch Lunularsäure als Liganden nutzen. In MpRCAR2 wurden zwei Aminosäurereste bestimmt, die wichtig für die Interaktion mit Lunularsäure sind. In einem *in vivo* System konnte erstmalig die Induktion des ABA Signalwegs durch einen alternativen, natürlich vorkommenden Liganden gezeigt werden.

Summary

The plant hormone abscisic acid (ABA) is a key player in responses to abiotic stress. ABA regulates a plant's water status and mediates drought tolerance by controlling stomatal gas exchange, water conductance, and differential gene expression. ABA is recognized and bound by the Regulatory Component of ABA Receptors (RCARs)/PYR1/PYL (Pyrabactin Resistance 1/PYR1-like). Ligand binding stabilizes the interaction of RCARs with type 2C protein phosphatases (PP2C), which are ABA co-receptors. The trimeric receptor-ligand complex is catalytically inhibited and allows phosphorelay of downstream-acting protein kinases of the sucrose non-fermenting 1-related subfamily 2 (SnRK2s) which targets ABA-responsive transcription factors and membrane-localized ion channels. While the core pathway of ABA signaling has been elucidated in Arabidopsis, the large number of different ABA receptors and co-receptors within a tree species generates a complexity of heteromeric receptor complexes that has not functionally been resolved to date.

This study presents a detailed analysis of receptor complexes of grey poplar (*Populus x canescens* [Ait.] Sm.). This work shows high conservation of ABA receptor components between an annual herbaceous plant and a perennial tree. In both species, the numbers of different RCARs and PP2Cs were identical. Characterization of ABA receptors and co-receptors of grey poplar showed a high number of regulatory combinations of holo-receptor complexes but also some preferential and selective RCAR-PP2C pairings. Poplar and Arabidopsis ABA receptor components revealed strong structural and functional conservation. Heterologous receptor complexes of poplar and Arabidopsis proteins showed functionality *in vitro* and regulated ABA-responsive gene expression in cells of both species. ABA-responsive promoters of Arabidopsis were also active in poplar, which was explored to generate poplar reporter lines expressing GFP in a time- and dose-dependent response to ABA.

Transgenic Arabidopsis and poplar lines, ectopically expressing different poplar RCARs, were generated and analyzed. Arabidopsis plants expressing poplar RCARs showed increased water use efficiency and a drought resistant trait. The instantaneous water use efficiency of transgenic poplar plants were determined by gas exchange

measurements. The analyses indicated that specific lines showed improved CO₂ capture relative to water loss, consistent with an improved drought resistance. Expression of poplar RCARs mediated also in *Arabidopsis* a water productive trait.

In addition, the question arose whether RCARs are able to bind a natural ligand different from ABA. Therefore, ABA receptors from the livermoss *Marchantia polymorpha* were analyzed. Livermosses possess lunularic acid, which elucidates physiological functions similar to ABA. The study showed that moss RCARs function as ABA receptors and regulate PP2C activity. In contrast to *Arabidopsis* ABA receptors and most *Marchantia* RCARs, the moss RCAR2 was able to use lunularic acid as an alternative ligand. Three amino acid residues of MpRCAR2 were detected to be crucial for the interaction with LA. Using lunularic acid, the induction of the ABA signaling cascade was shown for the first time by an alternative, natural ligand in an *in vivo* system.

1. Einleitung

1.1. Biotischer und abiotischer Stress

Pflanzen sind als sessile Organismen den Umweltbedingungen ausgesetzt. Neben den biotischen Faktoren wie Infektionen mit Pathogenen und Fressfeinden spielen abiotische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Limitierung von Wachstum und Verbreitung der Pflanzen (Brown and Hovmoller 2002; Maron and Crone 2006). Zu den abiotischen Faktoren zählen neben Trockenheit, Hitze und Kälte auch Nährstoffverfügbarkeit sowie ein Überschuss an Salz und Schwermetallen (Zhu 2016). Abiotischer Stress zählt zu den wichtigsten Faktoren, die das Pflanzenwachstum reduzieren und hauptverantwortlich für Ernteeinbußen sind. So können dadurch in den meisten Pflanzenspezies Wachstumseinbußen von über 50 % beobachtet werden (Wang et al. 2003). Die Frage, wie Pflanzen all diese Faktoren wahrnehmen und darauf reagieren können, ist seit langem Gegenstand der Forschung. Wichtig für die Landwirtschaft ist es, Pflanzen zu generieren, welche möglichst früh abiotische Stressoren wie Wasserknappheit erkennen. Ebenso wichtig ist die schnelle Interpretation und Reaktion, um den entstehenden Schaden zu minimieren. Die Weiterleitung und Adaption erfolgt meistens durch eine Kombination unterschiedlicher Pflanzenhormone und sekundärer Botenstoffe (Rejeb et al. 2014).

1.2. Trockenheit und Wassernutzeffizienz

Steigende Temperaturen und somit zunehmende Trockenheit ist heutzutage einer der wichtigsten Faktoren für Ernteeinbußen (Lobell and Field 2007). Da die Weltbevölkerung immer mehr zunimmt, steht der Landwirtschaftssektor vor doppelter Problematik. Da Anbauflächen bereits begrenzt sind und der Pflanzenanbau für Biogasproduktion um nutzbare Gebiete konkurriert, müssen andere Lösungsansätze erarbeitet werden. Gentechnisch veränderte Pflanzen stellen eine Möglichkeit dar, auf Wasserknappheit zu reagieren. Es werden Pflanzen benötigt, die bei gleicher Wasserverfügbarkeit mehr Biomasse aufbauen können. Dieses Verhältnis wird durch die Wassernutzeffizienz ausgedrückt. Sie beschreibt das Verhältnis von Ertrag zu verbrauchtem Wasser, oder

als *instantaneous* WUE, die Netto-CO₂-Assimilationsrate in Bezug auf die stomatäre Leitfähigkeit (Morison et al. 2008). Es wurde gezeigt, dass Pflanzen bei Wasserknappheit die Wassernutzeffizienz um den Faktor 1,5 bis 2,5 verbessern können (Ranney et al. 1991; Wall et al. 2001; Medrano et al. 2002; Rizza et al. 2012). Diese Gegebenheit wird bei der Wasserdefizit Bewässerung genutzt. Die Pflanze wird im milden Trockenstress gehalten, um die Wassernutzeffizienz zu erhöhen. Die genetische Basis der Wassernutzeffizienz ist auf ein Zusammenspiel mehrerer Gene zurückzuführen. Des Weiteren besitzen natürliche Varianten einzelner Spezies unterschiedliche Wassernutzeffizienzen (Juenger et al. 2005; Manzaneda et al. 2015).

Der Wasserverbrauch der Pflanze ist abhängig von der Transpiration, welche für den Gasaustausch und die CO₂-Aufnahme verantwortlich ist. Der Wasserverlust relativ zur CO₂-Aufnahme bei der Transpiration ist wiederum abhängig von dem Gradienten von CO₂ zu Wasserdampfdruck. Für die Modellpflanze Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) wurde gezeigt, dass die Wassernutzeffizienz durch Rezeptoren des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) beeinflusst werden kann (Yang et al. 2016). Durch die Überexpression einiger ABA Rezeptoren konnte die Wassernutzeffizienz um 40 % erhöht werden. Die Blattemperatur war durch eine verminderte Stomataöffnung erhöht und die Transpiration dadurch vermindert. Die CO₂-Assimilationsrate war jedoch nicht erniedrigt. Kompensiert wurde dies durch einen erhöhten CO₂-Gradienten.

Diese Gegebenheit verdeutlicht, wie wichtig das Phytohormon Abscisinsäure und dessen Signalkaskade im Wasserhaushalt der Pflanzen ist. Im Folgenden werden die Pflanzenhormone und ihre Wirkung näher beschrieben. Hauptaugenmerk liegt auf dem Stresshormon Abscisinsäure.

1.3. Pflanzenhormone

Pflanzenhormone sind eine Gruppe von niedrig abundanten Molekülen, welche eine Vielzahl von metabolischen und entwicklungsgesteuerten Prozessen auslösen. Wie tierische Hormone, können auch Phytohormone verschiedene Bildungs- und Zielgewebe haben. Zum Teil werden die niedermolekularen Hormone durch die Vaskulatur transportiert (Lacombe and Achard 2016). Unter ihnen gibt es zahlreiche Möglichkeiten von Zusammen- und Gegenspiel der einzelnen Hormone (Abb. 1-1).

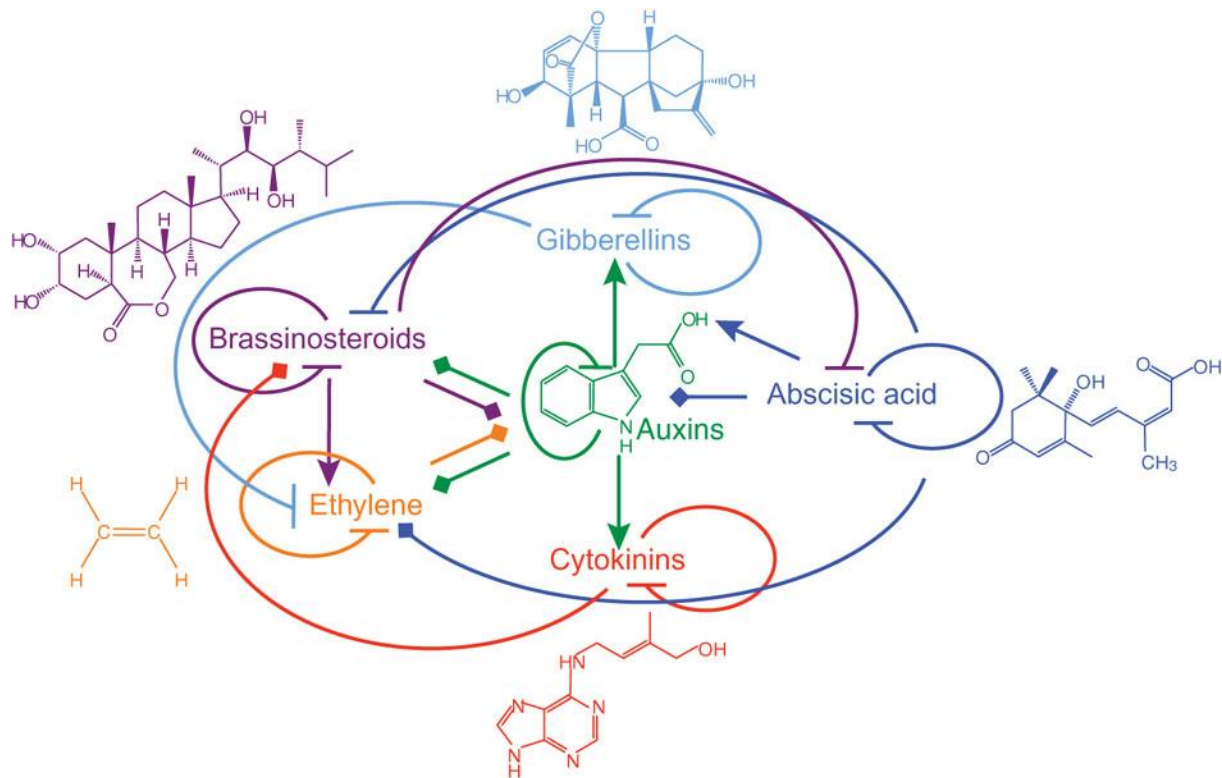


Abb. 1-1 Phytohormone und deren Zusammenspiel.

Linien mit Pfeilen stellen eine Hochregulierung von Genen für die Hormonbiosynthese oder Herunterregulierung von Genen für Hormoninaktivierung dar. Blockierte Linien stehen für eine Herunterregulierung von Genen für die Hormonbiosynthese oder Hochregulierung von Genen für Hormoninaktivierung. Diamantförmige Linienenden beschreiben Änderungen der Genexpression mit unterschiedlichen Wirkungen (Jaillais and Chory 2010).

Klassisch werden die Phytohormone in wachstumsfördernde und wachstumshemmende Hormone eingeteilt. Zu den wachstumsfördernden Hormonen zählen Auxine, welche verantwortlich für die Apikaldominanz sind. Desweiteren wird durch Auxin das Streckenwachstum, die sekundäre Wurzelbildung sowie Zellteilung gefördert. Die Zellteilung wird ebenfalls durch Cytokinine gesteigert (Werner et al. 2001). So werden die Vertreter Benzylaminopurin (BAP) und Thidiazuron zur Induktion von Kallus und Sprosswachstum genutzt (Huetteman and Preece 1993). Brassinosteroide fördern die Zellteilung und -streckung und sind verantwortlich für die Zelldifferenzierung (Clouse 2011). Ebenfalls wachstumsfördernd sind Gibberelline, welche das Streckenwachstum fördern und eine Regulation in Blütenbildung und Keimung besitzen (Sun 2008).

Im Gegensatz dazu stellt Ethylen ein das Wachstum inhibierendes Hormon dar. Es reguliert neben Fruchtreife und Samenkeimung die Blattseneszenz sowie Stress- und Pathogenreaktionen (Schaller and Kieber 2002). Für die Pathogenabwehr sind auch Jasmon- und Salizylsäure verantwortlich (Acosta and Farmer 2010; Dempsey et al.

2011). Strigolactone, welche sich von den Carotinoiden ableiten, spielen eine Rolle in Verzweigung und Seitenwurzelbildung (Gomez-Roldan et al. 2008; Umehara et al. 2008). Als letztes wichtiges Pflanzenhormon ist die Abscisinsäure zu nennen, welche eine wichtige Rolle in der Adaption der Pflanze an abiotischen Stress besitzt.

1.4. Abscisinsäure

Abscisinsäure (ABA) wurde in den 1960er Jahren das erste Mal als „Abszissin II“ oder „Dormin“ aus Baumwollfrüchten isoliert (Ohkuma et al. 1963; Cornforth et al. 1965). Das monozyklische Sesquiterpen (3-Methyl-5-(1'-hydroxy-4'-oxo-2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexen-1'yl)-cis-2,4-pentadiensäure) fungiert als Wachstumsinhibitor und ist an vielen weiteren Regulationen der Pflanze beteiligt. ABA wirkt in der Keimung antagonistisch zu Gibberellinen (Huttly and Baulcombe 1989), reguliert die Öffnung der Spaltöffnungen (Kim et al. 2010) und spielt eine große Rolle bei Trocken- und Salztoleranz (Christmann et al. 2006). Zu den weiteren Prozessen, an denen das Hormon beteiligt ist, zählen Embryoreifung und Samenruhe (Karssen et al. 1983; Parcy et al. 1994; Bewley 1997; Holdsworth et al. 1999), Zellteilung und -elongation (Zeevaart and Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000; Barrero et al. 2006) sowie Blühinduktion (Finkelstein 2013). ABA wird vor allem bei Wassermangel gebildet, was zur raschen Regulation der Stomata führt (Cutler et al. 2010; Kim et al. 2010; Raghavendra et al. 2010).

ABA spielt nicht nur eine Rolle bei höheren Pflanzen, Moosen und Algen (Nambara and Marion-Poll 2005), sondern wurde auch in Tieren und Menschen nachgewiesen. Neben der entzündungsfördernden Wirkung als Zytokin und der möglichen Regulation des Muskeltonus, ist es am glykämischen Stoffwechsel beteiligt (Bruzzone et al. 2007; Magnone et al. 2009; Vigliarolo et al. 2015).

Die Bildung von ABA erfolgt in mehreren Stufen aus Carotinoiden. Im Chloroplasten wird Xanthoxin über Zeaxanthin, Antheraxanthin und *all-trans*-Violaxanthin gebildet. Die Umwandlung der Carotinoide erfolgt durch ZEP (Zeaxanthin-Epoxidase/ ABA1) und Violaxanthin-Deepoxidase (VDE). Durch Spaltung des C₄₀-Carotinoide durch die 9-cis Epoxy-carotinoid-Dehydrogenasen (NCEDs) entsteht das Xanthoxin, welches ins Cytosol transportiert wird und dort durch eine Dehydrogenase/ Reduktase (ABA2) und

eine Aldehydoxidase (AAO) in Abscisinsäure umgewandelt wird (Abb. 1-2) (Tan et al. 2003).

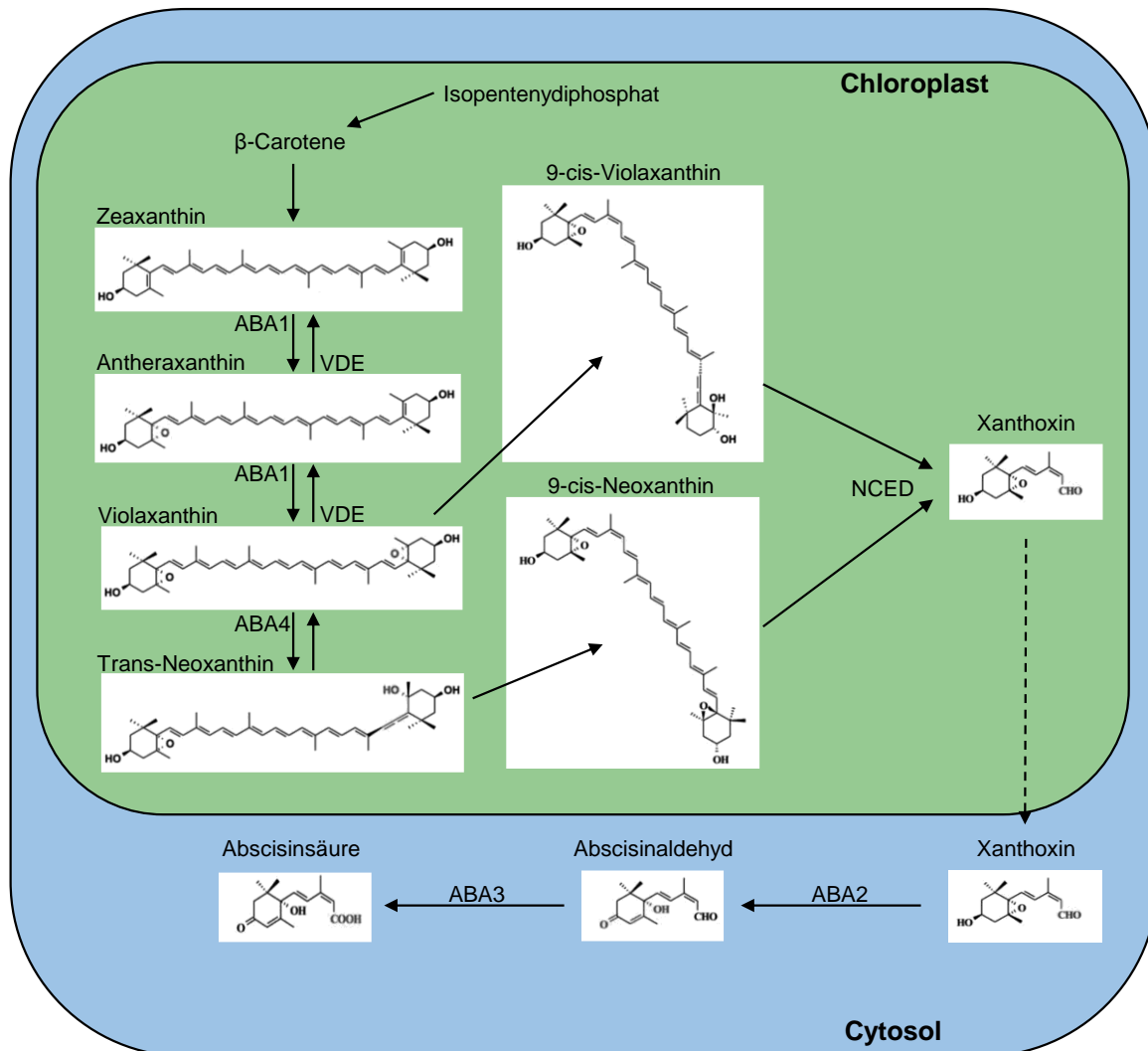


Abb. 1-2 ABA-Biosynthese.

Die Synthese von ABA erfolgt im Chloroplasten ausgehend von Carotinoiden. Die enzymatisch katalysierte Reaktion beinhaltet die Umwandlung von Zeaxanthin, über Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin zu Xanthoxin. Dieses wird ins Cytosol transportiert, zu Abscisinaldehyd dehydriert und zur Abscisinsäure oxidiert. Die Abbildung wurde erstellt nach Schwartz et al. (2003).

Der Abbau von ABA erfolgt über Hydroxylierung des C'8 Atoms über P-450 Monooxygenasen (Kushiro et al. 2004; Saito et al. 2004). Diese werden von vier Genen der CYP707A- Familie aufgrund phylogenetischer Verteilung und Expressionsmuster enkodiert. Dabei entsteht instabiles 8'-OH-ABA, das zu Phaseinsäure bzw. Dihydrophaseinsäure umgewandelt wird. Eine Hydroxylierung am C'7 und C'9 Atom konnte ebenfalls gezeigt werden (Zhou et al. 2004).

Alternativ erfolgt die physiologische Inaktivierung über reversible Glucoseester-Konjugat Bildung (ABA-GE) und Speicherung in Vakuolen oder dem Apoplast. Es sind acht

ABA Glycosyltransferasen (UGT) in Arabidopsis bekannt, die diese Reaktionen katalysieren (Lim et al. 2005). Durch die β -Glucosidasen BG1 und BG2/BGLU33 können die Speicherformen im endoplasmatischen Retikulum, beziehungsweise der Vakuole reaktiviert werden (Lee et al. 2006; Xu et al. 2012).

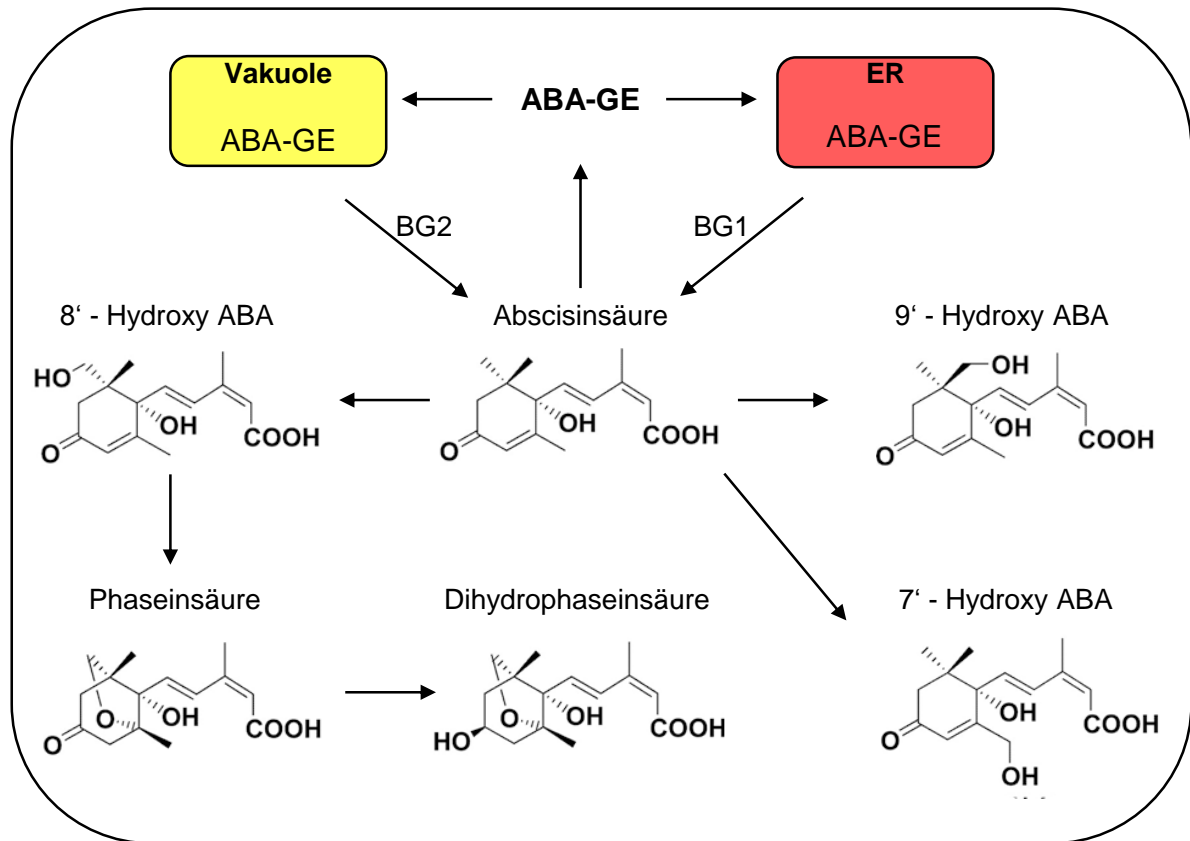


Abb. 1-3 ABA-Katabolismus.

Durch Glukoseveresterung kann ABA inaktiviert und in Vakuolen gespeichert werden (ABA-GE). Die β -Glucosidasen BG1 und BG2 können das inaktive ABA-GE im ER und in der Vakuole wieder zu aktiven ABA umwandeln. ABA kann durch Hydroxylierung am C'7, C'8 und C'9 Atom mit Oxidation zu Phaseinsäure und Diehydrophaseinsäure abgebaut werden. Die Abbildung wurde erstellt nach Krochko et al. (1998), Zhou et. al (2004) und Schroeder (2006).

1.5. ABA-Signaltransduktion

Das durch Stress gebildete ABA wird apoplastisch zu den Bündelscheiden transportiert und passiv mit dem Wasserstrom über das Xylem zu den Schließzellen transportiert (Christmann et al. 2007; Umezawa et al. 2010). Dort kann es über ABC-Transporter in die Zelle gelangen (Kang et al. 2010; Kuromori et al. 2010). ABA wird von seinen Rezeptoren, den RCARs (*Regulatory component of ABA receptor*), detektiert und gebunden. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex interagiert mit einer Proteinphosphatase

des Typs 2C, welche durch die Bindung im ternären Komplex inhibiert wird (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Die sonst durch die Proteinphosphatase inhibierte Proteinkinase wird durch Autophosphorylierung aktiviert und reguliert Ionenkanäle wie SLAC1 und KAT1 (Geiger et al. 2009; Sato et al. 2009). Im Zellkern werden Transkriptionsfaktoren wie AREBs und ABFs aktiviert (Fujii et al. 2009; Raghavendra et al. 2010). Es kommt einerseits zu einer schnellen Antwort über die Regulation von Ionenkanälen und die nachfolgende Schließung der Stomata, andererseits zu einer langsameren Antwort durch Genexpression ABA-responsiver Gene (Abb. 1-4) (Christmann et al. 2006; Kim et al. 2010). Nachfolgend werden die einzelnen Kernkomponenten der ABA Signaltransduktion näher betrachtet.

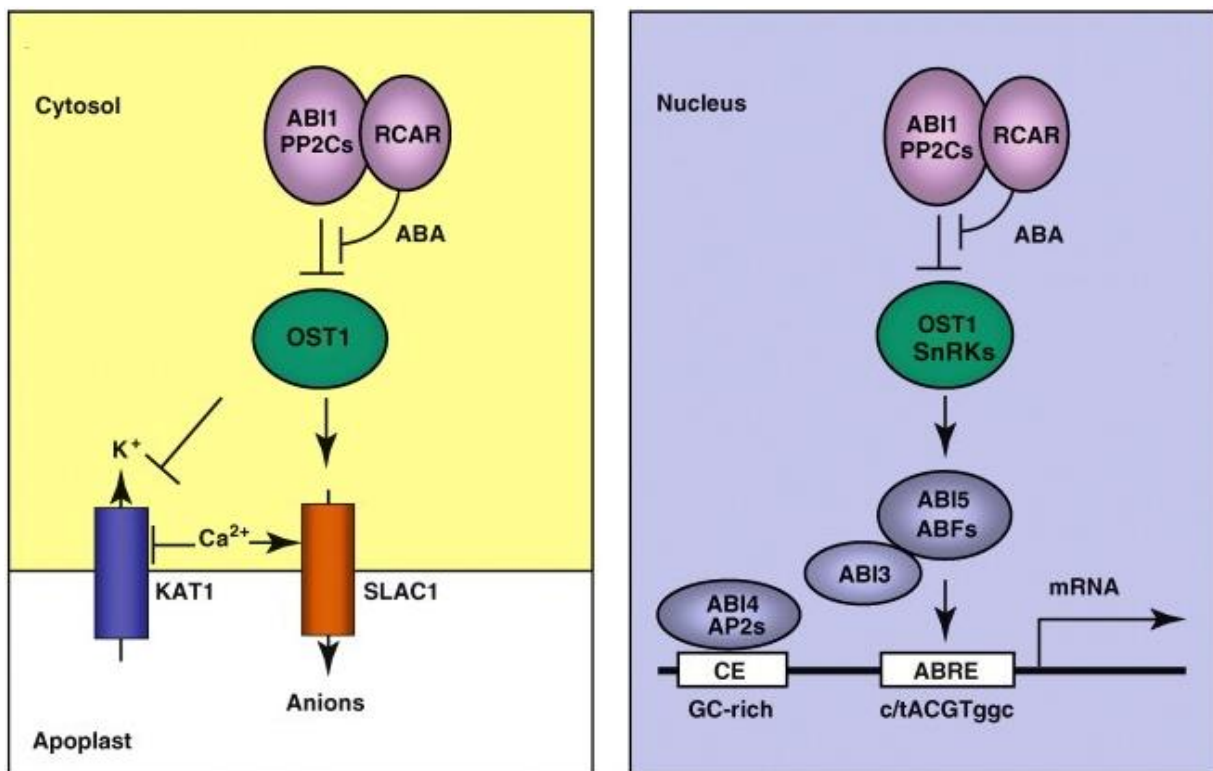


Abb. 1-4 ABA Signalkaskade.

ABA wird durch das RCAR gebunden worauf ein ternärer Komplex mit einer Proteinphosphatase des Typs 2C (PP2C) stabilisiert wird. SnRK2 Proteinkinasen (OST1) werden von ihrer Inhibierung gelöst und regulieren cytosolisch Ionenkanäle (SLAC1 und KAT1) und nuklear Transkriptionsfaktoren (ABFs) (Abbildung modifiziert nach Ragavendra et al. 2010).

1.5.1. ABA Rezeptoren

Die Rezeptoren der ABA Signalkaskade wurden über einen Screen für Pyrabactin-Resistenz gefunden. Pyrabactin ist ein synthetisches Sulfonamid, das ähnliche physiologische Effekte wie ABA auslöst (Abb. 1-5). Die Rezeptoren wurden *PYRABACTIN RESISTANT/PYRABACTIN RESISTANT-LIKE* (PYR/PYL) genannt (Park et al. 2009). Zur gleichen Zeit wurden Proteine gesucht, die eine Interaktion mit der Proteinphosphatase ABI2 eingehen können. Es stellte sich heraus, dass es sich um die gleichen Proteine handelte. Sie wurden *REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR* (RCAR) genannt (Ma et al. 2009). Das Genom von Arabidopsis kodiert für 14 Proteine dieser Bet v 1 Superfamilie (START Proteine). Dabei handelt es sich um ca. 20 kDa große Proteine, welche sich aufgrund ihrer Primärstruktur in drei Unterfamilien gliedern lassen (Abb. 1-6) (Ma et al. 2009; Park et al. 2009).

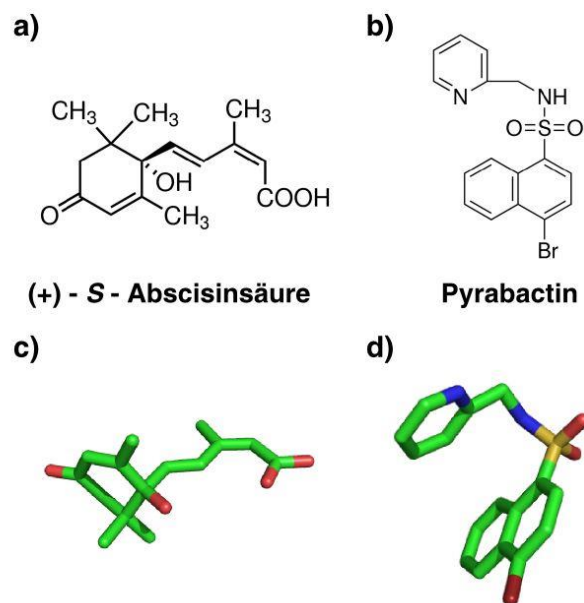


Abb. 1-5 Struktur von Abscisinsäure und Pyrabactin.

(+) – S – Abscisinsäure (a+c) und Pyrabactin (b+d) als Strukturformel (a+b) und Bändermodell (c+d). Die roten Reste stellen Sauerstoffatome, die blauen Stickstoffatome, die gelben Schwefelatome und die braunen Bromatome dar.

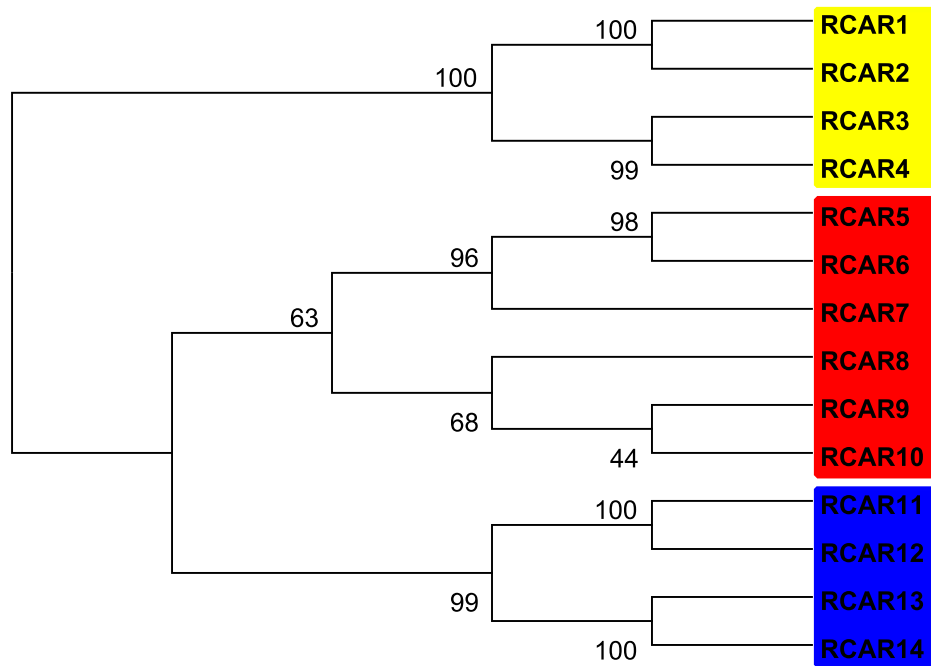


Abb. 1-6 Stammbaum von Arabidopsis RCARs.

Phylogenetische Analyse basierend auf Neighbor-Joining-Algorithmus von RCARs in Arabidopsis. Die RCARs unterteilen sich in drei Unterfamilien. Unterfamilie I ist in gelb, Unterfamilie II in rot und Unterfamilie III in blau dargestellt. Die Zahlen geben den Anteil der Einzelbäume in Prozent an, in denen der betreffende Ast enthalten war.

Die RCARs besitzen eine ähnliche Sekundärstruktur aus sieben antiparallelen Faltblättern um eine alpha-Helix (Gajhede et al. 1996). Bindet ABA an den Rezeptor, induziert dies eine Konformationsänderung von zwei β -Faltblättern mit Umschließung des Liganden. Gleichzeitig wird eine optimale Bindestelle für die Proteinphosphatase geschaffen. Durch diese Komplexbildung wird die Proteinphosphatase inhibiert und nachfolgende Proteinkinasen von ihrer Inaktivierung gelöst (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Yin et al. 2009). Alle 14 RCARs können S-ABA binden, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität. So liegt die Dissoziationskonstante (K_d) für die Unterfamilien I und II bei etwa $1 \mu\text{M}$ (Ma et al. 2009; Santiago et al. 2009b; Szostkiewicz et al. 2010), für Unterfamilie III um die $55 \mu\text{M}$ (Miyazono et al. 2009; Yin et al. 2009).

1.5.2. Proteinphosphatasen

Proteinphosphatasen stellen den ABA Ko-Rezeptor dar und werden abhängig nach ihren biochemischen Eigenschaften charakterisiert. Die Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2C) gehören zu den Mg^{2+} und Mn^{2+} -abhängigen Serin/Threonin Proteinphosphatasen und bilden die größte Familie der Phosphatasen in Pflanzen (Cohen 1989; Meyer et al. 1994; Leung et al. 1997; Rodriguez et al. 1998a). So sind 80 PP2Cs im Arabidopsis Genom kodiert, welche in zwölf Klassen (A-L) eingeteilt werden (Xue et al. 2008; Yang et al. 2010). An der ABA-Signaltransduktion sind allerdings nur PP2Cs der Klasse A involviert (Abb. 1-7). Diese neun Vertreter können durch Dephosphorylierung von Proteinkinasen die ABA Antwort inhibieren (Umezawa et al. 2009; Fuchs et al. 2013).

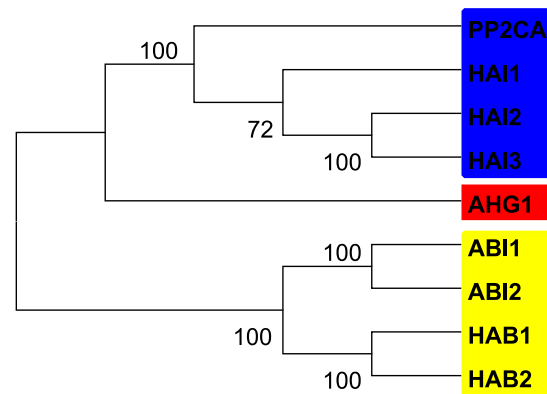


Abb. 1-7 Stammbaum von Arabidopsis Proteinphosphatasen.

Phylogenetische Analyse basierend auf Neighbor-Joining-Algorithmus von PP2Cs in Arabidopsis. Die PP2Cs unterteilen sich in drei Unterfamilien. Unterfamilie I ist in gelb, Unterfamilie II in rot und Unterfamilie III in blau dargestellt. Die Zahlen geben den Anteil der Einzelbäume in Prozent an, in denen der betreffende Ast enthalten war.

Die ersten PP2Cs wurden durch Mutantenscreens auf ABA-insensitive (*abi*) Phänotypen gefunden. Die Mutanten *abi1* und *abi2* weisen eine durch einen einzelnen Aminosäureaustausch in der Phosphatasedomäne hervorgerufene Reduktion der enzymatischen Aktivität auf (Bertauche et al. 1996; Leung et al. 1997). Hinzu kommt eine ineffizientere Komplexbildung mit den RCARs und einer folglich bestehenden Inhibierung der Proteinkinasen (Ma et al. 2009). Später wurden andere Proteinphosphatasen mit Funktion im ABA Signalweg gefunden. Zwei Gene mit hoher Homologie zu ABI1 und ABI2 wurden durch Hypersensitivität gegenüber ABA bei der Samenkeimung identifiziert (HAB1 und HAB2) (Rodriguez et al. 1998b; Saez et al. 2004). Auf gleichem Weg

wurden AHG1 (*ABA Hypersensitive Germination 1*) und PP2CA/AHG3 (*ABA Hypersensitive Germination 3*) identifiziert (Yoshida et al. 2006; Nishimura et al. 2007). Bei den letzten drei PP2Cs der Klasse A handelt es sich um *highly ABA induced 1-3* (HAI1-3), welche sich über den starken Anstieg ihrer Expressionslevel in Gegenwart von ABA auszeichnen (Bhaskara et al. 2012; Lim et al. 2012).

Proteinphosphatasen werden als Antwort auf osmotischen, Trocken- und Salzstress verstärkt exprimiert. Sie sind im Cytosol, als auch im Nucleus lokalisiert (Moes et al. 2008; Ma et al. 2009). Im Cytosol regulieren sie Ionenkanäle und somit die hydrostatischen Eigenschaften der Pflanzenzellen. Im Zellkern können PP2Cs Transkriptionsfaktoren wie ABFs oder HB6 inaktivieren. Entweder durch direkte Interaktion (Himmelbach et al. 2002; Lynch et al. 2012) oder über Inaktivierung von ABF-aktivierende Proteinkinasen (Fujii et al. 2007; Fujita et al. 2013).

1.5.3. Proteinkinasen

Proteinkinasen wie die *sucrose non-fermenting 1 (SNF1) related protein kinases 2* (SnRK2s) können als Gegenspieler zu den Proteinphosphatasen angesehen werden. Das Arabidopsis Genom kodiert für 38 Gene der Familie der SnRKs. Die SnRK2 Familie besteht aus zehn Mitgliedern und wird durch osmotischen Stress aktiviert (Hrabak et al. 2003; Boudsocq et al. 2004; Fujii et al. 2011). Die Kinasen SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6/OST1 werden durch Dephosphorylierung im Aktivierungs-Loop inhibiert, was die Kinaseaktivität blockiert und die ABA-Signaltransduktion unterbricht (Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009; Xie et al. 2012; Rodrigues et al. 2013). In Anwesenheit von ABA bildet sich ein ternärer Komplex, bestehend aus ABA, dem RCAR-Rezeptor und einer Proteinphosphatase. Die SnRK2s werden von der PP2C gelöst und durch intramolekulare Autophosphorylierung aktiviert (Vlad et al. 2010; Ng et al. 2011). Als Substrate der Proteinkinasen zählen einerseits Ionenkanäle, andererseits werden im Zellkern Transkriptionsfaktoren wie AREBs und ABFs phosphoryliert und damit aktiviert (Kobayashi et al. 2005; Furihata et al. 2006; Fujita et al. 2009; Sirichandra et al. 2010).

1.5.4. Ionenkanäle

Die stomatären Bewegungen kontrollieren den Ein- und Austritt von Wasserdampf und somit den hydrostatischen Zustand der Pflanze (Lawson and Blatt 2014). Zu den Ionenkanälen, die an der Stomataregulierung beteiligt sind und durch SnRKs reguliert werden, zählen S-Typ Anionenkanäle wie SLAC1 (*slow anion channel-associated 1*) (Geiger et al. 2009; Brandt et al. 2012), K⁺-Ionenkanäle wie KAT1 (Sato et al. 2009) und AKT1 (Xu et al. 2006) sowie R-Typ Anionenkanäle wie QUAC1 (*quick activating anion channel 1*) (Meyer et al. 2010; Imes et al. 2013). SLAC1 und QUAC1 werden durch Phosphorylierung aktiviert, was eine kurzzeitige Membrandepolarisation mit dem Efflux von Cl⁻- und Malat²⁺-Ionen aus den Schließzellen zur Folge hat. Das cytosolische, osmotische Potenzial wird verringert und die Schließzellen schließen sich (Roelfsema et al. 2004). Die Aktivierung von SLAC1, durch Phosphorylierung im N-Terminus, und QUAC1 erfolgt durch die Proteinkinase OST1/SnRK2.6 (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Brandt et al. 2012; Imes et al. 2013). Das Öffnen der Schließzellen wird durch den Influx von K⁺-Ionen verursacht (Kwak et al. 2001; Pilot et al. 2001; Lebaudy et al. 2010). Es wurde außerdem gezeigt, dass die K⁺-Ionenkanäle KAT1 und KAT2 durch OST1/SnRK2.6 inhibiert werden können (Sato et al. 2009).

1.5.5. Transkriptionsfaktoren

Neben der Regulierung von Ionenkanälen können die Proteinkinasen auch Transkriptionsfaktoren regulieren. Die meisten durch ABA induzierbaren Gene besitzen in ihrer Promotorsequenz ein cis-regulatorisches DNA Motiv (*ABA responsive element/ABRE*: ACGTGG/TC) (Busk and Pages 1998). Diese ABREs kontrollieren die Genexpression über *ABA-responsive element binding protein/ ABRE-binding factor* (AREB/ABF) Transkriptionsfaktoren (Yoshida et al. 2010), wobei mehrere ABREs, bzw. die Kombination mit einem *coupling element* (CE) benötigt wird (Shen et al. 1996; Hobo et al. 1999; Narusaka et al. 2003). Sie gehören der 75 Mitglieder großen Familie der *basic region/leucine zipper* (bZIP) Transkriptionsfaktoren an und werden von den SnRK2 Kinasen aktiviert (Jakoby et al. 2002; Kobayashi et al. 2005; Fujii et al. 2009). Neben den bZIP Transkriptionsfaktoren sind unter anderen auch HD-ZIP-, MYB-, bHLH- und B3-Transkriptionsfaktoren an der ABA Signaltransduktion beteiligt (Urao et al. 1993; Abe et al. 1997; Himmelbach et al. 2002; Monke et al. 2004; Nakashima et al. 2006).

1.6. Die Pappel als Modellorganismus

Die Pappeln sind als Baum ein wichtiger Modellorganismus in der Biologie. Pappeln gehören zu den am besten charakterisierten Bäumen in Bereich Genetik, Transkriptomik und Proteomik (Tuskan et al. 2006; Jansson and Douglas 2007). Das Genom von *Populus trichocarpa* wurde 2006 entschlüsselt und die Pappel stellt nicht nur wegen der nahen Verwandtschaft zu *Arabidopsis thaliana* eine gute Modellpflanze dar, sondern erlaubt es mehrjährige Prozesse wie Holzentwicklung zu studieren (Tuskan et al. 2006). Pappeln sind außerdem von großer Bedeutung für die Wirtschaft. Sie dienen als Rohstoff für die Papier- und Biokraftstoff-Produktion (Sannigrahi et al. 2010; Guo 2014). Des Weiteren weisen sie große natürliche Variation auf. In der vorliegenden Arbeit wird mit der Graupappel, *P. canescens*, gearbeitet. Sie ist ein Artbastard der Kombination *P. alba* x *P. tremula* (Abb. 1-8).



Abb. 1-8 Habitus von Schwarz- und Graupappel.

Plantage mit Schwarzpappeln (*P. nigra*) bei Savigliano (Piemont, Italien) und Habitus einer drei Monate alten Graupappel (*P. x canescens*). Foto links von Gail Taylor, University of Southampton.

Die schnellwachsenden Pappeln können für Kurzumtriebsplantagen genutzt werden und alle drei bis fünf Jahre geerntet werden (Aylott et al. 2008). Mit steigender Weltbevölkerung und Klimaerwärmung werden landwirtschaftlich nutzbare Flächen immer geringer, was einen Interessenskonflikt zwischen nahrungsmittelliefernden Anbau und den für die Biokraftstoffproduktion auslöst. Da marginales Land häufig durch Wasserverfügbarkeit limitiert ist, bietet es keine Alternative für die trockenanfälligen und von hohem Wasserverbrauch gekennzeichneten Pappeln (Liang et al. 2006; Street et al. 2006; Viger et al. 2016). Deshalb kommt der Züchtung und Entwicklung von trockenresistenten Pappeln besonderes Augenmerk zu. Da die Kosten für ganze Genomsequenzierungen in den letzten Jahren stark zurückgingen, stiegen die Entwicklungen in molekularen Züchtungstechniken. Es stehen Verbesserungen im Ernteertrag, der Qualität sowie der Trocken- und Krankheitsresistenz im Vordergrund.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Das Phytohormon Abscisinsäure ist an einer Vielzahl an Prozessen beteiligt. Es spielt eine Hauptrolle bei der Anpassung an biotische und abiotische Faktoren und ist im gesamten Pflanzenreich vertreten (Christmann et al. 2006; Lee et al. 2006; Xu et al. 2012). Die Entdeckung der Hormonrezeptoren und die Entschlüsselung der ABA Signalkaskade eröffnete für die Forschung viele Möglichkeiten (Ma et al. 2009; Raghavendra et al. 2010). So wurden mögliche Interaktionen von RCARs und PP2Cs mit unterschiedlichen Methoden identifiziert. Es wurde eine Vielzahl an Kombinationen nachgewiesen, die auch regulatorische Funktion zeigen (Fuchs 2013; Tischer et al. 2017). In dieser Arbeit sollen die ABA Rezeptoren und Ko-Rezeptoren der Pappel identifiziert und charakterisiert werden. Es soll gezeigt werden, inwieweit die ABA Perzeption und die ABA Signalkaskade, in einem mehrjährigen Baum, konserviert sind. Darüber hinaus sollen kombinatorische Möglichkeiten zwischen den RCARs und PP2Cs *in vitro* und *in vivo* analysiert werden. Diese Kombinationen werden im heterologen (Pappel-Arabidopsis), als auch im homologen System untersucht und mögliche Spezifitäten innerhalb der Kombinationen näher analysiert.

Neben Stressreaktionen ist ABA auch hauptverantwortlich für die Regulation des Wasserhaushalts der Pflanze (Christmann et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass durch Überexpression einer Arabidopsis PP2C Mutante in Pappel, die Pflanzen extreme Trockensymptome zeigten und nur unter hoher Luftfeuchte kultiviert werden konnten (Arend et al. 2009). Des Weiteren konnte in Arabidopsis gezeigt werden, dass Überexpression von ABA Rezeptoren die Wassernutzeffizienz steigern kann (Yang et al. 2016). Dieses Potential der ABA Rezeptoren soll auch für die Pappel Proteine untersucht werden. Neben der Analyse von den Pappelproteinen in Arabidopsis sollen auch transgene Pappeln erzeugt werden und diese in Bezug auf die Wassernutzeffizienz analysiert werden.

2. Ergebnisse

2.1. Phylogenetische Analysen

2.1.1. RCAR Homologe in *Populus trichocarpa*

In Arabidopsis sind 14 Mitglieder der Familie der RCARs (*Regulatory Components of ABA Receptors*) bekannt. Die ABA Rezeptoren können anhand ihrer Primärstruktur in drei Unterfamilien eingeteilt werden. In Unterfamilie I ist RCAR1-4, in Unterfamilie II RCAR5-10 und Unterfamilie III beinhaltet RCAR11-13 (Ma et al. 2009). Um im Nachfolgenden zwischen Arabidopsis- und Pappelproteinen unterscheiden zu können wird bei den Pappelproteinen die Abkürzung Pt (*Populus trichocarpa*), bzw. Pc (*Populus canescens*) hinzugefügt.

Für die Identifizierung von potentiellen homologen RCAR Proteinen in *Populus trichocarpa* (Tuskan et al. 2006) wurden die 14 Primärstrukturen der von in Arabidopsis bekannten RCARs verwendet. Die Sequenzen aus „*The Arabidopsis Information Resource*“ (TAIR) wurden gegen das Pappelgenom verglichen. Dies wurde mit Hilfe des Joint Genome Institute (JGI) Phytozome Portals (<http://www.phytozome.net/>) durchgeführt (Goodstein et al. 2012). Für die Identifizierung von Sequenzähnlichkeiten wurde die JGI Gen Annotation v.2 *Populus trichocarpa* genutzt. Bei der Suche wurde ein Erwartungswert von $E = 1 \times e^{-40}$ verwendet, um falsch positive Homologien auszuschließen.

Die erhaltenen Primärsequenzen wurden mit der Software BioEdit vergleichend gruppiert und mit MEGA6 wurde ein phylogenetischer Baum aufgrund des Neighbor-Joining-Algorithmus erstellt (Hall 1999; Tamura et al. 2013). Es wurde das Poisson Modell und paarweise Deletion verwendet und der Bootstrap Test mit 1000 Wiederholungen durchgeführt (Zuckermandl and Pauling 1965; Felsenstein 1985).

Der phylogenetische Baum zeigt die Eingliederung der Pappelproteine in die drei Arabidopsis Unterfamilien (Abb. 2-1). Die Arabidopsis Unterfamilie I besitzt sechs homologe RCARs in *Populus trichocarpa*, Unterfamilie II ist von sechs auf vier reduziert und in Unterfamilie III haben beide Spezies vier RCAR Proteine.

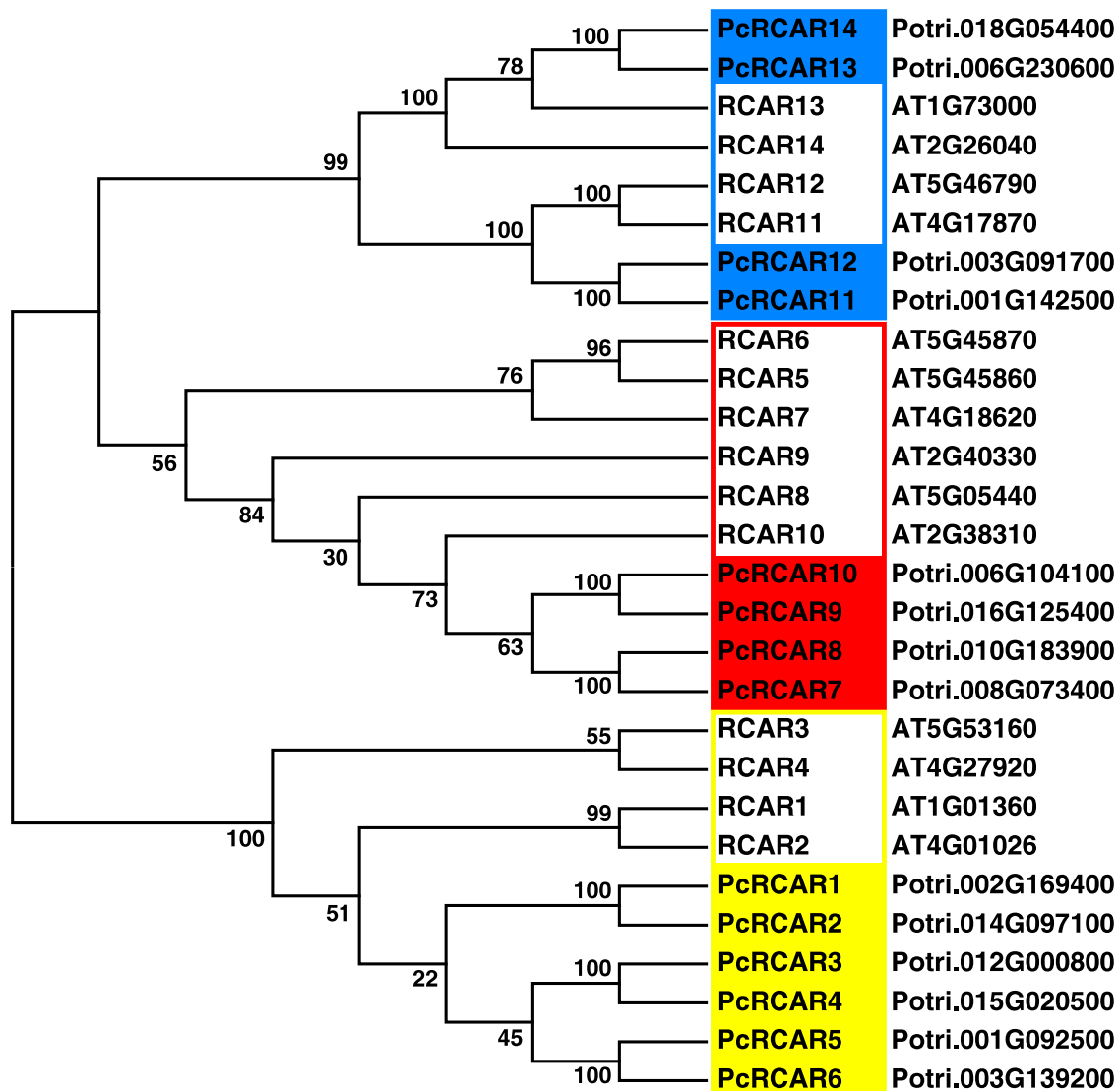


Abb. 2-1 Stammbaum von Arabidopsis und Pappel RCARs.

Phylogenetische Analyse basierend auf dem Neighbor-Joining-Algorithmus von RCARs in Arabidopsis und *P. trichocarpa*. Die RCARs unterteilen sich in drei Unterfamilien. Unterfamilie I ist in gelb, Unterfamilie II in rot und Unterfamilie III in blau dargestellt. Die Pappel RCARs sind in den jeweiligen Farben hinterlegt. Die Gennummer ist neben den Proteinen angegeben. Die Zahlen geben den Anteil der Einzelbäume von 1000 Permutationen in Prozent an, in denen der betreffende Ast enthalten war.

Die potentiellen homologen Pappelproteine teilen sich in den Unterfamilien mit den Arabidopsis RCARs 35 bis 76 Prozent ihrer Aminosäuresequenz (Abb. 2-2). Die Identität und Ähnlichkeit der Aminosäureresten der RCARs variiert innerhalb der jeweiligen Spezies stärker als zwischen den nächsten Homologen von Pappel und Arabidopsis. So sind bei RCAR1 und RCAR13 aus Arabidopsis 35% der Aminosäuren identisch, bei RCAR1 und PtRCAR1 sind es 76%.

	PtRCAR1	PtRCAR2	PtRCAR3	PtRCAR4	PtRCAR5	PtRCAR6	PtRCAR7	PtRCAR8	PtRCAR9	PtRCAR10	PtRCAR11	PtRCAR12	PtRCAR13	PtRCAR14
RCAR1	76	75	70	72	71	71	40	41	38	38	30	39	41	41
	84	84	84	84	84	83	54	54	53	52	41	53	58	57
RCAR2	63	63	59	61	61	61	37	37	35	35	28	34	35	35
	73	73	72	72	73	72	51	52	49	49	37	49	50	49
RCAR3	46	46	51	51	48	49	29	29	26	26	19	25	31	32
	57	57	59	59	61	61	37	37	36	34	27	37	41	40
RCAR4	65	64	68	69	64	65	38	39	35	35	28	38	39	39
	83	83	80	81	82	82	50	50	48	49	38	51	54	53
RCAR5	40	39	37	37	38	38	40	41	38	39	30	38	39	39
	51	50	48	49	49	50	53	53	50	50	37	47	54	53
RCAR6	38	38	35	35	37	37	40	41	38	39	31	39	39	38
	51	51	49	50	51	51	52	53	51	51	38	50	56	55
RCAR7	36	36	31	31	34	34	38	39	35	36	27	33	36	35
	51	51	49	50	50	50	49	50	48	48	34	45	49	47
RCAR8	37	37	37	37	37	38	56	57	52	54	31	38	41	41
	51	51	51	52	50	51	70	70	66	66	41	54	55	54
RCAR9	33	33	34	33	35	42	52	54	53	53	33	35	41	41
	46	46	48	48	46	55	67	68	66	65	44	47	55	55
RCAR10	39	39	39	39	38	39	60	60	64	63	35	44	41	41
	54	55	55	56	54	55	71	71	75	74	43	56	54	55
RCAR11	39	38	39	39	39	39	40	40	39	38	48	61	51	51
	56	55	55	56	54	55	51	53	49	48	53	69	65	64
RCAR12	34	34	33	33	34	33	40	40	40	40	47	61	42	43
	50	50	50	50	49	49	54	54	54	54	57	75	58	58
RCAR13	31	30	31	31	28	30	35	33	35	35	31	41	55	57
	48	48	48	48	47	47	51	50	51	51	46	61	67	69
RCAR14	40	39	39	38	38	38	40	40	42	40	36	45	65	67
	58	58	58	57	55	56	55	55	56	54	45	59	78	77

Abb. 2-2 Matrix der RCAR Sequenzhomologien.

In der Matrix sind für die RCARs von Arabidopsis und Pappel die jeweilige Identität (erste Zeile), bzw. Ähnlichkeit (zweite Zeile) der Aminosäuresequenzen aufgrund der evidenzbasierten Substitutionsmatrix BLOSUM62 (BLOCKS SUBstitution Matrix) in Prozent dargestellt (Henikoff and Henikoff 1992). Am meisten stimmt RCAR1 mit PtRCAR1 überein (76% Identität), am wenigstens RCAR3 und PtRCAR11 (19% Identität).

Der Vergleich von Arabidopsis und Pappel RCARs auf Proteinebene stellt zudem zwei Domänen heraus, die in allen RCARs stark konserviert sind. Es handelt sich um die *GATE* (SerGlyLeuProAla) und *LATCH* (HisArgLeu) Domäne. Diese strukturelle Identität lässt bereits vermuten, dass die 14 identifizierten Pappel RCARs ebenfalls eine Funktion als ABA Rezeptoren besitzen.

Die hohe Konservierung in der Primärstruktur erlaubt es, das Pappel PtRCAR1 auf die 3-dimensionale Struktur von Arabidopsis RCAR1 zu legen. In Abb. 2-3 sind die konservierten Aminosäurereste in rot dargestellt.

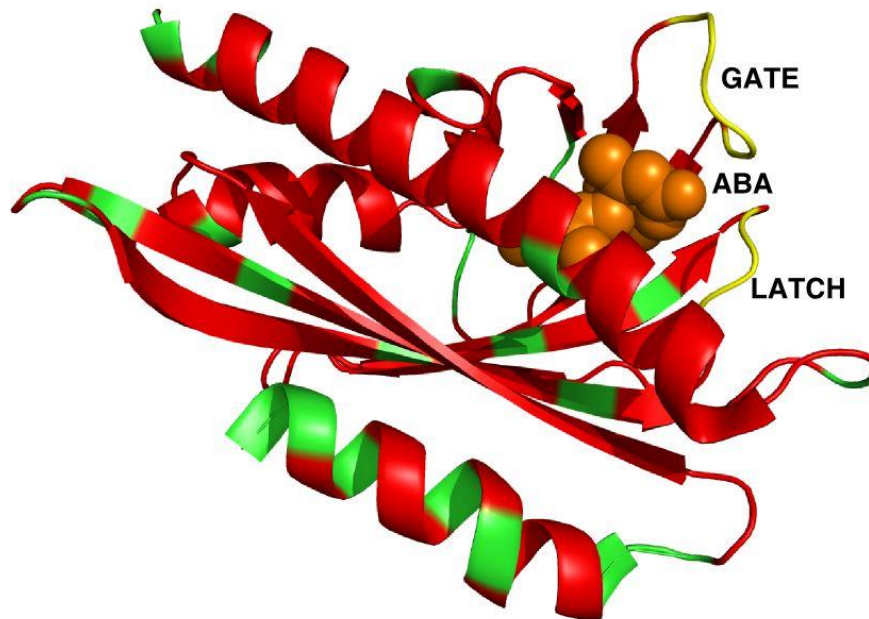


Abb. 2-3 3D-Struktur von RCAR1.

Arabidopsis RCAR1 in grün überlagert mit Pappel PtRCAR1. Die 76% identischen, konservierten Stellen sind in rot gekennzeichnet. ABA ist als Molekül in orange, die *GATE* und *LATCH* Domänen in gelb eingezeichnet. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL, basierend auf dem PDB: 3w9r.

2.1.2. PP2C Homologe in *Populus trichocarpa*

Für die bioinformatische Suche nach Homologen Ko-Rezeptoren wurden ebenfalls die Arabidopsis Proteinsequenzen aus TAIR verwendet. Das Genom von *Populus trichocarpa* weist neun Gene auf, welche für Klasse A Proteinphosphatasen kodieren. Wie in Arabidopsis, werden die Pappelproteinphosphatasen in drei Unterfamilien gegliedert. Unterfamilie I mit ABI1-2 und HAB1-2 ist von vier auf drei PcPP2Cs (PcHAB1-3) reduziert, Unterfamilie II mit AHG1 hat zwei homologe Verwandte (PcAHG1 und PcAHG2) und Unterfamilie III mit PP2CA und HA11-3 besitzt vier homologe PcPP2Cs (Abb. 2-4).

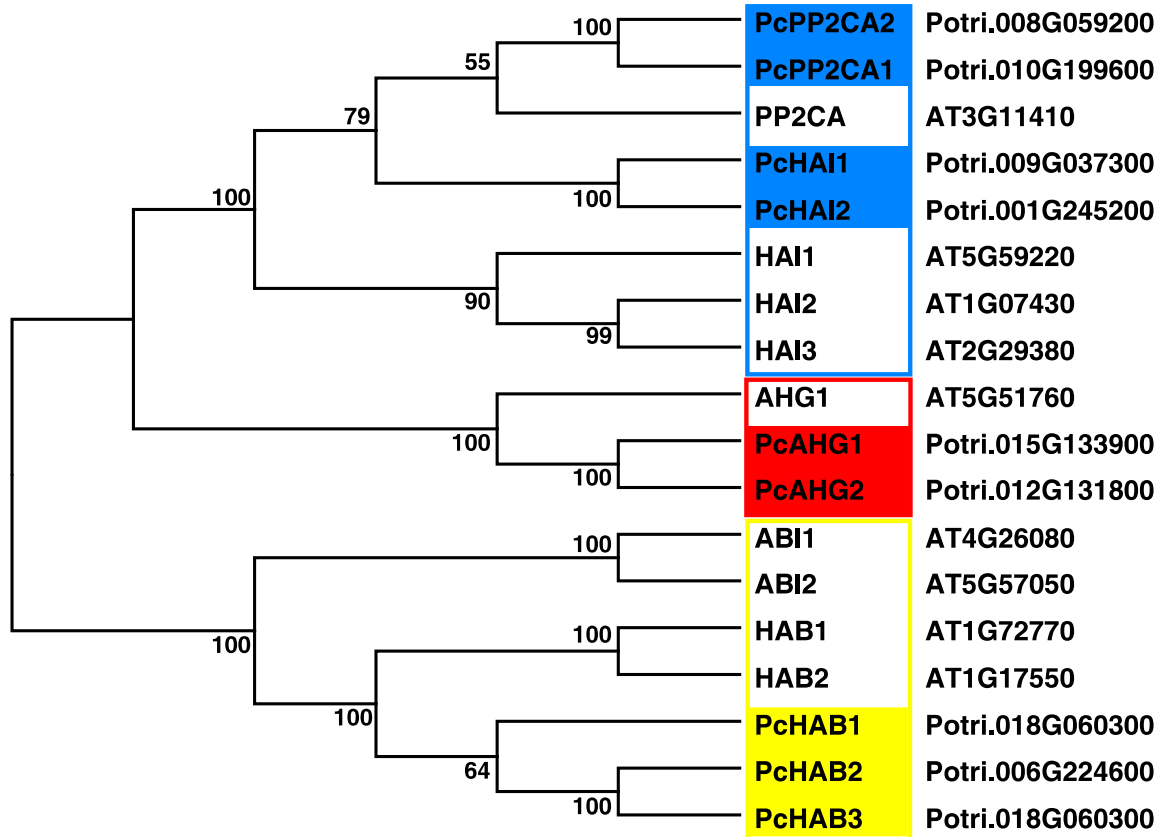


Abb. 2-4 Stammbaum von Arabidopsis ABA-Korezeptoren und Pappel Proteinphosphatasen 2C.

Phylogenetische Analyse basierend auf Neighbor-Joining-Algorithmus von PP2Cs in Arabidopsis und Pappel. Die PP2Cs unterteilen sich in drei Unterfamilien. Unterfamilie I ist in gelb, Unterfamilie II in rot und Unterfamilie III in blau dargestellt. Die Pappel PP2Cs sind in den jeweiligen Farben hinterlegt. Die Gennummer ist neben den Proteinen angegeben. Die Zahlen geben den Anteil der Einzelbäume von 1000 Permutationen in Prozent an, in denen der betreffende Ast enthalten war.

Die Klasse A Proteinphosphatasen von Arabidopsis sind als ABA Ko-Rezeptoren charakterisiert und besitzen einen konservierten Tryptophanrest in der Interaktionsfläche mit ABA (Fuchs et al. 2013). Arabidopsis AHG1 stellt hier die Ausnahme dar, weil das Tryptophan durch Valin ersetzt ist. Ähnlich verhält sich die Situation bei den zwei existierenden Pappelhomologen PtAHG1 und PtAHG2. Auch ihnen fehlt das Tryptophan und ist ebenfalls durch eine hydrophobe Aminosäure ersetzt. In der Pappel ist es nicht Valin sondern Leucin, welches um eine Kohlenstoffgruppe größer ist.

Wie bei den RCARs ist auch bei den Proteinphosphatasen die Variation in der Primärstruktur in den Spezies größer als unter den jeweiligen Arabidopsis-Pappel-Homologen. Zum Beispiel teilt sich Pappel PcHAB1 53% identische Aminosäuren mit Arabidopsis HAB1, während Arabidopsis HAB1 mit Arabidopsis AHG1 nur 30% identische Aminosäure aufweist (Abb. 2-5).

	PtHAB1	PtHAB2	PtHAB3	PtAHG1	PtAHG2	PtHAI1	PtHAI2	PtPP2CA1	PtPP2CA2
ABI1	51	43	42	37	38	38	37	35	35
	64	53	52	52	50	52	49	50	50
ABI2	50	43	43	38	38	38	39	35	35
	65	53	53	51	50	49	50	50	49
HAB1	53	51	50	31	31	31	33	34	31
	67	65	65	43	44	43	46	46	43
HAB2	53	49	49	30	29	32	33	31	32
	67	65	65	43	41	47	47	44	45
AHG1	33	27	28	54	54	40	39	41	41
	47	38	39	66	66	54	54	56	56
HAI1	34	29	29	42	43	54	53	52	52
	50	40	40	55	56	67	66	65	64
HAI2	33	30	30	38	38	55	53	52	52
	49	41	41	51	53	69	66	65	65
HAI3	32	28	27	46	45	50	53	52	53
	46	38	37	57	58	62	63	68	69
PP2CA	35	29	28	43	42	52	50	62	62
	51	42	40	55	56	66	63	73	73

Abb. 2-5 Matrix der PP2C Sequenzhomologien.

In der Matrix sind für die PP2Cs von Arabidopsis und Pappel die jeweilige Identität (erste Zeile), bzw. Ähnlichkeit (zweite Zeile) der Aminosäuresequenzen aufgrund der evidenzbasierten Substitutionsmatrix BLOSUM62 (BLOCKS SUBstitution Matrix) in Prozent dargestellt (Henikoff and Henikoff 1992). Am meisten stimmt PP2CA mit PtPP2CA1 und PtPP2CA2 überein (62% Identität), am wenigstens HAI3 und PchAB3 (27% Identität).

Auch hier kann die Arabidopsis Proteinphosphatase HAB1 mit ihrem homologen Pappelprotein PchAB1 in ihrer 3-dimensionalen Struktur übereinandergelegt werden (Abb. 2-6). Aufgrund der starken Sequenzhomologie liegt die Vermutung nahe, dass die Proteinfunktion der beiden Spezies ähnlich sein könnte.



Abb. 2-6 3D Struktur der PP2C HAB1.

Arabidopsis HAB1 in blau überlagert mit Pappel PchAB1. Die 53% identischen, konservierten Stellen sind in rot gekennzeichnet, die Interaktionsfläche mit den RCARs in gelb umrandet und die zentralen Metallkofaktoren (Kugeln) des aktiven Zentrums in Magenta. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL, basierend auf dem PDB: 3kb3.

2.2. Arabidopsis Reporter in *Populus canescens*

2.2.1. Stabile Transformation der Pappel

Die stabile Transformation der Pappel erfolgte durch Agrobakterien vermittelten Gentransfer, angelehnt an das Protokoll von Leple (Leple et al. 1992). Hierfür wurden die Internodienabschnitte mit Agrobakterien ohne Plasmid, Agrobakterien mit einem Glucuronidase (GUS) -Marker (Leervektor pBI121) und Agrobakterien mit dem gewünschten Konstrukt transformiert. Nach viertägiger Inkubation im Dunkeln und dem

Waschen der Internodien wurden diese auf Platten mit Carbenicillin und Cefotaxime, zur Unterdrückung des erneuten Agrobakterienwachstumes sowie Kanamycin zur Selektion positiv transformierter Internodien transferiert. Die nachfolgende 20-tägige Inkubation im Dunkeln diente zur Etablierung von Kallus. Das Umsetzen auf ein Thidiazuron-haltiges Medium führte zur Sprossinduktion. Nachdem die Sprosse eine Länge von ca. 3 cm – 4 cm erreicht hatten wurden sie abgeschnitten und zur Bewurzelung in Pappel-MS Gläser ohne Antibiotika und Hormone gesetzt (Abb. 2-7). Die jungen Pappeln wurden weiter steril in Gläsern oder in Erde kultiviert.



Abb. 2-7 Regeneration transformierter Pappelinternodien

Während der 20-tägigen Dunkelphase erfolgte die Kallusbildung mit nachfolgender Sprossinduktion der transformierten Pappelinternodien (a). Nach der erfolgreichen Ausbildung eines Sprosses (b) wurden die Pappeln zur Bewurzelung und weiteren Kultivierung in Gläser mit Pappel MS gesetzt (c).

Um die erfolgreiche Transformation zu bestätigen wurde vor der Bestimmung der Genexpressionslevel eine GUS-Färbung durchgeführt.

Für die GUS Färbung wurden die Kalli, oder die jungen Blätter fixiert und gefärbt. Die Auswertung erfolgte nach der Übernachtinkubation in der Färbelösung (Abb. 2-8). Die durchschnittliche Transformationseffizienz der Pappelinternodien lag je nach Konstrukt bei 1 % bis 5 % (n = 50). In der anschließenden Regenerationsphase zeigten ca. 75 % der transformierten Kalli eine Sproßentwicklung und konnten weiter kultiviert werden.

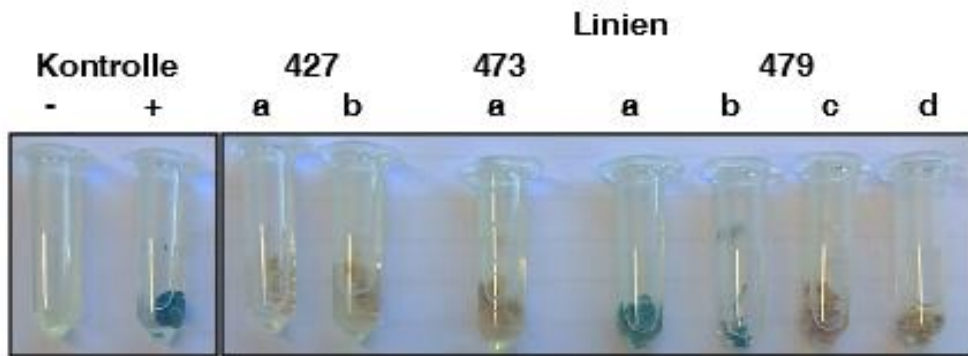


Abb. 2-8 Glucuronidase Färbeanalyse möglicher transformierter Pappelregenerate.

GUS Färbung unterschiedlicher Pappellinien. Die Blaufärbung der Kalli zeigte eine erfolgreiche Transformation. Die Transformationseffizienz der Pappelinternodien lag bei 1 % bis 5 %, die der anschließenden Regeneration etwa 75 %.

2.2.2. Transiente Expression

Für die Analyse der Pappelproteine war zunächst wichtig ein geeignetes Messsystem zu etablieren. Um die potentiellen homologen Proteine der Pappel zu untersuchen wurde zunächst überprüft, ob das Reportersystem, welches am Lehrstuhl für Arabidopsis etabliert ist, ebenso in der Pappel valide ist. Zur Untersuchung von Rezeptorinteraktionen in Arabidopsis Protoplasten hat sich am Lehrstuhl ein Reportersystem bewährt, in welchem die Expression des Enzyms Luciferase an einen ABA induzierten Promotor gekoppelt ist. Läuft die ABA Antwort im Protoplasten ab, werden unter anderem Transkriptionsfaktoren wie ABFs aktiviert. Diese binden an ABREs, welche in ABA induzierbaren Promotoren vorkommen. Somit kommt es zur Expression der Luciferase. Die Luciferaseaktivität kann ausgelesen werden und die Aktivierung oder Inhibierung der ABA Antwort quantitativ bestimmt werden.

Zunächst wurde die Funktionalität unterschiedlicher Promotoren aus Arabidopsis in Pappel untersucht. Hierfür wurde die am Lehrstuhl etablierte Protoplastierung von Arabidopsis für Pappel modifiziert. Es wurden statt 1 % Cellulase 3 % und statt 0,25 % Macerozym 0,8 % verwendet (Guo et al. 2012). Der enzymatische Verdau wurde von 3,5 h auf 4,5 h erhöht.

Die Pappel Protoplasten wurden mit drei unterschiedlichen Promotorkonstrukten transfiziert. Es handelte sich um die Promotoren der Gene „*Responsive to ABA 18*“ (RAB18), „*Homeobox protein 6*“ (HB6) und „*Responsive to desiccation 29B*“ (RD29B).

Die Promotorregionen wurden kloniert und die Luciferase dahinter geschaltet. Diese Konstrukte waren am Lehrstuhl bereits vorhanden. Col-0 Protoplasten wurden mit jeweils 6 µg Reporterkonstrukt transfiziert und mit und ohne 10 µM ABA für 18 h inkubiert.

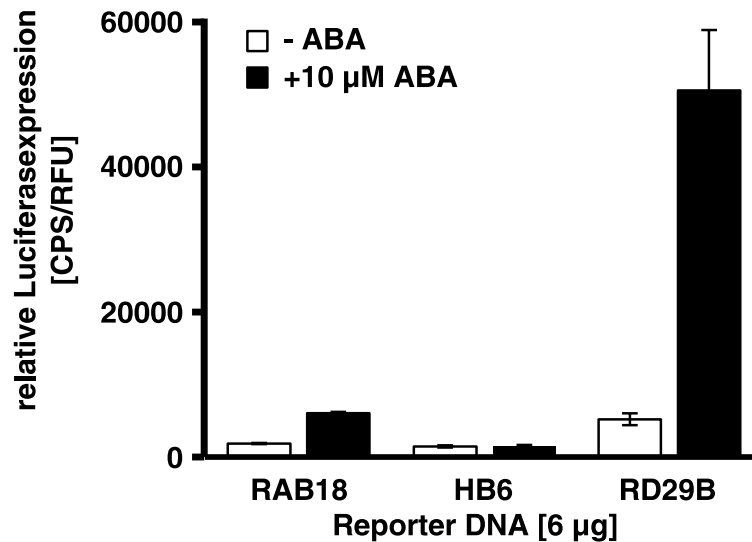


Abb. 2-9 Reporteraktivitäten in Pappel.

Induktion unterschiedlicher ABA induzierbarer Promotoren in *Populus canescens* Protoplasten in Abwesenheit (weiße Balken) und Anwesenheit (schwarze Balken) von 10 µM exogenem ABA. Die Protoplasten wurden jeweils mit 6 µg Reporterkonstrukt transfiziert und für 18 h bei 21°C inkubiert. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW ± SF).

Abb. 2-9 zeigt eine durch ABA verursachte Induktion der Promotorkonstrukte von RAB18 und RD29B. Das *pRAB18* Luciferase Konstrukt besaß eine Induktionsrate durch 10 µM ABA von 3,2 und das *pRD29B::LUC* Konstrukt von 16,2. Das *pHB6* Promotorkonstrukt war nicht durch ABA induzierbar.

Während die Aktivität von der RAB18 induzierten Luciferase ohne exogen appliziertem ABA gleich zu der von HB6 war, war die des Promotorkonstrukts RD29B um das Dreifache höher. Die höhere Luciferaseaktivität ist durch eine erhöhte Proteinmenge und auf eine somit höhere Induktion und Expression der Luciferase zurückzuführen. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl das *pRAB18* und das *pRD29B* Luciferase Konstrukt in der Pappel aktiv und funktional sind.

Da der RAB18 Promotor auch durch Kälte und Osmotika induzierbar ist, wurde entschieden mit dem ABA-spezifischen RD29B Promotorkonstrukt (Christmann et al. 2005) alle nachfolgenden Analysen durchzuführen.

Um die ideale Induktionsrate in der Pappel zu definieren, wurde das Reporterkonstrukt mit unterschiedlichen ABA Konzentrationen induziert (Abb. 2-10). Bis 3 μM ABA war ein linearer Anstieg in der Luciferaseaktivität zu erkennen, welcher dann in eine Plateauphase bis 30 μM ABA überging. Für die nachfolgenden Protoplastenanalysen wurde eine ABA Konzentration von 10 μM , innerhalb der Plateauphase, gewählt.

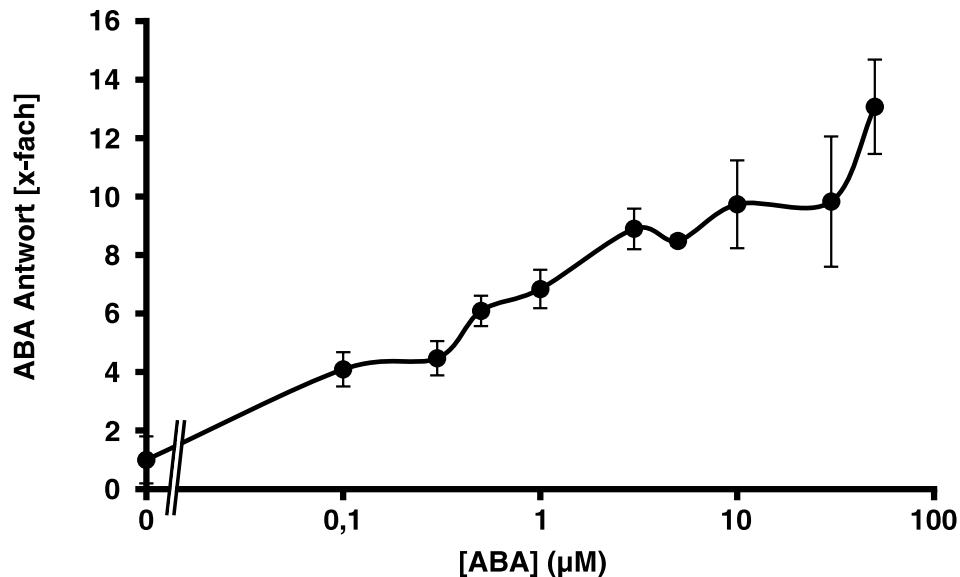


Abb. 2-10 Induktionsraten des *pRD29B* Luciferase Konstrukts in Abhängigkeit von ABA. Protoplasten wurden mit 6 μg des Reporterkonstrukts *pRD29B::LUC* transformiert und für 18 h in Anwesenheit unterschiedlicher ABA Konzentrationen inkubiert. Die Induktion der Luciferase ohne ABA wurde auf 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf normalisiert ($1 \cong 5,5$ kCPS/RFU). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

2.2.3. Transformation und Nachweis von eGFP

Neben der transienten Analyse in Protoplasten wurden auch Pappeln mit dem ABA-induzierbaren Promotor *pRD29B* („*Responsive to dessication*“) aus *Arabidopsis* mit daran konjugiertem GFP transformiert. Positive Transformanten wurden selektiert, in Erde überführt und kultiviert. Blätter von drei unabhängigen adulten Linien wurden nach gründlicher Wässerung abgetrennt und in 50 μM , bzw. 100 μM ABA inkubiert. Die Blätter wurden nach zwei, vier, sechs und acht Stunden mit flüssigem Stickstoff schock gefroren, das Gesamtprotein extrahiert, mit Aceton gefällt und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte der Nachweis von potentiell gebildetem eGFP mittels an Meerrettich Peroxidase konjugiertem anti-GFP. Wie aus Abb. 2-11 hervorgeht, wurde in den Transformationslinien T47b3 und T47b1 das Protein GFP durch den ABA-induzierten Promotor *pRD29B* aus *Arabidopsis* gebildet. Es konnte

gezeigt werden, dass der Arabidopsis Promotor ebenso in Pappel induzierbar ist. Linie 47b3 zeigte eine klare zeitabhängige GFP Produktion. Bei 50 μM ABA stieg die Proteinabundanz mit der Zeit von 3,4-facher Menge für $t = 6$ h bis zur 5,1-fachen Menge für $t = 8$ h deutlich an. Während bei niedriger ABA Konzentration bei zwei und vier Stunden noch keine Induktion erfolgte, war das Protein bei 100 μM nach zwei Stunden bereits um das doppelte induziert. Bei $t = 6$ h wurde das eGFP mit der 6,9-fachen Menge am höchsten exprimiert, während es zwei Stunden später bereits wieder abnahm (5,1-fache Menge). Für die Linie 47b1 ließ sich keine eindeutige Steigerung des GFP Signals mit der Zeit, oder der Erhöhung der ABA-Konzentration erkennen. Deutlich war aber die Induktion in allen Fällen im Vergleich zur unbehandelten Pflanze ($t = 0$ h) um das 4,2 bis 12,5-fache. Bei der dritten untersuchten Linie T46 konnte keine Induktion festgestellt werden, da bereits bei $t = 0$ h ein GFP-Signal vorhanden war. Für die folgende Analyse der RCAR und PP2C Proteine in Pappel konnte somit der *pRD29B* Promotor aus Arabidopsis verwendet werden.

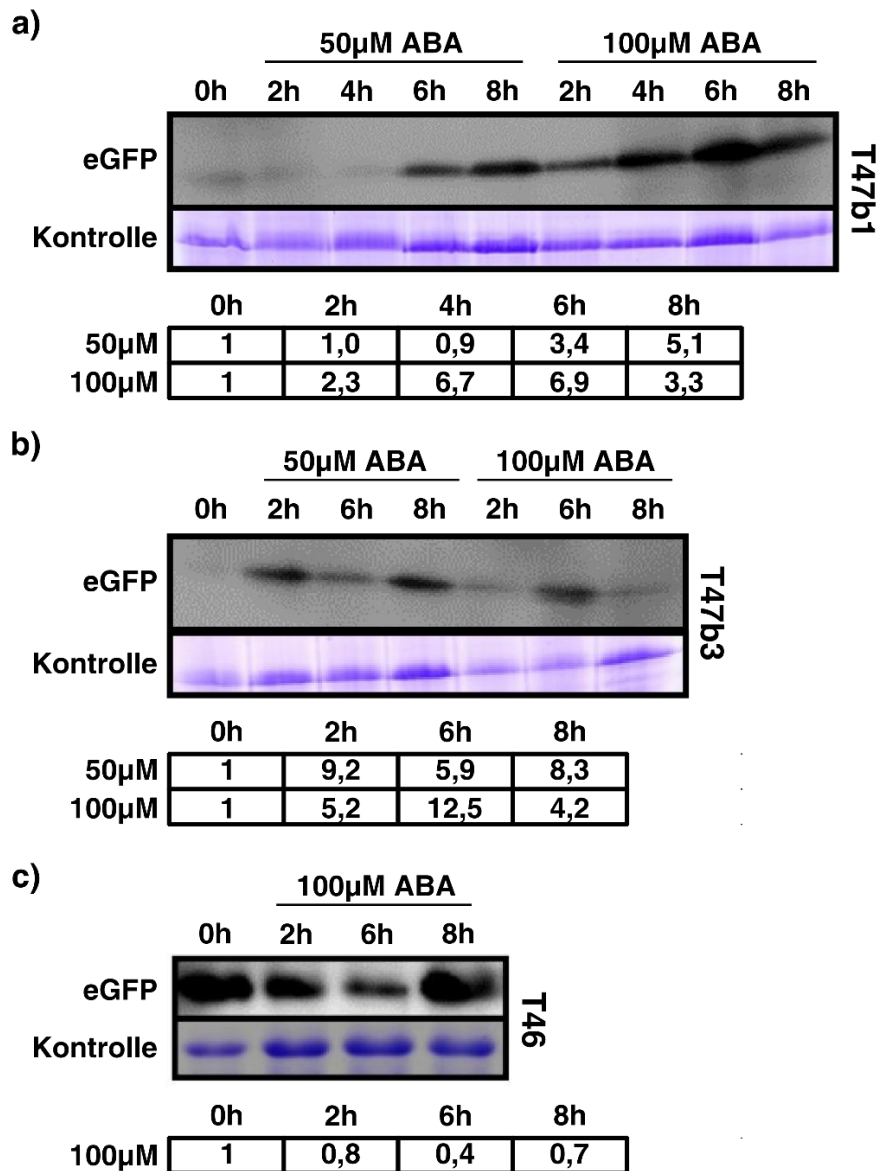


Abb. 2-11 Zeit- und konzentrationsabhängige GFP Induktion.

Abgetrennte Blätter von den transgenen Pappellinien a) T47b1, b) T47b3 und c) T46 (*pRD29B::eGFP*) wurden mit 50 µM, bzw. 100 µM ABA inkubiert. Vor der Auftrennung über ein SDS-Gel erfolgte die Extraktion von Gesamtprotein und eine Acetonfällung. Zellextrakte wurden geblottet und das GFP mittels HRP-konjugiertem anti-GFP Antikörper nachgewiesen. Ein repräsentatives Gel zeigt die Lademengen. Die Induktionsraten für jeden Zeitpunkt und Hormonkonzentration sind in der Tabelle angegeben. Intensitäten wurden mit ImageJ bestimmt und die GFP Menge auf die Rubisco normalisiert.

2.3. Charakterisierung von Pappel RCARs

In Arabidopsis wurde gezeigt, dass die RCARs positive Regulatoren der ABA Signalkaskade sind und die ABA Antwort induzieren (Fujii et al. 2009; Ma et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010; Fuchs et al. 2014; Tischer et al. 2017). Durch die hohe Konservierung von Pappel und Arabidopsis RCARs liegt die Vermutung nahe, dass auch Pappel RCARs dazu in der Lage sind die ABA Antwort zu initiieren bzw. zu verstärken. Für diese Analysen wurden Konstrukte generiert, bei denen die jeweiligen Pappel RCARs unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors *p35S* sind (Odell et al. 1985; Benfey and Chua 1990). Die Konstrukte wurden in Pappel Protoplasten transient exprimiert und die Luciferaseaktivität nach 16 h Inkubation gemessen.

Wie aus Abb. 2-12 hervorgeht, wurde durch jedes der getesteten Pappel RCARs die ABA Antwort stimuliert. In Abwesenheit des Hormons reichte die Aktivierung von zehnfach für PcRCAR2 und PcRCAR7 bis zum 25-fachen für PcRCAR4. PcRCAR1 und PcRCAR13 zeigten, ähnlich wie PcRCAR4, eine starke Induktion der ABA Antwort. Die restlichen getesteten PcRCARs lagen zwischen 10- und 15-fach. In Gegensatz zu Arabidopsis ließ sich keine unterschiedliche Tendenz der Initiierung der ABA Antwort in den einzelnen Subfamilien erkennen.

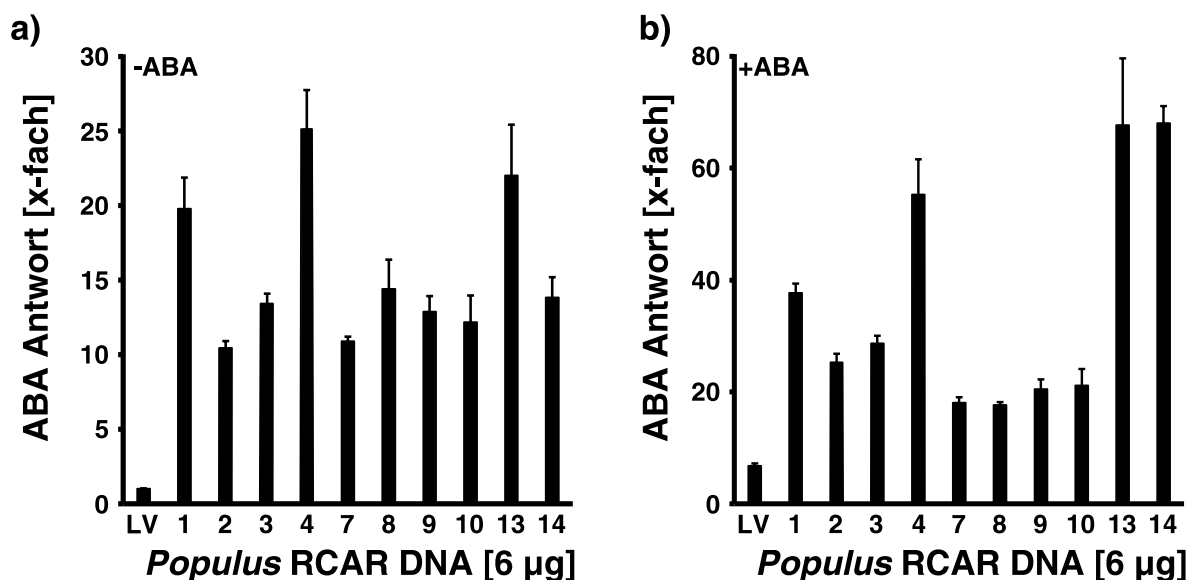


Abb. 2-12 Induktion der ABA Antwort durch PcRCARs.

Ektopische Expression von Pappel RCARs in Pappel Protoplasten a) ohne und b) mit 10 μ M exogenen ABA. Die Protoplasten wurden mit 6 μ g Effektor transfiziert und für 18 h bei 21°C inkubiert. Der Leervektor (LV) ohne ABA wurde auf 1 normalisiert ($1 \pm 14,8$ kCPS/RFU). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

Wurde 10 μM ABA zum System gegeben, resultierte dies in einer Steigerung der Induktion der ABA Antwort für alle RCARs. Die Aktivität der Luciferase wurde hierbei um etwa das doppelte erhöht. PcRCAR13 hingegen induzierte um das 3,5-fache im Vergleich zur Kontrolle ohne ABA, PcRCAR14 sogar um das 4,5-fache. Wie in Arabidopsis gezeigt wurde, wirken RCARs der dritten Unterfamilie als Dimere und brauchen höhere ABA Konzentrationen um aktivierend zu wirken (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b; Zhang et al. 2012; Tischer et al. 2017). Die bereits hohe Induktion der PcRCARs ohne exogen appliziertes ABA kann entweder durch eine höhere Sensitivität der Pappel RCARs gegenüber ABA verursacht werden oder durch eine eventuell von Grund auf höhere Konzentration von ABA in Pappel Protoplasten. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zum einen Arabidopsis RCARs in Pappel Protoplasten exprimiert (Abb. 2-13a+b) und zum anderen die homologen Pappel RCARs in Arabidopsis Protoplasten (Abb. 2-13c+d). Darüber hinaus wurden die Pappel RCARs in Arabidopsis *aba2-1* Protoplasten, in denen der endogene ABA-Gehalt erniedrigt ist, getestet (Abb. 2-14) und der Abscisinsäuregehalt in den Pappelprotoplasten bestimmt (Abb. 2-15).

Arabidopsis RCAR9 und RCAR13 konnten mit dem endogenen Hormonlevel der Pappelprotoplasten die ABA Antwort nicht, bzw. nur sehr gering beeinflussen (Abb. 2-13a). RCAR1 hingegen induzierte die Luciferase bei 6 μg um das 25-fache im Vergleich zum Leervektor (LV). In Gegenwart von 10 μM ABA waren alle Arabidopsis RCARs in der Lage die ABA Antwort Dosis-abhängig zu stimulieren (Abb. 2-13b). Auch hier war die ABA Antwort durch RCAR1 am höchsten induzierbar (50-fach bei 6 μg).

Wurden die potentiellen ABA Rezeptoren der Pappel in Arabidopsis Protoplasten exprimiert, war zu erkennen, dass bereits mit dem endogenen ABA-Gehalt eine starke Induktion der ABA Antwort zu Grunde lag (Abb. 2-13c). Die getesteten Pappel RCARs PcRCAR4, PcRCAR9 und PcRCAR13 induzierten das System bis zum 100-, bzw. 140-fachen, bezogen auf den Leervektor. Auch hier war der Effekt Dosis-abhängig. Wurden die Protoplasten in Anwesenheit von 10 μM ABA inkubiert war für PcRCAR13 eine weitere Induktion auf das 600-fache erkennbar (Abb. 2-13d). Dieser Effekt wurde bereits in den Pappel Protoplasten beobachtet (Abb. 2-12). Bei PcRCAR4 hatte das exogen applizierte ABA eine geringere additive Wirkung, bei PcRCAR9 kam es zu keiner weiteren Steigerung der ABA Antwort.

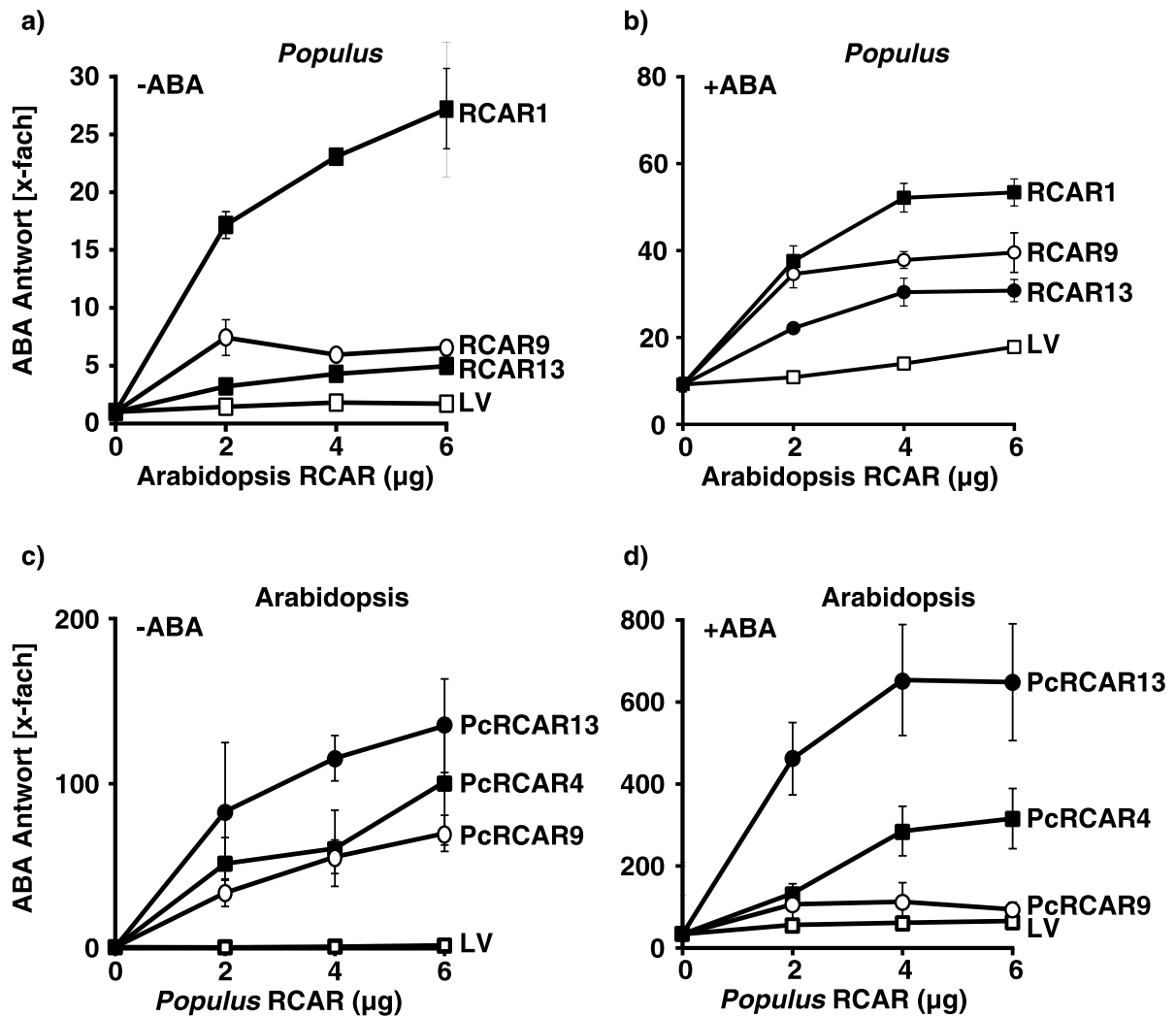


Abb. 2-13 Heterologe Expression von RCARs.

a+b) Aktivierung der ABA Induktion mittels Arabidopsis RCARs in Pappel Protoplasten in a) Abwesenheit und b) Anwesenheit von 10 µM ABA ($1 \pm 3,9$ kCPS/RFU). c+d) ABA Antwort in Arabidopsis Protoplasten durch transiente Expression von Pappel RCARs c) ohne und d) mit 10 µM ABA ($1 \pm 9,1$ kCPS/RFU). Protoplasten wurden mit unterschiedlichen Mengen an Effektor DNA transfiziert und für 18 h bei 21°C in Abwesenheit und Gegenwart von 10 µM ABA inkubiert. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

Die Analysen in *aba2-1* Protoplasten zeigten die ABA Abhängigkeit der Pappel ABA Rezeptoren. Ohne exogen appliziertes ABA war die Induktion der ABA Antwort bei bereits ca. 80-fach (Abb. 2-14). PcRCAR7 und die zwei Vertreter der Unterfamilie III (PcRCAR13 und PcRCAR14) konnten die ABA Antwort ohne ABA nicht stimulieren. Jedes getestete Pappel RCAR, außer PcRCAR9, zeigte eine Induktion der ABA Antwort durch Zugabe von ABA. PcRCAR9, das schon ohne exogenes ABA um 200-fach

induzierte, ließ sich nicht mehr steigern. PcRCAR13 und PcRCAR14 waren die Ausnahmen, die eine durchschnittlich um sechsfach höhere Induktion nach ABA-Applikation zeigten.

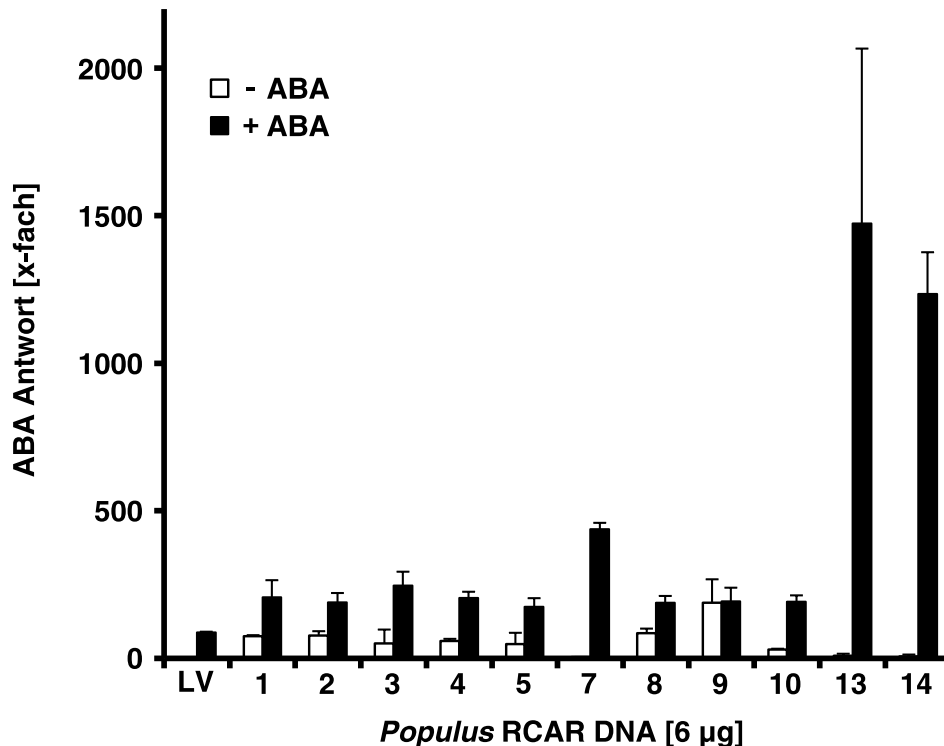


Abb. 2-14 Induktion der ABA Antwort in *aba2-1* Protoplasten durch PcRCARs.

Ektopische Expression von Pappel RCARs in Arabidopsis *aba2-1* Protoplasten ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) 10 µM exogenem ABA. Die Protoplasten wurden mit 5 µg Effektor transfiziert und für 18 h bei 21°C inkubiert. Der Leervektor (LV) ohne ABA wurde auf 1 normalisiert ($1 \pm 3,8$ kCPS/RFU). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

Bereits durch diese Tests konnte darauf geschlossen werden, dass nicht eine möglicherweise erhöhte ABA Grundkonzentration in Pappelprotoplasten an der erhöhten Induktion ohne exogen appliziertes ABA verantwortlich war, sondern die erhöhte Sensitivität der Pappel RCARs.

Die Messung des ABA Gehalts in Protoplasten wurde von Frau Dr. Tischer (Lehrstuhlmitarbeiterin) durchgeführt. Hierfür wurde eine Methanol-/ Essigsäureextraktion durchgeführt und der Abscisinsäuregehalt anschließend mittels LCMS analysiert. In den Pappel Protoplasten lag kein erhöhtes Hormonlevel vor. Während für Arabidopsis Protoplasten ein ABA-Level von 121,81 ng pro Gramm Protoplasten ermittelt wurde, war das der Pappel um fast die Hälfte auf 70,20 ng ABA pro Gramm Protoplasten reduziert. Die Abscisinsäurekonzentration lag bei Arabidopsis Col-0 Protoplasten bei 16,6 nM,

bei Pappelprotoplasten bei 9,3 nM und bei Arabidopsis *aba2-1* Protoplasten bei 1,9 nM (Abb. 2-15).

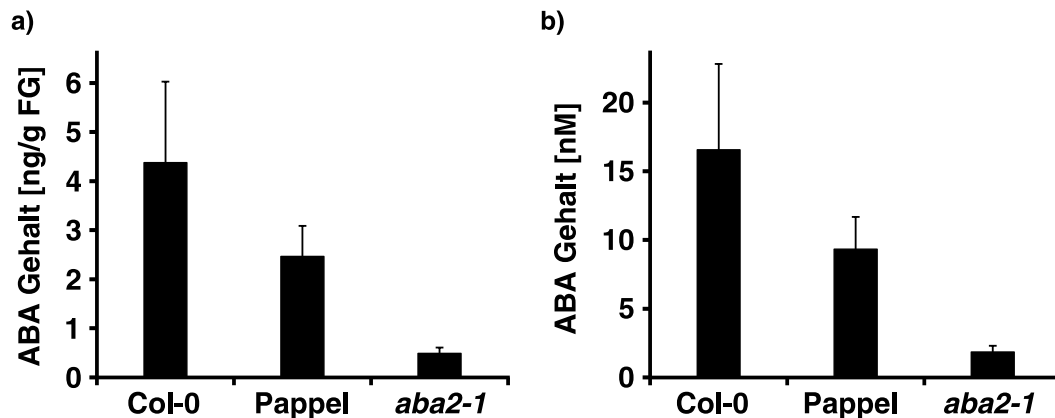


Abb. 2-15 ABA Gehalt in Protoplasten

a) ABA Gehalt pro Frischgewicht in Arabidopsis Ökytyp Columbia-0, Pappel und Arabidopsis *aba2-1* Protoplasten. b) ABA Gehalt pro Protoplast. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus drei Wiederholung dar (MW \pm SF).

Diese Befunde unterstützten die Annahme, dass die Pappel RCARs eine höhere Aktivierungseffizienz besitzen, da sie einerseits sowohl in Pappel, als auch in Arabidopsis Protoplasten bereits ohne exogen appliziertes ABA eine starke Induktion aufwiesen und andererseits keine erhöhte, sondern eine erniedrigte Hormonkonzentration in Pappelprotoplasten im Vergleich zu Arabidopsis Col-0 vorlag. (Abb. 2-13, Abb. 2-14, Abb. 2-15).

2.4. Charakterisierung von Pappel Proteinphosphatasen

Im Gegensatz zu den RCARs als positive Regulatoren der ABA Signalkaskade wirken die Proteinphosphatasen als negative Regulatoren (Umezawa et al. 2009; Fuchs et al. 2013). Die PP2Cs inhibieren die Proteinkinasen, was zur Folge hat, dass Transkriptionsfaktoren nicht mehr aktiviert werden. Diese binden nicht mehr an ABA induzierbaren Promotoren, was zu einem Ausbleiben der Genexpression führt. In Arabidopsis wird die Luciferaseexpression des Reporterkonstrukts mit steigenden PP2C Konzentration zunehmend gehemmt. Um die Regulation der Pappel PP2Cs zu untersuchen wurden die entsprechenden Gene ebenfalls unter die Kontrolle des Promotors *p35S* kloniert. Die Konstrukte wurden in Pappel Protoplasten exprimiert und die Luciferaseaktivität gemessen.

Für die vier getesteten Pappel Proteinphosphatasen PcPP2CA1, PcPP2CA2, PcHAI2 und PcAHG2 konnte eine deutliche Inhibierung der Luciferaseaktivität und somit eine Hemmung der ABA Antwort nachgewiesen werden. Auffallend war, dass sich die Pappelproteinphosphatasen in ihrer Wirksamkeit nur gering unterschieden. Bereits mit 0,25 µg Effektor DNA war die ABA Antwort um 40 % blockiert. PcHAI2 hemmte die ABA Antwort in dieser Konzentration sogar um 60 %. Wurde die Effektormenge weiter erhöht, war die ABA Antwort bei 1 µg mit etwa 80 % maximal gehemmt und eine weitere Erhöhung erfolgte nur noch in der langsamen Reduktion der ABA Antwort. Bei 5 µg Effektor DNA inhibierten alle Pappelproteinphosphatasen zu 90 % (Abb. 2-16a). Es wurden ebenfalls alle neun Arabidopsis PP2Cs auf ihre Funktionalität in Pappel Protoplasten untersucht. Hierfür wurden die Pappel Protoplasten mit jeweils 1 µg der entsprechenden *p35S::PP2C* Konstrukte transfiziert. Während die Pappel PP2Cs bei 5 µg die ABA Antwort auf 10% reduzierten, war dies bei den Arabidopsis PP2Cs bereits bei geringerer Effektor DNA (1 µg) möglich. Während HAI1 und PP2CA die Signalkaskade um 60 %, bzw. 70 % inhibierten, reduzierten die restlichen PP2Cs ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, HAI3 und AHG1 die ABA Antwort um ca. 80 % (Abb. 2-16b). Die Inhibierung durch Arabidopsis PP2Cs in Pappel war vergleichsweise effektiver. Es zeigte sich, dass durch die hohe Konservierung dieser Proteine eine ähnliche, negative Regulation in der Signalkaskade ausgeübt wurde.

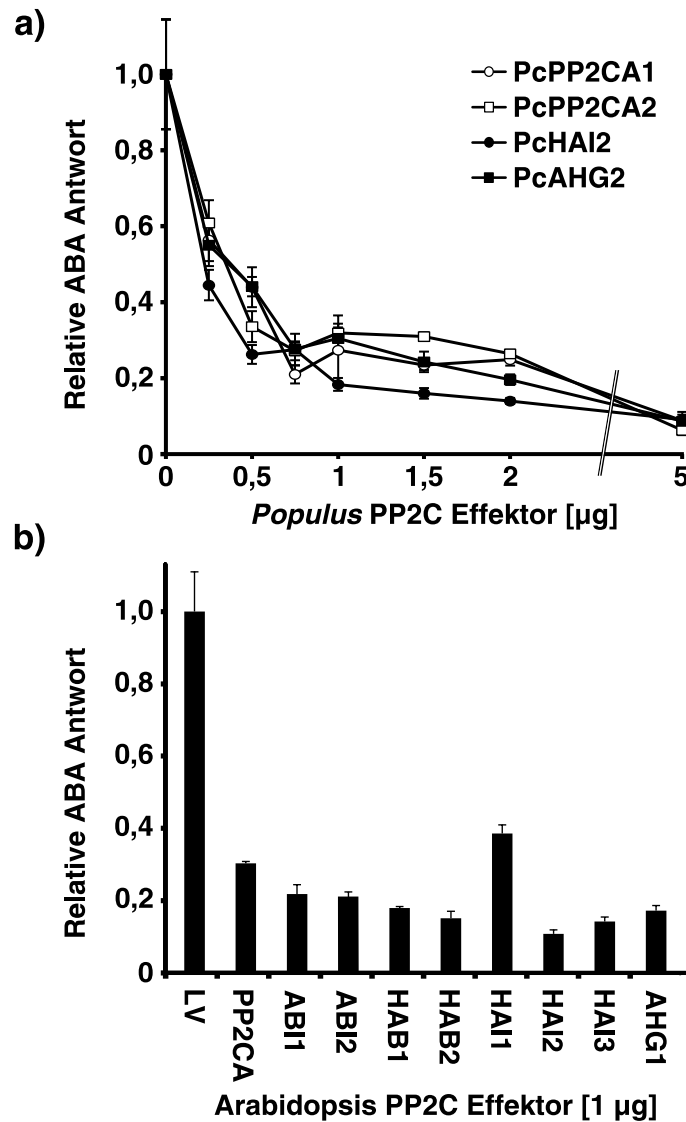


Abb. 2-16 Regulation der ABA Antwort durch PP2Cs.

a) Inhibierung der ABA Antwort durch steigende Konzentrationen verschiedener Pappel PP2Cs in Pappel Protoplasten in Gegenwart von 10 µM exogenem ABA ($1 \pm 2,7$ kCPS/RFU).
 b) Hemmung der ABA Signalkaskade in Pappel Protoplasten durch Arabidopsis PP2Cs. Der Leervektor (LV) in Gegenwart von 10 µM ABA wurde auf 1 gesetzt ($1 \pm 18,8$ kCPS/RFU). Protoplasten wurden mit unterschiedlichen Mengen an PP2C Effektor DNA transfiziert und für 18 h bei 21°C in Anwesenheit von 10 µM ABA inkubiert. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

2.5. Speziesübergreifende Rezeptorinteraktionen

Die bisherigen Analysen zeigten nicht nur eine hohe strukturelle Konservierung von ABA Rezeptoren und Ko-Rezeptoren, sondern auch eine funktionale Konservierung der Proteine zwischen den Spezies *Arabidopsis* und *Populus*. Wenn Komponenten der *Arabidopsis* ABA Signalkaskade in Pappel aktiv sind und umgekehrt, so müssen Pappel RCARs auch in der Lage sein, *Arabidopsis* PP2Cs zu regulieren. Um dies zu überprüfen, wurden die entsprechenden Proteine zunächst in einem Hefe-zwei-Hybrid-System Versuch analysiert (Fields et al. 1993).

Hierfür wurden die Protein kodierenden Sequenzen in die Vektoren pGAD424 und pBridge eines Galaktose Metabolismus 4 (GAL4) Transkriptionsfaktor basierenden 2-Hybrid Systems kloniert (Bai and Elledge 1996). Die generierten Konstrukte enkodieren die GAL4 Transkriptionsfaktor Aktivierungsdomäne (AD) mit den *Arabidopsis* Phosphatasen (pGAD), bzw. die GAL4 Transkriptionsfaktor DNA Bindedomäne (BD) mit den Pappel RCARs (pBridge). Plasmid DNA aus Bakterien wurde sequenziert und die AD- und BD-Konstrukte wurden schließlich in den Hefestamm AH109 transformiert (James et al. 1996). Doppeltransformationen wurden auf die Reporteraktivierung untersucht. Die Selektion der positiv transformierten Zellen erfolgte mittels Leu und Trp Autotrophiegenen, welche auf den Plasmiden pGAD und pBridge kodiert sind. Wenn die zu testenden Proteine miteinander interagieren, wird ein funktionaler GAL4 Transkriptionsfaktor exprimiert, welcher Reportergene aktiviert (Gietz et al. 1997). Die Induktion des Reportergens Histidin (HIS), das für die Histidinsynthese benötigt wird, erlaubt den Zellen auf Medium ohne Histidin zu wachsen. Kombinationen, die nicht interagieren, können auf dreifach Selektionsmedium (-L/ -W/ -H) nicht wachsen. Da ABA einen stabilisierenden Effekt auf manche RCAR-PP2C Kombinationen hat, wurde das Experiment mit und ohne Hormonzusatz im Medium durchgeführt (Park et al. 2009). Es wurden die elf Pappel RCAR-BD Konstrukte gegen die neun *Arabidopsis* PP2C-AD Konstrukte getestet.

Abb. 2-17 zeigt die Interaktionen von den Pappel RCARs mit den *Arabidopsis* PP2Cs. Die Phosphatasen HAB2 und HAI1 zeigten mit keinem der getesteten PcRCARs eine Interaktion. Die restlichen PP2Cs, ausgenommen AHG1, konnten mit allen PcRCARs interagieren, wenn auch nur in Anwesenheit von 30 μ M ABA. Die ABA abhängige Interaktion war vor allem in Unterfamilie III (PcRCAR13 und PcRCAR14) ausgeprägt, da sie mit den Phosphatasen ausschließlich in Gegenwart des Hormons interagierten. Die

Hypothese, dass RCARs der dritten Unterfamilie als Dimere agieren und eine höhere ABA Konzentration benötigen, konnte auch hier für die Pappel RCARs bestätigt werden (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b; Zhang et al. 2012). Andere PcRCARs, wie PcRCAR5, PcRCAR7, PcRCAR8, PcRCAR9 und PcRCAR10 konnten teilweise mit, aber auch ohne ABA mit entsprechenden PP2Cs interagieren. Im Gegensatz zu Unterfamilie III interagierten die Rezeptoren der Unterfamilie I bereits ohne exogen appliziertes ABA mit den PP2Cs. AHG1 stellte eine Ausnahme dar. AHG1 reagierte nur mit vier der elf getesteten PcRCARs und auch nur in Anwesenheit von ABA. Die stabilisierende Wirkung von Abscisinsäure auf den Rezeptor-Ko-Rezeptor Komplex konnte hiermit ebenfalls bestätigt werden (Park et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Rezeptorkomplexe aus Proteinen unterschiedlicher Spezies gebildet werden können und diese physikalisch in Hefe interagieren.

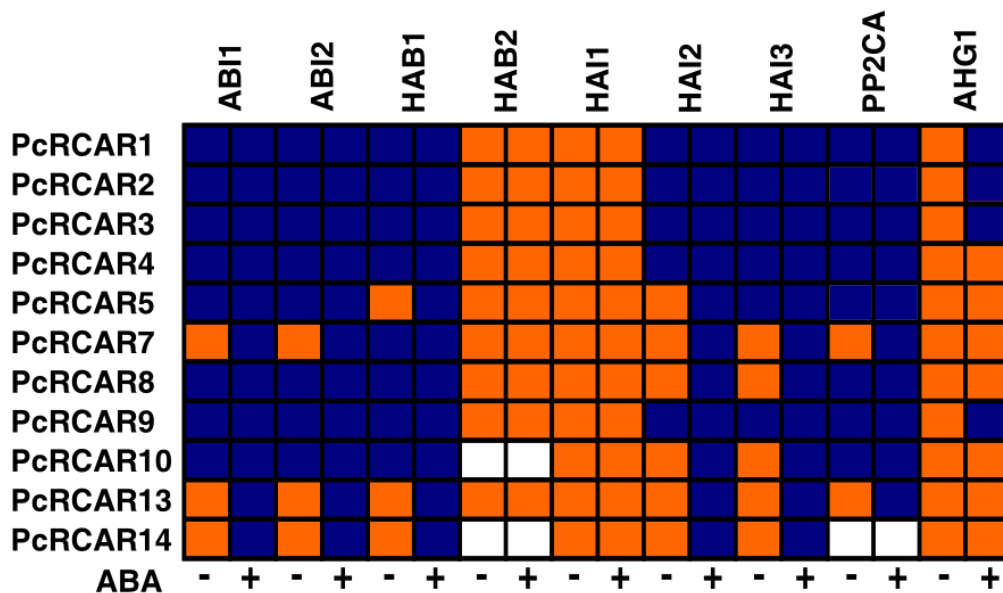


Abb. 2-17 Interaktionen zwischen Pappel RCARs und Arabidopsis PP2Cs.

Pappel PcRCAR-BD Fusionskonstrukte wurden mit Arabidopsis PP2C-AD Fusionskonstrukten zusammen in Hefezellen exprimiert. Interaktionen wurden auf Selektionsmedium ohne Histidin, mit (+ ABA) oder ohne (- ABA) 30 μ M ABA bestimmt (blau = Interaktion, orange = keine Interaktion, weiß = konnte nicht kloniert werden).

Da die Interaktion von Pappel RCARs mit Arabidopsis PP2Cs in Hefe bestätigt wurde stellte sich die Frage, ob die ABA Rezeptoren aus Pappel die artfremden Phosphatasen auch funktional inhibieren können. Hierfür wurden die Protein-kodierenden Sequenzen in die Plasmide pQE30, bzw. pQE70 kloniert. Die Proteine wurden heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über den im Plasmid vorhandenen Hexa-Histidin-Tag. Tabelle 2-1 stellt eine Auflistung der verwendeten Proteine dar. Die Konzentrationsbestimmung von Proteinausbeute pro ml Medium erfolgte über eine optische Konzentrationsabschätzung (Abb. 2-18).

Tabelle 2-1 Konstrukte zur heterologen Expression

Gen	Größe [kDa]	Plasmid	<i>E.coli</i> Stamm	Ausbeute pro 500 ml TB
PcRCAR4	21,1	pQE30	M15	0,9 mg
PcRCAR9	24,4	pQE30	Rosetta pLYS	0,6 mg
PcRCAR13	21,1	pQE30	M15	1,0 mg
PcPP2CA2	43,0	pQE70	Rosetta pLYS	0,25 mg
ABI2	46,3	pQE70	Rosetta pLYS	0,5 mg

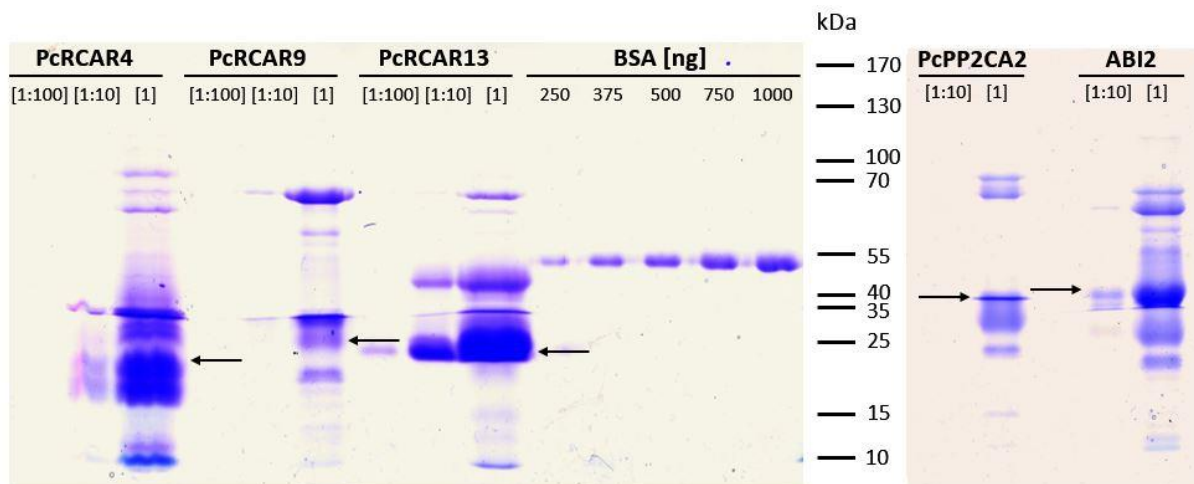


Abb. 2-18 Aufgereinigte Proteine.

Proteinmuster von unterschiedlichen ABA Rezeptorproteinen nach SDS-PAGE und Coomassie-Brillantblau-Färbung. Die Aufreinigung der Pappel ABA Rezeptoren zeigten erwartete Proteinbanden zwischen 20 kDa und 25 kDa, die der Ko-Rezeptoren Banden zwischen 40 kDa und 50 kDa.

Die Inhibierung der Phosphataseaktivität wird durch die Bildung eines ternären Komplexes aus Rezeptor (RCAR), Ko-Rezeptor (PP2C) und dem Hormon (ABA) verursacht. Der ABA Rezeptor verdrängt die Proteinkinasen am aktiven Zentrum der Proteinphosphatase, was durch das RCAR-gebundene ABA stabilisiert wird. Diese Komplexbildung ist bei hohen Hormonkonzentration eine Reaktion erster Ordnung. Die Konzentrationen und Stöchiometrie von RCAR und PP2C beeinflussen somit die Inhibierung und den IC_{50} Wert für ABA (Szostkiewicz et al. 2010; Kepka et al. 2011).

Neben der arteigenen Proteinphosphatase PcPP2CA2 wurde auch die Arabidopsis Proteinphosphatase ABI2 getestet. Die eingesetzte Konzentration beider PP2Cs lag bei ca. 50 nM, die der RCARs um das doppelte. Gemessen wird die Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl-Phosphat (4-MUP) zu 4-Methylumbelliferon (4-MU), welches durch seine Fluoreszenz auf die Umsatzrate der Phosphatase schließen lässt. Durch steigende Konzentrationen an ABA wird mehr Phosphatase im ternären Komplex gebunden, was zu einer Aktivitätsabnahme der Phosphatase und der Reduzierung des Umsatzes an 4-MUP führt.

Die Arabidopsis Proteinphosphatase ABI2 wurde effektiv im sub-mikromolaren Bereich von ABA durch die Pappel PcRCARs inhibiert. Die IC_{50} -Werte reichen von $371 \pm 19,2$ nM für PcRCAR9 und 409 ± 30 nM für PcRCAR13 bis 491 ± 110 nM für PcRCAR4. Die arteigene Pappelproteinphosphatase PcPP2CA2 wurde durch die PcRCARs effizienter gehemmt. Die IC_{50} -Werte liegen hier bei $45 \pm 4,8$ nM für PcRCAR9, $113 \pm 24,5$ nM für PcRCAR4 und $220 \pm 28,2$ nM für PcRCAR13 (Abb. 2-19).

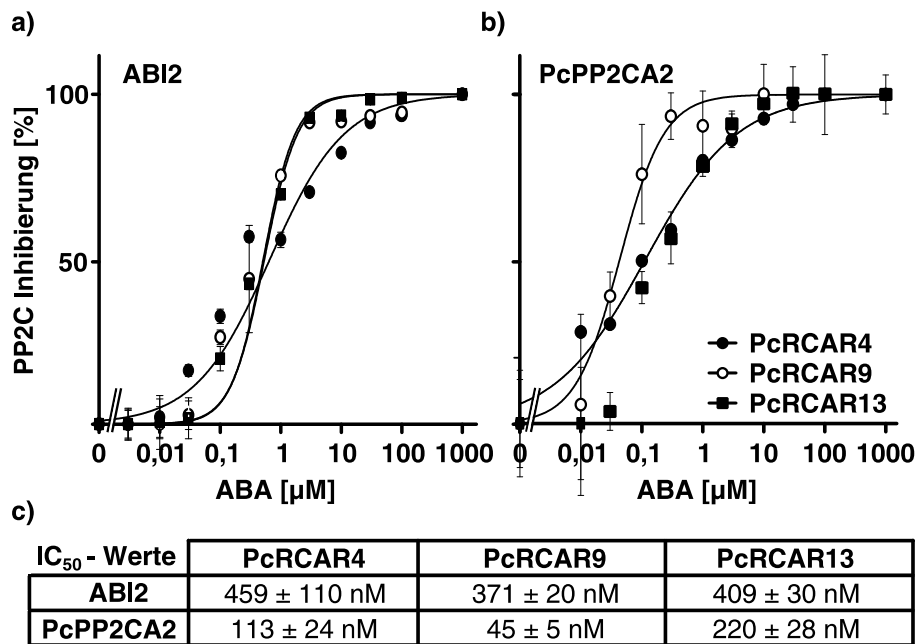


Abb. 2-19 Inhibition der Phosphataseaktivität durch RCARs

Pappel PpRCAR4, PpRCAR9 und PpRCAR13 vermittelte Inhibition von Arabidopsis ABI2 (a) und Pappel PpPP2CA2 (b) in Abhängigkeit von ABA. Die Proteinphosphatasen hatten eine spezifische enzymatische Aktivität von 3 nkat/ mg ABI2 und 2 nkat/ mg PpPP2CA2. Die PP2Cs wurden in einer Konzentration von 50 nM mit doppelten Überschuss von RCARs inkubiert. c) Die IC₅₀ Werte wurden mit der Software Origin ermittelt.

Die *in vitro* Daten konnten die vorhandenen Interaktionen der Proteinrezeptoren von Pappel und Arabidopsis in Hefe bestätigen. Die getesteten Pappel RCARs konnten die Pappel PP2Cs im submikromolaren Bereich regulieren. Durch die hohe Konservierung waren sie ebenfalls dazu in der Lage, nicht nur mit den artfremden Arabidopsis PP2Cs zu interagieren, sondern diese auch zu inhibieren.

2.6. Regulatorische Kombinationen des Holorezeptorkomplexes

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl die Pappel PP2Cs als negative Regulatoren der ABA Signalkaskade dienen, als auch von den Pappel RCARs reguliert werden können. Um dies *in vivo* nachzuweisen, wurde wieder das Protoplastensystem verwendet. Die Protoplasten wurden mit Proteinphosphatasen und RCARs ko-transfiziert. Wenn ein bestimmtes ko-exprimiertes RCAR die Proteinphosphatase reguliert, resultiert dies in einer Aufhebung der inhibierenden Wirkung der PP2C. Die ABA Antwort wird sozusagen wiederhergestellt oder „gerettet“. Die ABA Antwort in Gegenwart von RCAR ohne PP2C Expression fungiert hierbei als Referenzwert.

Pappel und Arabidopsis Protoplasten wurden mit den Proteinphosphatasen PcAHG2, bzw. PcHAI2 transfiziert (Abb. 2-20). Mit zunehmender Konzentration an Phosphatase wurde, wie bereits gezeigt, die ABA Antwort gehemmt. Wurden die Protoplasten zusätzlich mit PcRCAR4 (Abb. 2-20a+c), bzw. PcRCAR13 (Abb. 2-20b+d) ko-transfiziert, wurde die inhibierende Wirkung der Proteinphosphatase aufgehoben bzw. verzögert. Bei 100 ng PcAHG2 Effektor DNA war die ABA Antwort in Pappelprotoplasten auf ca. 60 % Restaktivität inhibiert (Abb. 2-20a). Wurde PcRCAR4 ko-exprimiert, stieg die ABA Antwort um das doppelte des Anfangswertes ohne Phosphatase an, bevor die inhibierende Wirkung der Phosphatase aufgrund steigender Konzentrationen die positive Wirkung des RCARs dominierte. In Arabidopsis Protoplasten kam es zu einer 1,7-fachen Induktion der ABA Antwort durch PcRCAR4 bei 90 % Inhibierung durch PcAHG2 (Abb. 2-20c). Ein vergleichbarer Effekt lag bei der Proteinphosphatase PcHAI2 vor. Die hemmende Wirkung konnte durch PcRCAR13 erfolgreich um das 1,3-fache für Pappel Protoplasten (Abb. 2-20b) bzw. um über das zweifache für Arabidopsis Protoplasten (Abb. 2-20d) aufgehoben werden. Die ABA-Antwort wurde in jedem Fall durch Ko-expression der jeweiligen Phosphatase weiter durch das RCAR stimuliert. Der Pappel Proteinkomplex war also in Pappel und Arabidopsis funktional und beide Proteine mussten spezifisch miteinander interagieren um diese Wirkung zu vermitteln.

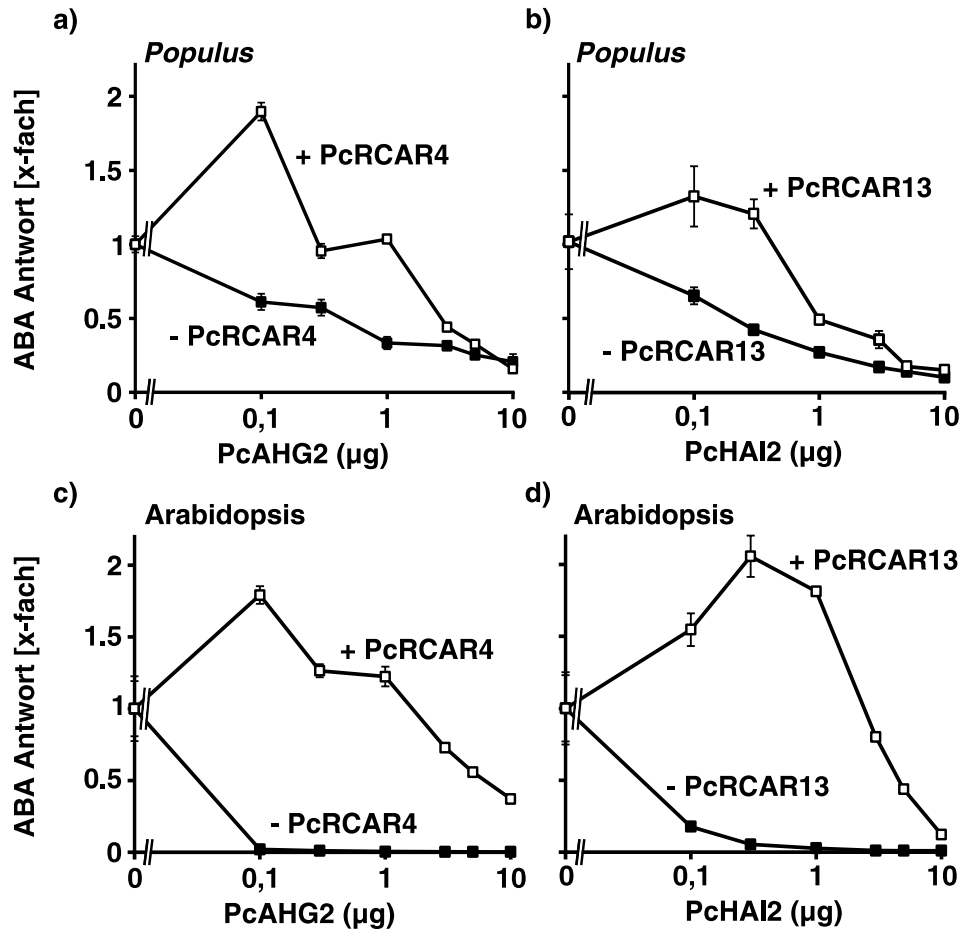


Abb. 2-20 RCAR-abhängige Regulierung von Pappel PP2Cs.

Inhibition der ABA-induzierten Reporterexpression durch ektopische Expression von Pappel PcAHG2 (a + c) und PcHAI2 (b + d) mit und ohne Pappel PcRCAR4 (a + c) und PcRCAR13 (b + d). Die Reporterexpression ohne PcAHG2 war 20,2 kCPS/RFU für Pappel Protoplasten ohne PcRCAR4 und 27,7 kCPS/RFU mit PcRCAR4 für Arabidopsis Protoplasten 975,2 kCPS/RFU und 3685,8 kCPS/RFU. Beide Werte wurden auf 1 gesetzt. Reporterexpression ohne PcHAI2 war für Pappel Protoplasten 43,8 kCPS/RFU ohne PcRCAR13 und 100,7 kCPS/RFU mit PcRCAR13, für Arabidopsis Protoplasten 678,8 kCPS/RFU und 5175,9 kCPS/RFU (MW ± SF).

Es wurde gezeigt, dass die Pappel ABA Rezeptoren sowohl in Pappel, als auch in Arabidopsis Protoplasten ihre Ko-Rezeptoren regulieren können. Im nachfolgenden Versuch wurde gezeigt, dass die Pappel RCARs auch dazu in der Lage sind, die spe-zies-fremden Arabidopsis Ko-Rezeptoren zu regulieren. Hierfür wurde die ABA Antwort in Arabidopsis Protoplasten durch die Proteinphosphatasen ABI1, bzw. PP2CA um 90 % gehemmt. Die Protoplasten wurden mit unterschiedlichen Mengen an Pappel-RCAR DNA ko-transfiziert. Mit zunehmender Menge des RCAR Effektors wurde die ABA Antwort induziert. PcRCAR3 induzierte die ABA Antwort bei 10 μg um das 600-fache für ABI1-gehemmte Protoplasten und um das 170-fache für PP2CA-gehemmte. PcRCAR9 hingegen induzierte die Protoplasten bis über das 1000-fache bei

ABI1 und um über das 500-fache bei PP2CA. PcRCAR4 liegt in beiden Fällen dazwischen.

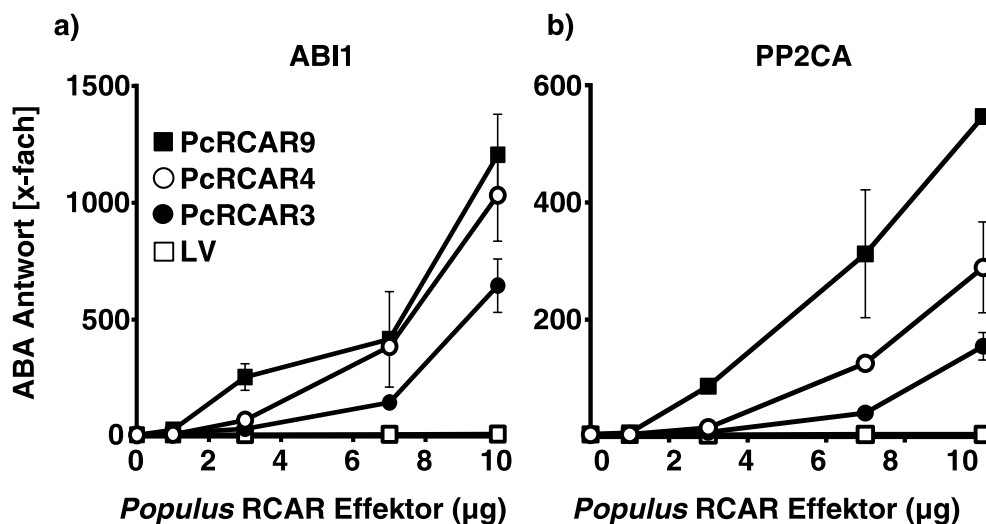


Abb. 2-21 RCAR-abhängige Regulierung von Arabidopsis PP2Cs.

Inhibierung der ABA-induzierten Reporterexpression durch ektopische Expression von a) 0,3 µg Arabidopsis ABI1 und b) 0,3 µg PP2CA auf ca. 10% Restaktivität in Col-0 Protoplasten mit Ko-Transfektion von Pappel PcRCAR3, PcRCAR4 und PcRCAR9. Die Reporterexpression ohne PcRCAR war 72 kCPS/RFU für ABI1 und 51 kCPS/RFU für PP2CA (MW ± SF).

Die Genome von Arabidopsis und Pappel kodieren beide für 14 ABA Rezeptoren und neun Ko-Rezeptoren. Werden die RCARs mit den Proteinphosphatasen kombiniert, ergeben sich insgesamt 126 Möglichkeiten. Um mögliche regulatorische Kombinationen zwischen Pappel RCARs und PP2Cs zu identifizieren, wurde die ABA Antwort durch unterschiedliche PP2Cs in *aba2-1* Protoplasten um ca. 90 % inhibiert und mit 5 µg PcRCAR Effektor ko-transfiziert (Abb. 2-22).

Bei den meisten Proteinphosphatasen konnte die ABA Antwort am stärksten in Abwesenheit von ABA durch PcRCARs der Unterfamilie I (PcRCAR1 - PcRCAR6) induziert werden (Abb. 2-22a). PcPP2CA1 wurde um bis das 150-fache für PcRCAR2, PcPP2CA2 um das 73-fache für PcRCAR3 und PcHAI2 um das 34-fache für PcRCAR2 induziert werden. Die Proteinphosphatase PcHAB1 hatte ein umgekehrtes Muster zur Selektivität der einzelnen Unterfamilien. Die inhibierte ABA Antwort konnte hier am effektivsten durch PcRCAR13 und PcRCAR14, also Mitglieder der Unterfamilie III, um das 131-fache, bzw. 122-fache aktiviert werden. PcAHG2 stellte mit maximaler Induktion, von 28 für PcRCAR1, die am schwächsten induzierbare Phosphatase dar. Deren inhibierende Wirkung konnte durch PcRCAR5, PcRCAR7 und PcRCAR14 nicht aufgehoben werden. Ebenso konnte PcHAI2 ohne das Hormon nicht mit PcRCAR9 und

PcRCAR13 reguliert werden. PcRCAR13 war ebenso nicht in der Lage die ABA Antwort in mit PcPP2CA2 gehemmten Protoplasten wiederherzustellen. PcHAB1 und PcPP2CA1 waren die Proteinphosphatasen, die mit den meisten PcRCARs reagierten, während PcHAI2 und PcAHG2 ohne Hormon nur kaum die ABA Antwort mit den PcRCARs wiederherstellten. Im Vergleich zu PcRCAR5, welches die ABA Antwort durchschnittlich um das 15-fache aktivierte, war PcRCAR8 in der Lage die ABA Antwort um das 78-fache zu aktivieren.

Für den Versuch in Gegenwart von 10 μ M ABA verschob sich die Selektivität hin zu Unterfamilie III (Abb. 2-22b). Bei allen Phosphatasen, bis auf PcAHG2, waren die PcRCARs 13 und 14 die wirksamsten PcRCARs in der Wiederherstellung und Aktivierung der ABA Antwort. Die stärkste Interaktion fand von PcRCAR14 mit PcHAB1 statt. So induzierte diese Kombination das System um das 687-fache. PcPP2CA1 wurde von PcRCAR13 und PcRCAR14 um das 514-fache, bzw. das 587-fache induziert. PcPP2CA2 und PcHAI2 wurden um das 200- bis 400-fache durch die beiden PcRCARs reguliert. Während bei PcPP2CA1 und PcHAB1 die Interaktionsstärke von Unterfamilie III über II zu I stetig abnahm, gab es bei PcPP2CA2 keinen Unterschied zwischen den PcRCARs der Unterfamilie I und II. PcHAI2 wurde nach Unterfamilie III PcRCARs stärker durch die der Unterfamilie I reguliert. PcAHG2, wieder die am wenigsten interagierende Phosphatase, wurde am stärksten durch PcRCARs der Unterfamilie I induziert. Hier aktivierte PcRCAR4 am effektivsten um das 84-fache, PcRCAR10 der Unterfamilie II um das 21-fache und PcRCAR14 lediglich um das 4-fache. Wie auch ohne Hormonzugabe reagierten PcPP2CA1 und PcHAI2 am stärksten mit den PcRCARs. Während PcRCAR8 ohne Hormonzugabe das am effektivsten aktivierende PcRCAR war, war es in Anwesenheit von ABA mit 42-facher Induktion das schwächste. Stärkster Vertreter hier war PcRCAR14 mit einer durchschnittlichen Induktionsrate von 403, gefolgt von PcRCAR13 mit 325 (Abb. 2-22b).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Kombinationen der RCAR-PP2C Regulationen in Pappel sowohl sehr selektiv, als auch sehr flexibel und kompatibel waren. Neben der Interaktion von RCARs und PP2Cs stellte sich ebenfalls die Frage, ob statt ABA als Ligand, die RCARs auch durch andere natürlich vorkommende Liganden induziert werden können. Hierfür wurde das Modellsystem *Marchantia polymorpha* verwendet, da es neben ABA auch Lunularsäure besitzt, was ähnliche physiologische Prozesse wie ABA auslöst.

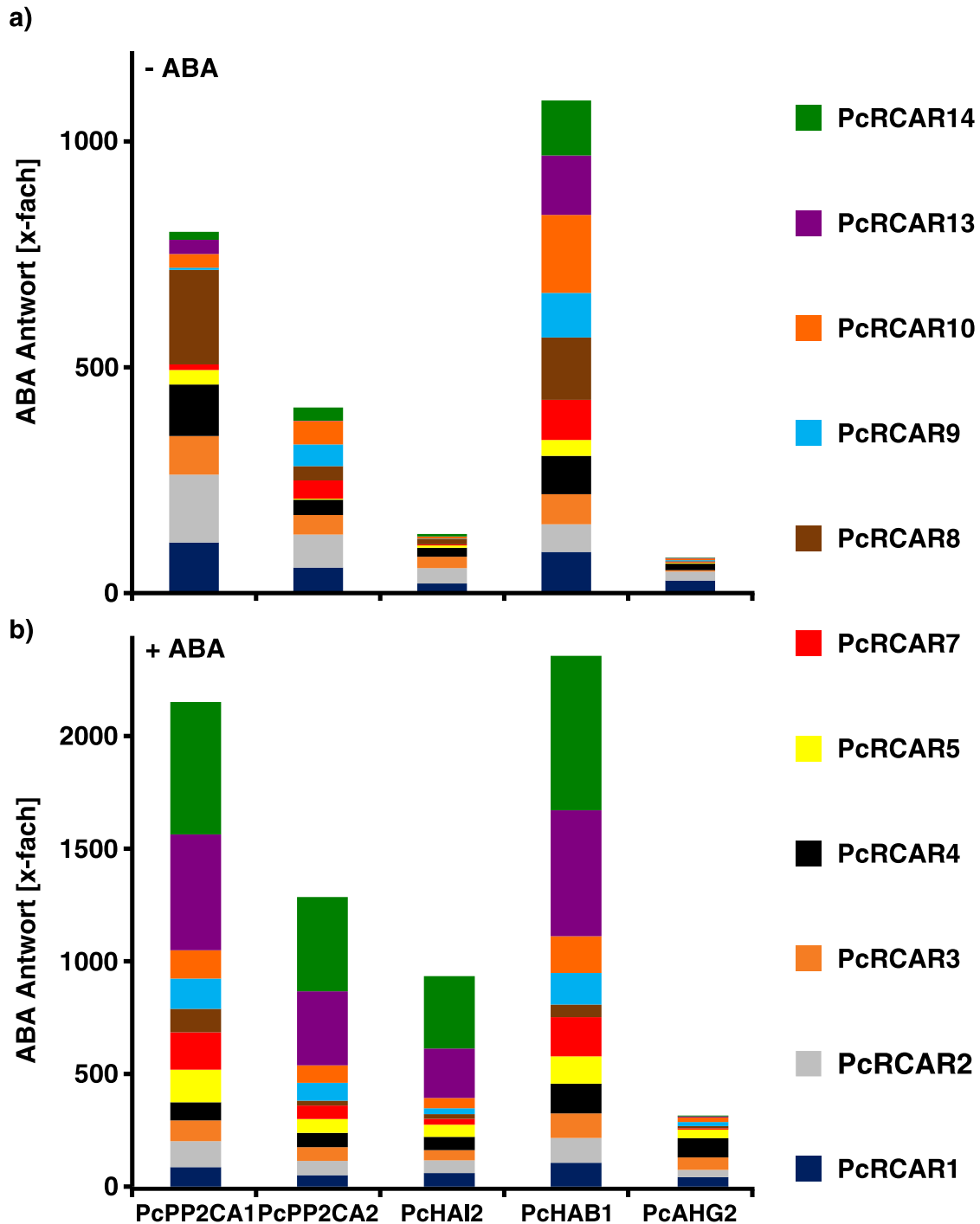


Abb. 2-22 Regulation der ABA Antwort durch unterschiedliche ABA Rezeptor-Ko-Rezeptor Kombinationen.

Die Analyse wurde in a) Abwesenheit und b) Anwesenheit von 10 μM ABA in *aba2-1* Protoplasten durchgeführt. Die ABA Antwort wurde mit unterschiedlichen PcPP2Cs um ca. 90% inhibiert. Die Zellen wurden mit 5 μg Effektor PcRCAR DNA ko-transfiziert. Die Reporterexpression von PP2C mit ko-exprimierten Leervektor wurde auf 1 gesetzt. Induktionsraten von ABA ohne PcRCAR waren 12,1 für PcPP2CA1, 7,8 für PcPP2CA2, 4,3 für PcHAI2, 15,0 für PcHAB1 und 1,8 für PcAHG2.

2.7. ABA Rezeptoren von *Marchantia polymorpha*

Es wurde bisher gezeigt, dass die homologen Pappel RCARs und PP2Cs mit ABA einen Komplex eingehen konnten und die ABA-Antwort auslösten. Im Modellsystem *Marchantia polymorpha* wurden fünf potentielle ABA Rezeptoren und zwei Proteinphosphatasen des Typs 2C identifiziert (Tougane et al. 2010; Bowman et al. 2017). Auch hier sind die wichtigen Aminosäuren der *GATE*- und *LATCH*-Domänen zum Großteil konserviert (Abb. 2-23). MpRCAR5 stellt mit der Abwesenheit der *GATE*-Domäne eine Ausnahme dar. Die *LATCH*-Domäne ist bei MpRCAR2 und MpRCAR3 mit einem Aminosäureaustausch von Histidin nach Asparagin, bzw. Leucin nach Cystein modifiziert. Während die Größe von MpRCAR1, MpRCAR2 und MpRCAR4 mit ca. 200 Aminosäuren den Arabidopsis und Pappel RCARs ähnelt, nimmt auch MpRCAR3 mit verlängertem C-Terminus und 370 Aminosäuren eine Sonderstellung ein.

		<u>GATE</u>		<u>LATCH</u>				
RCAR1	85	VK	SGLPA	TTS	114	GGD	HRL	KNY
MpRCAR1	114	LV	SGLPA	TNS	143	GGG	HRL	KNY
MpRCAR2	102	VQ	TGLPA	TDS	131	GGD	NRL	KNY
MpRCAR3	262	IR	SGLAA	KYS	291	GGE	HRC	RNY
MpRCAR4	102	LQ	TGLPG	IDS	131	GGE	HRL	RNY
MpRCAR5	79	LQPEFPFKCS			108	GGE	HRL	RN-

Abb. 2-23 *GATE* und *LATCH* Domäne bei *Marchantia polymorpha*

Ausschnitt des Proteinalignments von Arabidopsis RCAR1 und *Marchantia* RCAR1-5. Die *GATE* (Aminosäuren SGLPA) und *LATCH* (Aminosäuren HRL) sind farbig gekennzeichnet. Die Zahlen geben die Position der ersten gezeigten Aminosäure im Protein an.

Um zunächst die Funktion der MpRCARs als potentielle ABA Rezeptoren *in vivo* zu testen, wurden die *Marchantia* Proteine in Arabidopsisprotoplasten exprimiert um eine Veränderung der ABA-Antwort zu überprüfen. Hierfür wurden Col-0 Protoplasten mit 3 µg MpRCAR Effektor DNA transfiziert und die ABA Induktion mittels Luciferaseaktivität bestimmt. Es konnte bei den getesteten MpRCAR1 bis MpRCAR4, bis auf MpRCAR3, eine Induktion der ABA Antwort von 150-fach für MpRCAR4 bis 200-fach für MpRCAR1 beobachtet werden (Abb. 2-24). MpRCAR1 war bereits ohne exogen appliziertes ABA um das 100-fache induziert. Die Induktionen der ABA Antwort *in vivo* stehen in Einklang mit der *in vitro* ABA Rezeptor-Funktion der *Marchantia* RCARs (Wunschel 2017).

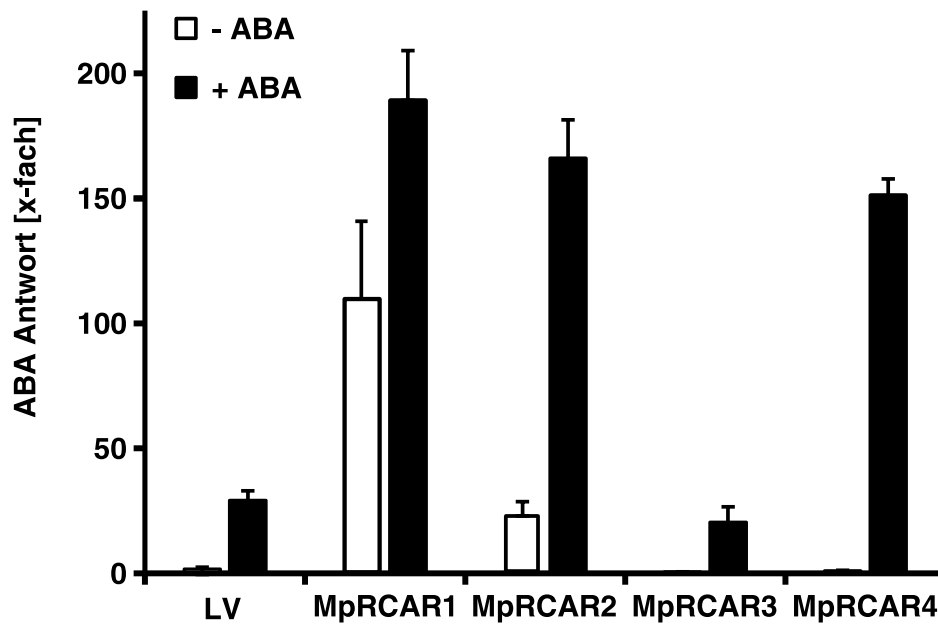


Abb. 2-24 Induktion der ABA Antwort durch *Marchantia* RCARs.

Ektopische Expression von *Marchantia* RCARs in Arabidopsis Col-0 Protoplasten ohne und mit 10 μ M exogenem ABA. Die Protoplasten wurden mit 3 μ g Effektor transfiziert und für 18 h bei 21°C inkubiert. Der Leervektor (LV) ohne ABA wurde auf 1 normalisiert ($1 \pm 2,9$ kCPS/RFU). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

Das Lebermoos *Marchantia polymorpha* besitzt neben Abscisinsäure auch Lunularsäure (LA). Untersuchungen im Lebermoos *Lunaria cruciata* zeigten, dass LA ebenso wie ABA eine Rolle in der Dormanz besitzt. So konnten die Thalli des Lebermooses *Lunaria cruciata* für mehrere Jahre Luft getrocknet konserviert werden, ohne dass das nachfolgende Wachstum beeinträchtigt wurde. Als Signal, welches für die Induktion der Dormanz verantwortlich ist, wurde LA identifiziert (Valio et al. 1969). LA zeigt neben der biologischen Aktivität, ähnlich zu ABA, auch chemische Ähnlichkeiten auf (Abb. 2-25). Im nachfolgenden wurde getestet, ob LA die ABA-Antwort über RCARs induzieren kann. Hierfür wurden Protoplasten zunächst mit Arabidopsis und den *Marchantia* RCARs transfiziert und in Gegenwart von LA inkubiert. Wie aus Abb. 2-25 hervorgeht, hatte LA auf die Induktion der ABA Antwort in Gegenwart von Arabidopsis RCARs keinen positiven Effekt. Bei manchen RCARs wurde die ABA Antwort durch die LA im Vergleich zur Kontrolle inhibiert. Anders war die Lage bei *Marchantia* Rezeptoren. Die ABA Antwort wurde spezifisch durch MpRCAR2 und 50 μ M LA um das 30-fache induziert, während die anderen *Marchantia* RCARs keine Induktion der ABA Antwort mittels LA zeigten.

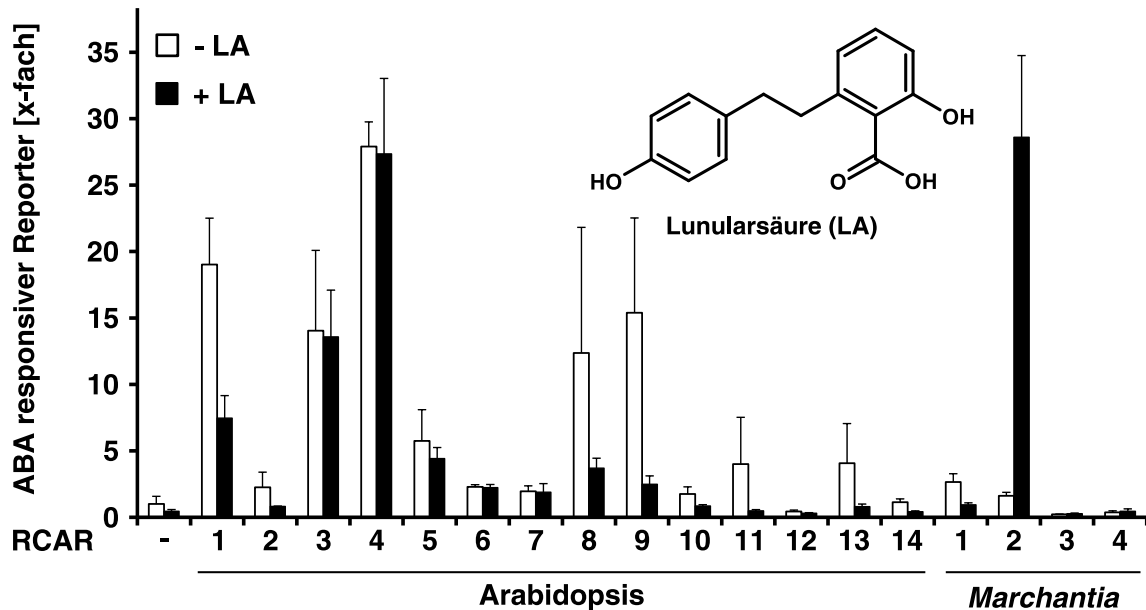


Abb. 2-25 Auswirkungen auf die ABA Antwort durch Lunularsäure und ABA Rezeptorexpression von Arabidopsis und *Marchantia*.

Arabidopsis *aba2-1* Protoplasten wurden mit 1 μ g Arabidopsis, bzw. *Marchantia* RCARs transfiziert. Die Induktion der ABA Antwort wurde nach 18 h in Ab- und Anwesenheit von 50 μ M LA gemessen. Der Leervektor (-) ohne LA wurde auf 1 normalisiert ($1 \pm 4,4$ kCPS/RFU). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

Es stellte sich weiter die Frage, ob das regulatorische Protein MpRCAR2 konzentrations- und ligandenabhängig die ABA Antwort aktiviert. Hierfür wurden Arabidopsis Protoplasten zum einen mit steigender MpRCAR2 Effektormenge transfiziert, zum anderen wurde bei gleichbleibender Effektormenge der Ligand LA titriert. Abb. 2-26 zeigt klar, dass die ABA Antwort durch steigende Effektormengen bei gleichbleibender Konzentration von 50 μ M LA aktiviert wurde. So wurde die ABA Antwort um bis über das 150-fache durch MpRCAR2 in Anwesenheit von LA induziert, bezogen auf die Transfektion ohne MpRCAR2 (Abb. 2-26a). Außerdem lag eine Liganden-abhängige Stimulation der ABA Antwort vor. Bis zu 1 μ M LA konnte keine Induktion der ABA Antwort in *aba2-1* Protoplasten festgestellt werden. Ab 3 μ M LA kam es zur Induktion der ABA Antwort, welche sich ab 10 μ M und einer zwölffachen Induktion, bezogen auf die Transfektion ohne LA, nicht weiter steigern ließ (Abb. 2-26b).

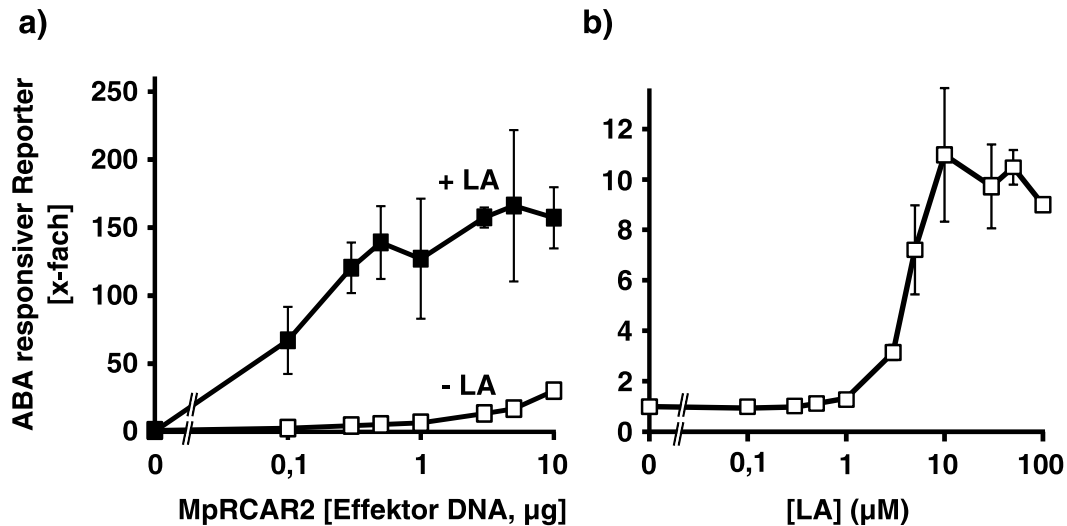


Abb. 2-26 Abhängigkeit der LA-aktivierten ABA Antwort durch MpRCAR2 und LA

(a) Arabidopsis *aba2-1* Protoplasten wurden mit steigender MpRCAR2 Effektormenge in Ab- und Anwesenheit von 50 µM LA transfiziert. (b) Induktion des ABA responsiven Promotors *pRD29B* durch Transfektion von 1 µg MpRCAR2 in Abhängigkeit unterschiedlicher LA Konzentrationen. Inkubiert wurden die Protoplasten für 18 h bei 21°C. Der Transfektionsansatz ohne MpRCAR2 Effektor, bzw. ohne LA wurde auf 1 normalisiert ($1 \pm 5,0$ kCPS/RFU für a und $1 \pm 15,9$ kCPS/RFU für b). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

Da MpRCAR2 neben ABA auch durch LA reguliert wurde, lag die Vermutung nahe, dass auch Proteinphosphatasen durch den MpRCAR2-LA-Komplex reguliert werden können. Um dies zu überprüfen wurde wie in Abb. 2-22, die ABA Antwort durch unterschiedliche Arabidopsis PP2Cs inhibiert und mit MpRCAR2, bzw. MpRCAR1 als Negativkontrolle ko-transfiziert, und mit LA inkubiert. Sollte ein ternärer Komplex aus LA, MpRCAR2 und PP2C gebildet werden können und die Aktivität der Proteinphosphatase inhibiert werden, sollte dies in einer Induktion der ABA Antwort resultieren. Aus Abb. 2-27 geht hervor, dass MpRCAR2 die *Marchantia* Proteinphosphatase MpABI1 in Gegenwart von LA regulierte und dadurch die ABA Antwort induzierte. Es konnten auch einige Arabidopsis PP2Cs durch MpRCAR2 in Abhängigkeit von LA reguliert werden. AHG1, HAI2 und HAB1 wurden nicht durch MpRCAR2 inhibiert. Die besten Interaktionspartner von MpRCAR2 waren HAB2 mit einer Induktion der ABA Antwort um das 25-fache, gefolgt von PP2CA (17-fach) und HAI2 (14-fach). HAI1, ABI1 und ABI2 konnten die ABA Antwort durch MpRCAR2 und LA um das Achtfache induzieren.

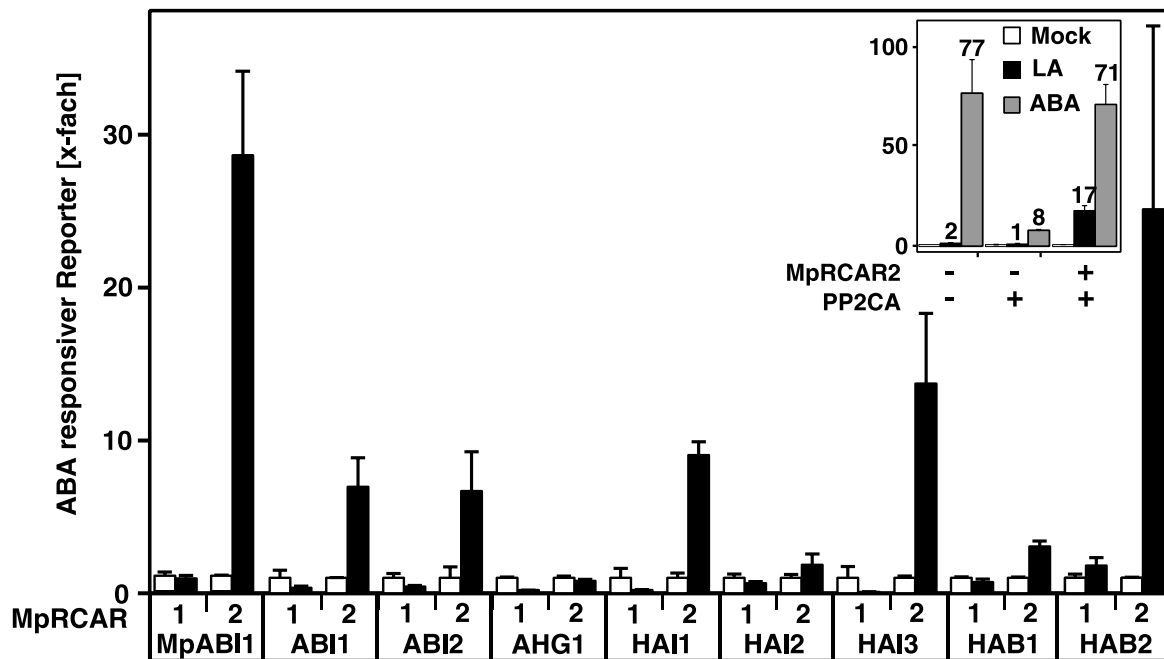


Abb. 2-27 Regulation der PP2Cs durch *Marchantia* ABA Rezeptoren und LA

Arabidopsis *aba2-1* Protoplasten wurden mit unterschiedlichen Proteinphosphatasen transfiziert, um die ABA Antwort auf ca. 10 % Restaktivität zu inhibieren. Die Protoplasten wurden mit MpRCAR1 und MpRCAR2 ko-transfiziert und in Gegenwart von 50 μ M LA inkubiert. Einlage: die PP2CA inhibierte ABA Antwort (10 μ M ABA) wurde durch Ko-Expression von MpRCAR2 und LA aufgehoben. Die Zahlen auf den Balken repräsentieren die Werte der jeweiligen Induktion. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW \pm SF).

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass das Lebermoos *Marchantia polymorpha* funktionale ABA Rezeptoren besitzt. Darüber hinaus konnte ein ABA Rezeptor, MpRCAR2 auch über LA Proteinphosphatasen regulieren. Diese Regulation durch LA war ausschließlich für MpRCAR2 zu beobachten, was die Frage aufwarf, weshalb die nahen homologen Proteine nicht durch LA induzierbar waren. Werden die Aminosäuren der Bindetasche für ABA, bzw. LA näher betrachtet ist größtenteils eine Übereinstimmung von den Arabidopsis und *Marchantia* Proteinen zu beobachten. Eine Ausnahme von MpRCAR2 stellt ein Histidin (Position 187) dar, welches bei den *Marchantia* und Arabidopsis Homologen ein Asparagin bildet. Des Weiteren ist das Histidin der *LATCH*-Domäne (Position 134) exklusiv in MpRCAR2 durch ein Asparagin substituiert (Abb. 2-23). Außerdem könnte ein Phenylalanin, in MpRCAR2 durch Valin (Position 179) ersetzt, eine Rolle bei der Bindung von LA aufweisen. Um zu testen, ob diese Aminosäuren Auswirkungen auf die Induktion von MpRCAR2 durch LA haben, wurden Einzel- und Doppelvarianten erzeugt und in Protoplasten getestet. Wie Abb. 2-28 zeigt, unterschied sich die Reporterinduktion durch die Einzelvariante H187N im Vergleich zum Wildtyp MpRCAR2-Konstrukt. Während das Wildtyp Konstrukt die ABA-

Antwort um das 170-fache induzierte, war die Induktion bei der Variante H187N auf das 125-fache herabgesetzt. Die Doppelvarianten zeigten ein deutliches Bild. Beide Konstrukte konnten die ABA Antwort nicht mehr durch LA induzieren. Gleichzeitig war die Grundinduktion ohne LA verändert und führte zu einer verstärkten Aktivierung der ABA Antwort. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die untersuchten Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Ligandenspezifität und Aktivierung der ABA Antwort über MpRCAR2 nehmen.

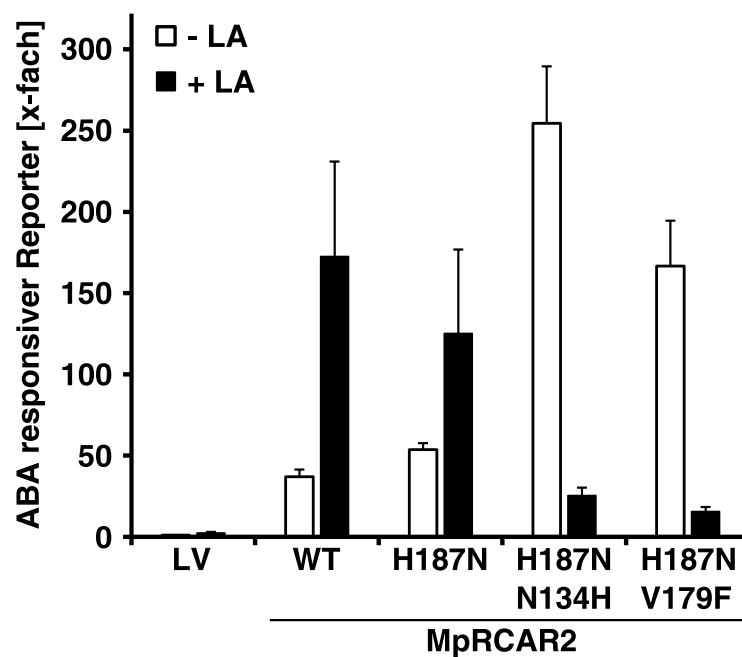


Abb. 2-28 Induktion der ABA Antwort durch MpRCAR2 Varianten

Arabidopsis aba2-1 Protoplasten wurden mit 5 µg MpRCAR2 Effektor-konstrukt und unterschiedlichen MpRCAR2 Varianten transfiziert. Die Inkubation erfolgte für 18 h bei 21°C mit und ohne 50 µM LA. Der Leervektor (LV) ohne LA wurde auf 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert dreier unabhängiger Transfektionen dar (MW ± SF).

2.8. Physiologische Rolle der Pappel PcRCARs

2.8.1. Keimung

Abscisinsäure besitzt bei der Samenentwicklung, Einleitung und Aufrechterhaltung der Dormanz eine wichtige Rolle (Zeevaart and Creelman 1988; Bewley 1997; Holdsworth et al. 1999). Das Modellsystem *Arabidopsis* mit dessen kurzem Generationszyklus bietet im Vergleich zur Pappel große Vorteile. Das leichte Einbringen von Fremd-DNA über die Blüte wurde genutzt, um ABA Rezeptoren der Pappel stabil ins *Arabidopsis*-Genom zu integrieren. So konnten Pappel RCARs und deren biologische Relevanz in der Samenkeimung in *Arabidopsis* näher untersucht werden. Die ersten Versuche mit *Arabidopsis* RCARs und deren Auswirkung auf die Samenkeimung zeigten für die Überexpression von RCAR1 und RCAR8 eine hypersensitive Reaktion auf ABA relativ zum Wildtyp (Ma et al. 2009; Santiago et al. 2009b). Auch für die restlichen RCARs wurde bei ektopischer Expression eine ABA-Hypersensitivität in der Samenkeimung relativ zum Wildtyp nachgewiesen (Yang et al. 2016).

Für die nachfolgenden Versuche wurden *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) Pflanzen mit unterschiedlichen pBI121 *p35S::PcRCAR* Konstrukten über die *Floral Dip* Methode transformiert und auf Homozygotie selektiert. Die Samen der transgenen Linien wurden auf MS-Platten mit und ohne Hormon ausgebracht und nach zwei Tagen Stratifizierung im Dauerlicht bei 21°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach fünf Tagen. Für die Keimungsuntersuchung wurde von jeder Unterfamilie ein PcRCAR ausgewählt. Unterfamilie I wurde durch PcRCAR2, Unterfamilie II durch PcRCAR9 und Unterfamilie III durch PcRCAR13 vertreten.

Die Ergebnisse der Keimungsuntersuchung sind in Abb. 2-29 zusammengefasst. Durch die Applikation von 3 µM ABA wurde die Keimungsrate beim Wildtyp Col-0 von 100 % auf 43 % herabgesetzt. Bei den Linien PcRCAR2-3 und PcRCAR13-1 kam es zu einer Abnahme der Keimung um durchschnittlich 90 %, was wie erwartet den Ergebnissen von *Arabidopsis* RCARs entsprach. Auffallend war Linie PcRCAR9-7, welche durch 3 µM Hormonkonzentration nur um ca. 20 % gehemmt wurde. Hier lag keine Hypersensitivität gegenüber dem Hormon vor, sondern eine In-, bzw. Hyposensitivität.

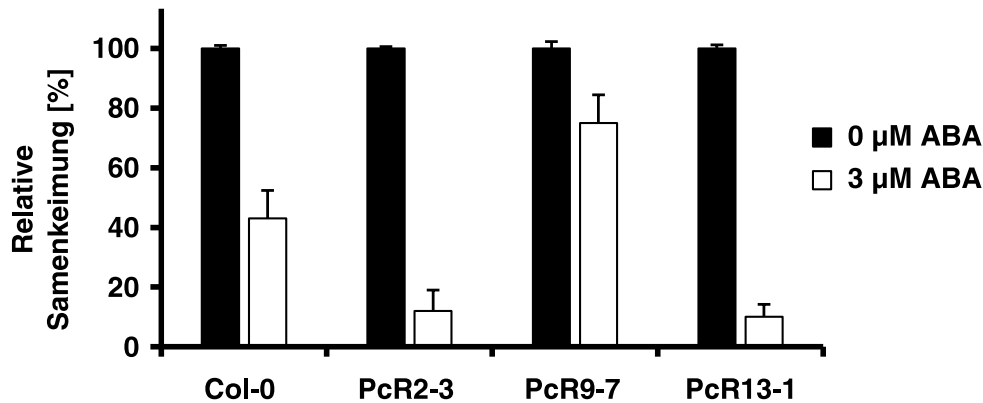


Abb. 2-29 Relative Samenkeimung der PcRCAR Linien.

Relative Inhibierung der Samenkeimung unterschiedlicher PcRCAR Überexpressionslinien in Gegenwart von 3 μM ABA nach 5 Tagen. Die Samen wurden für zwei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend im Dauerlicht bei 21°C inkubiert. Die relative Keimung wurde in Prozent dargestellt und bezieht sich auf die absolute Keimung auf MS-Medium ohne Hormonzugabe. Die absolute Keimung lag bei allen Linien zwischen 95 % und 100 %. Pro Datenpunkt wurden mindestens n = 90 (MW ± SF) Samen analysiert. Der Keimungsversuch wurde zweimal wiederholt.

Um dies näher zu analysieren, wurden mehrere, unabhängig transgene PcRCAR9 Linien in Bezug auf ihre Keimung untersucht (Abb. 2-30). Eine weitere Linie, PcRCAR9-8, verhielt sich ebenso insensitiv gegenüber dem exogen applizierten Hormon (12 % Keimungsinhibierung). Die restlichen getesteten Linien waren in der Keimung hypersensitiv gegenüber dem Wildtyp Col-0. Während Col-0 auf 48 % relative Samenkeimung reduziert war, waren die Linien PcRCAR9-1 auf 24 %, PcRCAR9-2 auf 36 %, PcRCAR9-9 auf 23 % und PcRCAR9-11 auf 20 % Keimung reduziert.

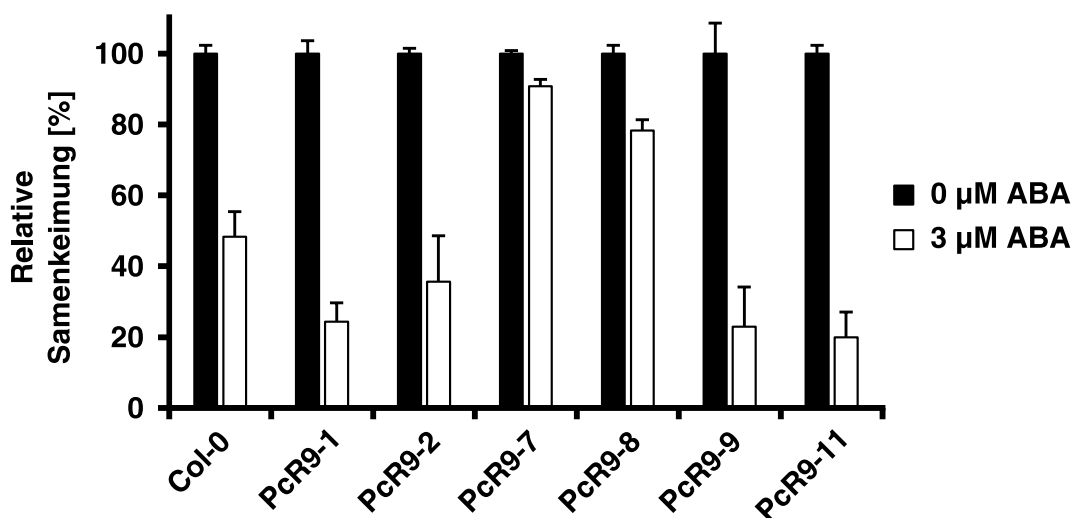


Abb. 2-30 Relative Samenkeimung unterschiedlicher PcRCAR9 Linien.

Relative Inhibierung der Samenkeimung unterschiedlicher PcRCAR9 Linien in Gegenwart von 3 μM ABA nach fünf Tagen. Der Versuch wurde wie der in Abb. 2-29 durchgeführt.

Um den insensitiven Phänotyp von den Linien PcRCAR9-7 und PcRCAR9-8 zu erklären, wurde zunächst die Genexpression von den PcRCAR9 Linien mittels RT-qPCR überprüft. Wie aus Abb. 2-31 hervorgeht, lag bei diesen Linien keine erhöhte Expression des PcRCAR9 Transkriptes im Vergleich zum wildtypischen RCAR9 vor. Denkbar wäre eine durch zu starke Expression verursachte Inaktivierung der Expression über *gene-silencing* für dieses PcRCAR. Dadurch könnten Arabidopsis RCARs, ebenfalls über *gene-silencing* mit herunterreguliert werden und so die ABA-Insensitivität erklären. Um diese Frage zu klären, wurden die Linien ebenfalls auf die Genexpression der 14 Arabidopsis RCARs überprüft (Abb. 2-32). Die Vermutung, dass in den Linien PcRCAR9-7 und PcRCAR9-8 andere Arabidopsis-eigene RCARs herunterreguliert waren und die Hyposensitivität gegenüber ABA in der Samenkeimung verursachen, konnte nicht bestätigt werden. Allerdings war die Arabidopsis RCAR9-Transkriptmenge in den beiden Linien im Vergleich zu den anderen etwas herabgesetzt. Die Arabidopsis RCARs RCAR4, RCAR6, RCAR7 und RCAR13 waren relativ zum Wildtyp geringer exprimiert, doch war dies auch bei den hypersensitiven Linien der Fall.

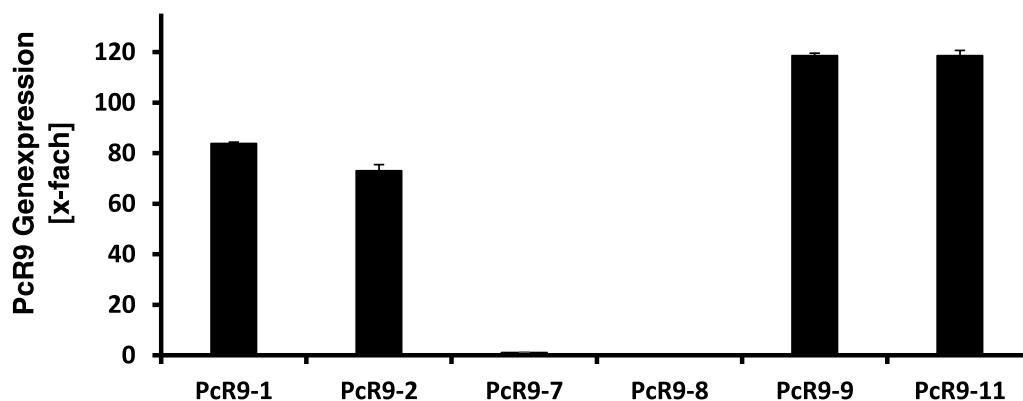


Abb. 2-31 Genexpression von PcRCAR9 in Arabidopsis.

Genexpressionsanalyse des Pappel PcRCAR9 von zwölf Tage alten Arabidopsis Keimlingen. Die Transkriptmenge wurde relativ zum Referenzgen *UBI10* und zum wildtypischen RCAR9 Gen dargestellt ($n = 3, \pm SF$). Während die Linien PcRCAR9-1, PcRCAR9-2, PcRCAR9-9 und PcRCAR9-11 das Pappelgen PcRCAR9 bis über 100-fach stärker exprimierten als das Wildtyp Gen, zeigten die Linien PcRCAR9-7 und PcRCAR9-8 keine Überexpression.

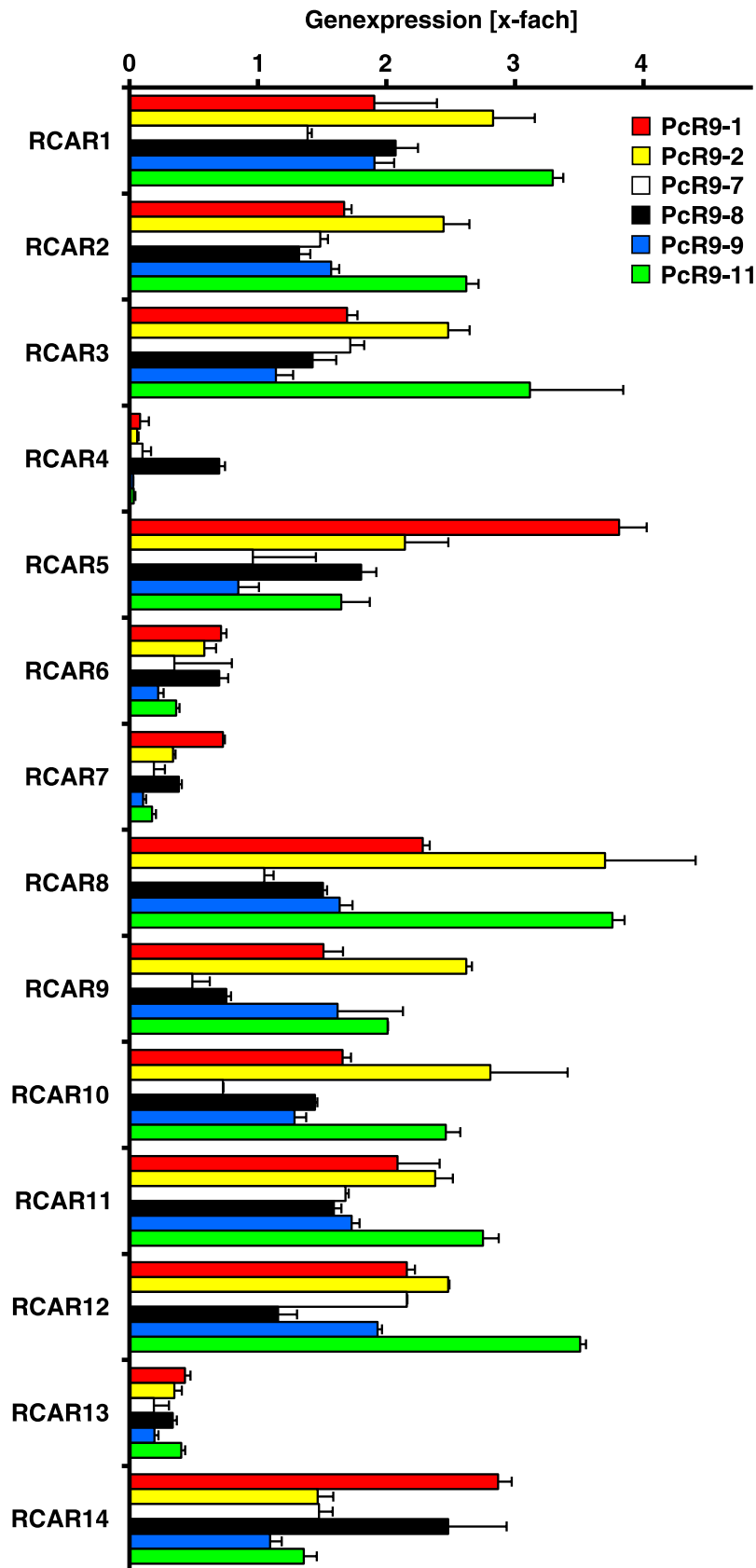


Abb. 2-32 Genexpression von Arabidopsis RCARs in PcRCAR9 Linien.

Expressionslevel von Arabidopsis RCARs in unterschiedlichen PcRCAR9 Überexpressionslinien relativ zum Referenzgen *UBI10* und zum jeweiligen RCAR im Wildtyp Col-0 ($n = 3, \pm SF$). Analysiert wurden jeweils zwölf Tage alte Keimlinge auf MS-Platten im Dauerlicht.

2.8.2. Wurzelwachstum

Neben der bereits erwähnten wichtigen Rolle in der Samenkeimung hat ABA auch eine entscheidende Funktion beim Wurzelwachstum (Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000). In niedrigen Konzentrationen aktiviert das Hormon das Wurzelwachstum, bei höheren Konzentrationen wirkt es Wachstums-inhibierend (Zeevaart and Creelman 1988). Durch die Überexpression der ABA Rezeptoren kommt es in der Pflanze zu einer sensitiveren Wahrnehmung von ABA. Dementsprechend sollten diese Überexpressionslinien auf exogene Hormonzugabe auch sensitiver reagieren. Dies wurde für die generierten Linien PcRCAR9, PcRACR10, PcRCAR13 und PcRCAR14 im nachfolgenden Versuch näher untersucht. Hierfür wurden sechs Tage alte Keimlinge auf MS-Platten mit unterschiedlicher ABA Konzentration gesetzt und für drei Tage im Dauerlicht bei 21°C inkubiert. Ausgewertet wurde der Zuwachs der Wurzellänge im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Die Ergebnisse sind in Abb. 2-33 zusammengefasst.

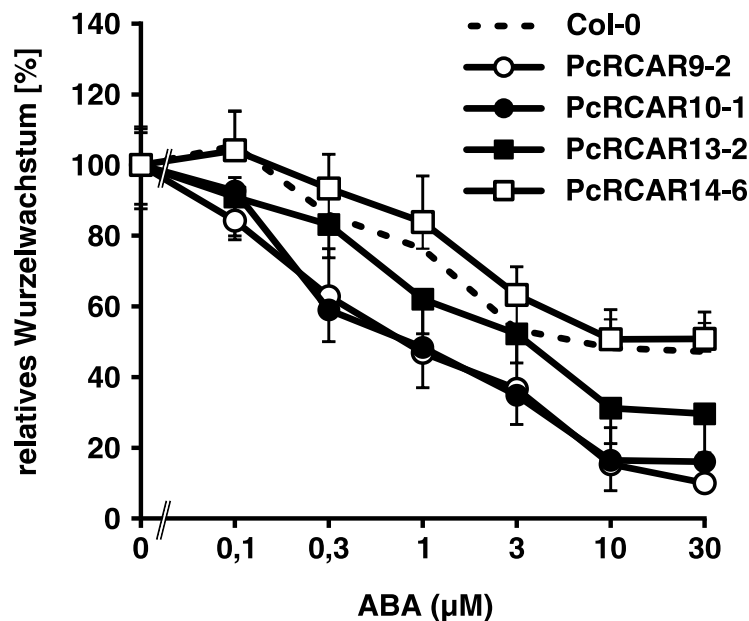


Abb. 2-33 Relatives Wurzelwachstum von PcRCAR-Überexpressionslinien.

Inhibition des Wurzelwachstums von neun Tage alten Keimlingen in Bezug auf Col-0 in Gegenwart unterschiedlicher Hormonkonzentrationen. Nach dreitägiger Stratifizierung bei 4°C keimten die Samen für sechs Tage in Dauerlicht und 21°C. Anschließend wurden sie auf hormonversetztes Medium umgesetzt und nach drei Tagen Inkubation ausgewertet. Die Auswertung erfolgte in Bezug auf absolutes Wurzelwachstum unter Kontrollbedingungen, ohne ABA, was pro Linie jeweils auf 100% gesetzt wurde. Die Werte waren für Col-0 $40,0 \pm 4,3$ mm, für PcRCAR9-2 $45,0 \pm 4,1$ mm, für PcRCAR10-1 $40,8 \pm 4,5$ mm, für PcRCAR13-2 $43,1 \pm 5,3$ mm und für PcRCAR14-6 $39,8 \pm 4,1$ mm. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus $n > 18$ Keimlingen.

Für den Wildtyp Col-0 und die Überexpressionslinie PcRCAR14 konnte bei einer niedrigen Hormonkonzentration von 0,1 μM der positive Effekt von ABA auf das Wurzelwachstum beobachtet werden. Der Wildtyp wurde um 5 %, die Linie PcRCAR14 um 4 % stimuliert. Bei den restlichen Linien blieb dieser Effekt aus. Im Gegensatz dazu, wurde bei 0,1 μM Hormonzugabe das Wurzelwachstum bereits um 10 % bei PcRCAR10 und PcRCAR13 bzw. um 20 % bei der Linie PcRCAR9 gehemmt. Mit maximaler Hormonkonzentration von 30 μM wurde der Wildtyp als auch die Linie PcRCAR14 auf 50 % Wurzelwachstum inhibiert. Während PcRCAR13 maximal auf 30 % Wurzelwachstum relativ zur Wildtypkontrolle inhibiert wurde, waren es bei PcRCAR10 16 %, bei PcRCAR9 10 %.

Es wurde gezeigt, dass die Überexpressionslinien PcRCAR9, PcRCAR10 und PcRCAR13 hypersensitiv gegenüber ABA beim Wurzelwachstum reagieren. Somit könnte bei diesen Rezeptoren eine regulatorische Funktion in der ABA-abhängigen Inhibierung des Wurzelwachstums vorliegen.

2.8.3. Fortschreitender Trockenstress

Die physiologische Bedeutung der Pappel RCARs wurde bereits bei der Samenkeimung und beim Wurzelwachstum in Arabidopsis gezeigt. In einem weiteren Versuch wurde die potentielle, positive Rolle der Pappel RCARs in Arabidopsis Pflanzen bei Trockenstress untersucht. Hierfür wurde das am Lehrstuhl etablierte System des fortschreitenden Trockenstresses verwendet (Yang et al. 2016). Fortschreitender Trockenstress beschreibt in der Natur einen verspäteten oder ganz ausbleibenden Regen. Um dieses Szenario nachzustellen, wurden die mit Erde befüllten Töpfe bis zur Feldkapazität gewässert und die weitere Bewässerung eingestellt. Um Evaporation zu minimieren wurden die Töpfe mit Parafilm abgedichtet. Sieben Tage alte Keimlinge wurden für elf Tage im Kurztag unter gut bewässerten Bedingungen herangezogen, bevor die Abdichtung mit Parafilm erfolgte und die Bewässerung eingestellt wurde. Zweimal pro Woche wurde der Wasserverbrauch durch Wiegen und der Zuwachs der Blattfläche durch die Ermittlung der projizierten Blattfläche bestimmt. Für den fortschreitenden Trockenstress wurden jeweils vier Keimlinge von den PcRCAR9 Linien aus Abb. 2-30 verwendet.

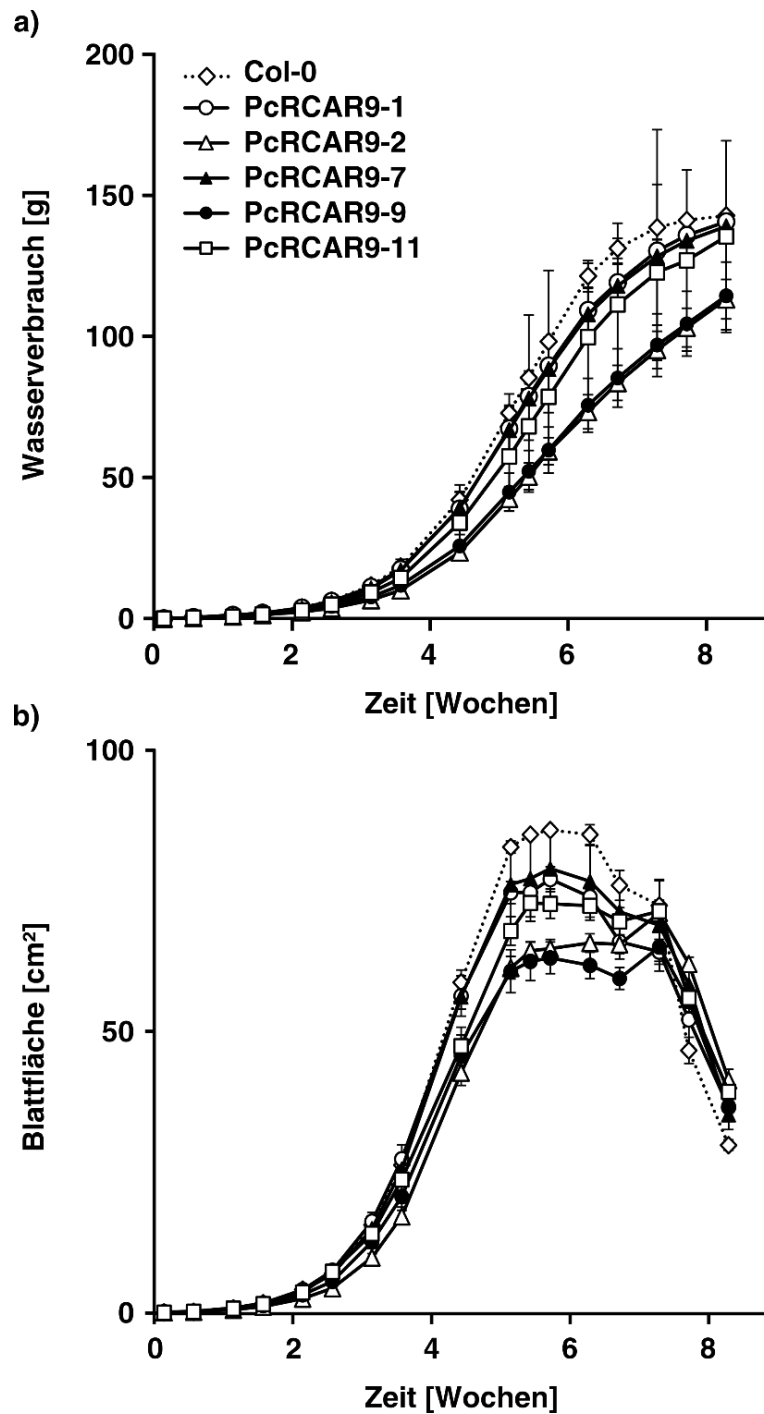


Abb. 2-34 Wasserverbrauch und Blattflächenzuwachs der PcRCAR9 Überexpressionslinien im fortschreitenden Trockenstress.

a) Der Wasserverbrauch der einzelnen Linien wurde durch das zweimalige Wiegen pro Woche der Töpfe ermittelt. b) Für die Bestimmung der Blattfläche wurden die Pflanzen fotografiert und mit der Software Photoshop die projizierte Blattfläche ermittelt. Einzelne Pflanzen wurden für 18 Tage im Kurztag unter guter Bewässerung kultiviert, bevor die Bewässerung eingestellt wurde und die Evaporation des Substrats durch das Verschließen der Töpfe mit Parafilm minimiert wurde. Die Blattflächen zu Beginn des Experiments betragen $0,2 \pm 0,09 \text{ cm}^2$. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert vier biologischer Wiederholungen (MW \pm SF).

Während des sich entwickelnden Trockenstresses haben Wildtyp Col-0 Pflanzen in den ersten drei Wochen $11,7 \pm 3,5$ g Wasser verbraucht (Abb. 2-34a). Innerhalb der nächsten drei Wochen stieg der Wasserverbrauch um das zehnfache auf $109,7 \pm 10,9$ g an. Im letzten Drittel des Trockenstressexperiments haben die Wildtyp-Pflanzen noch weitere $21,43 \pm 0,9$ g Wasser verbraucht. In diesem letzten Drittel waren die Pflanzen bereits starkem Trockenstress mit Welksymptomen der Blätter ausgesetzt. Bei einem maximalen Wassergehalt von 158 g pro Topf hat der Wildtyp Col-0 50 % davon mit der fünften Woche verbraucht. Die transgenen Überexpressionslinien PcRCAR9-2 und PcRCAR9-9 haben dagegen die 50 % Wasser erst mit Woche sieben verbraucht. Am Ende des Experiments hat der Wildtyp $142,8 \pm 0,9$ g Wasser verbraucht, die Linien PcRCAR9-1, PcRCAR9-7 und PcRCAR9-11 vergleichsweise genauso viel. Die Linien PcRCAR9-2 und PcRCAR9-9 haben mit $113,2 \pm 14$ g, bzw. $114,3 \pm 23$ g weniger Wasser verbraucht.

Dem Zuwachs der Blattmasse liegt zum Großteil der Biomassegewinn durch die Photosynthese zu Grunde. Während des sich entwickelnden Trockenstresses wird die Wasserverfügbarkeit und somit direkt die Photosynthese minimiert. Die projizierte Blattfläche wurde zweimal pro Woche bestimmt (Abb. 2-34b). Während der ersten drei Wochen gab es nur wenig Unterschied im Zuwachs der Blattfläche vom Wildtyp Col-0 und den PcRCAR9 Überexpressionslinien. Von Woche drei bis Woche fünf fand der Großteil der Blattexpansion statt. So hatte der Wildtyp Col-0 von Tag 22 bis Tag 36 eine Blattexpansionsrate von $4,8 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$. Die Linien PcRCAR9-1, PcRCAR9-7 und PcRCAR9-11 lagen bei $3,8$ bis $4,4 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$, während die Linien PcRCAR9-2 und PcRCAR9-9, die in dieser Zeit auch am wenigsten Wasser verbrauchten (Abb. 2-34a), eine Expansionsrate zwischen $3,4$ und $3,6 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$ aufwiesen. Während die maximale Blattexpansionsrate bei allen Linien in der gleichen Zeit vorlag, gab es bei der maximalen Blattfläche deutliche Unterschiede. Der Wildtyp Col-0 hatte die größte maximale Blattfläche von $85,7 \pm 1,2 \text{ cm}^2$, gefolgt von PcRCAR9-7 mit $78,9 \pm 15 \text{ cm}^2$, PcRCAR9-1 mit $77,0 \pm 4,4 \text{ cm}^2$ und PcRCAR9-11 mit $72,8 \pm 4,9 \text{ cm}^2$. Die Linien PcRCAR9-2 und PcRCAR9-9 kamen auf $71,0 \pm 3,6 \text{ cm}^2$ und $63,1 \pm 5,6 \text{ cm}^2$. Ab Woche sechs kam es zu einer Stagnation beim Blattzuwachs gefolgt von einer Abnahme der projizierten Blattfläche. Diese Abnahme der Blattfläche lässt sich auf die Abnahme des Turgordrucks in den Zellen zurückführen, was zu einem Welken der Blätter führte. Am Ende des Experiments wurde das Trockengewicht der einzelnen Pflanzen bestimmt. Hierfür wurde die Rosette von den Wurzeln abgelöst und für drei Tage bei 60°C vollständig

getrocknet und anschließend gewogen. Während der Wildtyp Col-0 und die PcRCAR9 Überexpressionslinien PcRCAR9-1 und PcRCAR9-11 zwischen $284,15 \pm 8,6$ mg und $293,85 \pm 17,5$ mg Biomasse aufbauten, waren es bei PcRCAR9-2, PcRCAR9-7 und PcRCAR9-9 zwischen $259,7 \pm 46$ mg und $270,6 \pm 4,5$ mg (Abb. 2-35a). Durch die Überexpression von den Pappel PcRCAR9 Rezeptoren kam es zu einer Verzögerung des Wachstums, mit weniger Wasserverbrauch über die Zeit (Abb. 2-34), aber schlussendlich auch zu einem geringeren Aufbau an Trockenmasse (Abb. 2-35a).

Durch die ermittelte Biomasse und dem Wasserverbrauch konnte die Wassernutzeffizienz (aufgebaute Biomasse [g] pro verbrauchtem Liter Wasser) berechnet werden. Die Wassernutzeffizienten der Überexpressionslinien unterschieden sich nicht im Vergleich zum Wildtyp Col-0 und lagen alle um den Wert $2,1 \pm 0,1$ (Abb. 2-35b).

Der potentiell positive Effekt der RCARs auf den Wasserverbrauch und die Akkumulation an Biomasse konnte im Gegensatz zu Arabidopsis (Yang et al. 2016) für das PcRCAR9 Gen nicht nachgewiesen werden.

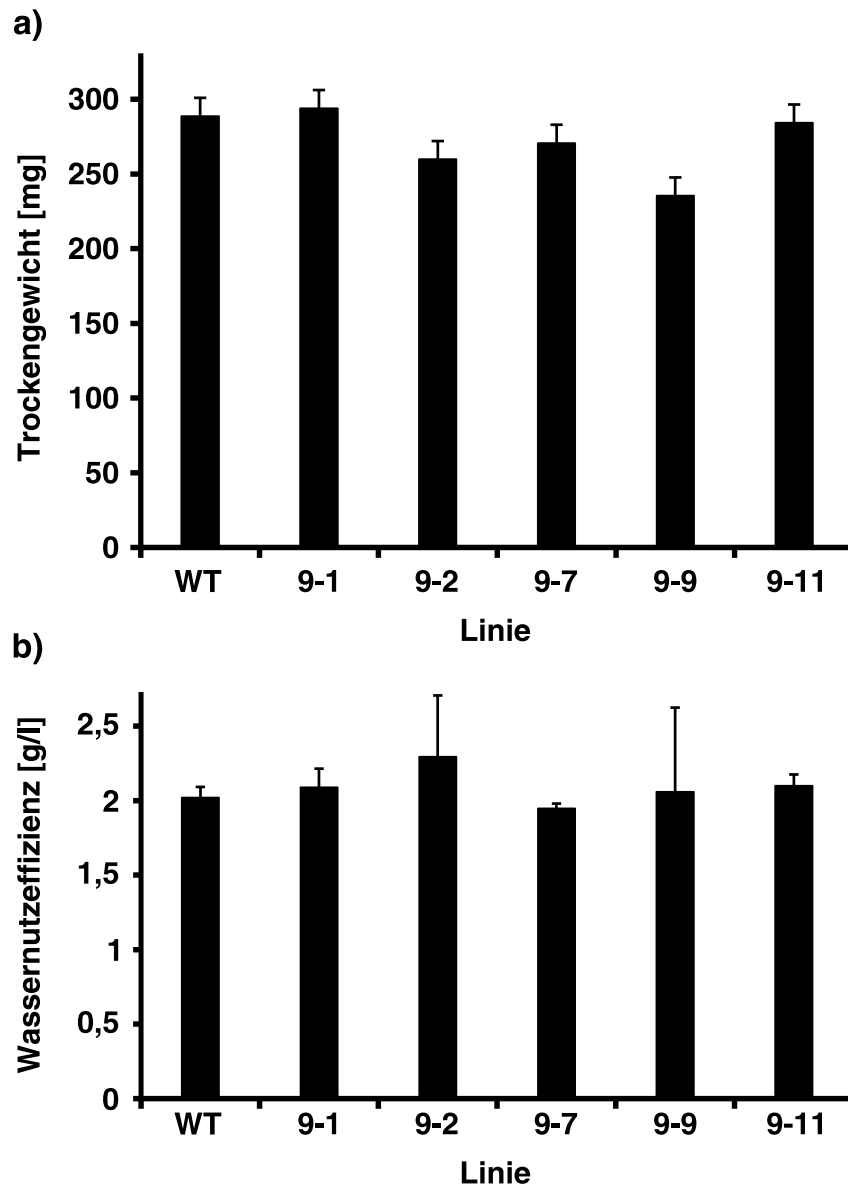


Abb. 2-35 Trockengewicht und Wassernutzeffizienz der PcRCAR9 Überexpressionslinien.

a) Am Ende des fortschreitenden Trockenstressexperimentes wurde das Trockengewicht der einzelnen Linien bestimmt. Hierfür wurden die Rosetten von den Wurzeln getrennt und für drei Tage bei 60°C getrocknet und gewogen. b) Die Wassernutzeffizienz wurde aus dem Trockengewicht und dem verbrauchten Wasser berechnet. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von vier biologischen Wiederholung dar (MW \pm SF).

Neben der gravimetrischen Methode zur Bestimmung des Wasserverbrauchs und der Ermittlung der Blattfläche wurden ebenfalls Gaswechsellmessungen durchgeführt. Hierfür wurde der Gasaustausch der ganzen Arabidopsis Pflanze in einer Ringkammer gemessen. Als Zeitpunkt wurde das Ende der dritten Woche festgelegt, da den Pflanzen noch genügend Wasser zur Verfügung stand und noch keine Stresssymptome vorhanden waren. Als Vertreter der unabhängigen Linien wurde PcRCAR9-11 gewählt,

da diese Linie in Bezug auf Wasserverbrauch und Blattflächenzuwachs eine moderate Stellung zu den restlichen Linien und der Kontrolle (WT) einnahm (Abb. 2-34).

Es konnte die Netto-CO₂-Assimilationsrate (A), die Transpirationsrate (E) und die stomatäre Leitfähigkeit (g_s) ermittelt werden. Aus diesen Werten wurde außerdem die Transpirationseffizienz ($T_E = \frac{A}{E}$) und die photosynthetische Wassernutzeffizienz ($insWUE = \frac{A}{g_s}$) berechnet.

Wie in Abb. 2-36 zu sehen ist, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp Col-0 (WT) und der PcRCAR9-11 Überexpressionslinie. Die Netto-CO₂-Assimilationsrate und die Transpirationsrate war bei der Kontrolle Col-0 und der Linie PcRCAR9-11 identisch. Die stomatäre Leitfähigkeit war bei PcRCAR9-11 in Bezug zum Wildtyp leicht reduziert, was sich in einer leicht gesteigerten insWUE widerspiegelt.

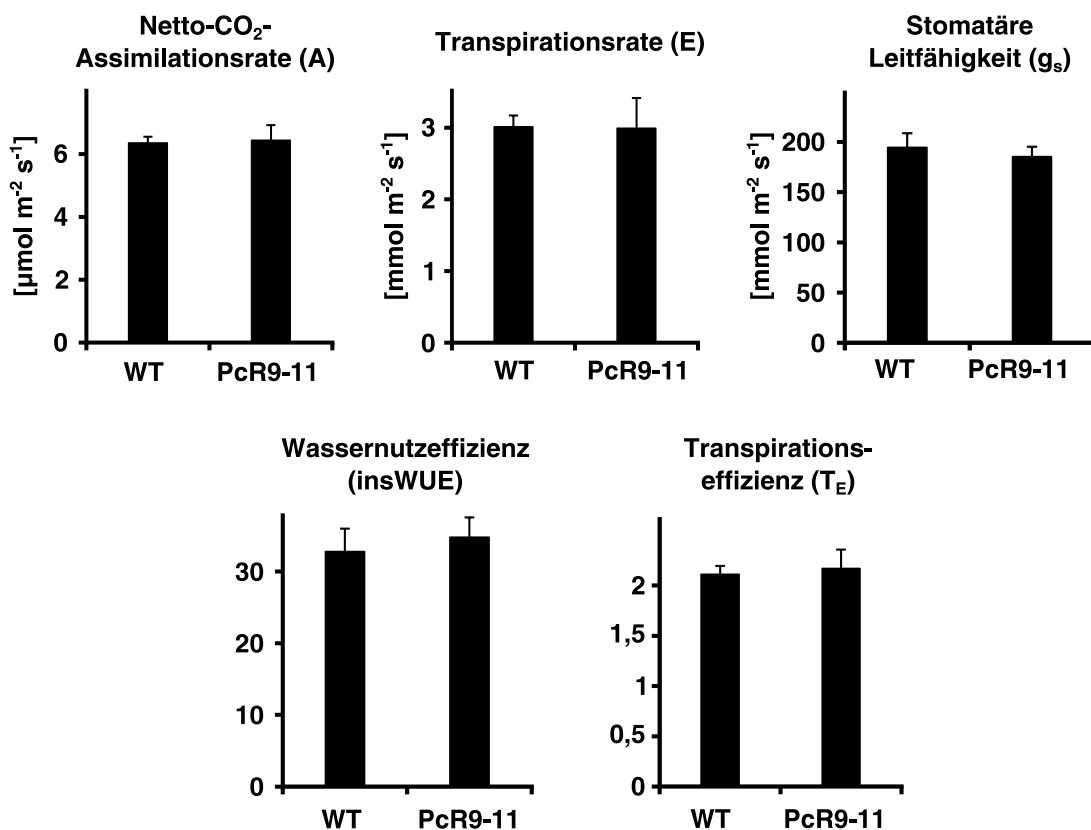


Abb. 2-36 Gaswechsellmessungen der PcRCAR9-11 Überexpressionslinie.

Gemessene Netto-CO₂-Assimilationsrate (A), Transpirationsrate (E) und stomatäre Leitfähigkeit (g_s) von Wildtyp (WT) und der PcRCAR9-11 Überexpressionslinie (PcR9-11). Die photosynthetische Wassernutzeffizienz (insWUE) und die Transpirationseffizienz (T_E) wurden mittels $WUE = A / g_s$ und $T_E = A / E$ berechnet. Die Pflanzen wurden im Kurztag (8 h Licht/ 16 h Dunkelheit mit 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 22°C und 50 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von jeweils vier biologischen und fünf technischen Replikaten (MW \pm SF).

Da die PcRCAR9 Überexpressionslinien keine Unterschiede zum Wildtyp zeigten, wurde eine weitere Linie, die im Wurzelwachstum ebenso wie PcRCAR9 hypersensitiv gegenüber ABA war, im fortlaufenden Trockenstress-Experiment getestet. Hierfür wurden zwei unabhängige PcRCAR10 Überexpressionslinien ausgewählt und wie zu Beginn des Kapitels 2.8.3 (Fortschreitender Trockenstress) beschrieben, vorbereitet. Der Wasserverbrauch und der Zuwachs der Blattfläche wurde zweimal pro Woche bestimmt.

Während der ersten drei Wochen waren der Wasserverbrauch und der Zuwachs der Blattfläche vom Wildtyp Col-0 und den PcRCAR10 Überexpressionslinien vergleichbar (Abb. 2-37). Der Zeitpunkt, an dem 50 % des zu Verfügung stehenden Wassers verbraucht worden ist, war bei Col-0 Anfang der vierten, bei PcRCAR10-3 Ende der vierten Woche und für die Linie PcRCAR10-1 Anfang der fünften Woche. Am Ende des Experiments hat der Wildtyp $143 \pm 1,5$ g Wasser verbraucht, die Linie PcRCAR10-1 $140,5 \pm 3,6$ g und PcRCAR10-3 $142,4 \pm 2,1$ g (Abb. 2-37a).

Die Blattexpansionsrate zwischen Tag 22 und Tag 36, zwischen denen wieder die größte Wachstumsphase vorlag, war für den Wildtyp Col-0 $4,2 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$. Die Überexpressionslinie PcRCAR10-1 lag bei $3,7 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$ und PcRCAR10-3 bei $4,7 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$. Während die maximale Blattfläche von PcRCAR10-1 ($72,9 \text{ cm}^2$) mit der des Wildtyps ($71,3 \text{ cm}^2$) vergleichbar war, hat PcRCAR10-3 mit $87,5 \text{ cm}^2$ im Vergleich zum Wildtyp 22,3% mehr Blattfläche aufgebaut (Abb. 2-37b).

Die maximale Blattfläche konnte für den Wildtyp an Tag 35, für PcRCAR10-1 an Tag 41 und für PcRCAR10-3 an Tag 38 ermittelt werden. Der Wildtyp zeigte als erstes Welkerscheinungen, was sich in der Abnahme der Blattfläche widerspiegelte.

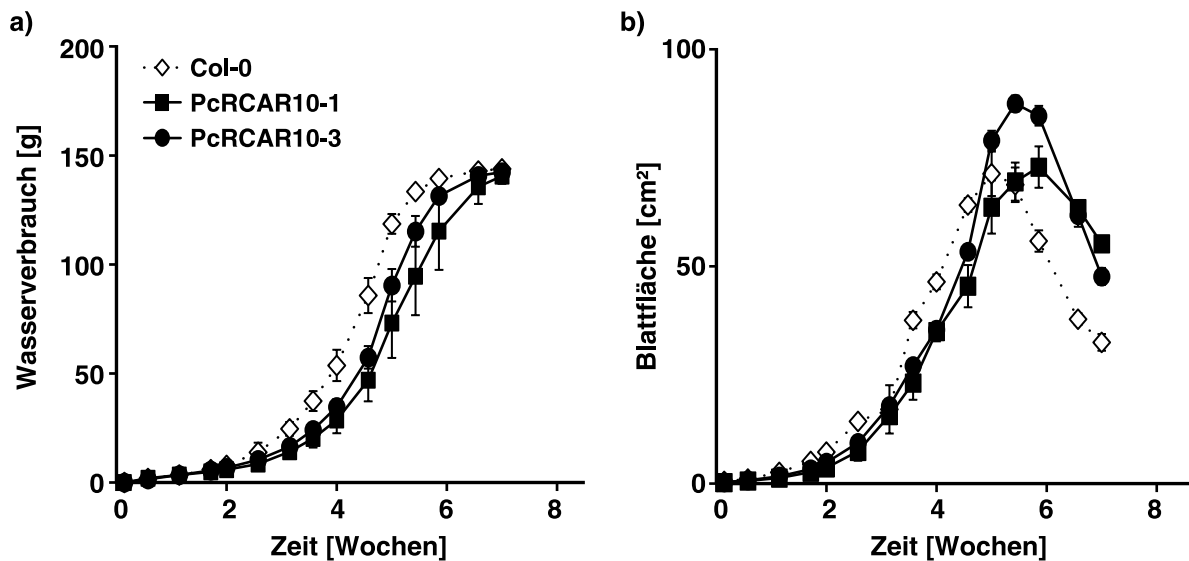


Abb. 2-37 Wasserverbrauch und Blattflächenzuwachs der PcRCAR10 Überexpressionslinien im fortschreitenden Trockenstress.

a) Der Wasserverbrauch der einzelnen Linien wurde durch das zweimalige Wiegen pro Woche der Töpfe ermittelt. b) Für die Bestimmung der Blattfläche wurden die Pflanzen fotografiert und mit der Software Photoshop die projizierte Blattfläche ermittelt. Einzelne Pflanzen wurden für 18 Tage im Kurztag unter guter Bewässerung kultiviert, bevor die Bewässerung eingestellt wurde und die Evaporation des Substrats durch das Verschließen der Töpfe mit Parafilm minimiert wurde. Die Blattfläche zu Beginn des Experiments betrug $0,4 \pm 0,01 \text{ cm}^2$. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert vier biologischer Wiederholungen (MW \pm SF).

Am Ende des Experiments wurden die Trockengewichte nach dreitägiger Inkubation bei 60°C ermittelt. Der Wildtyp Col-0 hat in sieben Wochen $339,4 \pm 32 \text{ mg}$ Biomasse aufgebaut. Bei PcRCAR10-1 waren es mit $410,9 \pm 30 \text{ mg}$ 23 % mehr im Vergleich zum Wildtyp, bei PcRCAR10-3 mit $423,5 \pm 37 \text{ mg}$ 25 % mehr (Abb. 2-38a).

Mit der ermittelten Biomasse und der verbrauchten Wassermenge konnte die Wassernutzeffizienz berechnet werden. Während die Wassernutzeffizienz für den Wildtyp bei 2,3 lag, war die von PcRCAR10-1 2,9 und PcRCAR10-3 3,0 (Abb. 2-38b). Anders als bei den PcRCAR9 Überexpressionslinien hatten die Linien PcRCAR10-1 und PcRCAR10-3 eine um 26%, bzw. um 30% erhöhte Wassernutzeffizienz im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 2-35b, Abb. 2-38b).

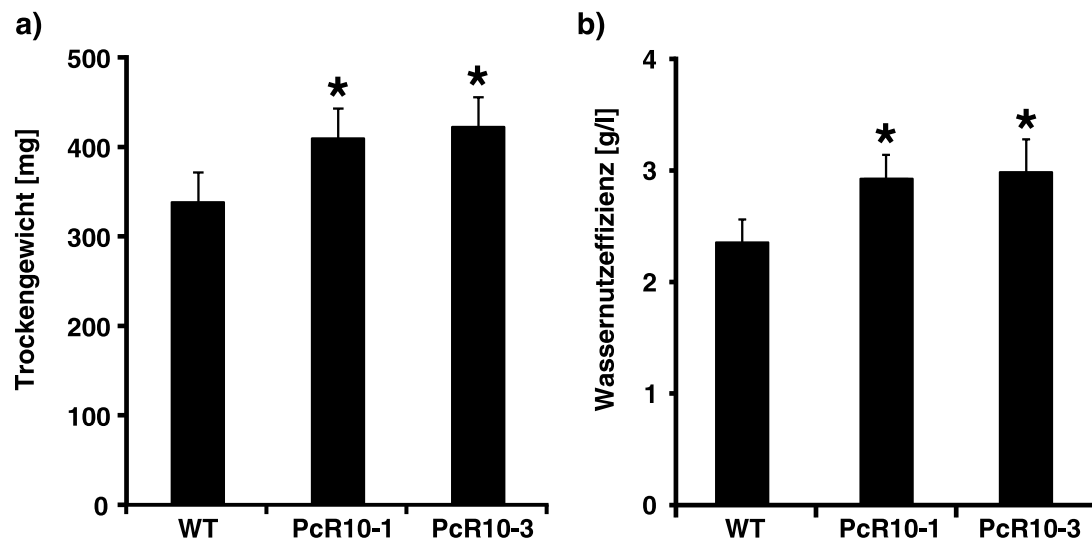


Abb. 2-38 Trockengewicht und Wassernutzeffizienz der PcRCAR10 Überexpressionslinien.

a) Am Ende des fortschreitenden Trockenstressexperimentes wurde das Trockengewicht der einzelnen Linien bestimmt. Hierfür wurden die Rosetten von den Wurzeln getrennt und für drei Tage bei 60°C getrocknet und gewogen. b) Die Wassernutzeffizienz wurde aus dem Trockengewicht und der verbrauchten Wassermenge ermittelt. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von drei biologischen Wiederholung dar (MW \pm SF). Die Sterne (*) kennzeichnen P-Werte unter 0,05 verglichen zum Wildtyp.

Neben der errechneten Wassernutzeffizienz zum Ende des Experimentes wurden wieder Gaswechselfmessungen am Übergang von der dritten zur vierten Woche durchgeführt. Diesmal wurden beide unabhängigen Linien PcRCAR10-1 und PcRCAR10-3 zusammen mit dem Wildtyp (WT) gemessen.

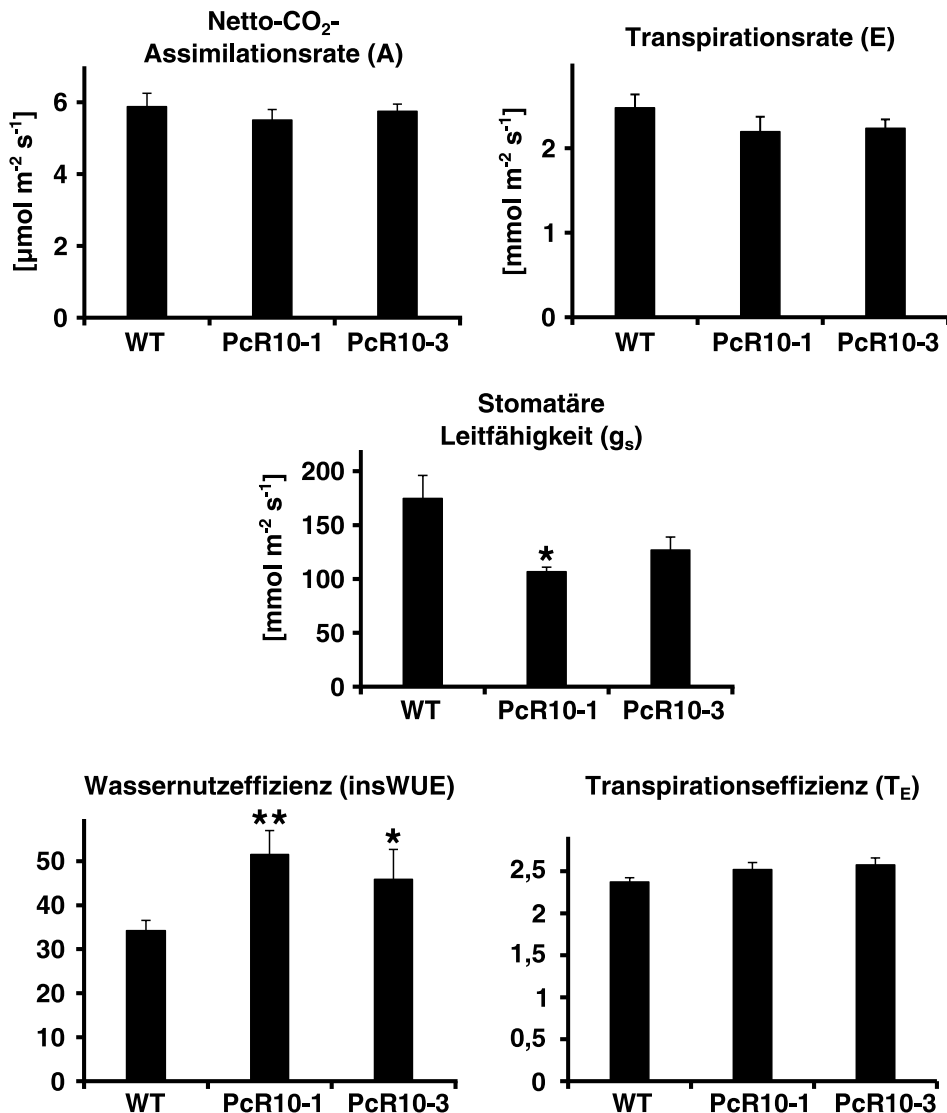


Abb. 2-39 Gaswechsellmessungen der PcRCAR10 Überexpressionslinie.

Gemessene Netto-CO₂-Assimilationsrate (A), Transpirationsrate (E) und stomatische Leitfähigkeit (g_s) von Wildtyp (WT) und den PcRCAR10 Überexpressionslinien (PcR10-1/ PcR10-3). Die Wassernutzeffizienz der Photosynthese (insWUE) und die Transpirationseffizienz (T_E) wurden mittels $WUE = A / g_s$ und $T_E = A / E$ berechnet. Die Pflanzen wurden im Kurztag (8 h Licht/ 16 h Dunkelheit mit $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 22°C und 50 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von jeweils drei biologischen und fünf technischen Replikaten ($MW \pm SF$). Die Sterne kennzeichnen P-Werte unter (*) 0,05 und (**) 0,01 verglichen zum Wildtyp.

Während die Netto-CO₂-Assimilationsrate vom Wildtyp Col-0 und den PcRCAR10 Überexpressionslinien vergleichbar waren, war die Transpirationsrate in den transgenen Linien leicht herabgesetzt (Abb. 2-39). Durch die Überexpression des ABA Rezeptors PcRCAR10 kam es zu einer deutlichen Verringerung der stomatären Leitfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Dadurch ist die insWUE in diesen Linien um bis zu 50 % für PcRCAR10-1 gestiegen.

Den transgenen Linien war es möglich, bei einer verminderten stomatären Leitfähigkeit, dieselbe Netto-CO₂-Assimilationsrate zu halten. Dies bedeutet, dass die Photosynthese effizienter war und mit weniger Wasser vergleichbare Biomasse aufgebaut wurde.

Es konnte also gezeigt werden, dass durch eine gesteigerte Expression von Pappel ABA Rezeptoren in Arabidopsis die WUE verbessert werden kann. Inwiefern das Modellsystem Pappel auf die gesteigerte Expression von Pappel ABA Rezeptoren reagiert und ob auch eine Verbesserung der WUE erreicht werden kann wird im nächsten Kapitel betrachtet.

2.9. Analyse transgener Pappeln

2.9.1. Etablierung von transgenen Pappeln

In den vorherigen Kapiteln wurde die Wirkung von Pappel ABA Rezeptoren in Arabidopsis näher untersucht. Nachfolgend wird auf ihre Auswirkung im homologen System, also Pappel RCARs in der Pappel, näher eingegangen. Hierfür wurden, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, Internodienstücke der Graupappel mit unterschiedlichen *p35S::PcRCAR* Konstrukten über Agrobakterien vermittelten Gentransfer transformiert. Für die Rezeptorstudien wurde jeweils ein Vertreter von jeder Unterfamilie ausgewählt. Ausgehend aus den *pSK::35S* Konstrukten für die Protoplastenversuche wurden die Expressionskassetten für *PcRCAR4*, *PcRCAR9* und *PcRCAR13* ausgeschnitten und in den binären Vektor *pBI121* über *Ascl* kloniert. Die Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft. Potentiell, positiv transformierter Kallus wurde über Kanamycin selektiert, und die Regenerate wurden weiter auf Pappel MS-Medium kultiviert und propagiert. Dabei mussten die Internodienstücke wöchentlich auf neues Antibiotikaversetztes Medium umgesetzt werden, um das Wachstum von restlichen Agrobakterien zu verhindern. Bevor das Umsetzen in Erde erfolgte, wurde über qRT-PCR die Genexpression der transformierten Pappel RCARs bestimmt. Hierfür wurde RNA extrahiert, und die synthetisierte cDNA als Template eingesetzt. Als Referenzgene dienten *ACT2* (*Actin 2*), *TIP4-like* und *CDC2* (*Cell division control protein 2*) (Nicole et

al. 2006; Gutierrez et al. 2008; Pettengill et al. 2012). In nachfolgender Abbildung sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen relativ zum Wildtyp dargestellt.

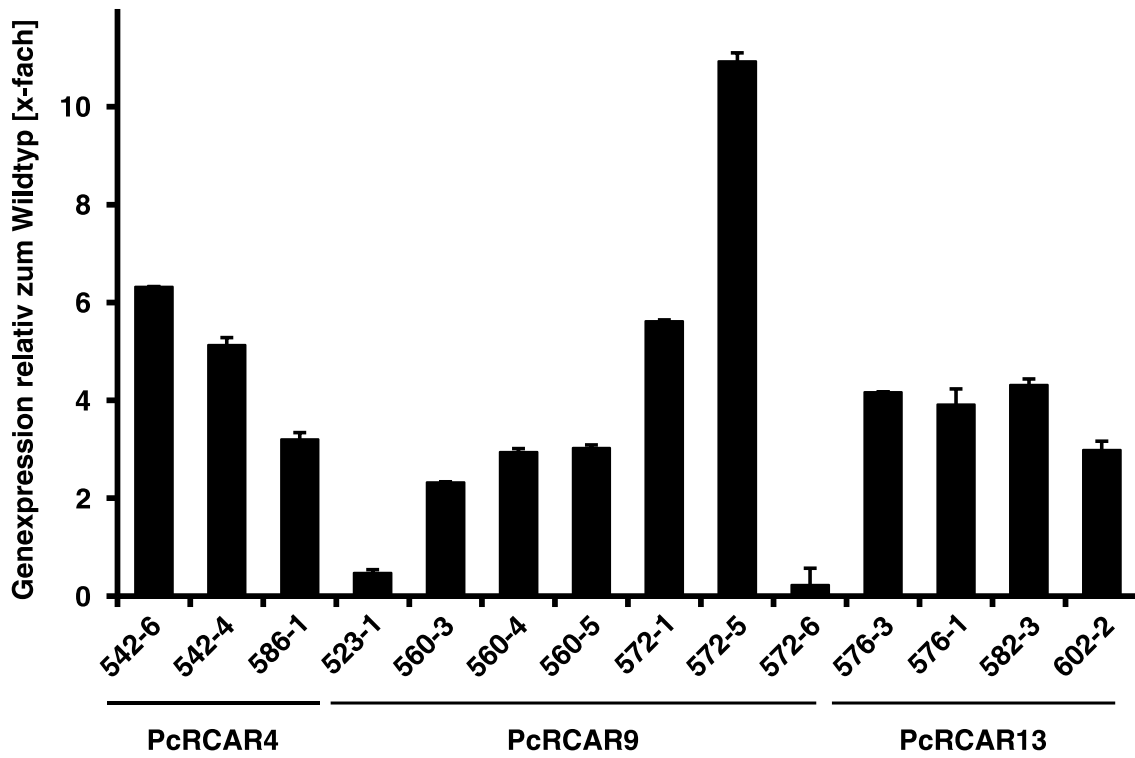


Abb. 2-40 Genexpression der Pappel RCARs in Pappel

Expressionslevel von Pappel RCARs in unterschiedlichen PcRCAR Überexpressionslinien relativ zur jeweiligen PcRCAR Expression im Wildtyp. Als Referenzgen diente *ACT2* ($n = 3, \pm SF$). Analysiert wurden Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen, kultiviert auf Pappel-MS im Dauerlicht ($120 \mu E, 22^{\circ}C$).

Während in *Arabidopsis* durch den 35S-Promotor eine bis zu 100-fache Überexpression von PcRCAR9 erreicht wurde (Abb. 2-31), war die Transkriptmenge in Pappel maximal um das elffache erhöht (Abb. 2-40).

Die Linien 542-6 (PcRCAR4), 572-1 und 572-5 (PcRCAR9) und 582-3 (PcRCAR13) wurden selektiert und zusammen mit dem Wildtyp von Pappel-MS-Medium in Erde überführt. Für eine Woche erfolgte die Kultivierung unter einer Haube, um die Luftfeuchtigkeit relativ hoch zu halten und das Welken der Blätter zu minimieren. Um zu untersuchen, ob die Pappel RCARs auch in Pappel die insWUE verbessern können, wurden bei diesen Linien Gaswechsellmessungen durchgeführt. Hierfür wurden die Pflanzen für ca. sechs bis sieben Wochen weiter in Erde kultiviert.

2.9.2. Gas-Wechsel-Messungen

Im Gegensatz zu Arabidopsis konnte bei den Gaswechselfmessungen mit der Pappel aufgrund ihrer Größe nicht die Gesamtpflanze analysiert werden. Anstelle der Ringkammer wurde eine klemmbare Messeinheit mit einer Fläche von 8 cm^2 verwendet. Diese wurde an das dritte voll entwickelte Blatt geklemmt. Vor der Messung der unterschiedlichen Linien wurde sichergestellt, dass den Pflanzen 24 h zuvor und während der Messung genügend Wasser zur Verfügung stand. Nachfolgende Abbildung zeigt die Netto- CO_2 -Assimilationsrate (A), die Transpirationsrate (E) und die stomatäre Leitfähigkeit (g_s) der transgenen Pappeln. Aus diesen Messgrößen wurde außerdem die Transpirationseffizienz (T_E) und die photosynthetische Wassernutzeffizienz (insWUE) berechnet.

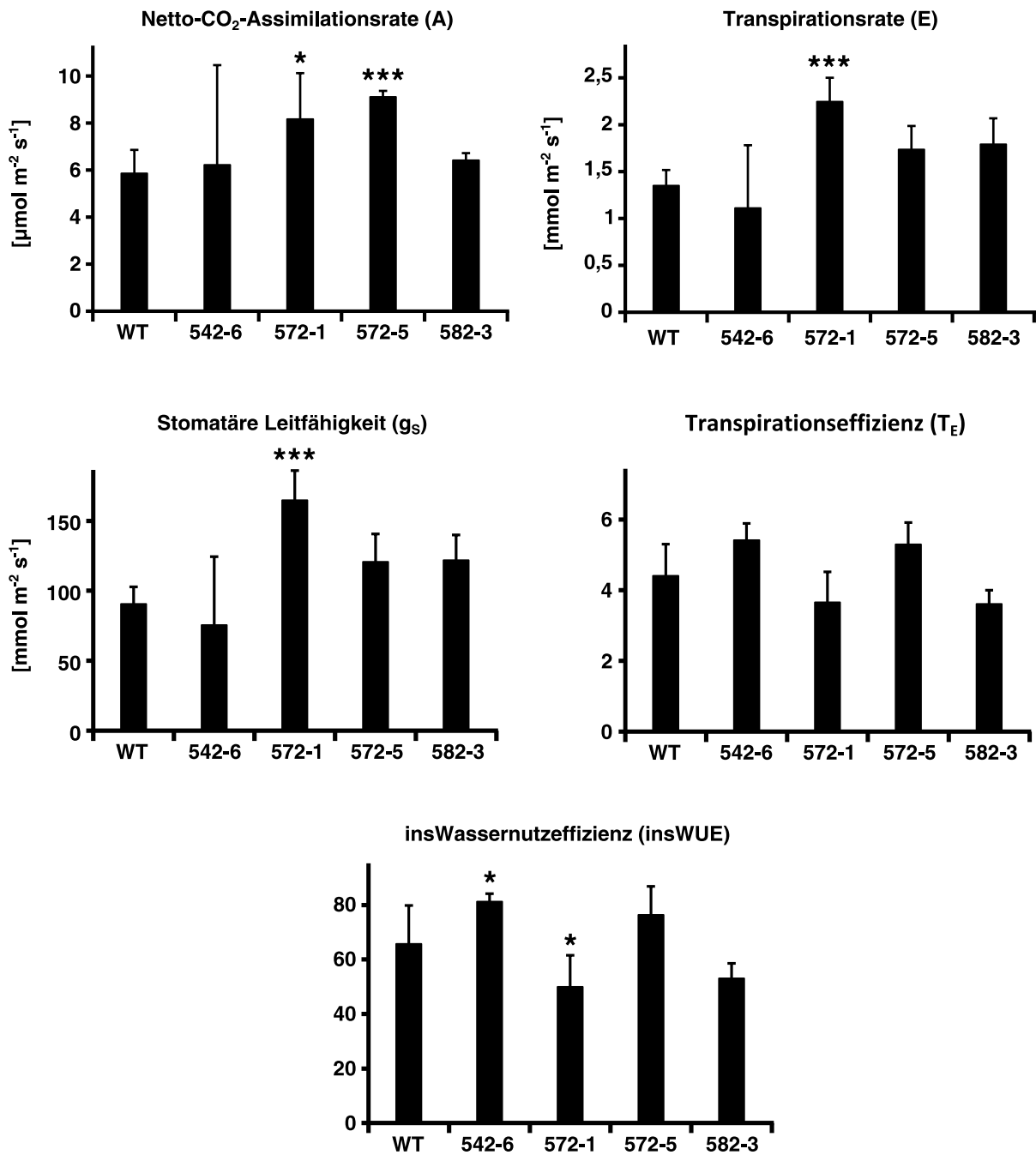


Abb. 2-41 Gaswechsellmessungen der PcRCAR Überexpressionslinien in Pappeln.

Gemessene Netto-CO₂-Assimilationsrate (A), Transpirationsrate (E) und stomatäre Leitfähigkeit (g_s) von Wildtyp (WT) und den PcRCAR Überexpressionslinien 542-6 (PcRCAR4), 572-1 und 572-5 (PcRCAR9) und 582-3 (PcRCAR13). Die photosynthetische Wassernutzeffizienz (insWUE) und die Transpirationseffizienz (T_E) wurden mittels $\text{insWUE} = A / g_s$ und $T_E = A / E$ berechnet. Die Pflanzen wurden im Langtag (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit mit $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 22°C und 50 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von jeweils zwei biologischen und fünf technischen Replikaten ($\text{MW} \pm \text{SF}$). Die Sterne kennzeichnen P-Werte unter (*) 0,05 und (***) 0,001 verglichen zum Wildtyp.

Bei den Messungen der drei Pappellinien wurde eine hohe Variabilität bei den Einzelmessungen festgestellt, was sich in den teilweise hohen Standardabweichungen widerspiegelte.

Die Überexpression des Pappel RCAR4 zeigte bei der Assimilationsrate keinen Unterschied zum Wildtyp. Jedoch war die Transpirationsrate und die stomatäre Leitfähigkeit leicht herabgesetzt, was eine gesteigerte Transpirationseffizienz und eine signifikante Verbesserung in der photosynthetischen Wassernutzeffizienz von 24 % zur Folge hatte.

Die beiden PcRCAR9-Linien, 572-1 und 572-5, zeigten in ersten Messungen eine um ca. 30% erhöhte Assimilationsrate im Vergleich zum Wildtyp und den PcRCAR4 und PcRCAR13 Überexpressionslinien. Zusätzlich waren bei der Linie 572-1 auch die Transpirationsrate und die stomatäre Leitfähigkeit signifikant erhöht, was zu einer Erniedrigung der insWUE führte. Anders bei PcRCAR9-Linie 572-5. Mit der höchsten Assimilationsrate war die Transpirationsrate und stomatäre Leitfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp nur leicht erhöht. Dies hatte eine gesteigerte insWUE zur Folge.

Die Überexpression des PcRCAR13 resultierte in einer erhöhten Transpirationsrate und stomatären Leitfähigkeit, bei gleichbleibender Assimilationsrate. Die insWUE und die Transpirationsrate waren somit geringer im Vergleich zur Wildtyp Pappel. Zusammenfassend zeichnete sich ab, dass das Pappel RCAR4 der Unterfamilie I in der Lage zu sein scheint, die insWUE ohne erkennbare Einbußen der Photosyntheseleistung zu erhöhen. Es konnten erste Pappellinien generiert und analysiert werden, die in Bezug auf die insWUE effizienter als der Wildtyp waren. Diese Linien sollten weiter in Feldversuchen getestet werden.

3. Diskussion

In Gegenwart von Trockenstress kommt es in der Pflanze zur Bildung von ABA, was eine Reihe von physiologischen Antworten auslöst und die Genexpression verändert (Christmann et al. 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006). Neben dem Stomataschluss kommt es auch zur Inhibierung von vegetativen Wachstum und Keimung (Himmelbach et al. 1998; Kim et al. 2010). Die Kernkomponenten des ABA-Signalweges sind die ABA Rezeptoren (RCARs, PYR1/PYLs) (Ma et al. 2009; Park et al. 2009), die Proteinphosphatasen des Typs 2C (Fuchs et al. 2013) und die Proteinkinasen SnRK2s (Fujii et al. 2009; Cutler et al. 2010). Durch die Bindung von ABA an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung mit stabilisierter Bindung an die PP2Cs (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009). Die daraus resultierende Inhibierung der Proteinphosphatasen ermöglicht die Autophosphorylierung der Proteinkinasen, was neben der ABA induzierten Genexpression zur Aktivierung von Ionenkanälen und nachfolgenden Stomataschluss führt (Miyazono et al. 2009; Raghavendra et al. 2010; Geiger et al. 2011).

In Arabidopsis sind alle 14 RCARs als ABA Rezeptoren charakterisiert (Fujii et al. 2009; Fuchs et al. 2014) und es gibt Informationen darüber, welche Kombinationen von RCARs und PP2Cs möglich und in Pflanze realisierbar sind (Tischer et al. 2017). In dieser Arbeit wurden potentielle ABA Rezeptoren und Ko-Rezeptoren der Pappel analysiert. Neben der positiven, aktivierenden Wirkung von den ABA Rezeptoren wurde auch die inhibierende Wirkung der PP2Cs nachgewiesen. Es konnten eine Reihe funktionaler Interaktionen der Pappel RCARs mit PP2Cs gezeigt werden. Darüber hinaus konnten auch funktionale Rezeptorkomplexe, bestehend aus Pappel und Arabidopsis Komponenten analysiert werden.

Neben Pappelrezeptoren wurden auch ABA Rezeptoren des Lebermooses *Marchantia polymorpha* auf ihre Funktionalität geprüft. Dabei konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass die RCARs auch durch einen anderen natürlichen Liganden, LA, induziert werden können.

Zusätzlich zur Kombinatorik von RCARs und PP2Cs wurde auch die physiologische Rolle der Pappelrezeptoren evaluiert. Es zeigte sich bei Pappel RCAR Überexpressionslinien eine Hypersensitivität gegenüber ABA, als auch eine verbesserte Wassernutzeffizienz in Arabidopsis und Pappel. So liefert diese Arbeit erste Ansätze, den

Wasserhaushalt von Bäumen zu verbessern. Die Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit Pappeln, als schnell nachwachsende Rohstoffe, interessant für Biogas- und Bioethanolproduktion, genetisch so zu verändern, dass diese besser an trockenere und marginale Standorte angepasst werden können. Im Rahmen des Klimawandels ist dies von besonderer Bedeutung.

3.1. ABA Signalkaskade in Bäumen

3.1.1. Artfremde Reporterexpression

Um die Funktion der RCARs und PP2Cs der Pappel zu testen wurde zunächst ein geeignetes System benötigt. Das am Lehrstuhl etablierte System verwendet Protoplasten, in welchen neben einem Reporter- und einem Standardgen zur Normalisierung das gewünschte Effektorgen transient exprimiert werden kann.

Der erste Schritt war es, ein vergleichbares Testsystem für Pappel zu etablieren. Die Protoplastierung wurde erfolgreich modifiziert und es konnten vitale und transformierbare Pappelprotoplasten erhalten werden. Dadurch konnte das üblicherweise verwendete Reportergen *pRD29B::LUC* aus Arabidopsis auf seine Funktionalität und Induzierbarkeit in der Pappel überprüft werden.

Die Übertragbarkeit der ABA Signalkaskade wurde bereits unter anderen bei Mais, Baumwolle und Pappel gezeigt (Rohde 2002; Mittal et al. 2014). So konnte in Maisprotoplasten eine ABA-induzierte Genexpression durch Arabidopsis Transkriptionsfaktoren wie RAV1 (*relative to ABI3/ Viviparous1*), RAV2 und ABI5 nachgewiesen werden (Mittal et al. 2014). Mittal und Kollegen zeigten auch, dass Baumwollpflanzen, welche diese Proteine der ABA Signalkaskade exprimierten, neben einer effizienteren Photosynthese auch verbesserte Trockenresistenz zeigten. Auch in Pappeln gibt es Hinweise auf Parallelen in Bezug auf die molekularen Mechanismen der ABA Antwort. Diese basieren auf Untersuchungen des Transkriptionsfaktors ABI3 aus Arabidopsis, welcher kurz vor dem Eintritt der Dormanz in Pappelknospen exprimiert wird (Rohde 2002). Diese Beispiele zeigen, dass die ABA Signalkaskade mit ihren cis- und trans-Elementen im Pflanzenreich konserviert ist und somit auf die Pappel übertragbar ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch ABA Applikation die Arabidopsis-promotoren RAB18 und RD29B in Pappelprotoplasten induziert werden konnten. Das Konstrukt mit dem HB6 Promotor konnte nicht durch ABA induziert werden (Abb. 2-9). Es wurde entschieden mit dem *pRD29B::LUC* Konstrukt zu arbeiten, da zum einen die Expressionsstärke höher als die des *pRAB18::LUC* Konstruktes war und letzteres auch durch Kälte, Osmotika und Trockenstress induzierbar ist (Lang and Palva 1992). Für den Promotor *pHB6* wurde die Induktion durch ABA (30 μ M) und Trockenstress ($\Psi = -0,8$ MPa) in stabil transformierten Arabidopsis Keimlingen gezeigt (Christmann et al. 2005). In Protoplasten konnte das *pHB6::LUC* Konstrukt nur durch Inkubation mit

dem Protein HB6 induziert werden (Himmelbach et al. 2002), was stimmig mit der Tatsache ist, dass der Promotor primär in der Vaskulatur induziert wird, welche durch die Protoplastierung zerstört wird (Christmann et al. 2006). Dies erklärt möglicherweise, warum auch in Pappelprotoplasten das *pHB6::LUC* Konstrukt nicht induziert war.

Neben der transienten Expression wurde der RD29B Promotor, gekoppelt an GFP, auch in stabil transformierten Pappeln analysiert. Durch die Induktion von GFP mittels ABA, bzw. abiotischen Stress, der ABA-relevante Signalkomponenten aktiviert, wird die Möglichkeit geschaffen, Stressreaktionen *in planta* zu beobachten. Wenn GFP durch Zugabe von ABA exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass die Kernkomponenten der ABA Signalkaskade bei Pappel, einer Baumart, denen von krautigen Pflanzen wie Arabidopsis entsprechen. Die getesteten Pappeln zeigten eine hormon- und zeitabhängige Induktion der GFP-Expression. So konnte die GFP-Expression in den Stomata beobachtet werden. Allerdings verdeutlichten die Versuche auch die Relevanz des Bewässerungszustandes der Pflanzen, da eine Linie bereits ohne exogene Applikation von ABA induziert war. Dies deutet auf eine bereits Stress-induzierte Gegebenheit hin. Ist die Pflanze bereits Trockenstress ausgesetzt kommt es zur Bildung von Abscisinsäure, um das Schließen der Stomata einzuleiten. Dieses endogene Level an Hormon könnte bereits ausgereicht haben, den ABA induzierbaren Promotor zu aktivieren und GFP zu exprimieren. Die ABA-abhängige Induktion des Promotors RD29B in stabil transformierten Pappeln, als auch die ABA-induzierte Genexpression in den Protoplasten legitimierte die weitere Verwendung des Promotors in Pappeln. Dadurch konnten die Kernkomponenten der ABA Signalkaskade in der Pappel weiter charakterisiert werden.

3.1.2. Kernkomponenten der ABA Signalkaskade in Pappel

Die Bet v 1 Superfamilie, zu der auch die Mitglieder der ABA Rezeptoren (RCARs) gehören, kommt im gesamten Pflanzenreich vor (Radauer et al. 2008). Bryophyten, wie *Physcomitrella patens* besitzen zum Beispiel vier Vertreter der RCARs, *Marchantia polymorpha* und Lykophyten wie *Selaginella moellendorffii* fünf (Sakata et al. 2014). Im Bereich der Angiospermen hat Reis zehn, die Tomate acht, die Erdbeere elf, der Wein mindestens sieben und die Sojabohne 23 potentielle ABA Rezeptoren (Chai et

al. 2011; Sun et al. 2011; Ben-Ari 2012; Boneh et al. 2012; Kim et al. 2012; Bai et al. 2013; Bowman et al. 2017).

In dieser Arbeit wurden die bekannten RCAR Proteine aus Arabidopsis gegen das Genom von *Populus trichocarpa* geblastet und es konnten 14 potentielle Homologe im Pappelgenom identifiziert werden (Abb. 2-1). Die Anzahl der gefundenen homologen Proteine entsprach der von Arabidopsis. Sie konnten nach den phylogenetischen Analysen auch in drei Unterfamilien eingeteilt werden. Allerdings stimmte die Anzahl der Mitglieder der Unterfamilien nicht mit denen von Arabidopsis überein. So war Unterfamilie I von vier auf sechs vergrößert, Unterfamilie II von sechs auf vier verringert und Unterfamilie III mit vier Vertretern identisch. Bai et al. analysierten potentielle ABA Rezeptoren der Sojabohne (*Glycine max*). Die 23 homologen Proteine ließen sich wie in Arabidopsis und Pappel in drei Unterfamilien einteilen. Die Gruppierung der einzelnen Unterfamilien erfolgte an die Arabidopsis Unterfamilien. Ebenso ist die Aufteilung bei den potentiellen Tomaten ABA-Rezeptoren. Hier entsprach die Anzahl der Homologen in den Unterfamilien denen von Arabidopsis (Gonzalez-Guzman et al. 2014). Anders war die Lage bei den *Marchantia* Rezeptoren, welche nicht den drei Unterfamilien angegliedert werden konnten (vgl. Anhang Abb. 5-3).

Der Vergleich von den 28 Proteinen von Arabidopsis und Pappel zeigte, dass sich die jeweiligen homologen RCAR Proteine mehr ähnelten als die RCARs einer Spezies. So besaßen zum Beispiel RCAR1 und PcRCAR1 76% identische Aminosäuren. Die Sequenzidentität bei RCAR1 und RCAR14 lag bei 43%, für PcRCAR1 und PcRCAR14 bei 45%. Somit war die Identität der homologen Proteine (At – Pc) höher, als die der Vertreter einer Spezies (At – At, bzw. Pc – Pc). Dies zeigt auch der nachfolgende phylogenetische Baum von RCARs aus Arabidopsis, Pappel und Tomate (Abb. 3-1). Die jeweiligen homologen RCARs der unterschiedlichen Spezies gruppieren sich näher, als die Proteine der gleichen Spezies.

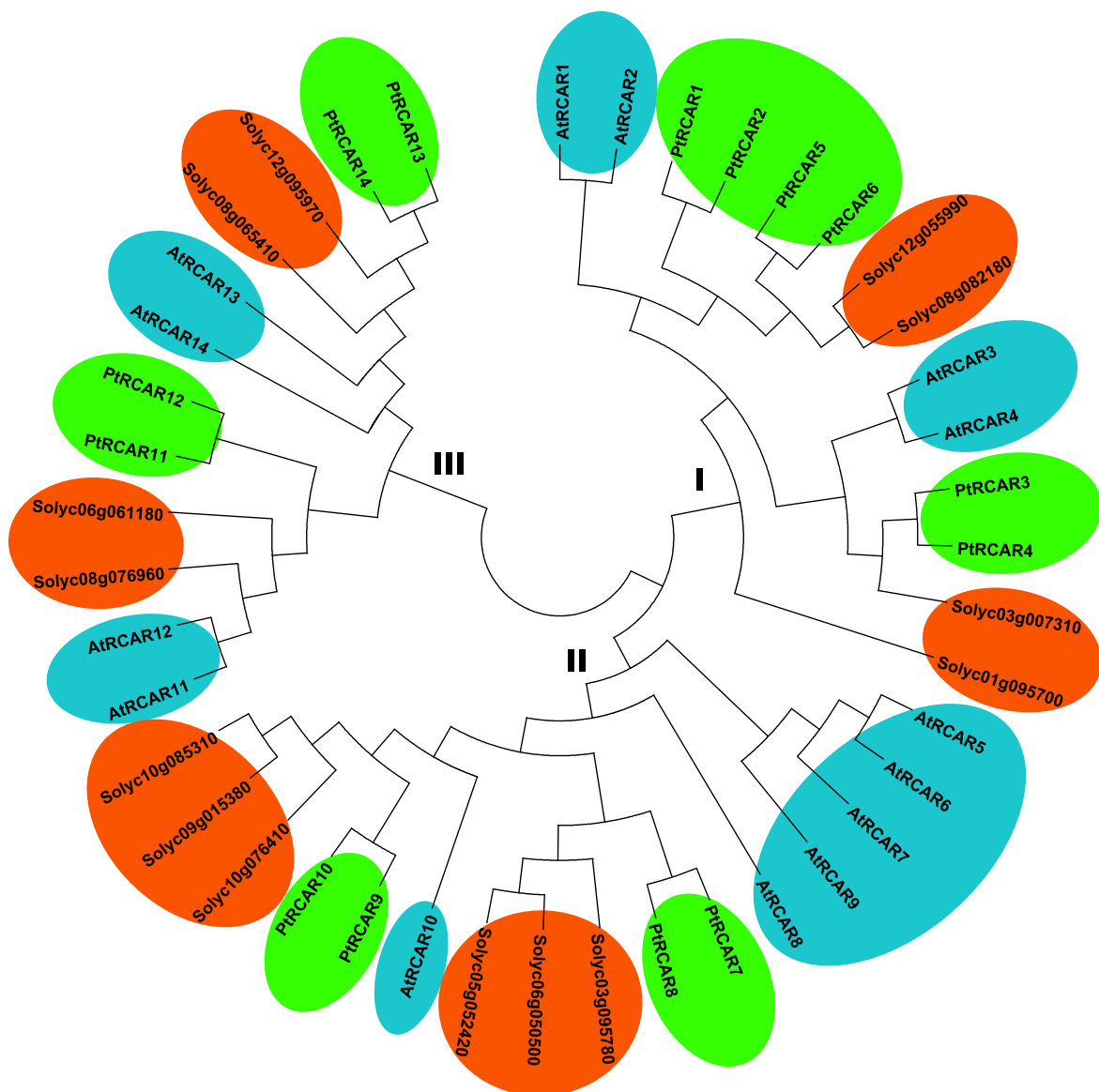


Abb. 3-1 Stammbaum von Arabidopsis, Pappel und Tomaten RCARs.

Phylogenetische Analyse basierend auf dem Neighbor-Joining-Algorithmus von RCARs in Arabidopsis (blau), Pappel (grün) und Tomate (orange). Die homologen Proteine gruppieren sich in den Unterfamilien I bis III, wobei die homologen Proteine näher miteinander verwandt sind, als die Proteine einer Spezies.

Auffallend war die starke Konservierung der *GATE* und *LATCH* Domänen, die wichtig für das Umschließen des gebundenen Liganden sind. So kommt es bei diesen Domänen bei Bindung des Phytohormones zu einer Konformationsänderung (Melcher et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a). Diese Aminosäurestrukturen sind ebenfalls in den potentiellen ABA-Rezeptoren der Sojabohne (Bai et al. 2013), Wein (Boneh et al. 2012), Erdbeere (Chai et al. 2011) und Tomate (Gonzalez-Guzman et al. 2014) konserviert. Das Prolin der *GATE* Domäne ist neben der ABA Perzeption auch

wichtig für die Interaktion mit den PP2Cs, was in Sojabohne gezeigt wurde (Bai et al. 2013). Dies und die starke restliche Konservierung der Proteine ließ bereits vermuten, dass die Pappelproteine an der Perzeption von ABA beteiligt sind (Abb. 2-3). Der Beweis für die Rezeptorfunktion konnte in Protoplasten erbracht werden. Die getesteten Pappel RCARs konnten die ABA Antwort in Protoplasten induzieren. In Arabidopsis wurde ebenfalls in Protoplasten gezeigt, dass alle 14 ABA Rezeptoren die ABA Antwort induzieren können (Fujii et al. 2009; Fuchs et al. 2014; Tischer et al. 2017).

Nicht nur in Arabidopsis lassen sich den einzelnen Unterfamilien bestimmte Muster in Bezug auf die ABA-abhängige Induktion der RCARs zuordnen. So ist Unterfamilie I bereits ohne exogen appliziertes ABA stark aktiv. Während einige Vertreter der Unterfamilie II ohne ABA Zugabe schwach aktiv sind, benötigen andere Vertreter ABA. Unterfamilie III ist ohne ABA bis auf RCAR13 nicht aktiv (Tischer et al. 2017). In der Pappel war kein eindeutiges Muster erkennbar: ohne ABA Zugabe waren bereits alle RCARs induziert, PcRCAR1, PcRCAR4 und PcRCAR13 bis zu 25-fach. Diese ABA unabhängige Induktion ließ sich durch zusätzliche Hormonzugabe für PcRCAR4, PcRCAR13 und PcRCAR14 weiter steigern. Die anderen PcRCARs waren nicht mehr stark durch Hormonzugabe weiter induzierbar (Abb. 2-12). Denkbar für die ABA unabhängige Induktion wäre eine gesteigerte Affinität der Pappelproteine zu ABA, sodass das endogene ABA Level bereits für die Induktion ausreichte. Ebenso möglich wäre ein gesteigertes Grundlevel an ABA in den Pappelprotoplasten. Die Messung des ABA Gehalts in Pappelprotoplasten zeigte jedoch kein erhöhtes Grundlevel (vgl. Abb. 2-15). ABA kann als Glucoseester-Konjugat in Vakuolen oder dem Apoplasten gespeichert werden (Lim et al. 2005). In Koniferen wurde gezeigt, dass 7'-Hydroxy-ABA als Speicherform von ABA unter anderen in dormanten Knospen vorhanden ist (Feurtado et al. 2007; Kong et al. 2009). Es bleibt fraglich, ob nicht diese Speicherform bei der Pappel durch die Protoplastierung, bzw. der nachfolgenden über-nacht Inkubation reaktiviert wird und folglich mehr aktives ABA in den Zellen vorhanden ist.

Werden die Induktionswerte in *aba2-1* Protoplasten betrachtet, in denen das endogene ABA Level reduziert ist (Gonzalez-Guzman et al. 2002), so war die ABA Abhängigkeit bei allen Pappel RCARs klar erkennbar (Abb. 2-14). Eine Ausnahme stellte PcRCAR9 dar, bei dem keine weitere Induktion durch ABA hervorgerufen werden konnte. Vergleichsweise ähnelten die Induktionswerte der Pappel RCARs denen von Arabidopsis

(Tischer et al. 2017). Die zwei Ausnahmen waren PcRCAR13 und PcRCAR14 mit einer vier- bis fünffach höheren Induktionsrate in Vergleich zu ihren Arabidopsis Homologen. Eine mögliche Erklärung kann erhöhte Proteinstabilität dieser ABA Rezeptoren im heterologen System sein. Es wurde gezeigt, dass die proteasomale Ubiquitinierung und Degradation von RCAR3 durch ABA inhibiert wird (Irigoyen et al. 2014). Dieser Mechanismus, dass ABA auf die Stabilität seiner Rezeptoren Einfluss nehmen kann, könnte auch bei PcRCAR13 und PcRCAR14 greifen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die erste und zweite Unterfamilie der Pappel RCARs in Bezug auf die ABA Abhängigkeit nicht unterscheiden und alle PcRCARs bis auf PcRCAR7 mit endogenem ABA Level bereits induzierten. Die dritte Unterfamilie, und PcRCAR7, zeigten eine starke ABA-abhängige Induktion der Rezeptoren, wie bei Arabidopsis (Abb. 2-14). Diese ABA-abhängige Induktion im Protoplastensystem zusammen mit den *in silico* Daten zeigen, dass die homologen RCARs aus Pappel als ABA-Rezeptoren fungieren.

Ebenso wie die ABA Rezeptoren sind auch die Ko-Rezeptoren im Pflanzenreich weit verbreitet. Bryophyten und Lebermoose weisen zwei PP2Cs der Subklasse A auf, Lycophyten drei (Sakata et al. 2014; Bowman et al. 2017). Reis besitzt acht PP2Cs, in Tomate wurden sieben Vertreter gefunden, doch nur vier davon zeigten Interaktionen mit ABA Rezeptoren (Sun et al. 2011; Ben-Ari 2012). Im Wein wurden neun Vertreter der Gruppe A PP2Cs nachgewiesen (Gambetta et al. 2010).

Bei den potentiellen Ko-Rezeptoren der Pappel wurde die gleiche Anzahl an Homologen Proteinen wie in Arabidopsis gefunden (Abb. 2-4). Wie bei den Rezeptoren, teilen sich die jeweiligen homologen Proteine mehr Aminosäuren, als die Proteine einer Spezies. Es sind, wie auch in Arabidopsis, drei Unterfamilien erkennbar (Tischer et al. 2017). Während die Proteinphosphatase PP2CA zwei homologe Proteine aufweist sind die drei HAI's auf zwei Homologe begrenzt. Die Unterfamilie mit ABI1/2 und HAB1/2 besitzt lediglich drei HAB Homologe. Die dritte Unterfamilie mit AHG1 zeichnet sich durch einen Aminosäureaustausch aus, welcher wichtig für die RCAR Interaktion ist. Das sonst konservierte Tryptophan, ist in Arabidopsis AHG1 durch Valin ersetzt (Dupeux et al. 2011a; Fuchs et al. 2013). In der Pappel kommen zwei Homologe AHG1 Proteine vor, bei denen das entsprechende Tryptophan durch Leucin ersetzt ist. Es weist ebenfalls hydrophobe Eigenschaften auf, ist aber um eine Kohlenstoffgruppe

größer. Beim AHG1 der Weinpflanze (*Vitis vinifera*), ist das Tryptophan durch die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Methionin substituiert (Boneh et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die getesteten Pappel PP2Cs eine inhibitorische Wirkung auf die ABA Signalkaskade nachgewiesen, was in Einklang mit den homologen PP2Cs aus Arabidopsis steht (Fuchs et al. 2014; Tischer et al. 2017).

3.1.3. Rezeptorkomplex-Kombinationen

Einige Untersuchungen aus Arabidopsis zeigten, welche RCARs mit den jeweiligen PP2Cs interagieren und die ABA Antwort auslösen (Fujii et al. 2009; Ma et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010; Zhao et al. 2013). Neben einer vollständigen Analyse der kombinatorischen Interaktionsmöglichkeiten von Rezeptoren und Ko-Rezeptoren in Hefe (Fuchs 2013) gibt es seit kurzem eine Analyse von möglichen RCAR-PP2C Kombinationen *in vivo* (Tischer et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen von Pappel RCARs mit Arabidopsis Phosphatasen im Hefe-zwei-Hybrid-System, als auch *in vivo* untersucht. Außerdem konnte die Regulation von einer Arabidopsis und Pappel PP2C durch Pappel RCARs *in vitro* gezeigt werden. Von den elf klonierten Pappel RCARs konnten mit den neun PP2Cs insgesamt 69 positive Interaktionen, von 99 möglichen, in Hefe nachgewiesen werden (Papacek et al. 2017). Dabei war auffallend, dass sich die einzelnen RCAR Unterfamilien durch spezifische Interaktionsmuster mit den PP2Cs auszeichneten.

Unterfamilie I reagierte konstitutiv, ABA-unabhängig mit den PP2Cs, wohingegen Unterfamilie III obligat ABA benötigte um funktionale Interaktionen auszubilden. Unterfamilie II stellte eine Mischform dar. Die Phosphatasen HAB2 und HAI1 konnten mit keinem der Pappel RCARs eine Interaktion eingehen, unabhängig davon, ob der Ligand vorhanden war, oder nicht. In Arabidopsis und Tomate konnte HAB2 mit den jeweiligen RCARs eine Interaktion eingehen. In beiden Fällen benötigte die Interaktion mit Unterfamilie III RCARs die Anwesenheit des Phytohormons (Fuchs 2013; Gonzalez-Guzman et al. 2014). Während HAI1 in Arabidopsis und Pappel mit keinem RCAR eine Interaktion zeigte, konnte es mit einem ABA-Rezeptor der Tomate interagieren (Gonzalez-Guzman et al. 2014).

Interaktionen mit AHG1 konnten nur für PcRCAR1, PcRCAR2, PcRCAR3 und PcRCAR9 in Gegenwart von ABA bestätigt werden. Dies entsprach weitgehend dem Muster der Arabidopsis RCARs. Neben RCAR1, RCAR3 und RCAR9 konnte auch RCAR5 eine positive Interaktion mit AHG1 eingehen (Fuchs 2013). Bei Tomate konnte keine Interaktion mit AHG1 detektiert werden, jedoch wurden nur zwei RCARs der Unterfamilie I getestet (Gonzalez-Guzman et al. 2014). Die Interaktion mit AHG1 ist in allen Fällen auf die RCARs der Unterfamilie I und RCAR9 begrenzt.

Dieses Interaktionsmuster, dass Unterfamilie I ABA unabhängig eine Interaktion mit den PP2Cs eingehen konnte und Unterfamilie III obligat ABA benötigte war auch in Sojabohne erkennbar (Bai et al. 2013). Das gleiche Interaktionsmuster der Unterfamilien war auch bei Pappel-Pappel-Protein-Interaktionen im Rahmen einer Bachelorarbeit zu erkennen (Wiedorn 2015) (vgl. Anhang, Abb. 5-4).

Neben den Dikotyledonen, besitzen auch Monokotyledonen wie Weizen (*Triticum aestivum*) oder Zwenken (*Brachypodium distachyon*) ABA Rezeptoren (Gordon et al. 2016; Zhang et al. 2017). Interaktionen mit den PP2Cs zeigten auch in Monokotyledonen das bereits erwähnte Muster der drei Unterfamilien in Bezug auf die ABA Sensitivität (Pri-Tal et al. 2017). Zusammenfassend zeigen RCARs der ersten Unterfamilie bereits ohne exogen appliziertes ABA eine Interaktion mit den PP2Cs, RCARs der dritten Unterfamilie benötigen hierfür ABA.

Neben Interaktionen von RCARs und PP2Cs wurden auch Regulationen von Arabidopsis PP2Cs durch spezie fremde RCAR Homologe wie Sojabohne, Tomate und Wein nachgewiesen (Li et al. 2012; Bai et al. 2013; Gonzalez-Guzman et al. 2014). In Arabidopsis wurden die Kombinationen der 14 RCARs mit einigen Proteinphosphatasen getestet (Ma et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010; Hao et al. 2011; Okamoto et al. 2013; Li et al. 2015; Wunschel 2017). Dabei konnte gezeigt werden, dass einige RCARs bereits ohne Ligand dazu in der Lage waren, Proteinphosphatasen zu inhibieren, was mit den Hefedaten in Einklang steht. Die Effizienz der inhibitorischen Wirkung variierte dabei unter den Arabidopsis RCARs (Wunschel 2017). Dies war auch bei den Pappel-Homologen der Fall. Die Effizienz für die Inhibierung der PP2Cs war zum einen RCAR-abhängig, zum anderen von der Proteinphosphatase.

Neben den Interaktionen in Hefe und *in vitro* blieb die Frage offen, ob sich die RCAR-PP2C Interaktionen auch in Pflanze realisieren lassen. Es wurden alle möglichen Kombinationen in *aba2*-Protoplasten getestet. Von den 55 möglichen Interaktionen gab es bereits 40 Interaktionen ohne, und 53 mit exogen appliziertem ABA. Erkennbar war zum einen die spezifische Regulierung der Phosphatasen durch die einzelnen RCARs, als auch eine Spezifität der RCARs.

Auffallend waren die RCARs der Unterfamilie III. Sie drängten in Gegenwart von ABA die RCARs der Unterfamilie I und II in den Hintergrund. In Arabidopsis sind RCARs der dritten Unterfamilie, außer RCAR13, als Dimere beschrieben (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Dupeux et al. 2011b). Studien zeigten, dass RCARs dieser Unterfamilie keine, bzw. eine schwache inhibierende Wirkung auf PP2Cs ohne ABA haben (Hao et al. 2011; Wunschel 2017). In Arabidopsis wurden 113 regulatorische Interaktionen gezeigt, 56 davon bereits ohne exogen appliziertes ABA. Diese ABA-unabhängigen Interaktionen waren wieder primär der Unterfamilie I zuzuschreiben (Tischer et al. 2017). Die Pappelrezeptoren der Unterfamilie I waren ohne ABA bereits ebenfalls induziert, was für die RCARs der Unterfamilie III bis auf in Kombination mit PchAB1 nicht zutrifft. Für die Pflanze könnte dies bedeuten, dass RCARs der dritten Unterfamilie bei Stress, wenn ABA gebildet wird und in hoher Konzentration in der Pflanze vorliegt, die Regulation übernehmen. Ist der Stresspegel und die ABA Konzentration gering, regulieren RCARs der ersten Unterfamilie die ABA Antwort.

Zusammenfassend kann folgendes Modell für die Unterfamilien aufgestellt werden: die RCARs der Unterfamilie I, welche bereits ohne exogenes ABA mit den PP2Cs interagieren können scheinen die ABA Regulation unter nicht Stressbedingungen zu regeln. Erhöht sich das Stresslevel, und somit auch die ABA Konzentration in der Pflanze, werden RCARs der Unterfamilie III wirksam. Durch die hohen ABA Konzentrationen können sie die entsprechenden PP2Cs inhibieren und somit die ABA abhängige Genexpression regulieren. Die stabilisierende Wirkung von ABA auf die Interaktion wurde bereits früher gezeigt (Park et al. 2009). Unterfamilie II stellt eine Mischform dar. Es liegt also auf der Hand, dass RCARs und PP2Cs bereits ohne ABA interagieren können und die Bindung von ABA an den Rezeptor eine stabilisierende Wirkung auf den RCAR-PP2C Komplex hat und die Inaktivierung der PP2C begünstigt. Bei Anwesenheit von Stress sind deutlich mehr PP2Cs inhibiert, was verstärkt Ionenkanäle und die Genexpression reguliert (Abb. 3-2).

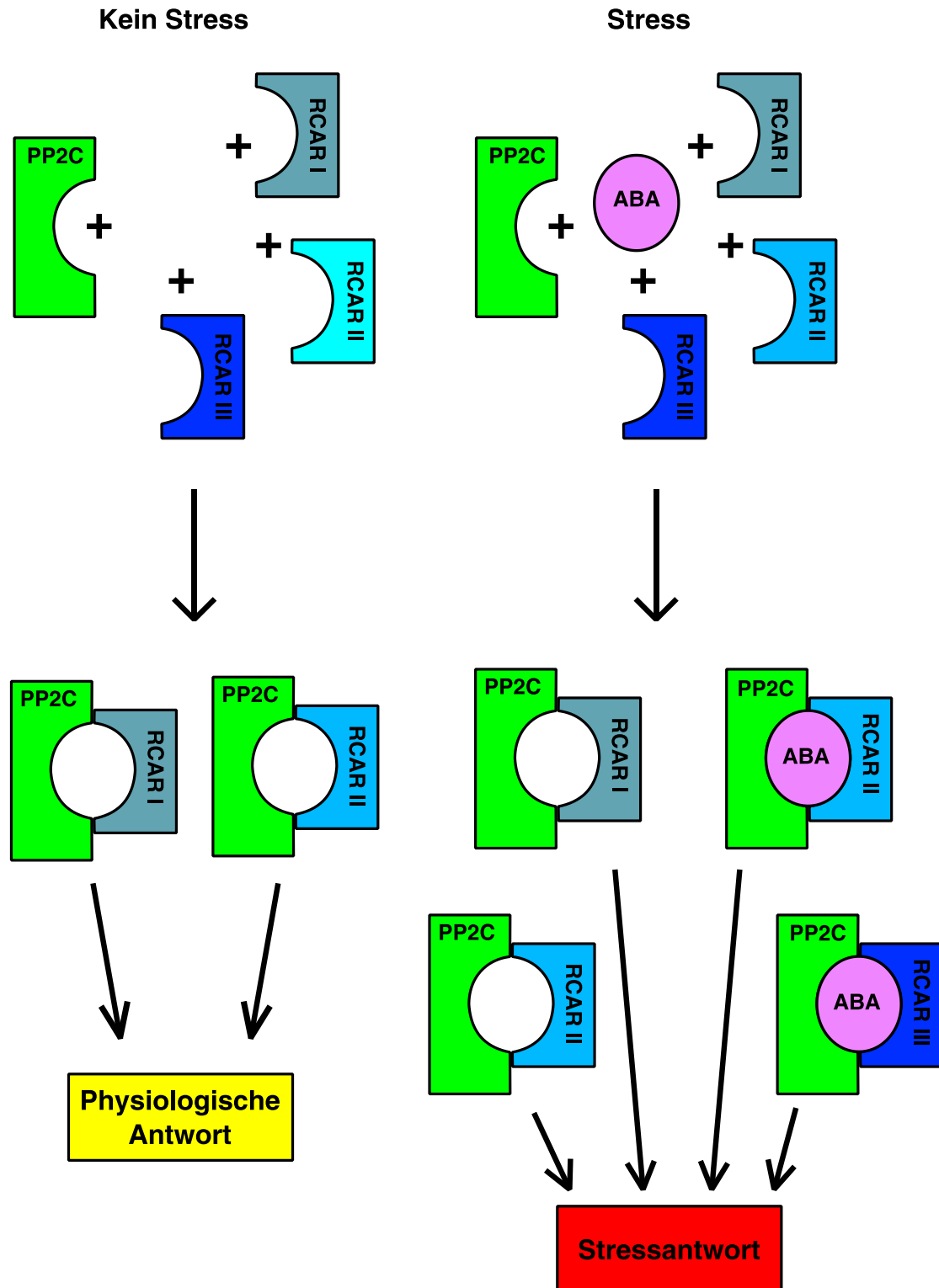


Abb. 3-2 Schematische Darstellung einer möglichen ABA Signaltransduktion

Modell einer ABA abhängigen Signaltransduktion. Die RCARs der ersten (RCAR I) und zweiten Unterfamilie (RCAR II) können bereits ohne ABA eine Interaktion mit den PP2Cs eingehen und halten die physiologische Signalkaskade aufrecht. Die RCARs der Unterfamilie III (RCAR III) und einige RCARs der Unterfamilie II werden bei steigenden Stresslevel aktiv. Sie benötigen ABA um die Interaktion einzugehen. Somit sind bei der Stressantwort mehr RCAR-PP2C Interaktionen aktiv.

Bei den PP2Cs stellt AHG1 eine Sonderrolle dar. PcAHG2 wurde fast ausschließlich durch RCARs der Unterfamilie I (PcRCAR1 bis PcRCAR6) inhibiert. Arabidopsis AHG1 wurde auch *in vitro* ausschließlich durch RCARs der ersten Unterfamilie und RCAR9 reguliert (Abb. 2-17). Die Ergebnisse aus dem Hefe-zwei-Hybrid-System wurden somit in Protoplasten bestätigt. Es wurde gezeigt, dass für RCAR-AHG1 Interaktion drei Aminosäurereste im Interaktionsbereich von RCAR und PP2C ausschlaggebend sind. RCAR4, welches sich in diesen drei Aminosäuren unterscheidet und AHG1 nicht regulieren kann, konnte durch Überführung in die jeweiligen Aminosäuren wie sie in RCAR1-3 vorkommen, AHG1 regulieren (Tischer et al. 2017). Diese drei Aminosäuren - Aspartat, Tyrosin und Lysin - sind ebenfalls in der Pappel RCAR Unterfamilie I vorhanden, was die wenn auch schwache Regulation von PcAHG2 mit Unterfamilie I RCARs erklären kann (Abb. 3-3).

Arabidopsis RCAR	R1	155	K	D	E	T	C	Y	F	V	E	A	L	I	R	C	N	L	K	S
	R2	157	K	D	D	T	C	Y	F	V	E	S	L	I	K	C	N	L	K	S
	R3	153	K	D	E	T	C	Y	F	V	E	A	L	I	K	C	N	L	K	S
	R4	149	K	E	E	T	C	F	F	V	E	A	L	I	Q	C	N	L	N	S
	R5	131	E	E	E	T	T	S	F	A	D	T	V	V	G	F	N	L	K	S
	R6	130	E	E	E	T	L	F	A	D	T	V	G	C	N	L	R	S		
	R7	137	E	E	D	T	I	F	F	V	D	N	I	I	R	Y	N	L	T	S
	R8	178	E	E	E	T	L	S	F	V	D	T	I	V	R	C	N	L	Q	S
	R9	186	K	E	E	T	C	S	F	A	D	T	I	V	R	C	N	L	Q	S
	R10	172	K	E	E	T	C	D	F	V	D	V	I	V	R	C	N	L	Q	S
	R11	153	E	D	D	T	R	M	F	A	D	T	V	V	K	L	N	L	Q	K
	R12	183	E	E	D	T	R	L	F	A	D	T	V	I	R	L	N	L	Q	K
	R13	182	E	E	D	T	R	M	F	V	D	T	V	V	K	S	N	L	Q	N
	R14	159	E	E	D	T	K	M	F	V	D	T	V	V	K	L	N	L	Q	K
I																				
Pappel RCAR	R1	149	K	D	E	T	C	Y	F	V	K	A	L	I	R	C	N	L	K	S
	R2	149	K	D	E	T	C	Y	F	V	K	A	L	I	R	C	N	L	K	S
	R3	154	K	D	E	T	C	Y	F	V	E	A	L	I	K	C	N	L	K	S
	R4	154	K	D	E	T	C	Y	F	V	E	A	L	I	K	C	N	L	K	S
	R5	153	K	D	E	T	C	Y	F	V	E	A	L	I	K	C	N	L	K	S
	R6	153	K	D	E	T	C	Y	F	V	E	A	L	I	K	C	N	L	K	S
	R7	179	K	E	D	T	C	S	F	L	D	T	I	V	R	C	N	L	Q	S
	R8	179	K	E	D	T	C	S	F	I	E	T	I	V	R	C	N	L	Q	S
	R9	186	K	E	D	T	C	V	F	V	D	T	I	V	R	C	N	L	Q	S
	R10	187	K	E	D	T	C	V	F	V	D	T	I	V	R	C	N	L	Q	S
	R11	248	E	E	D	T	R	L	F	A	D	T	V	V	K	L	N	L	Q	K
	R12	178	E	E	E	A	R	L	F	A	D	T	V	V	K	L	N	L	Q	K
	R13	161	V	E	D	T	E	M	F	V	D	T	V	V	K	L	N	L	Q	K
	R14	159	G	E	D	T	K	M	F	V	D	T	V	V	K	L	N	L	Q	K
II																				
III																				

Abb. 3-3 Ausschnitt des Proteinalignments der Arabidopsis und Pappel RCARs.

Die konservierten Aminosäuren der Unterfamilie I, die für die Interaktion mit AHG1 wichtig sind, sind mit gelb hinterlegt. Die Zahlen geben die Position der ersten Aminosäure in der Proteinstruktur wieder.

Es wurde gezeigt, dass die Pappel ABA Rezeptoren ihre Ko-Rezeptoren als solche auch *in vivo* regulieren können. Keine Interaktion von ABA Rezeptor und Ko-Rezeptor kann aber auch bedeuten, dass die zu exprimierenden Proteine nicht in ihrer aktiven Form vorliegen. So ist es durchaus möglich, dass *in planta* mehr Kombinationen realisierbar sein könnten. Auf der anderen Seite ist jedoch zu beachten, dass die Proteine im Protoplastensystem unter einem konstitutiv aktiven Promotor in den Zellen exprimiert werden. Dies muss wiederum nicht heißen, dass die Proteine unter ihren endogenen Promotoren in der intakten Pflanze auch zum gleichen Zeitpunkt im gleichen Gewebe exprimiert werden. Trotz dieser Limitationen konnte die Analyse einen Einblick in die Vielfalt der regulatorischen Möglichkeiten der ABA Signaltransduktion in Pappel geben.

3.2. Ein ABA Rezeptor als LA Rezeptor

Die ABA Rezeptoren gehören zur Bet V 1 Superfamilie, deren Vertreter mehrere Liganden binden können (Radauer et al. 2008). Immer wieder stellte sich die Frage, ob die Stressantwort über RCARs nicht durch mehrere Liganden induziert werden kann. Bereits mit der Entdeckung der RCARs, einerseits über die Interaktion mit PP2Cs (Ma et al. 2009), andererseits über den synthetischen Wachstumsinhibitor Pyrabactin (Park et al. 2009) wurde klar, dass die Wechselwirkungen zwischen RCAR und Ligand durchaus flexibel sind. Es wurde weiter gezeigt, dass einige Vorstufen von ABA, bzw. deren Abbauprodukte die ABA-Antwort auslösen können. Die Vorstufen wurden zum Großteil in der Pflanze zu aktiven ABA umgewandelt (Raschke et al. 1975; Parry et al. 1991; Yamomoto and Oritani 1996). Weng et al. zeigten jedoch, dass Phaseinsäure (PA), ein ABA-Abbauprodukt, für einige RCARs, wie RCAR1, RCAR3 und RCAR5 ein effektiver Ligand für die PP2C Inhibierung ist (Weng et al. 2016). Die Sensitivität gegenüber ABA ist jedoch weitaus höher als gegenüber PA. Dies steht im Einklang mit Kepka et al., welche eine ABI2-Regulation mit RCAR1, RCAR3 und RCAR11 und PA zeigten (Kepka et al. 2011). Die Frage bleibt allerdings, ob es andere natürlich vorkommende Liganden für die ABA-Rezeptoren gibt.

Neben den ABA Rezeptoren der Pappel wurden in dieser Arbeit ebenfalls Analysen mit den ABA Rezeptoren aus *Marchantia polymorpha* durchgeführt. Die Lebermoose sind für die Fragestellung, ob es andere Liganden für RCARs gibt ein gutes System, da sie neben ABA auch Lunularsäure (LA) besitzen. Wie gezeigt wurde, ist LA bei *Lunaria cruciata* verantwortlich für die Induktion und Aufrechterhaltung der Dormanz, was in höheren Pflanzen durch ABA übernommen wird (Valio et al. 1969; Pryce 1971). Diese Analogie spiegelt sich in ähnlichen chemischen Eigenschaften von ABA und LA wieder (Abb. 3-4). Entscheidend für die Bindung von ABA zu RCAR sind die polaren Interaktionen. LA fehlt am C1'-Atom im Vergleich zu ABA eine Alkoholgruppe, hat allerdings eine zusätzlich am C15-Atom. Bereits 2002 stellten Yoshikawa und Kollegen die These auf, dass LA und ABA an den gleichen Rezeptor binden, da beide Moleküle das Wachstum von *Lunularia cruciata* inhibierten. Diese Aussage wurde verstärkt durch die berechnete *in silico* Überlagerung von ABA mit LA (Yoshikawa et al. 2002).

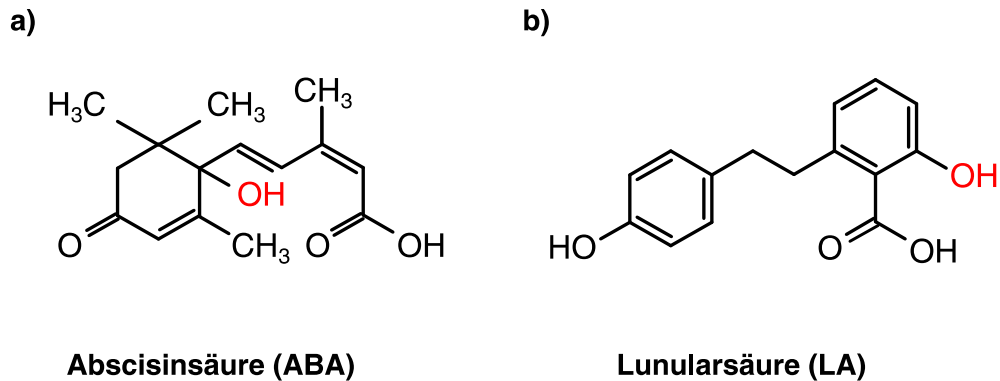


Abb. 3-4 Strukturen von Abscisin- und Lunularsäure

Ähnlichkeiten von a) ABA und b) LA mit den polaren Gruppen, die essentiell für die Bindung zu RCAR Proteinen in der Bindetasche sind. Während ABA eine zusätzliche polare Gruppe am C1'-Atom besitzt, hat LA eine zusätzliche Alkoholgruppe am C15-Atom (rot gekennzeichnet).

Werden die ähnlichen polaren Gruppen von ABA und LA zusammen mit der Tatsache betrachtet, dass die hydrophoben Interaktionen der Bindetasche des RCARs und dem Liganden ausreichend Flexibilität besitzen um auch andere Moleküle aufzunehmen und zu stabilisieren (Wunschel 2017), könnte es durchaus möglich sein, dass LA ein alternativer Ligand für die RCARs ist.

Zunächst wurde mit dieser Arbeit bestätigt, dass drei der fünf vorhandenen *Marchantia* RCAR Proteine als ABA Rezeptoren dienen (Abb. 2-24). Des Weiteren wurde gezeigt, dass MpRCAR2 eine Sonderstellung der fünf *Marchantia* RCARs besitzt. Neben ABA konnte das Protein auch durch LA induziert werden (Abb. 2-25).

Darüber hinaus war es möglich, einen ternären Komplex von MpRCAR2 und PP2C mit LA, statt mit ABA, zu bilden. So konnte die spezieeigene Proteinphosphatase MpABI1 durch MpRCAR2 und LA reguliert werden. Ebenfalls konnten speziefremde Arabidopsis PP2Cs durch die Kombination mit MpRCAR2 und LA reguliert werden (Abb. 2-27). Somit wurde zum ersten Mal der Nachweis erbracht, dass RCARs mehr natürlich vorkommende Liganden außer ABA besitzen. Wenn also ein *Marchantia* RCAR durch LA induziert werden konnte stellte sich weiter die Frage, ob dies auch für die Arabidopsis RCARs gilt. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden; die Interaktion und Induktion der getesteten *Marchantia* und Arabidopsis Proteine mit LA beschränkte sich auf MpRCAR2.

Wird die Tertiärstruktur von MpRCAR2 mit den restlichen RCARs verglichen, kommen einige Aminosäuren ausschließlich in MpRCAR2 vor, welche die Interaktion mit LA erklären könnten. Durch ortsspezifische Mutagenese konnte die Induktion von

MpRCAR2 durch LA verhindert werden. Mutiert wurden drei Aminosäuren, welche exklusiv in MpRCAR2 vorhanden sind (Abb. 3-5). Während die Einzelmutation nur einen leichten Effekt zeigte, war die Doppelmutation am Zugang der Bindetasche und in der *LATCH* Domäne sehr viel effektiver. Dies deutet darauf hin, dass diese Aminosäuren einen entscheidenden Beitrag zur Etablierung des Interaktionsnetzwerkes von LA mit den RCARs leisten. Die Annahme, dass das durch Histidin substituierte Asparagin bei MpRCAR2 den zentralen Kern des Interaktionsnetzwerkes darstellt (Wunschel 2017), konnte nicht bewiesen werden, da diese Mutation (H187N) nur einen leichten Effekt zeigte.

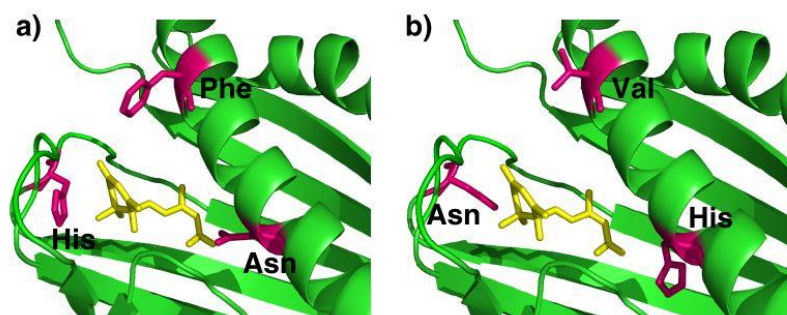


Abb. 3-5 Vergleich der Bindetaschen von RCAR1 und MpRCAR2

Bindetasche von a) RCAR1 und b) MpRCAR2 mit ABA (gelb). Die Aminosäuren in magenta wurden bei MpRCAR2 durch die des RCAR1 mutiert. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf dem PdB: 4JDL.

Diese Analysen zeigten, dass LA durchaus in der Lage ist einen ABA Rezeptor anzusprechen. Die nachfolgende Regulation von Proteinphosphatasen erklärt die beobachtete ähnliche biologische Funktion von LA und ABA. Während ABA die Stressantwort und Dormanz in höheren Pflanzen über die RCAR-Rezeptoren regelt, könnte in Cyanobakterien und Algen, welche keine ABA Rezeptoren besitzen, diese Rolle LA zumindest teilweise übernehmen. Nachfolgendes Modell vergleicht die ABA Signalwege in *Arabidopsis*, bzw. *Populus* und *Marchantia polymorpha* (Abb. 3-6).

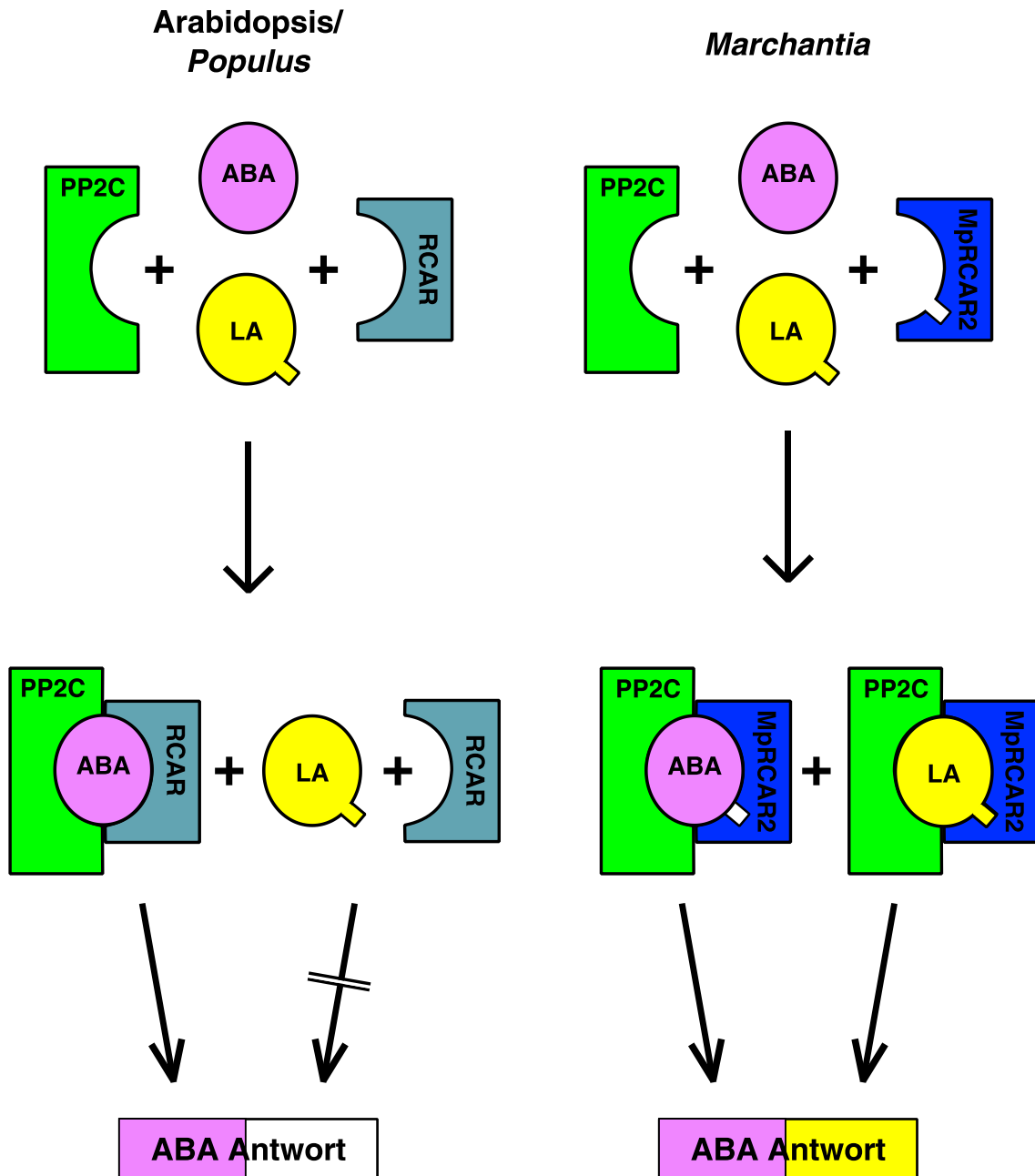


Abb. 3-6 Schematische Darstellung einer möglichen ABA Signaltransduktion in *Arabidopsis*, *Populus* und *Marchantia*

Durch die ABA Bindung an das RCAR wird der ternäre Komplex mit der Proteinphosphatase ausgebildet. Im Lebermoos *Marchantia polymorpha*, kann der ABA Rezeptor MpRCAR2 neben ABA auch LA binden. Dadurch kommt es einerseits zu physiologischen Reaktionen der Pflanze wegen ABA, als auch wegen LA. In *Arabidopsis* können die ABA Rezeptoren nicht durch LA induziert werden.

3.3. Physiologische Funktion von Pappel RCARs

Es wurde bereits gezeigt, dass es sich bei den homologen Pappel RCARs und PP2Cs um funktionale ABA Rezeptoren und Ko-Rezeptoren handelt. Im Weiteren geht es um die physiologische Rolle der RCAR Proteine, ihren Stellenwert in der Samenkeimung und Wurzelwachstum und schließlich bei der Trockenresistenz.

3.3.1. Samenkeimung und Wurzelwachstum

Wie bereits erwähnt, fungiert Abscisinsäure als Wachstumsinhibitor. So ist es bei der Embryoreifung und Aufrechterhaltung der Dormanz aktiv (Karssen et al. 1983). Somit ist die Perzeption und Weiterleitung von ABA ein wichtiges Signal in der Bewertung von ungünstigen Umgebungsbedingungen für die Pflanze.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von Arabidopsis RCARs eine ABA Hypersensitivität in Bezug auf die Samenkeimung zur Folge hat (Ma et al. 2009; Santiago et al. 2009b; Tischer 2016). Analog wurde für Arabidopsis RCAR Knockoutlinien eine ABA Insensitivität beobachtet (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Antoni et al. 2013).

In dieser Arbeit wurden Arabidopsislينien mit ektopischer Expression von Pappel RCARs generiert und bezüglich ihres Keimungsverhalten untersucht. In Anwesenheit von ABA, was ungünstige Umweltbedingungen simulieren sollte, wurde für jede Linie eine ABA-hypersensitive Reaktion beobachtet. So war die Keimung im Vergleich zum Wildtyp stark herabgesetzt. Yu et al. exprimierten ein Pappel RCAR der dritten Unterfamilie in Arabidopsis und konnten ebenfalls eine ABA-hypersensitive Reaktion in der Samenkeimung beobachten (Yu et al. 2016). Während bei Tomaten RCARs, ein Vertreter der dritten Unterfamilie die Keimung in Anwesenheit von Abscisinsäure nicht inhibierte, war sie bei RCARs der zwei anderen Unterfamilien im Vergleich zum Wildtyp deutlich inhibiert (Gonzalez-Guzman et al. 2014). Ein ABA-hypersensitiver Phänotyp auf die Keimung wurde auch bei einem Reis Homologen, OsRCAR5 beobachtet (Kim et al. 2012).

Wird die Rolle der Proteinphosphatasen bei der Samenkeimung betrachtet gilt analog, dass Überexpression von PP2Cs einen ABA-insensitiven Phänotyp verursachen. So wurde von Arshad & Mattsson gezeigt, dass die Überexpression der Pappel Proteinphosphatase PP2CA2 in Gegenwart von 5 μ M ABA im Vergleich zum Wildtyp Col-0

noch keimen kann (Arshad and Mattsson 2014). Gleiches gilt für das Arabidopsis Homolog PP2CA. Auch hier konnten Überexpressionslinien in Gegenwart von ABA keimen (Kuhn et al. 2006). Ein anderes Beispiel, dass der ABA Signalweg bei Pappel in der Samenkeimung konserviert ist, belegt die Proteinphosphatase HAB1. Chen et al. zeigten, dass das Homolog zu HAB1 aus *Populus euphratica* in Arabidopsis bei Überexpression einen ABA insensitiven Phänotyp zeigte und somit konsistent mit der HAB1 Überexpression in Arabidopsis ist (Saez et al. 2004; Chen et al. 2015).

Es liegt somit nahe, dass die Proteinphosphatasen PP2CA2 und HAB1 aus Pappel eine Rolle in der Keimung besitzen. Eine genaue Aussage über die Relevanz der getesteten RCARs in Kombination mit den vorkommenden PP2Cs bei der Aufrechterhaltung der Samenruhe und des Wurzelwachstums ist jedoch schwierig, da keine Expressionsdaten von RCARs in Pappelsamen existieren, und die Expression in Arabidopsis unter einem konstitutiven Promotor den wirklichen Sachverhalt nicht widerspiegelt.

Neben der Rolle bei der Dormanz besitzt Abscisinsäure auch eine wichtige Funktion im Wurzelwachstum (Himmelbach et al. 1998; Spollen et al. 2000). In niedriger Konzentration wirkt das Hormon aktivierend, in höheren Konzentrationen inhibierend auf das Wurzelwachstum (Zeevaart and Creelman 1988).

In dieser Arbeit wurde der Effekt unterschiedlicher Pappel RCARs auf das Wurzelwachstum untersucht. So kam es im submikromolaren Bereich zu einer Inhibierung für die Linien der Unterfamilie II. Die ABA-Hypersensitivität von RCAR9 und RCAR10 konnte auch bei den Pappel Homologen PcRCAR9 und PcRCAR10 bestätigt werden (Pizzio et al. 2013; Tischer 2016). Unterfamilie III hatte keine oder nur eine geringe Auswirkung auf das Wurzelwachstum, was mit den Daten aus Arabidopsis konsistent war. Arabidopsis RCAR13 zeigte eine schwache Inhibierung der Wurzelelongation, RCAR14 unterschied sich nicht zum Wildtyp (Tischer 2016). Ähnlich gestaltete sich das Verhalten der Unterfamilie III RCARs bei Tomate. Bei der Überexpression eines Unterfamilie III RCARs war keine Hypersensitivität gegenüber ABA in der Keimung erkennbar. Die Wurzellänge wurde jedoch durch dieses RCAR in Anwesenheit von ABA inhibiert (Gonzalez-Guzman et al. 2014). In Sojabohne wurde gezeigt, dass die Überexpression eines RCARs den ABA-insensitiven Phänotyp retten konnte (Bai et al. 2013). Diese Daten implizieren, dass die getesteten RCARs der Unterfamilie II durchaus eine Funktion im Wurzelwachstum besitzen. Des Weiteren zeigte Arend et al.,

dass bei Überexpression der Pappel-PP2C-Mutante, *abi1*, das Seitenwurzelwachstum in Pappel beeinträchtigt ist und die Wurzel-Biomasse signifikant reduziert ist (Arend et al. 2009). Außerdem zeigten die Pappelpflanzen eine reduzierte Sensitivität gegenüber ABA.

3.3.2. Trockenresistenz

Neben der Wirkung auf die Samenkeimung und das Wurzelwachstum hat Abscisinsäure auch einen Effekt auf die Regulierung der Stomata (Kim et al. 2010). Das Öffnen, bzw. Schließen der Stomata hat direkt Einfluss auf den CO₂ Gradienten zwischen der Umgebung und der Atemhöhle der Spaltöffnung (Farquhar et al. 1989; Franks et al. 2013). Dieser Gradient ist der entscheidende Faktor für die photosynthetische Wassernutzeffizienz (Yang et al. 2016). Es ist bekannt, dass sich die Wassernutzeffizienzen in den einzelnen Ökotypen von *Arabidopsis* unterscheiden. Außerdem kann die WUE bei Trockenstress um den Faktor zwei gesteigert werden (Medrano et al. 2002; Rizza et al. 2012). Diese Gegebenheit wird bereits bei der Wasserdefizitbewässerung genutzt. Zusätzlich werden dadurch Wasserressourcen geschont, was in heutiger Zeit wegen dem Klimawandel von enormer Bedeutung ist. Seit 1950 stieg die Oberflächentemperatur der Erde um 1° - 3° C an. Gleichzeitig nahm die Niederschlagsmenge, v.a. über Afrika, dem südlichen Europa, Asien und Zentralamerika ab (Abb. 3-7). Die Häufung und Schwere von Trockenperioden nimmt zudem immer weiter zu (Sheffield and Wood 2008; Dai 2011). Asseng und Kollegen prognostizierten die Reduktion der globalen Weizenproduktion um 6 % pro Temperaturerhöhung um 1° C (Asseng et al. 2015). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, Pflanzen zu züchten, die mit den vorhandenen Wasserressourcen besser haushalten können. Eine gesteigerte Wassernutzeffizienz ist aber meistens auch an Einbußen im Ernteertrag gekoppelt (Blum 2005; Morison et al. 2008; Kenney et al. 2014).

In Studien mit *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass eine Überexpression von RCARs Trockenresistenz vermittelt (RCAR1) (Zhao et al. 2016), den Wasserverbrauch minimiert (RCAR8) (Santiago et al. 2009b), oder die Wassernutzeffizienz steigert (RCAR6, RCAR8, RCAR9 und RCAR10) (Pizzio et al. 2013; Yang et al. 2016). In allen Fällen wurden bereits vorhandene Proteine, nämlich ABA Rezeptoren, in ihrer Expression verstärkt. So konnte die Trockenresistenz durch das Potential der eigenen Pflanze erreicht werden.

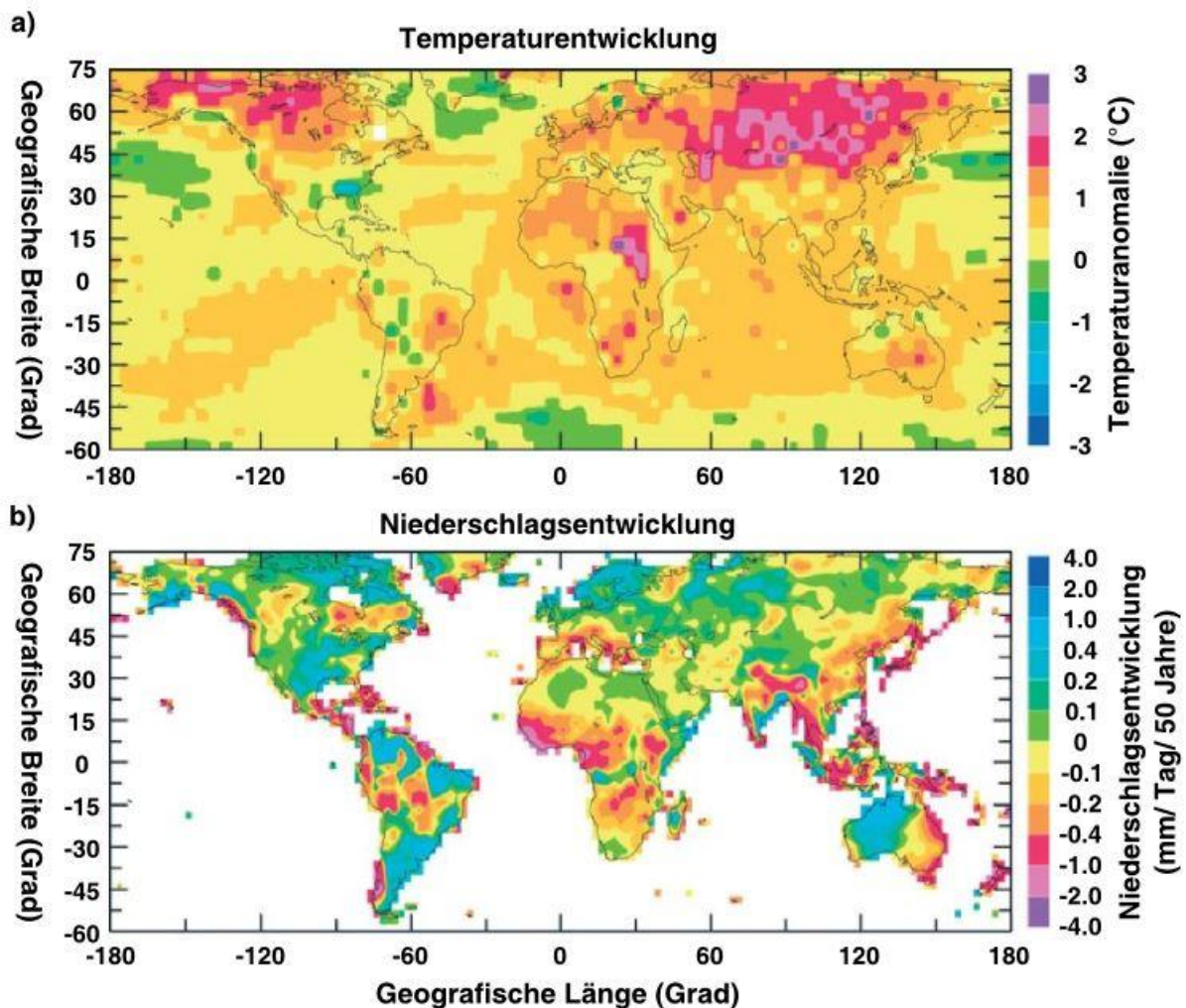


Abb. 3-7 Entwicklung von Temperatur und Niederschlagsmenge.

a) Temperaturentwicklung der Erdoberfläche von 1950 bis 2008 gemessen in °C. b) Weltweite Entwicklung der Niederschlagsmenge. Abbildung modifiziert nach Dai (2011).

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Pappel-RCARs auf ihre Auswirkung auf die WUE in *Arabidopsis* getestet. Hierfür wurden den Pflanzen Niederschlagsausfälle durch fortschreitenden Trockenstress simuliert. Die WUE am Ende des Trockenstressversuchs war in den transgenen Pflanzen um ca. 30 % verbessert, was stimmig mit den Versuchen mit *Arabidopsis* RCARs ist (Yang et al. 2016).

Neben der errechneten Wassernutzeffizienz aus Biomasse und Wasserverbrauch beschreibt die photosynthetische, oder instantaneous Wassernutzeffizienz (insWUE) das Verhältnis von Netto-CO₂-Assimilationsrate (A_n) zu stomatärer Leitfähigkeit (g_s). Durch dieses Verhältnis kann die insWUE entweder durch die Erhöhung der Assimilationsrate bei gleichbleibender stomatärer Leitfähigkeit verbessert werden, oder durch reduzierter stomatärer Leitfähigkeit bei gleichbleibender Assimilationsrate, bzw. Kombinationen daraus.

Durch Gaswechselfmessungen wurde ersichtlich, dass bereits in der Wachstumsphase, in denen die Pflanzen noch keinen Wasserstress erfahren mussten, eine gesteigerte Wassernutzeffizienz von bis zu 50 % in den PcRCAR10-Linien vorlag. Während die Assimilationsrate der Linien vergleichbar war, war die stomatäre Leitfähigkeit der PcRCAR10-Linien reduziert, was zu einer erhöhten insWUE führte.

In Arabidopsis konnte durch Überexpression von RCAR6 und RCAR10 die insWUE um bis zu 40% gesteigert werden (Yang et al. 2016). Die anderen RCARs zeigten keine gesteigerte oder geringere insWUE bei Überexpression. Bei den ABA Rezeptoren, die eine gesteigerte insWUE zeigten, handelt es sich bei Pappel und Arabidopsis um Vertreter der zweiten Unterfamilie. Diese Proteine wurden als moderate ABA Rezeptoren beschrieben, die mit dem endogenen ABA-Gehalt bereits eine moderate ABA Antwort auslösen können. Es ist denkbar, dass auch in Pappel die RCARs der zweiten Unterfamilie für die Steigerung der WUE nutzbar sind. Da die gesteigerte insWUE bereits in der Nicht-Stressphase erkennbar war, stellt die Verwendung von Gaswechselfmessungen ein gutes Mittel dar, um RCAR-abhängige Effekte in Bezug auf die Trockenresistenz zu evaluieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben transgenen Arabidopsis auch Pappeln transformiert. Es wurden mehrere unabhängige Linien mit ektopischer Expression von PcRCARs generiert und durch Gaswechselfmessungen an Blättern analysiert. Dabei zeigte eine der getesteten Linien eine gesteigerte insWUE von über 20 %. Anders als bei Arabidopsis, war das Pappel RCAR ein Vertreter der ersten und nicht der zweiten Unterfamilie. Durch die starke Konservierung der Arabidopsis und Pappel Proteine war anzunehmen, dass auch in Pappel nur RCARs der zweiten Unterfamilie zielführend sind; also ein ABA Rezeptor, der bereits ohne ABA aktivierend wirkt, aber nicht zu stark.

Die restlichen getesteten PcRCARs zeigten keine Verbesserung der insWUE. Da die Transformation der Pappel sehr zeitintensiv ist und die Ergebnisse aus Arabidopsis (Yang et al. 2016) zum damaligen Zeitpunkt noch nicht vorlagen, wurde nur ein RCAR der Unterfamilie II in Pappel transformiert. Diese Überexpression zeigte aber nicht die erwartete, verbesserte insWUE. Die Redundanz der RCARs und die Erfahrungen aus Arabidopsis zeigten, dass es notwendig ist die Analyse auf alle PcRCARs auszuweiten. Jedoch ist neben dem Transformationsaufwand auch die Umsetzung des fortschreitenden Trockenstresses und die Gaswechselfmessungen bei Pappeln technisch nicht einfach zu realisieren.

Während bei *Arabidopsis* die ganze Pflanze in Bezug auf ihren Gasaustausch in einer geschlossenen Messkammer analysiert werden konnte, ist aufgrund der Größe bei den Pappeln nur die Messung von einzelnen Blättern möglich. Schwierig ist hierbei die Vergleichbarkeit von gleich alten, gleich entwickelten Blättern. Dadurch, dass die Pappeln vegetativ vermehrt werden, sind unterschiedliche Anfangsbedingungen wie Biomasse oder Zustand der jeweiligen Achselknospe ausschlaggebend für das nachfolgende Wachstum und die Vitalität der Pflanze. Da in dieser Arbeit PcRCAR10 in *Arabidopsis* in Bezug auf die insWUE gute Erfolge brachte, sollte dieses Pappel RCAR weiter in transgenen Pappeln getestet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die ektopische Expression eines ABA Rezeptors in Pappel die insWUE verbessert werden konnte. Es wird angenommen, dass die Pappel mit weniger Wasser auskommt und trockenresistenter ist. Diese Daten stehen im Einklang mit den Experimenten von Yu und Kollegen. So zeigte die Überexpression von PtRCAR8 und einer N-terminal verkürzten Version von PtRCAR11 eine verbesserte Trockenresistenz in einem Pappelhybrid (*Populus davidiana* x *Populus bolleana*) (Yu et al. 2017). Diese Ansätze zur Verbesserung der Trockenresistenz nutzen das Potential der Pflanze. Es stellt sich die Frage, warum die Pflanze nicht selbst im Laufe der Evolution die Expression der RCARs hochregulierte, um sich in trockenere Gebiete auszubreiten. Das Merkmal Wasser zu sparen steht wahrscheinlich nur dann unter Selektion, wenn in der unmittelbaren Nachbarschaft keine Pflanzen stehen, die das „eingesparte“ Wasser verbrauchen. Die sparsame Pflanze hat keinen Vorteil, denn wenn Niederschläge ausbleiben und es trockener wird, haben die umgebenden Pflanzen das Wasser bereits verbraucht.

Die Frage bleibt allerdings, inwieweit die verbesserte insWUE zur dauerhaften Anpassung an trockeneres Klima beitragen kann. Darüber hinaus stellt der Boden eine wichtige Grundvoraussetzung für den Ertrag von Pflanzen dar. So kommt es auf die Bodentextur an, wieviel Wasser der Boden halten kann, und wieviel davon für die Pflanze verfügbar ist (Kramer and Boyer 1995). Überträgt man die Gegebenheit auf Nahrungsmittelpflanzen stellt sich eine weitere Problematik. Es zeigte sich, dass bei Steigerung des Ertrages und damit der Biomasse der Proteingehalt reduziert wird (Groos et al. 2003; Tsilo et al. 2013). Die Rede ist von „verstecktem Hunger“. Eine alternative Methode, um Pflanzen gegen abiotischen Stress wie Trockenheit zu stärken, ohne die Ertragsqualität zu mindern, wäre die Ausbildung von Symbiosen mit Mykorrhiza (Daei

et al. 2009; Smith et al. 2010; Miransari 2011). Neben der verbesserten Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen und Wasser, kommt es zudem zum Schutz vor Pathogenen (Jung et al. 2012). Die Züchtung sollte also immer mehrere Faktoren berücksichtigen und nicht nur auf ein spezielles Merkmal in Sachen Trockenresistenz selektieren.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden im Reinheitsgrad „molecular grade“ verwendet und sofern nicht anders angegeben von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), Merck (Grafing, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

4.1.2. Kits

Die Kits werden von Thermo Analytik Jena AG (Jena, Deutschland), Machery-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) und Gemoned (Löhne, Deutschland) verwendet.

innuPREP Plant RNA Kit	Analytik Jena
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery Nagel
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel
JETStar2.0 Plasmid Purification MAXI Kit	Genomed

4.1.3. Geräte

Tabelle 4-1 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blotting System	Trans-Blot® SD Cell	BioRad
Chemilumineszenzdetektor	LAS4000	GE Healthcare
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 V1.4	Implen
PCR Cycler	T-Gradient	Biometra
PCR Detection System	LightCycler® 480	Roche
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

4.1.4. Software

Für alle *in silico* Analysen wurden folgende Programme verwendet:

TAIR

<https://www.arabidopsis.org/>

(Ermittlung von Arabidopsis DNA Sequenzen)

BioEdit v7.1.11

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

(Erstellen von Alignments)

MEGA v6.06

<http://www.megasoftware.net/>

(Erstellen von phylogenetischen Bäumen)

Phytozome11

<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

(Ermittlung von Pappel DANN Sequenzen)

RCSB PDB

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

(Kristallstruktur von Proteinen)

PyMOL v1.1

<https://www.pymol.org/>

(Bearbeitung der Kristallstruktur von Proteinen)

Serial Cloner v2.6.1

http://www.serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html

(Erstellung von Vektorkarten)

4.1.5. Verwendete Organismen

Tabelle 4-2 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	#	Quelle
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZ ⁻ YA-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 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gald-cmrne131 (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)

Tabelle 4-3 *Agrobacterium tumefaciens* Stamm

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

Escherichia coli wurden in LB-Medium flüssig, bzw. auf LB-Medium fest bei 37°C kultiviert. Die Flüssigkultur wurde bei 200 rpm im Schüttler angezogen.

Die Proteinexpression erfolgte in flüssigen TB-Medium für 3,5 h bei 200 rpm.

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte in LB-Medium bei 30°C.

LB-Medium fest	5 g Hefeextrakt; 10 g Pepton; 10 g NaCl; 16 g Agar; mQ H ₂ O auf 1 l
LB-Medium flüssig	wie LB-Medium fest; ohne Agar
TB-Medium flüssig	24 g Hefeextrakt; 12 g Pepton; 4 ml 87 % Glycerin 9,4 g K ₂ HPO ₄ ; 2,2 g KH ₂ PO ₄

Transformanten wurden mit entsprechenden Antibiotika im Nährmedium selektiert.

Tabelle 4-4 Antibiotika und ihre Konzentration im Nährmedium

Antibiotikum	Konzentration [µl/ 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

Die Hinterlegung der *E. coli* und *A. tumefaciens* Stämme erfolgte in sterilem 43 % (v/v) Glycerin bei -80°C.

Tabelle 4-5 Hefestamm

Stamm	Genotyp	#	Quelle
AH109	MATa, trp1-109, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2AS-GAL2TATA-ADE2, URA::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	3332	Clontech Matchmaker-System

Die Anzucht der Hefen erfolgte in flüssigen oder festen SD- oder YPD-Medium bei 30°C. Die Flüssigkultur wurde bei 200 rpm im Schüttler kultiviert.

YPD-Medium fest	20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt; 20 g Agar; 950 ml mQ H ₂ O; Autoklavieren und auf 50°C abkühlen lassen; 50 ml Glucose (40 %)
SD-Medium fest	100 ml Makrosalze (10x); 1 ml Mikrosalze (1000x);

	800 ml mQ H ₂ O; 20 g Agar; Autoklavieren und auf 50°C abkühlen lassen; 100 ml Dropout (10x); 10 ml Supplement; 50 ml Glucose (40 %)
SD-Medium flüssig	wie SD-Medium fest; ohne Agar
10x Makrosalze SD	10 g K ₂ HPO ₄ ; 10,24 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 1 g NaCl; 1 g CaCl ₂ ; 50 g (NH ₄) ₂ SO ₄ mQ H ₂ O auf 1 l
1000x Mikrosalze SD	2 mg Biotin; 400 mg Pantothersäure Calciumsalz; 20 mg Folsäure; 2 g Myo-Inositol; 400 mg Nicotinsäure; 200 mg p-Aminobenzolsäure; 400 mg Pyridoxinhydrochlorid; 200 mg Riboflavin; 400 mg Thiamin HCl; 500 mg Borsäure; 40 mg CuSO ₄ ; 100 mg KI; 200 mg FeCl ₂ ; 400 mg MnSO ₄ ; 200 mg Na ₂ Mo ₄ ; 400 mg ZnSO ₄ ; mQ H ₂ O auf 1 l
10x Dropout	200 mg L-Adenin Hemisulfatsalz; 200 mg L-Arginin HCl; 300 mg L-Isoleucin; 300 mg L-Lysin HCl; 200 mg L-Methionin; 500 mg L-Phenylalanin; 2 g L-Threonin; 300 mg L-Tyrosin; 200 mg L-Uracil; 1,5 g L-Valin; mQ H ₂ O auf 1 l
Supplements (100x)	2 g L-Histidin; mQ H ₂ O auf 1 l 10 g L-Leucin; mQ H ₂ O auf 1 l 2 g L-Tryptophan; mQ H ₂ O auf 1 l

Die Selektion transgener Hefen erfolgte durch verschiedener Supplements entsprechend der Plasmideigenschaften.

4.1.6. Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde mit *Arabidopsis thaliana* und *Populus canescens* gearbeitet.

Von *Arabidopsis* wurde der Ökotyp Columbia (Col-0) und die generierte Mutante *aba2-1* verwendet. Col-0 kann über das *Arabidopsis Biological Resource Center* in Ohio, USA bezogen werden, die Mutante *aba2-1* über das Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (Leon-Kloosterziel et al. 1996). Die Anzucht erfolgte in Töpfen, mit einer Perlit-Einheitserdemischung (Typ7), in Phytokammern unter Langtagbedingungen 16 h mit 180 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 22°C und 65 % Luftfeuchte und 8 h mit 17°C und 75 %

Luftfeuchtigkeit. Unter diesen Bedingungen betrug die Generationszeit bei 6 bis 8 Wochen. *Populus canescens* wurde ebenfalls in Erde in Phytokammern wie Arabidopsis kultiviert. Für die Mikropropagation wurden Pappeln in Schraubverschlussgläsern mit 90ml Pappel-MS herangezogen. Diese wurden bei Dauerlicht ($120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bei 21°C kultiviert.

Arabidopsis-MS	100 ml Makrosalze (10x); 2,5 ml A-Mikrosalz (400x); 10 g Saccharose; 1 g MES; pH auf 5,8 mit KOH einstellen; mQ H ₂ O auf 1 l; 9 g Agar; Autoklavieren
Makrosalze (10x)	16,5 g NH ₄ NO ₃ ; 19 g KNO ₃ ; 1,7 g KH ₂ PO ₄ ; 4,4 g CaCl ₂ ·2H ₂ O; 3,7 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; mQ H ₂ O auf 1 l
Arabidopsis-Mikrosalze (400x)	11,12 g FeSO ₄ ·7H ₂ O; 14,89 g FeNaEDTA; 0,3 g KJ; 4 g MnSO ₄ ·H ₂ O; 1,2 g H ₃ BO ₃ ; 0,8 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 0,1 g Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O; 0,01 g CuSO ₄ ·5H ₂ O; 0,01 g CoCl ₂ ·6H ₂ O; mQ H ₂ O auf 1 l
Pappel-MS fest	50 ml Makrosalze (10x); 2,5 ml P-Mikrosalze (400x); 2,5 ml FeNaEDTA (400x); 1 ml P-Vitamine (1000x); 100 g Saccharose; pH auf 5,8 mit KOH einstellen; mQ H ₂ O auf 1 l; 6,8 g Agar; nach Autoklavieren auf 50°C abkühlen lassen; 0,2 g L-Glutamin hinzugeben
Pappel-Mikrosalze (400x)	0,332 g KJ; 6,76 g MnSO ₄ ·H ₂ O; 2,48 g H ₃ BO ₃ ; 3,44 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 0,1 g Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O; 0,01 g CuSO ₄ ·5H ₂ O; 0,01 g CoCl ₂ ·6H ₂ O; mQ H ₂ O auf 1 l
FeNaEDTA (400x)	1,492 g FeNaEDTA; mQ H ₂ O auf 100 ml
P-Vitamine (1000x)	0,5 g Nicotinsäure; 0,5 g Pyrodoxol HCl; 0,1 g Thiamine HCl; 0,1 g Myo-Inositol; mQ H ₂ O auf 1 l

4.1.7. Enzyme

Die eingesetzten Enzyme, Puffer und Standards wurden von ThermoFisher Scientific (München, Deutschland), New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) und Promega GmbH (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Die Protoplastenenzymlyse wurde mit Cellulase „Onozuka“ R-10 und Macerozym R-10 von Yakult Pharmaceutical Ind. Co., LTD. (Tokio, Japan) hergestellt.

4.1.8. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen

Oligonukleotide für die Amplifizierung von Pappel-Rezeptorkomponenten für Proplatenassays:

Tabelle 4-6 Oligonukleotide für Protoplastenvektoren

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Potri.002G169400	PcRCAR1_f	gatcgaattcATGAACGGTGGTGATGCGT
	PcRCAR1_r	gatcgtcgacTCAGAATTGATTGATGGGCT
Potri.014G097100	PcRCAR2_f	gatcgaattcATGAACGGCAGTGATGCGT
	PcRCAR2_r	gatcgtcgacTCAGAATTGATTGACAGGTTC
Potri.012G000800	PcRCAR3_f	gcatgagaattcATGAATGAAAATAGTAATGGAAGT
	PcRCAR3_r	gcatgagtcgacTTACATACACTCAATGGGCTC
Potri.015G020500	PcRCAR4_f	gatcgaattcATGAATGGAAATTGTAATGGAA
	PcRCAR4_r	gatcgtcgacTTACATACAATCAATGGGCTCGGT
Potri.001G092500	PcRCAR5_f	gatcgaattcATGGTGACAAATGATTATGTGA
	PcRCAR5_r	gatcgtcgacTTACGTTCTGTCAATGGGTTC
Potri.003G139200	PcRCAR6_f	gatcgaattcATGGTGACAAATGATTATGTGA
	PcRCAR6_r	gatcgtcgacTTACATTCTGTCAATGGGTTC
Potri.008G073400	PcRCAR7_f	gatcgaattcATGCCTGCATCGCTACAGCTCCAA
	PcRCAR7_r	gatcgtcgacTCATGATGTTATTGATATCTGGTTATT
Potri.010G183900	PcRCAR8_f	gatcgaattcATGCCTGCATCACTACAGCTCCAG
	PcRCAR8_r	gatcgtcgacTCATGATGATGTAGAAATCTGGGCA
Potri.016G125400	PcRCAR9_f	gatcgaattcATGCCTGCTAATCCTCCGA
	PcRCAR9_r	gatcgtcgacTCACGCTGATGATGATTTATTA
Potri.006G104100	PcRCAR10_f	gatcgaattcATGCCTGCTAATCCTCCA

	PcRCAR10_r	gatcgtcgacTCACGATGATGATTTATTATT
Potri.001G142500	PcRCAR11_f PcRCAR11_r	gatccccgggATGACATGTACTGTTGGCAT gatcgtcgacTTATTTACCGTCACCGTCA
Potri.003G091700	PcRCAR12_f PcRCAR12_r	gatcgaattcATGCCTCCACTACCCACC gatcgtcgacTTATTTACCGTCACCGTCTC
Potri.006G230600	PcRCAR13_f PcRCAR13_r	gatcgaattcATGGATGCTAATCACGCC gatcgtcgacTCACTCGTGTCCATGCAGAGCT
Potri.018G054400	PcRCAR14_f PcRCAR14_r	gcatgagaattcATGGATACGAATCAAGCCCC gcatgagtcgacTCATTCATGTCCATGCAGAGA
Potri.010G199600	PcPP2CA1_f PcPP2CA1_r	gatcgaattcATGGTCGGGATTTGCTGT gatcggatccTTAATGATGATTTCTTCTCAA
Potri.008G059200	PcPP2CA2_f PcPP2CA2_r	gatcgaattcATGGCTGGGATTTGCTGCG gatcagatctTTAATGTTGATTTCTTCTCAAATC
Potri.009G037300	PcHAI1_f PcHAI1_r	gatcgaattcATGGCTGATATTTGCTGTGGA gatcagatctCTACGTGTCTTTCCTTAAATC
Potri.001G245200	PcHAI2_f PcHAI2_r	gatcgaattcATGGCCGAGATTTACCGTG gatcgtcgacCTACGTGTCTTTCCTTAAATTC
Potri.015G133900	PcAHG1_f PcAHG1_r	gatcgaattcATGACAGAAGTTTGCCGAAGA gatcgtcgacTCAGCTACTTTTGAGATCAACA
Potri.012G131800	PcAHG2_f PcAHG2_r	gatcgaattcATGACGGAATTTTACCGAAGG gatcgtcgacTCAGCTCCTCTTGAGATCAA
Potri.003G044200	PcHAB1_f PcHAB1_r	gatcgaattcATGGAGGAGATGTACCGGG gatcgtcgacTTAAGATTTGCTCTTGAACTTC
Potri.006G224600	PcHAB2_f PcHAB2_r	gatccccgggATGGAGGAGATGTATCCGG gatcgtcgacTCATGTTTTGGTTTTGAACTTC
Potri.018G060300	PcHAB3_f PcHAB3_r	gatcgaattcATGGAGGAGATGTACCGGG gatcgtcgacTCATGTTTTGGTTTTGAACTTC

Oligonukleotide für die Amplifizierung von Pappel-Rezeptorkomponenten für Proteinexpression:

Tabelle 4-7 Oligonukleotide für Proteinexpression

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Potri.015G020500	PcR4_pQ30_f PcR4_pQ30_r	gatcggatccATGAATGGAAATTGTAATGG gatcgtcgacTTACATACAATCAATGGGCTCGGT
Potri.016G125400	PcR9_pQ30_f PcR9_pQ30_r	gatcggatccATGCCTGCTAATCCTCC gatcgtcgacTCACGCTGATGATGATTTATTA

Potri.006G230600	PcR13_pQ30_f PcR13_pQ30_r	gatcggatccATGGATGCTAATCACGC gatcgtcgacTCACTCGTGTCCATGCAGAGCT
Potri.008G059200	PcPP2CA2_pQ70 _f PcPP2CA2_pQ70 _r	gatcgcgatcggaATGGCTGGGATTTGCTGCG gatcggatccATGTTGATTTCTTCTCAAATC

Oligonukleotide für die quantitative RealTime PCR sind dem Anhang zu entnehmen

4.1.9. Plasmide und Vektoren

Die verwendeten Plasmide und Vektoren können dem Anhang entnommen werden. Sie sind nach der Lehrstuhl internen Stammsammlung nummeriert und bei -80°C gelagert.

Für die Protoplastenassays wurden die Effektorgene in den Vektor pSK:35S:Ascl (Hoffmann 2001) kloniert. Für die Proteinexpression wurden die Vektoren pQE30 (Qiagen, Germany) und pQE70 (Qiagen) verwendet. Stabile Transformationen von *Populus canescens* wurden mit Vektorkonstrukten basierend auf den binären Vektor pBI121:Ascl (Hoffmann 2001) generiert. Hierfür wurde die 35S:Effektor-Kassette des pSK Plasmids über Ascl in den pBI121:Ascl ligiert.

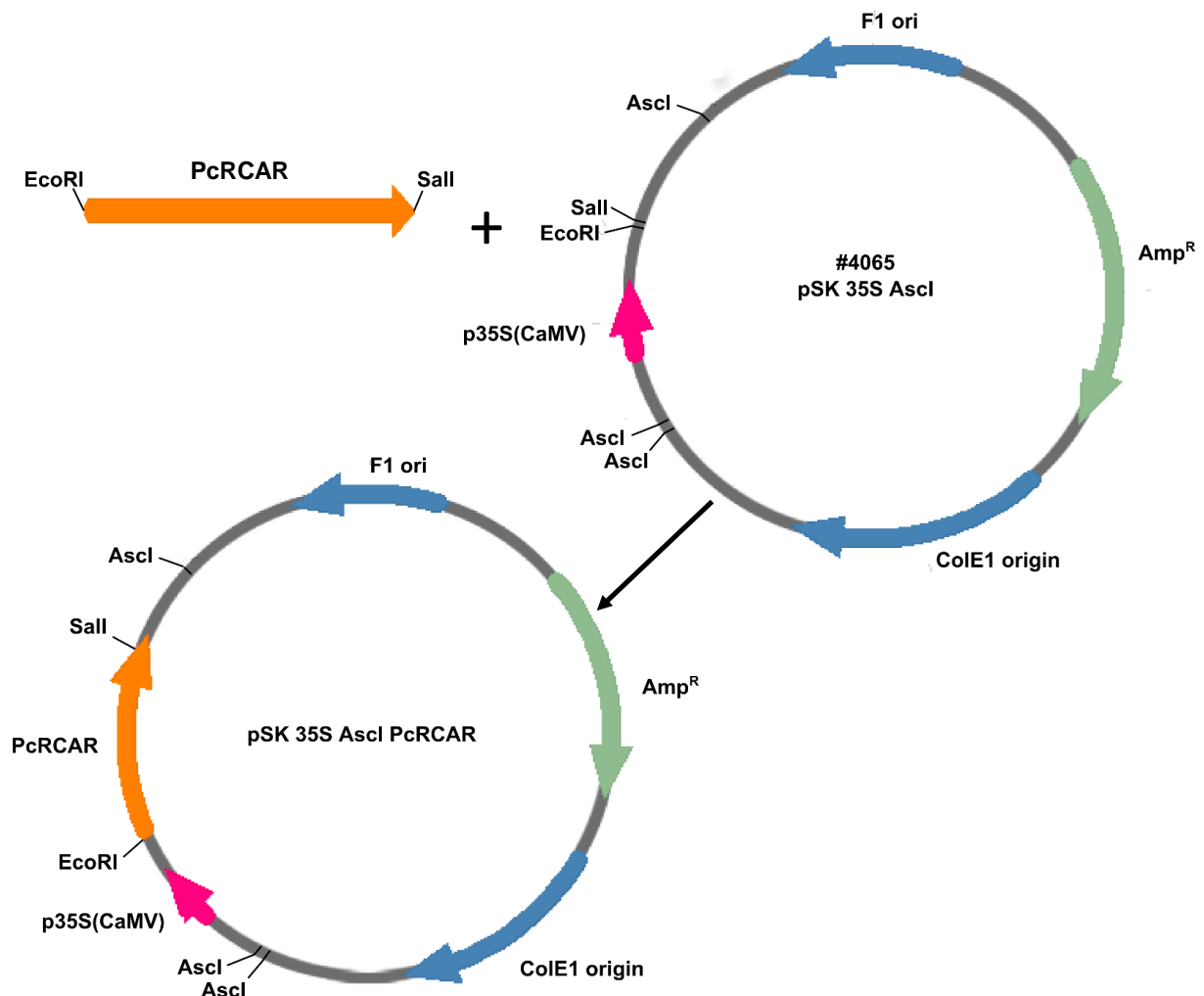


Abb. 4-1 Schematische Darstellung zur Generierung von pSK 35S Ascl PcRCAR

4.2. Physiologische Methoden

4.2.1. Oberflächensterilisation von Arabidopsis Samen

Die Sterilisation von Arabidopsis Samen erfolgte im Eppendorf Reaktionsgefäß mit Ethanol und Natriumhypochlorid. Hierfür wurden die Samen für 30 min bei Raumtemperatur in 80 % (v/v) Ethanol und 0,1 % (v/v) Triton X-100 geschüttelt. Anschließend wurden die Samen mit 3 % Natriumhypochlorid-lösung für 3 min behandelt. Abschließend wurde fünf Mal mit sterilem ddH₂O gewaschen und die Samen auf MS-Agarplatten ausgebracht.

4.2.2. Keimungsversuche

Das Keimungsverhalten wurde auf MS-Agarplatten unterschiedlicher Hormonkonzentrationen analysiert. Die Samen wurden sterilisiert und auf entsprechende Platten ausgebracht. Nach 48 h bei 4 °C zur Stratifizierung wurden sie unter Dauerlicht ($80 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) und konstanten 22 °C zum Keimen gebracht. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen. Als gekeimt wurden Samen bewertet, wenn die Radicula die Samenschale durchbrochen hatte.

4.2.3. Wurzelwachstum

Um das Wurzelwachstum zu untersuchen, wurden Arabidopsis Keimlinge auf MS-Platten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen analysiert. Hierfür wurden die Samen zunächst auf MS-Platten ohne Hormon zum Keimen gebracht und nach 4 Tagen auf ABA-haltige MS-Platten umgesetzt. Die Position der Wurzelspitze wurde markiert und die Pflanzen für weitere 3 Tage im Zellkulturraum vertikal inkubiert. Zur Auswertung wurden die Platten eingescannt und die Elongation mit der Software ImageJ v1.48 und Excel bestimmt. Pro Linie und Konzentration wurden mindestens 30 Keimlinge analysiert.

4.2.4. *Floral Dip* von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana wurde stabil mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer nach der *Floral Dip* Methode transformiert (Clough and Bent 1998; Zhang et al. 2006). Für die Klonierung der Konstrukte diente der binäre Ausgangsvektor pBI121 (Jefferson et al. 1987). Die Agrobakterien mit dem gewünschten Konstrukt wurden in einer 3 ml Übernachtskultur in selektiven Medium (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rifampicin) bei 30 °C angezogen. Die 200 ml Hauptkultur wurde für 24 h bei 30 °C inkubiert und bei 3000 g für 10 min bei 4°C geerntet und in 300 ml Infiltrationsmedium aufgenommen. 3 Wochen alte Arabidopsispflanzen wurden mit den Infloreszenzen kopfüber für mehrere Sekunden in die Zellsuspension getaucht. Nach 5 Tagen wurde der Vorgang wiederholt um die Transformationseffizienz zu steigern. Die infiltrierten Pflanzen wurden für ca. 6 Wochen kultiviert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte aus MS-Medium mit Kanamycin. Die Transformationseffizienz betrug in der Regel zwischen 0,1 und 1 %.

Infiltrationsmedium 70 g Saccharose; 0,5 g MES; pH = 5,8 (KOH); 500µl Silwet L-77; mit ddH₂O auf 1 l

4.2.5. Sterilisation von Pflanzenmaterial für die Mikropropagation

Um die Pappeln steril in Weckgläsern vermehren zu können mussten diese zunächst sterilisiert werden. Hierfür wurden junge Triebe mit 2 bis 3 Internodien von den Blättern befreit und für 5min in 70% Ethanol inkubiert. Es folgte eine Inkubation in 1%em Natriumhypochlorid für 20 min. Es wurde 5-mal mit sterilem Wasser gewaschen und das Pflanzenmaterial in Weckgläsern mit Pappel MS Medium transferiert. Die Achselknospen treiben aus und die Wurzelentwicklung setzt ein. Nach ca. 3 Monaten wurden die neu entstandenen Sprosse wieder von den Blättern befreit und Sprosstücke mit je 2 bis 3 Internodien in neue Gläser gesetzt.

4.2.6. Transformation von *Populus x canescens*

Für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer dienten 10 Wochen alte *Populus canescens* Pflanzen als Ausgangsmaterial. Von den sterilen im Glas kultivierten Pflanzen wurden die Sprosse von Blättern und Nodien befreit und für 2 Tage auf M1 Medium im Dunkeln bei 21°C kultiviert. Parallel wurden von den Agrobakterien 30 ml LB Hauptkultur bei 200 rpm bei 30°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 2200 rpm für 5 min geerntet und in Pappel MS resuspendiert. In 100 ml Kolben wurden 30 ml Pappel MS Flüssigmedium vorgelegt und mit den Agrobakterien auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. In die Bakteriensuspension wurden die Internodienabschnitte transferiert und bei 70 rpm bei 24°C für 18h geschüttelt. Die Internodienabschnitte wurden auf sterilem Filterpapier getrocknet und zweimal für 5 min in je 30 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Sprosse für 10 min in Cefotaximlösung (100 mg/ml) inkubiert und dreimal für 5 min in H₂O gewaschen. Das Pflanzenmaterial wurde auf M2 Platten bei 21°C für mindestens 20 Tage im Dunkeln kultiviert. Danach folgte die Kultivierung auf M3 Medium im Dauerlicht. Der entwickelte Kallus beginnt mit der Sprossentwicklung und Pflanzen können auf Pappel MS Medium umgesetzt werden und weiter analysiert werden. Für die Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurde RNA isoliert und die Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt.

M1 Medium Pappel MS mit 0,08 mg/l NAA; 0,3 mg/l BAP

M2 Medium	M1 Medium mit 500 mg/l Carbenicillin; 250 mg/l Cefotaxim; 25 mg/l Kanamycin
M3 Medium	M2 Medium mit 50 mg/l Kanamycin; 0,1 μ M Thidiazuron

4.2.7. β -D-Glucuronidase Färbung

Für die Bestimmung der Transformationseffizienz der Pappeln wurde eine GUS Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Pappeln mit dem binären Vektor pBI121 transformiert. Der Vektor besitzt das β - Glucuronidasegen unter Kontrolle des 35S Promotors. Die β – Glucuronidase hydrolysiert Cyclohexylammonium (X-Gluc) zu Glucuronsäure und 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Letzteres wird durch Sauerstoff zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Für die Färbung wurden die Kallus- oder Blattstücke mit 90 % kaltem Aceton für 20 Minuten auf Eis fixiert. Das Aceton wurde entfernt und das Pflanzenmaterial mit der Waschlösung gespült. Die Waschlösung wurde entfernt und das Material mit der X-Gluc Färbelösung bedeckt. Die Auswertung erfolgte nach Übernachtinkubation.

Waschlösung	50 mM NaPO ₄ , pH = 7,2; 0,5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ ; 0,5 mM K ₄ Fe(CN) ₆
Färbelösung	2 mM X-Gluc (Cyclohexylammoniumsalz) in DMF

4.2.8. Isolierung von Protoplasten

Die Präparation von Arabidopsis und Pappel Mesophyll Protoplasten erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Yoo et al. 2007. Es wurden 2-3 g Blattmaterial von drei Wochen alten Arabidopsis für 3-4 h in 18 ml Enzymlösung bei 25°C und 50 rpm inkubiert. Bei der Präparation von Pappelprotoplasten wurden 8 Wochen alte Pflanzen verwendet. Die Blätter wurden mit einer Rasierklinge in 2 mm breite Streifen geschnitten und für 4 h in Enzymlösung inkubiert. Nach dem Verdau wurde die Protoplastensuspension durch ein Nylonnetz (150 μ m Maschenweite) gefiltert und mit 10 ml W5 Lösung gespült. Die Protoplasten wurden für 2 min bei 60 g pelletiert, der Überstand abgenommen und in 10 ml W5 Lösung durch leichtes Schwenken gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten in geeignetem Volumen MM Lösung aufgenommen. Um die Vitalität und die Menger der Protoplasten zu bestimmen wurden 50 μ l

Protoplasten mit 1 µl Fluoresceindiacetat (FDA) versetzt. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe einer Thomakammer mit einem Zeiss Axioskop und HBO 50 und einem FITC Filtersatz (480 nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 nm Emissionsfilter) (Widholm 1972; Huang et al. 1986). Arabidopsis Protoplasten wurden 0,5 – 1 * 10⁶ Protoplasten/ml eingestellt, Pappelprotoplasten auf 2*10⁶ Protoplasten/ml und für mindestens 1 h auf Eis inkubiert.

Die Enzymlösung wurde nach dem Standardprotokoll von Sambrook and Russell 2001 hergestellt. Die Lösung wurde je zweimal für 30 min gegen 10 mM MES (pH = 5,7) dialysiert. Die fertige Lösung wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Arabidopsis Enzymlösung	1 % (w/v) Cellulase Onozuka R-10; 0,25 % (w/v) Macerozym R-10; 2,5 nM AEBSF; 400 mM Mannitol; 8 mM CaCl ₂ ; 5 mM MES; 0,6 % (w/v) BSA; pH = 5,7 (KOH)
Pappel Enzymlösung	wie Arabidopsis Enzymlösung, 3 % (w/v) Cellulase Onozuka R-10; 0,8% (w/v) Macerozym R-10
W5 – Lösung	154 mM NaCl; 125 mM CaCl ₂ ; 5 mM KCl; 2 mM MES; pH = 5,7 (KOH)
MM – Lösung	400 mM Mannitol; 20 mM KCl; 5 mM MES; pH = 5,7 (KOH)
FDA – Lösung	1 mg FDA/ 1 ml Aceton

4.2.9. Transfektion von Protoplasten

In einem 2ml Reaktionsgefäß wurde folgende DNA vorgelegt.

Reporter pRD29B::LUC	6 µg
Standard p35S::GUS	4 µg
Effektor	x µg
Mannitol (0,8M)	15 µl
mQ H ₂ O auf	30 µl

Zu der vorgelegten DNA wurden jeweils 100 µl Protoplasten und 130 µl PEG (37°C) gegeben und durch dreimaliges Invertieren durchmischt. Die Transfektion wurde nach

7-8 min durch Zugabe von 1 ml W5 Lösung gestoppt. Nach dreimaligen invertieren wurden die Reaktionsgefäße für 2 min bei 250 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 210 µl WIMK Lösung resuspendiert. Jede Transfektion wurde aufgeteilt und mit oder ohne ABA versetzt. Die Inkubation der Protoplastenansätze erfolgte über nacht bei 25°C.

PEG	40 % (w/V) PEG 400; 200 mM Mannitol; 100 mM CaCl ₂
WIMK	500 mM Mannitol; 20 mM KCl; 4 mM MES; pH = 5,7
ABA – Stocklösung	5 mM ABA in 10 mM MES; pH = 7,0 bis 7,5)
ABA – Verdünnungen	Aus ABA – Stocklösung verdünnt mit WIMK - Lösung

4.2.10. Messung der β-D-Glucuronidase Aktivität

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz und Normalisierung der Luciferaseaktivität wurde das Plasmid 35S::GUS eingesetzt. Die Aktivität der exprimierten β-D-Glucuronidase kann fluorimetrisch bestimmt werden durch die Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (4-MUG) zu Methylumbelliferon (MU). MU wird bei 365 nm angeregt und die Emission bei 460 nm quantifiziert. Für die GUS Messung wurden jeweils 50 µl Protoplasten mit 100 µl MUG-Puffer versetzt und in schwarzen Mikrotiterplatten bei 37°C für 10 min im BioTek Synergy 2 Plate Reader gemessen. Aktivität wurde dabei über die Zunahme der relativen Fluoreszenz pro Zeiteinheit als RFU/ sec (relativ fluorescence units) bestimmt, welche direkt proportional zur Enzymaktivität ist.

MUG-Puffer	10 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 % Triton X-100; 0,5 mM; 4-MUG; 50 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄
------------	--

4.2.11. Messung der Luciferase Aktivität

Das Reporterplasmid enthält den ABA induzierbaren Promotor des Gens AtRD29B, das das Gen Luciferase kontrolliert. Werden Transkriptionsfaktoren durch die ABA Signalkaskade aktiviert kommt es ebenfalls zur Expression des Luciferase Gens. Luciferin wird durch die Luciferase unter ATP Verbrauch zu Oxyluciferin umgesetzt. Für die Lumineszenzmessung wurden 50 ml Protoplasten in eine weiße Mikrotiterplatte vorge-

4.3.3. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Zellen wurde eine 500 ml LB Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Zellen wurden bei 30°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 5000 rpm bei 4°C für 10 min geerntet. Die Zellen wurden mit 500 ml eiskaltem mQ H₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach erneutem Waschen wurde das Pellet in 20 ml 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert und mit 5000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 9 ml 10 % (v/v) Glycerol aufgenommen. Es wurden 100 µl Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

4.3.4. Transformation von *A. tumefaciens*

Elektrokompetente Agrobakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 ng bis 50 ng Plasmid DNA versetzt. Das Gemisch wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Der Küvettenelektrodenabstand betrug 0,2 cm und nachfolgende Parameter wurden für die Elektroporation benutzt: 2500 V; C = 25 µF; R = 700 Ω, t ≥ 4 s.

Die elektroporierten Zellen wurden mit 800 µl LB Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 200 rpm bei 30°C für 2 h inkubiert. Die Zellen wurden 2200 rpm für 5 min geerntet und auf LB Agarplatten mit Selektion ausplattiert. Das Wachstum erfolgte bei 30°C für 2 Tage.

4.3.5. Plasmid Präparation

Plasmid Mini Präparationen wurden über Säulen gemäß den Herstellerangaben des Kits „Plasmid DNA purification“ der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Für Midi, Maxi und Mega Präparationen wurden die Kits JETSTAR der Firma Genomed (Löhne, Deutschland) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand des Nano-Drops.

4.3.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente zur Klonierung wurden mit der proofreading Polymerase „Phusion High Fidelity“ (Thermo Fischer) amplifiziert. Für Kolonie PCR wurde die GoTaq[®] Polymerase (Promega) verwendet. Die Überprüfung transgener Pappeln erfolgte mit der

„Phusion“ Polymerase. Die Ansätze der jeweiligen PCR sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4-8 Allgemeiner PCR Ansatz

	20 µl Ansatz	Endkonzentration
5x Phusion GC Puffer	4 µl	1x
5x GoTaq [®] Puffer	4 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	0,5 mM
10 µM fwd Primer	1 µl	0,5 µM
10 µM rev Primer	1 µl	0,5 µM
Phusion DNA Polymerase	0,1 µl	0,01 U
GoTaq [®] DNA Polymerase	0,1 µl	1,25 U
Template	X µl	1 - 20 ng
mQ H ₂ O	auf Σ 20 µl	

Die nachfolgenden Tabellen enthalten die Bedingungen mit welchen die PCR durchgeführt wurden.

Tabelle 4-9 Bedingungen für PCR mit „Phusion“ Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialdenaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	10 s	34
Annealing	X°C	15 s	
Elongation	72°C	15-30 s / kb	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Pause	10°C	∞	1

Tabelle 4-10 Bedingungen für PCR mit GoTaq[®] Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialdenaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	34
Annealing	X°C	30 s	
Elongation	72°C	60 s / kb	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Pause	10°C	∞	1

4.3.7. Agarose Gelelektrophorese

Für DNA Analysen wurden 0,8%ige Agarose Gele in 1x TAE verwendet um die Moleküle im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Als Größenstandard diente der 1 kb Marker von Thermo Fisher, DNA Ladepuffer wurde selbst hergestellt. Für die Visualisierung der DNA Moleküle wurde 0,1 µg Ethidiumbromid je 1 ml Agarose hinzugefügt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte für 25 min bei 200 V und 400 mA in 1x TAE Puffer.

50x TAE	2 mM Tris base; 5,71 % (v/v) Eisessig; 50 mM EDTA (pH = 8,0)
6x DNA Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Orange G; 1 mM EDTA (pH = 8,0)

4.3.8. Klonierungsmethoden

DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR Produkten und ausgeschnittenen DNA Fragmenten erfolgte gemäß den Herstellerangaben des Kits "NucleoSpin® and PCR Clean-up" von Machery-Nagel.

Restriktion von DNA Fragmenten und Plasmid DNA

Die Restriktion wurde mit FastDigest Restriktionsendonukleasen der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Folgende Tabellen zeigen die Zusammensetzung der Restriktionsansätze.

Tabelle 4-11 Restriktionsansatz für PCR Produkten

	30 µl Ansatz
Template	bis 200 ng
Restriktionsendonuklease	1 µl
10x Restriktionspuffer	3 µl
mQ H ₂ O	Auf Σ 30 µl

Tabelle 4-12 Restriktionsansatz für Plasmid DNA

	20 µl Ansatz
Template	1 µg

Restriktionsendonuklease	1 µl
10x Restriktionspuffer	2 µl
mQ H ₂ O	Auf Σ 20 µl

Die Restriktion erfolgte bei 37°C für 5 min bis 60 min, je nach Herstellerangabe für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Anschließend folgte die Auftrennung über ein Agarosegel. Die für die Klonierung benötigten DNA Fragmente wurden unter UV Licht visualisiert, ausgeschnitten und mit dem Kit „NucleoSpin® and PCR Clean-up“ von Machery Nagel aufgereinigt.

Dephosphorylierung verdauter Plasmid DNA

Linearisierte Plasmid DNA wurde zusätzlich dephosphoryliert um eine Religation zu verhindern. Hierfür wurde die Antarctic Phosphatase der Firma NEB (New England BioLabs, Ipswich, USA) verwendet. Zu 1 µg verdautem Vektor wurden $\frac{1}{10}$ des Volumens 10x Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer und 1 µl Antarctic Phosphatase gegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Vor der Aufreinigung mit Hilfe des „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ Kits wurde die Phosphatase für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Ligation

Die Ligation verdauter PCR Fragmente mit dephosphoryliertem Vektor erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E.coli* Zellen. Nachfolgende Tabelle enthält die Komponenten für einen 15 µl Ansatz.

Tabelle 4-13 Ligationsansatz

	15 µl Ansatz
Verhältnis PCR Produkt : Vektor	3 : 1
10x Ligationspuffer	1,5 µl
T4 DNA Ligase	0,3 µl
mQ H ₂ O	Auf Σ 15 µl

DNA Sequenzierung

Um die amplifizierten, bzw. ligierten Fragmente und Vektoren auf Mutationen zu überprüfen wurde die aufgereinigte DNA durch die Firma GATC Biotech (Konstanz,

Deutschland) sequenziert. Jede 10 µl Probe enthielt 2,5 µM Sequenzierungsprimer und von der aufgereinigten Plasmid DNA 500 ng, von PCR Fragmenten 300 ng. Die Auswertung erfolgte mit der Alignment Software BioEdit.

4.3.9. RNA Isolation

Für die gesamt RNA Isolation aus Pappelblättern oder Kallus wurde das innuPREP Plant RNA Kit der Firma Analytik Jena AG (Jena, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden bis zu 100mg Pflanzenmaterial in flüssigem N₂ schockgefroren und mit dem Tissue LyserII homogenisiert. Die Isolierung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die gebundene RNA wurde zusätzlich mit DNase behandelt. Hierfür wurde das innuPREP DNase I Digest Kit von Analytik Jena AG verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des NanoDrop.

4.3.10. cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific.

Tabelle 4-14 Ansatz für cDNA Synthese

	20 µl Ansatz
Template RNA	1 µg
Oligo (dT) ₁₈ primer	1 µl
H ₂ O nukleasefrei	auf Σ 12 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl

Der Ansatz wurde bei 42°C für 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde bei 70°C für 5 min terminiert. Als Kontrolle für die erfolgreiche cDNA Synthese wurde anschließend eine PCR mit Aktinprimern durchgeführt. Bei erfolgreicher Amplifikation wurde die cDNA als Template für Klonierungen verwendet oder Genexpressionsanalysen durchgeführt.

4.3.11. Quantitative RealTime PCR (qRT-PCR)

Die quantitative RealTime PCR wurde mit dem GoTaq® qPCR Master Mix der Firma Promega durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Light Cycler der Firma Roche. Als Referenzgene wurden TIP4-like (TIP4), Actin 2 (ACT2) und Cell division control protein 2 (CDC2) verwendet. Alle Proben wurden als Triplikate analysiert. Die Auswertung erfolgte nach folgenden Gleichungen.

Ermittlung der ΔCt Werte:

$$\Delta Ct = Ct_{Kandidatengen} - Ct_{Referenzgen}$$

Ermittlung der relativen Transkripthäufigkeit ($\Delta\Delta Ct$):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Kandidatengen} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

Ermittlung der relativen Veränderung der Transkriptmenge der analysierten Proben im Vergleich zur Kontrolle:

$$Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ermittlung der relativen Transkriptmenge der analysierten Proben im Vergleich zu den Referenzgenen:

$$Fold\ Change = 2^{\Delta Ct}$$

4.3.12. Transformation von Hefezellen

Für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen Stamm AH109 wurde ein abgeändertes Protokoll nach der LiOAc Methode von Gietz und Woods verwendet. Es wurde eine Vorkultur von 5 ml YPD oder SD Minimalmedium mit einer Hefezelle angeimpft und über Nacht bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Die Hauptkultur von 50 ml YPD wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zu eine OD₆₀₀ von 0,8 bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Die Hefezellen wurden bei 2200 g für 5 min und 4°C geerntet und in 25 ml H₂O gelöst. Nach erneutem zentrifugieren bei 2200 g für 5 min und 4°C wurde das Pellet in 1 ml 100 mM LiOAc resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation bei 12000 g für 30 s bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 500 µl 100 mM LiOAc aufgenommen. Die Carrier DNA wurde bei 95°C für 5 min gekocht und auf Eis wieder abgekühlt. Für die Transfektion wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 4-15 Transfektionsansatz von Hefezellen

	Transfektionsansatz
Kompetente Hefezellen	50 µl
50% PEG3000	240 µl

4.4.2. Proteinextraktion aus *E. coli*

Die Proteinextraktion erfolgte durch das Aufschließen der Zellen mit einer Ultraschallsonode (1 min, 100 %, 9 Cycles, 3-4 Wiederholungen) bei 4°C. Die lysierten Zellen wurden bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C für 45 min zentrifugiert, der Überstand durch einen 0,45 µm Filter filtriert und mit 20 mM Imidazol versetzt.

4.4.3. Proteinaufreinigung und Dialyse

Die Proteinaufreinigung erfolgte über His Trap™ FF Säulen der Firma GE Healthcare Bio-Science (Uppsala, Schweden). Zunächst wurden die Säulen mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit Waschpuffer equilibriert (5x Säulenvolumen, 0,4 ml/min) und anschließend mit der Proteinlösung beladen (0,4 ml/min). Es wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen gewaschen und die Proteine mit einem geeigneten Volumen an Elutionspuffer in Dialysekammern eluiert (0,4 ml/min). Diese wurden mit Schläuchen (16 mm MWCO 12-14 kDa) verschlossen und gegen Lysepuffer mit 1 mM DTT über Nacht bei 4°C und anschließend erneut für 4h dialysiert. Die Proteine wurden mit 10 % Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Waschpuffer	100 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 100 mM TRIS/HCl, pH = 7,9
Elutionspuffer	100 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 100 mM TRIS/HCl, pH = 7,9

4.4.4. Säulenregeneration

Die Säulenregeneration erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tabelle 4-16 Protokoll zur Säulenregeneration

	Säulenvolumen
0,1 mM EDTA	5-10
100 mM NaCl 500 mM Imidazol 5 mM GdmCl 100 mM TRIS/HCl, pH=7,9	5
mQ H ₂ O	5

100 mM NiSO ₄	3
mQ H ₂ O	10

4.4.5. Gesamtproteinextraktion aus Pappel

Für die Gesamtproteinextraktion aus Pappel wurde das Protokoll nach Laing und Christeller verwendet (Laing and Christeller 2004). Hierfür wurde das in flüssigem Stickstoff gefrorene und gemörserte Blattmaterial mit 1:5 (w/v) Extraktionspuffer versehen, gevortext und bei 30000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Proteine wurden danach mittels Aceton gefällt. Der Überstand wurde mit der vierfachen Menge an eiskaltem Aceton versetzt, gevortext und für 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nachdem das Pellet für 30 min getrocknet wurde, wurde es in 1x SDS Ladepuffer resuspendiert.

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

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld nach dem Molekulargewicht. Hierfür wurde ein 15 %es Trenngel und ein 4 %es Sammelgel hergestellt. Die Proben wurden mit 6x SDS Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der PageRuler Plus Protein Ladder von Thermo Scientific. Das Gel wurde ebenfalls mit BSA Standards beladen um die Proteinkonzentration zu bestimmen. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer bei 120 V und 40 mA für 60 min.

Tabelle 4-17 Trenn- und Sammelgel

	15 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % (w/v) Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	5 ml	390 µl
mQ H ₂ O	2,3 ml	2,3 ml
Trenngelpuffer (2 M TRIS/HCl, pH = 8,8)	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer (1,5 M TRIS/HCL, pH = 6,8)	-	255 µl
10 % SDS	100 µl	30 µl
TEMED	10 µl	3 µl
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	100 µl	30 µl

1x SDS Laufpuffer	25 mM Tris Base; 192 mM Glycerol; 0,1 % (w/v) SDS
6x SDS Ladepuffer	1 g SDS; 3,6 ml Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; mit 0,3 M TRIS/HCl pH = 6,8 auf 10 ml

4.4.7. Coomassie Färbung

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in der Coomassie Färbelösung für 1 min bei 360 W in der Mikrowelle gekocht und bei 40 rpm für 15 min inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt, mit Wasser gewaschen und mit 10% Essigsäure über Nacht bei 40 rpm entfärbt.

Coomassie Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
-----------------------	--

4.4.8. Western Blot

Für den Nachweis der eGFP Proteine diente ein Western Blot als immunologischer Nachweis. Die Proteine wurden wie oben beschrieben in einem SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden sie in einem halbtrockenen Blotverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Die mit Methanol aktivierte PVDF Membran und sechs Lagen Whatman®-Papier wurden mit Elektronentransferpuffer befeuchtet und in der Reihenfolge 6 x Whatman®-Papier, Membran, Gel, 6 x Whatman®-Papier auf die Anodenseite des Blot-Apparats gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei 400 mA und 15 V für 1 Stunde. Die Membran wurde für mindestens 1 h mit 2,5 % Milchpulverlösung geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Blocking-Lösung wurde durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertes anti-GFP in 2,5 % Magermilch ersetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die Membran wurde 5-mal für jeweils 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen bevor ein Enhanced-Chemilumineszenz-Substrat für HRP zugegeben wurde. Der Umsatz des Substrates erfolgt an den Positionen der HRP-gekoppelten Antikörper was zu einer Chemilumineszenz führt. Die Analyse erfolgte durch den Chemilumineszenzdetektor ImageQuant LAS 4000 der Firma GE Healthcare Life Sciences.

Elektronentransferpuffer	5,8 g TRIS/HCl, pH = 8,3 2,9 g Glycin 200 ml MeOH
--------------------------	---

	3,75 ml 10 % SDS, mit mQ H ₂ O auf 1 l
TBST – Puffer	50 mM TRIS/HCl, pH = 7,4 150 mM NaCl 0,1 % Triton-X-100
Antikörper	anti-GFP HRP-Konjugat (1 : 5000) Vector Lab

4.4.9. Phosphatase Aktivitätsmessung

Die Aktivität der Phosphatasen und deren Regulation durch RCARs wurde mit Hilfe des fluoreszierenden Methyllumbelliferon (MU) bestimmt. Als Substrat dient 4-Methylumbelliferyl Phosphat (4-MUP), welches von der Phosphatase zu MU dephosphoryliert wird. Dieses wurde bei 360nm angeregt und emittiertes Licht wurde bei 450nm im Plate Reader gemessen. Die Signalintensität ist proportional zur produzierten Stoffmenge des Fluorophors. Die Produktion wurde für 20min gemessen und in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen die Zeit aufgetragen. Die daraus resultierende Steigung entspricht der Phosphataseaktivität und wird in mRFU/ min angegeben.

Die Durchführung bestand zunächst in der Herstellung der Enzymlösung, welche bei 1400 rpm bei 35°C für 10 min geschüttelt wurde. Nach der Zugabe unterschiedlicher ABA Konzentrationen erfolgte eine weitere Inkubation bei 1400 rpm bei 35°C für 10 min. Parallel wurde die Substratlösung für 10 min bei 35°C inkubiert und mit der Enzymlösung vermischt (je 40 µl) und in eine Mikrotiterplatte gegeben. Die Messung erfolgte mit je 4 Replikaten im auf 30°C vorgeheizten Plate Reader.

Enzymlösung	25 µl 8x Puffer; 0,3 mM MnCl ₂ ; x µg Phosphatase; x µg RCAR; 20 µl ABA Stocklösung; mit mQ H ₂ O auf 200 µl
8x Puffer	0,8 M TRIS/HCl, pH = 7,9; 0,8 M NaCl; 40 mM DTT
Substratlösung	0,1 M TRIS/HCl, pH = 7,9; 5 mM 4-MUP; 0,1 M NaCl; 0,3 mM MnCl ₂

5. Anhang

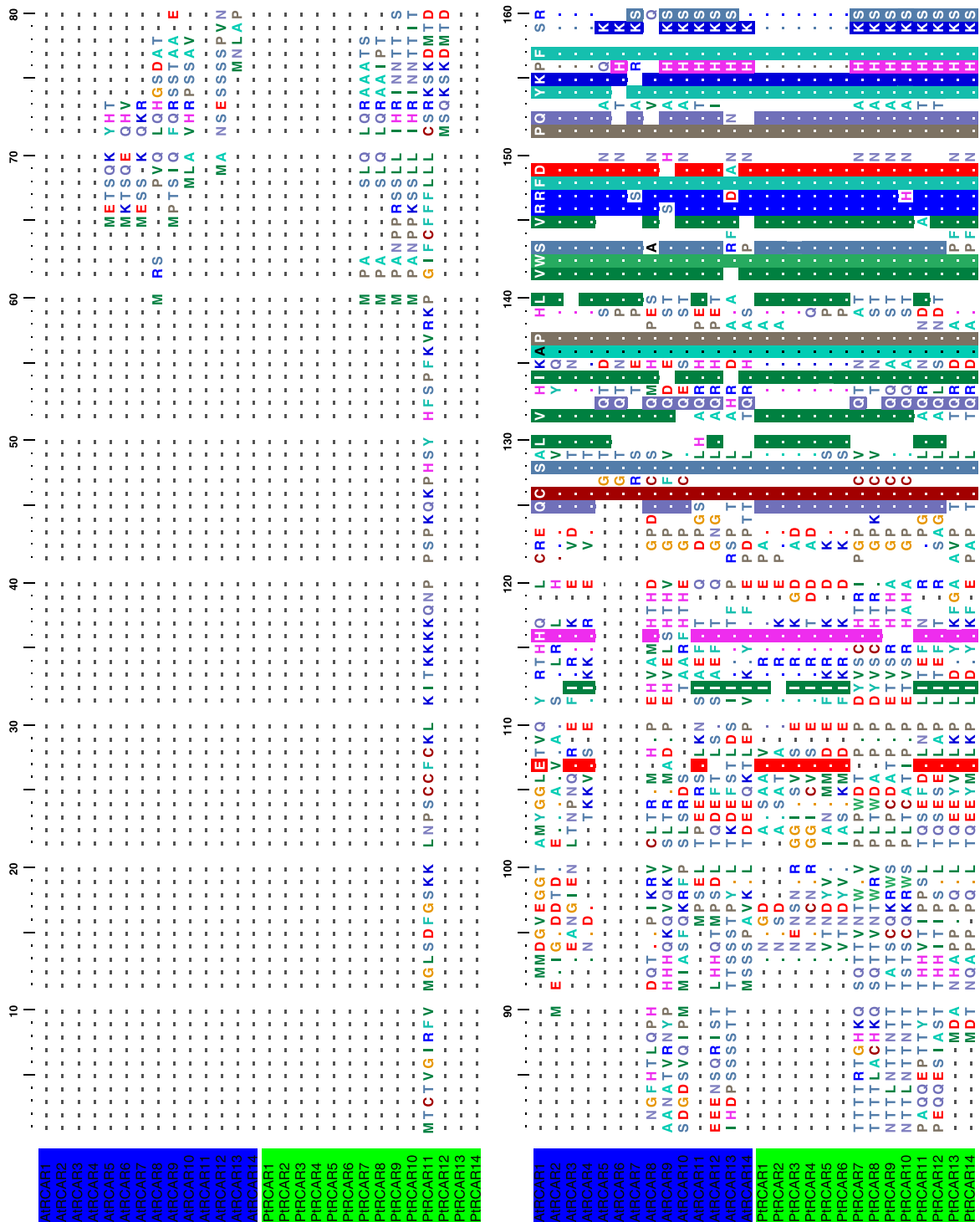
5.1. Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 5-1 Verwendete Oligonukleotide für quantitative RT-PCR

RT RCAR1 fwd	At1g01360	AGTTCAGCCGAGAGAGATTAGATG
RT RCAR1 rev	At1g01360	CGATGATCACCACCTATAATGCTA
RT RCAR2 fwd	At4g01026	GAAGACAGTGGTTGTGGAGAGTTA
RT RCAR2 rev	At4g01026	CCAACGATAGTATCAGCAAACAAC
RT RCAR3 fwd	At5g53160	TAGTTCCTTCCGGCACATCC
RT RCAR3 rev	At5g53160	TGGCGGTAACCATAGGCTTG
RT RCAR4 fwd	At4g27920	GACCACAGGCTCAAGAACTACC
RT RCAR4 rev	At4g27920	CACATCAACGATGTAAGACTCCAC
RT RCAR5 fwd	At5g45860	GCCACGTCATCAGTTTCAGC
RT RCAR5 rev	At5g45860	AGTCCTCCTCCGACTCATGC
RT RCAR6 fwd	At5g45870	TACGATGCAATCTTCAATCTCTTG
RT RCAR6 rev	At5g45870	TCACAGAGACATCTTCTTCTTGCT
RT RCAR7 fwd	At4g18620	GAACATAGGCTGACGAATTACAAA
RT RCAR7 rev	At4g18620	TATCAACGACGTAAGATTCCAAA
RT RCAR8 fwd	At5g05440	GGTTTAGTATAACCGGTGGTGAAC
RT RCAR8 rev	At5g05440	TCTCAAATCTATGAACCGTCGTAA
RT RCAR9 fwd	At2g40330	CAACGAGTTCGTCGTCTTGG
RT RCAR9 rev	At2g40330	CGACCGTATCCACAAACATCC
RT RCAR10 fwd	At2g38310	TTACACGGTGGTTCTTGAATCTTA
RT RCAR10 rev	At2g38310	TCCACAAACATTTTAGTGTCTTCC
RT RCAR11 fwd	At4g17870	ACTTCACAGGCTACAACACCAA
RT RCAR11 rev	At4g17870	TCGTTAGTTAGTCACATTCTTTCTTT
RT RCAR12 fwd	At5g46790	AAATTTTAAACAATAACAGCAACA
RT RCAR12 rev	At5g46790	GCATCACTTAAAATGAACTTTTTG
RT RCAR13 fwd	At1g73000	ATACTGCAGATGGAAAGTT- CTAAGCAAAAACGA
RT RCAR13 rev	At1g73000	ATAGGATCCTTACTTCATCATTTTCTTT- GTGAGC
RT RCAR14 fwd	At2g26040	GTGCTGCAAGGCGATTAAGT
RT RCAR14 rev	At2g26040	CGATGGTGTAGTCCTCGTTG
RT PcR4 fwd	Potri.015G020500	CTCCCTCCATCCAGAGATCA
RT PcR4 rev	Potri.015G020500	ATCCTTCGTGTTCCCATCAG
RT PcR9 fwd	Potri.016G125400	AGACCGTCTCACGCTACCAC
RT PcR9 rev	Potri.016G125400	GACCATACGGTGGAGATTGG
RT PcR13 fwd	Potri.006G230600	ATGTGGAAGTGAAGCCCTTG
RT PcR13 rev	Potri.006G230600	GCTGGTGCATCAATACGTTG
RT Pop TIP4 fwd	Referenz	GCTGATAATGGGGTGTGG
RT Pop TIP4 rev	Referenz	CAACTCTAAGCCAGAATCGC
RT Pop CDC2 fwd	Referenz	ATTCCCAAGTGGCCTTCTAAG

RT Pop CDC2 rev	Referenz	TATTCATGCTCCAAAGCACTCC
RT Pop ACT2 fwd	Referenz	TTCTACAAGTGCTTTGATGGTGAGTTC
RT Pop ACT2 rev	Referenz	CTATTCGATACATAGAAGATCAGAAT GTTC

5.2. Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel RCARs



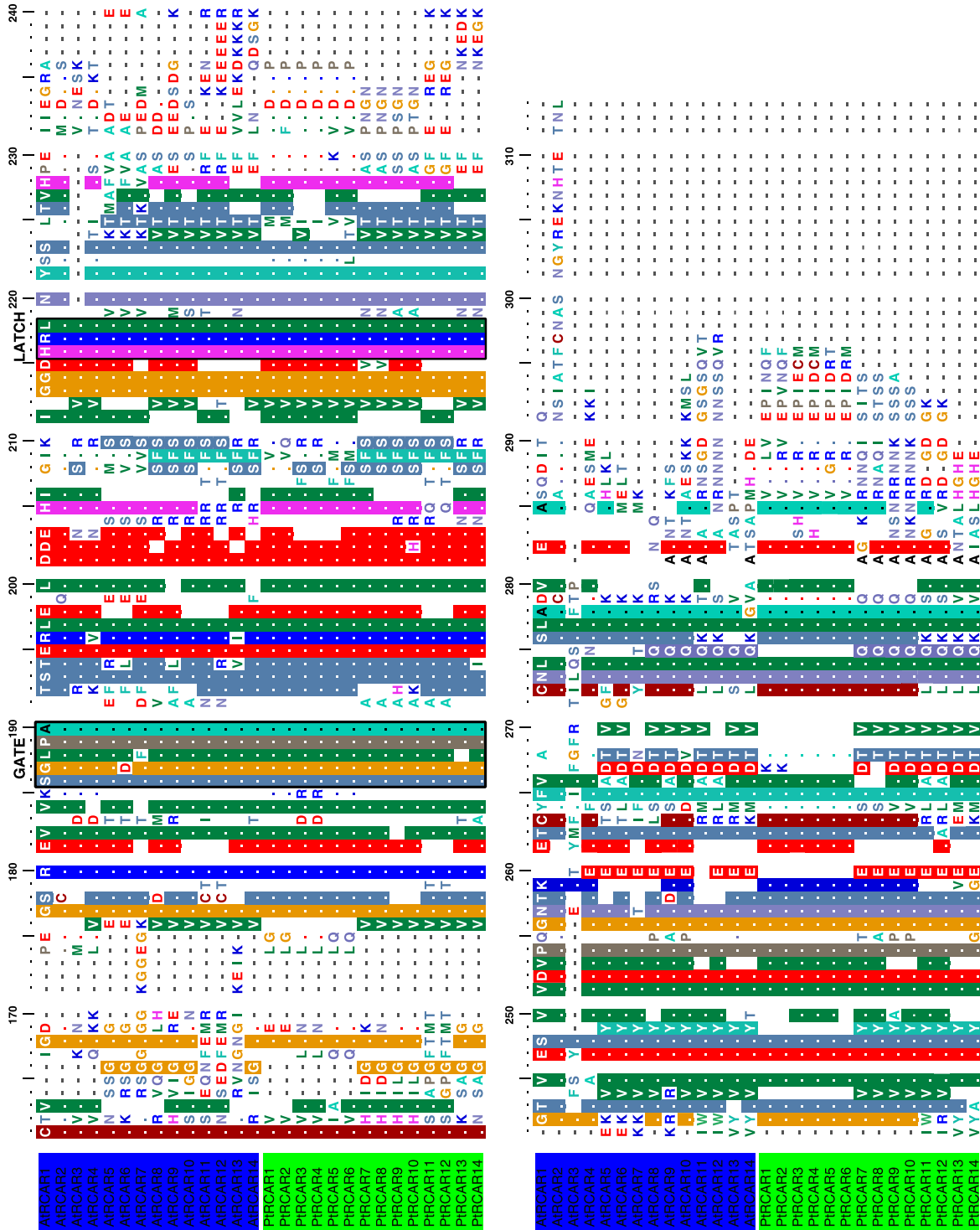
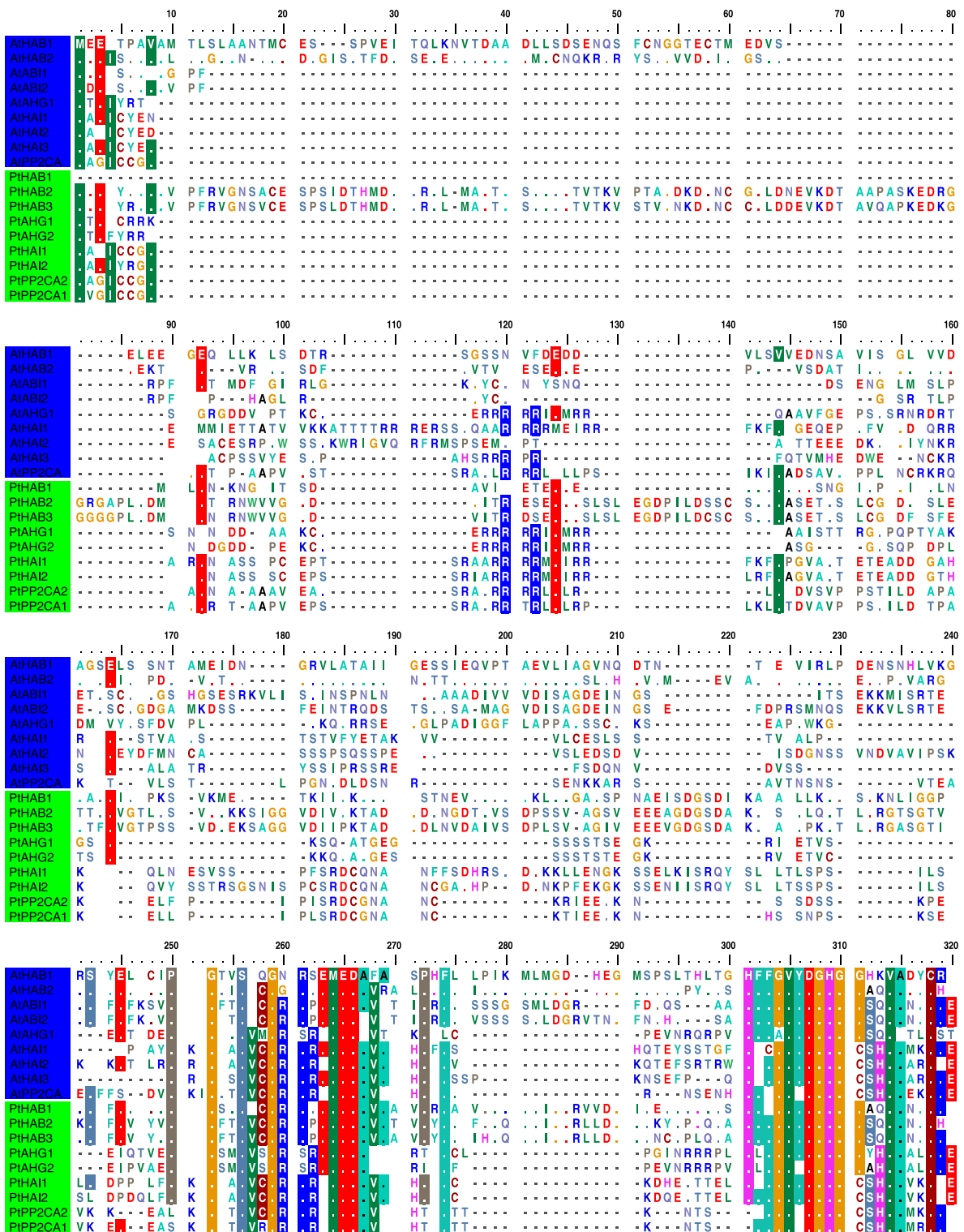


Abb. 5-1 Multiples Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel RCARs.

Die Primärstrukturen der Proteinsequenzen von Arabidopsis (blau) und Pappel (grün) RCARs wurden mit BioEdit aligniert. Das Gesamtalignment hat eine Länge von 313 Aminosäuren mit 112 konservierten Stellen (Grenzwert = 50%, farbhinterlegt). Die Aminosäuren des GATE und LATCH sind schwarz umrandet.

5.3. Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel PP2Cs



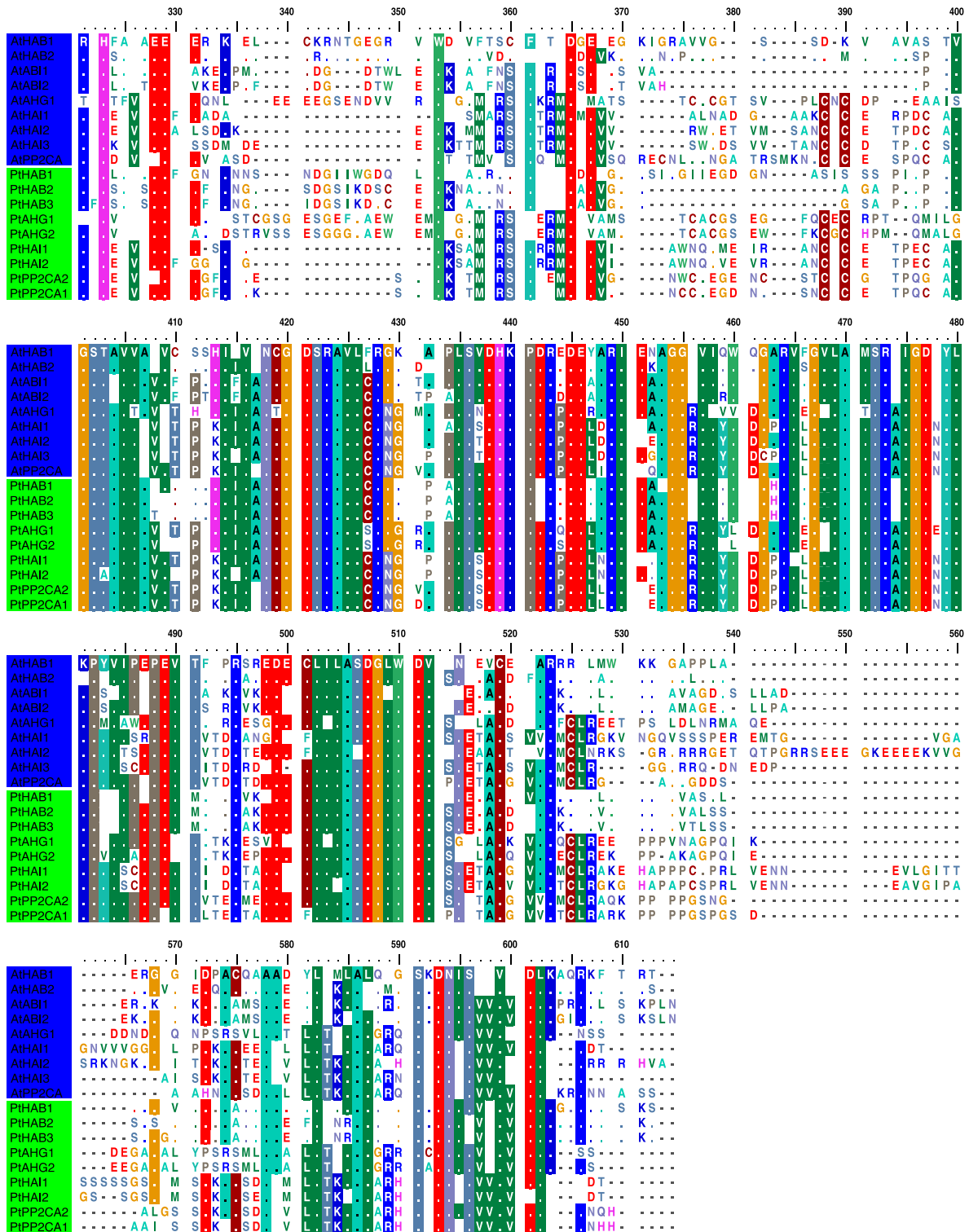


Abb. 5-2 Multiples Sequenzalignment von Arabidopsis und Pappel PP2Cs.

Die Primärstrukturen der Proteinsequenzen von Arabidopsis (blau) und Pappel (grün) PP2Cs wurden mit BioEdit aligniert. Das Gesamtalignment hat eine Länge von 614 Aminosäuren mit 219 konservierten Stellen (Grenzwert = 50%, farbhinterlegt). Das konservierte Tryptophan befindet sich an Position 460.

5.4. Stammbaum von *Arabidopsis* und *Marchantia* RCARs

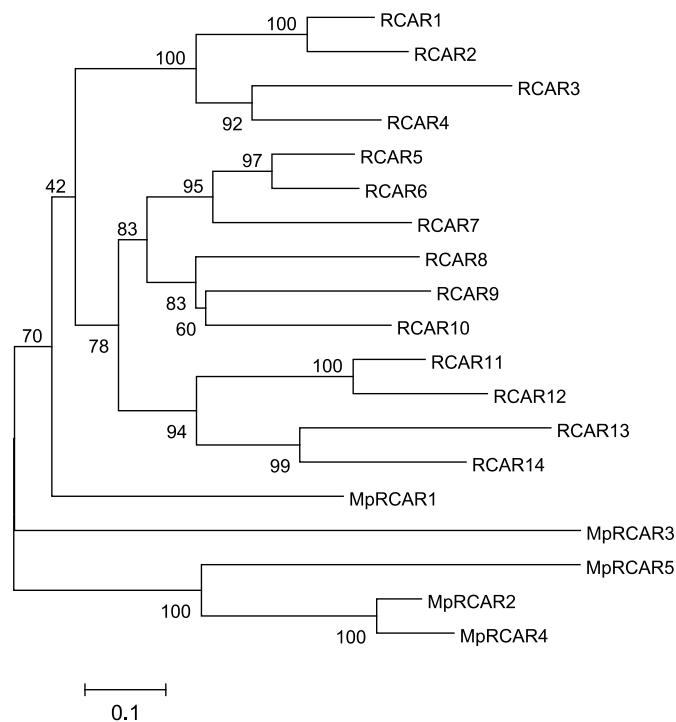


Abb. 5-3 Stammbaum von *Arabidopsis* und *Marchantia* RCARs.

Phylogenetische Analyse basierend auf dem Neighbor-Joining-Algorithmus von RCARs in *Arabidopsis* und *M. polymorpha*. Die Zahlen geben den Anteil der Einzelbäume von 1000 Permutationen in Prozent an, in denen der betreffende Ast enthalten war.

5.5. Interaktionsanalyse von Pappel RCAR und Pappel PP2Cs

	PcHAB1	PcHAI3	Pc PP2CA1	Pc PP2CA2
PcRCAR1	-	+	+	+
PcRCAR2	+	+	+	+
PcRCAR3	+	+	+	+
PcRCAR4	-	+	+	+
PcRCAR5	-	-	-	+
PcRCAR7	-	+	-	+
PcRCAR8	-	+	-	+
PcRCAR9	+	+	+	+
PcRCAR13	-	+	-	+
PcRCAR14	-	+	-	+
ABA	-	+	-	+

Abb. 5-4 Interaktionsanalyse von Pappel RCARs und PP2Cs

Interaktionsmatrix von Pappel RCARs und PP2Cs auf Selektionsmedium mit oder ohne ABA in Hefe. Positive Interaktionen sind mit grüner Farbe hinterlegt. Daten aus Bachelorarbeit Wiedorn (2015)

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. *The Plant cell* **9** (10):1859-1868. doi:10.1105/tpc.9.10.1859
- Acosta IF, Farmer EE** (2010) Jasmonates. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **8**:e0129. doi:10.1199/tab.0129
- 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 physiology* **161** (2):931-941. doi:10.1104/pp.112.208678
- Arend M, Schnitzler JP, Ehling B, Hansch R, Lange T, Rennenberg H, Himmelbach A, Grill E, Fromm J** (2009) Expression of the Arabidopsis mutant ABI1 gene alters abscisic acid sensitivity, stomatal development, and growth morphology in gray poplars. *Plant physiology* **151** (4):2110-2119. doi:10.1104/pp.109.144956
- Arshad M, Mattsson J** (2014) A putative poplar PP2C-encoding gene negatively regulates drought and abscisic acid responses in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Trees* **28**:531-543. doi:10.1007/S00468-013-0969-7
- Asseng S, Ewert F, Martre P, Rotter RP, Lobell DB, Cammarano D, Kimball BA, Ottman MJ, Wall GW, White JW, Reynolds MP, Alderman PD, Prasad PVV, Aggarwal PK, Anothai J, Basso B, Biernath C, Challinor AJ, De Sanctis G, Doltra J, Fereres E, Garcia-Vile M, Gayler S, Hoogenboom G, Hunt LA, Izaurrealde RC, Jabloun M, Jones CD, Kersebaum KC, Koehler AK, Muller C, Kumar SN, Nendel C, O'Leary G, Olesen JE, Palosuo T, Priesack E, Rezaei EE, Ruane AC, Semenov MA, Shcherbak I, Stockle C, Stratonovitch P, Streck T, Supit I, Tao F, Thorburn PJ, Waha K, Wang E, Wallach D, Wolf I, Zhao Z, Zhu Y** (2015) Rising temperatures reduce global wheat production. *Nat Clim Change* **5** (2):143-147. doi:10.1038/Nclimate2470
- Aylott MJ, Casella E, Tubby I, Street NR, Smith P, Taylor G** (2008) Yield and spatial supply of bioenergy poplar and willow short-rotation coppice in the UK. *New Phytol* **178** (2):358-370. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02396.x
- Bai C, Elledge SJ** (1996) Gene identification using the yeast two-hybrid system. *Methods Enzymol* **273**:331-347
- Bai G, Yang DH, Zhao Y, Ha S, Yang F, Ma J, Gao XS, Wang ZM, Zhu JK** (2013) Interactions between soybean ABA receptors and type 2C protein phosphatases. *Plant molecular biology* **83** (6):651-664. doi:10.1007/s11103-013-0114-4
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL** (2006) Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant Cell Environ* **29** (10):2000-2008. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01576.x
- Ben-Ari G** (2012) The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from Arabidopsis. *Plant cell reports* **31** (8):1357-1369. doi:10.1007/s00299-012-1292-2
- Benfey PN, Chua NH** (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* **250** (4983):959-966. doi:10.1126/science.250.4983.959
- 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. *The Plant cell* **9** (7):1055-1066. doi:DOI 10.1105/tpc.9.7.1055
- Bhaskara GB, Nguyen TT, Verslues PE** (2012) Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs. *Plant physiology* **160** (1):379-395. doi:10.1104/pp.112.202408
- Blum A** (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust J Agr Res* **56** (11):1159-1168. doi:10.1071/Ar05069
- Boneh U, Biton I, Zheng CL, Schwartz A, Ben-Ari G** (2012) Characterization of potential ABA receptors in *Vitis vinifera*. *Plant cell reports* **31** (2):311-321. doi:DOI 10.1007/s00299-011-1166-z
- 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. *The Journal of biological chemistry* **279** (40):41758-41766. doi:10.1074/jbc.M405259200

- Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Berger F, Adam C, Aki SS, Althoff F, Araki T, Arteaga-Vazquez MA, Balasubramanian S, Barry K, Bauer D, Boehm CR, Briginshaw L, Caballero-Perez J, Catarino B, Chen F, Chiyoda S, Chovatia M, Davies KM, Delmans M, Demura T, Dierschke T, Dolan L, Dorantes-Acosta AE, Eklund DM, Florent SN, Flores-Sandoval E, Fujiyama A, Fukuzawa H, Galik B, Grimanelli D, Grimwood J, Grossniklaus U, Hamada T, Haseloff J, Hetherington AJ, Higo A, Hirakawa Y, Hundley HN, Ikeda Y, Inoue K, Inoue SI, Ishida S, Jia Q, Kakita M, Kanazawa T, Kawai Y, Kawashima T, Kennedy M, Kinose K, Kinoshita T, Kohara Y, Koide E, Komatsu K, Kopischke S, Kubo M, Kyojuka J, Lagercrantz U, Lin SS, Lindquist E, Lipzen AM, Lu CW, De Luna E, Martienssen RA, Minamino N, Mizutani M, Mizutani M, Mochizuki N, Monte I, Mosher R, Nagasaki H, Nakagami H, Naramoto S, Nishitani K, Ohtani M, Okamoto T, Okumura M, Phillips J, Pollak B, Reinders A, Rovekamp M, Sano R, Sawa S, Schmid MW, Shirakawa M, Solano R, Spunde A, Suetsugu N, Sugano S, Sugiyama A, Sun R, Suzuki Y, Takenaka M, Takezawa D, Tomogane H, Tsuzuki M, Ueda T, Umeda M, Ward JM, Watanabe Y, Yazaki K, Yokoyama R, Yoshitake Y, Yotsui I, Zachgo S, Schmutz J (2017) Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* **171** (2):287-304 e215. doi:10.1016/j.cell.2017.09.030**
- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **109** (26):10593-10598. doi:10.1073/pnas.1116590109
- Brown JK, Hovmoller MS (2002) Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. Science** **297** (5581):537-541. doi:10.1126/science.1072678
- Bruzzo S, Moreschi I, Usai C, Guida L, Damonte G, Salis A, Scarfi S, Millo E, De Flora A, Zocchi E (2007) Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **104** (14):5759-5764. doi:10.1073/pnas.0609379104
- Busk PK, Pages M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant molecular biology** **37** (3):425-435. doi:10.1023/A:1006058700720
- Chai YM, Jia HF, Li CL, Dong QH, Shen YY (2011) FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. Journal of experimental botany** **62** (14):5079-5089. doi:10.1093/jxb/err207
- Chen JH, Zhang DZ, Zhang C, Xia XL, Yin WL, Tian QQ (2015) A Putative PP2C-Encoding Gene Negatively Regulates ABA Signaling in *Populus euphratica*. PloS one** **10** (10). doi:10.1371/journal.pone.0139466
- 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 physiology** **137** (1):209-219. doi:10.1104/pp.104.053082
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. Plant biology** **8** (3):314-325. doi:10.1055/s-2006-924120
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. The Plant journal : for cell and molecular biology** **52** (1):167-174. doi:10.1111/j.1365-3113.2007.03234.x
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant journal : for cell and molecular biology** **16** (6):735-743
- Clouse SD (2011) Brassinosteroids. The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists** **9**:e0151. doi:10.1199/tab.0151
- Cohen P (1989) The Structure and Regulation of Protein Phosphatases. Annu Rev Biochem** **58**:453-508. doi:10.1146/annurev.bi.58.070189.002321
- Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G (1965) Chemistry and Physiology of Dormins in Sycamore. Nature** **205** (4978):1269-+. doi:10.1038/2051269b0
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. Annual review of plant biology** **61**:651-679. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112122
- Daei G, Ardekani MR, Rejali F, Teimuri S, Miransari M (2009) Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. Journal of Plant Physiology** **166** (6):617-625. doi:10.1016/j.jplph.2008.09.013
- Dai AG (2011) Drought under global warming: a review. Wires Clim Change** **2** (1):45-65. doi:10.1002/wcc.81
- Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF (2011) Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists** **9**:e0156. doi:10.1199/tab.0156

- 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 physiology* **156** (1):106-116. doi:10.1104/pp.110.170894
- 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, Marquez JA** (2011b) A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *EMBO J* **30** (20):4171-4184. doi:10.1038/emboj.2011.294
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT** (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual review of plant biology* **40**:34
- Felsenstein J** (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39** (4):9
- Feurtado JA, Yang J, Ambrose SJ, Cutler AJ, Abrams SR, Kermode AR** (2007) Disrupting abscisic acid homeostasis in western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds induces dormancy termination and changes in abscisic acid catabolites. *J Plant Growth Regul* **26** (1):46-54. doi:10.1007/s00344-006-0035-4
- Fields S, Bartel PL, Iwabuchi K, Li B, Marraccino RL** (1993) The 2-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions. *Faseb J* **7** (7):A1261-A1261
- Finkelstein R** (2013) Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*:e0166. doi:10.1199/tab.0166
- Franks PJ, Adams MA, Amthor JS, Barbour MM, Berry JA, Ellsworth DS, Farquhar GD, Ghannoum O, Lloyd J, McDowell N, Norby RJ, Tissue DT, von Caemmerer S** (2013) Sensitivity of plants to changing atmospheric CO₂ concentration: from the geological past to the next century. *New Phytol* **197** (4):1077-1094. doi:10.1111/nph.12104
- 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. *The FEBS journal* **280** (2):681-693. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x
- 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 of the United States of America* **111** (15):5741-5746. doi:DOI 10.1073/pnas.1322085111
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK** (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462** (7273):660-664. doi:10.1038/nature08599
- 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*. *The Plant cell* **19** (2):485-494. doi:10.1105/tpc.106.048538
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK** (2011) *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** (4):1717-1722. doi:10.1073/pnas.1018367108
- 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 physiology* **50** (12):2123-2132. doi:10.1093/pcp/pcp147
- Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K** (2013) Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia plantarum* **147** (1):15-27. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01635.x
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** (6):1988-1993. doi:10.1073/pnas.0505667103
- Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, vanNeerven RJJ, Schou C, Lowenstein H, Spangfort MD** (1996) X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* **3** (12):1040-1045. doi:DOI 10.1038/nsb1296-1040
- Gambetta GA, Matthews MA, Shaghasi TH, McElrone AJ, Castellarin SD** (2010) Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta* **232** (1):219-234. doi:10.1007/s00425-010-1165-2
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R** (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling

- is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* **4** (173):ra32. doi:10.1126/scisignal.2001346
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (50):21425-21430. doi:10.1073/pnas.0912021106
- Gietz RD, TriggsRaine 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. doi:Doi 10.1023/A:1006859319926
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455** (7210):189-194. doi:10.1038/nature07271
- 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. *The Plant cell* **14** (8):1833-1846. doi:10.1105/tpc002477
- 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. *The Plant cell* **24** (6):2483-2496. doi:10.1105/tpc.112.098574
- Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Lorenzo-Orts L, Pons C, Sarrion-Perdigones A, Fernandez MA, Peirats-Llobet M, Forment J, Moreno-Alvero M, Cutler SR, Albert A, Granell A, Rodriguez PL** (2014) Tomato PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *Journal of experimental botany*. doi:10.1093/jxb/eru219
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS** (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40** (Database issue):D1178-1186. doi:10.1093/nar/gkr944
- Gordon CS, Rajagopalan N, Risseeuw EP, Surpin M, Ball FJ, Barber CJ, Buhrow LM, Clark SM, Page JE, Todd CD, Abrams SR, Loewen MC** (2016) Characterization of *Triticum aestivum* Abscisic Acid Receptors and a Possible Role for These in Mediating Fusarium Head Blight Susceptibility in Wheat. *PLoS one* **11** (10):e0164996. doi:10.1371/journal.pone.0164996
- Groos C, Robert N, Bervas E, Charmet G** (2003) Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theor Appl Genet* **106** (6):1032-1040. doi:10.1007/s00122-002-1111-1
- Guo J, Morrell-Falvey JL, Labbe JL, Muchero W, Kalluri UC, Tuskan GA, Chen JG** (2012) Highly efficient isolation of *Populus* mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays. *PLoS one* **7** (9):e44908. doi:10.1371/journal.pone.0044908
- Guo ML, J. Joyce J. Murphy, R.** (2014) The environmental profile of bioethanol produced from current and potential future poplar feedstocks in the EU. *Green Chemistry*. doi:10.1039/c4gc01124d
- Gutierrez L, Mauriat M, Guenin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O** (2008) The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant biotechnology journal* **6** (6):609-618. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00346.x
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98
- Hao Q, Yin P, Li W, Wang L, Yan C, Lin Z, Wu JZ, Wang J, Yan SF, Yan N** (2011) The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins. *Mol Cell* **42** (5):662-672. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.011
- Henikoff S, Henikoff JG** (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (22):10915-10919
- 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. doi:10.1093/emboj/cdf316
- Himmelbach A, Iten M, Grill E** (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos T Roy Soc B* **353** (1374):1439-1444. doi:DOI 10.1098/rstb.1998.0299

- Hobo T, Asada M, Kowyama Y, Hattori T** (1999) ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **19** (6):679-689
- 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. doi:Doi 10.1016/S1360-1385(99)01429-6
- 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 physiology* **132** (2):666-680. doi:10.1104/pp.102.011999
- Huetteman CA, Preece JE** (1993) Thidiazuron - a Potent Cytokinin for Woody Plant-Tissue Culture. *Plant Cell Tiss Org* **33** (2):105-119. doi:Doi 10.1007/Bf01983223
- Huttly AK, Baulcombe DC** (1989) A wheat alpha-Amy2 promoter is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. *EMBO J* **8** (7):1907-1913
- Imes D, Mumm P, Bohm J, Al-Rasheid KA, Marten I, Geiger D, Hedrich R** (2013) Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **74** (3):372-382. doi:10.1111/tpj.12133
- Irigoyen ML, Iniesto E, Rodriguez L, Puga MI, Yanagawa Y, Pick E, Strickland E, Paz-Ares J, Wei N, De Jaeger G, Rodriguez PL, Deng XW, Rubio V** (2014) Targeted Degradation of Abscisic Acid Receptors Is Mediated by the Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor DDA1 in Arabidopsis. *The Plant cell* **26** (2):712-728. doi:10.1105/tpc.113.122234
- Jaillais Y, Chory J** (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & molecular biology* **17** (6):642-645. doi:10.1038/nsmb0610-642
- Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F, b ZIPRG** (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science* **7** (3):106-111
- 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
- Jansson S, Douglas CJ** (2007) Populus: a model system for plant biology. *Annual review of plant biology* **58**:435-458. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.103956
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6** (13):3901-3907
- Juenger TE, McKay JK, Hausmann N, Keurentjes JJB, Sen S, Stowe KA, Dawson TE, Simms EL, Richards JH** (2005) Identification and characterization of QTL underlying whole-plant physiology in Arabidopsis thaliana: delta C-13, stomatal conductance and transpiration efficiency. *Plant Cell Environ* **28** (6):697-708. doi:DOI 10.1111/j.1365-3040.2004.01313.x
- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ** (2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J Chem Ecol* **38** (6):651-664. doi:10.1007/s10886-012-0134-6
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y** (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** (5):2355-2360. doi:10.1073/pnas.0909222107
- Karssen CM, Brinkhorstvanderswan DLC, Breckland 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. doi:Doi 10.1007/Bf00393650
- Kenney AM, McKay JK, Richards JH, Juenger TE** (2014) Direct and indirect selection on flowering time, water-use efficiency (WUE, delta (13)C), and WUE plasticity to drought in Arabidopsis thaliana. *Ecol Evol* **4** (23):4505-4521. doi:10.1002/ece3.1270
- 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. doi:DOI 10.1104/pp.111.182584
- Kim H, Hwang H, Hong JW, Lee YN, Ahn IP, Yoon IS, Yoo SD, Lee S, Lee SC, Kim BG** (2012) A rice orthologue of the ABA receptor, OsPYL/RCAR5, is a positive regulator of the ABA signal transduction pathway in seed germination and early seedling growth. *Journal of experimental botany* **63** (2):1013-1024. doi:10.1093/jxb/err338
- 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. *Annual review of plant biology* **61**:561-591. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112226
- Kobayashi Y, Murata M, Minami H, Yamamoto S, Kagaya Y, Hobo T, Yamamoto A, Hattori T** (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant Journal* **44** (6):939-949. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02583.x

- Kong LS, Abrams SR, Owen SJ, Van Niejenhuis A, Von Aderkas P** (2009) Dynamic changes in concentrations of auxin, cytokinin, ABA and selected metabolites in multiple genotypes of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) during a growing season. *Tree physiology* **29** (2):183-190. doi:10.1093/treephys/tpn009
- Kramer PJ, Boyer JS** (1995) *Water relations of plants and soils*. Elsevier Science, New York
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ** (1998) (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant physiology* **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 physiology* **140** (1):127-139. doi:10.1104/pp.105.070318
- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K** (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** (5):2361-2366. doi:10.1073/pnas.0912516107
- 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. doi:10.1038/sj.emboj.7600121
- Kwak JM, Murata Y, Baizabal-Aguirre VM, Merrill J, Wang M, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Schroeder JI** (2001) Dominant negative guard cell K⁺ channel mutants reduce inward-rectifying K⁺ currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **127** (2):473-485
- Lacombe B, Achard P** (2016) Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Current opinion in plant biology* **34**:1-8. doi:10.1016/j.pbi.2016.06.007
- Laing W, Christeller J** (2004) Extraction of proteins from plant tissues. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 4*:Unit 4.7. doi:10.1002/0471140864.ps0407s38
- Lang V, Palva ET** (1992) The Expression of a Rab-Related Gene, Rab18, Is Induced by Abscisic-Acid during the Cold-Acclimation Process of *Arabidopsis-Thaliana* (L) Heynh. *Plant molecular biology* **20** (5):951-962. doi:10.1007/Bf00027165
- Lawson T, Blatt MR** (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant physiology* **164** (4):1556-1570. doi:10.1104/pp.114.237107
- Lebaudy A, Pascaud F, Very AA, Alcon C, Dreyer I, Thibaud JB, Lacombe B** (2010) Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K⁺ current properties in *Arabidopsis* guard cells. *The Journal of biological chemistry* **285** (9):6265-6274. doi:10.1074/jbc.M109.068445
- 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. doi:10.1016/j.cell.2006.07.034
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (50):21419-21424. doi:10.1073/pnas.0910601106
- Leon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaert JA, Koornneef M** (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **10** (4):655-661
- Leple JC, Brasileiro AC, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L** (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant cell reports* **11** (3):137-141. doi:10.1007/BF00232166
- 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. *The Plant cell* **9** (5):759-771. doi:10.1105/tpc.9.5.759
- Li G, Xin H, Zheng XF, Li S, Hu Z** (2012) Identification of the abscisic acid receptor VvPYL1 in *Vitis vinifera*. *Plant biology* **14** (1):244-248. doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00504.x
- Li J, Shi CW, Sun DM, He Y, Lai CH, Lv P, Xiong Y, Zhang LH, Wu FM, Tian CL** (2015) The HAB1 PP2C is inhibited by ABA-dependent PYL10 interaction. *Sci Rep-Uk* **5**. doi:10.1038/srep10890
- Liang ZS, Yang JW, Shao HB, Han RL** (2006) Investigation on water consumption characteristics and water use efficiency of poplar under soil water deficits on the Loess Plateau. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* **53** (1):23-28. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.07.008
- 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 science : an international journal of experimental plant biology* **187**:83-88. doi:10.1016/j.plantsci.2012.01.013

- Lim EK, Doucet CJ, Hou B, Jackson RG, Abrams SR, Bowles DJ** (2005) Resolution of (+)-abscisic acid using an Arabidopsis glycosyltransferase. *Tetrahedron-Asymmetr* **16** (1):143-147. doi:10.1016/j.tetasy.2004.11.062
- Lobell DB, Field CB** (2007) Global scale climate - crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environ Res Lett* **2** (1). doi:10.1088/1748-9326/2/1/014002
- Lynch T, Erickson BJ, Finkelstein RR** (2012) Direct interactions of ABA-insensitive(ABI)-clade protein phosphatase(PP)2Cs with calcium-dependent protein kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response. *Plant molecular biology* **80** (6):647-658. doi:10.1007/s11103-012-9973-3
- 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. doi:10.1126/science.1172408
- Magnone M, Bruzzone S, Guida L, Damonte G, Millo E, Scarft S, Usai C, Sturla L, Palombo D, De Flora A, Zocchi E** (2009) Abscisic Acid Released by Human Monocytes Activates Monocytes and Vascular Smooth Muscle Cell Responses Involved in Atherogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **284** (26):17808-17818. doi:10.1074/jbc.M809546200
- Manzaneda AJ, Rey PJ, Anderson JT, Raskin E, Weiss-Lehman C, Mitchell-Olds T** (2015) Natural variation, differentiation, and genetic trade-offs of ecophysiological traits in response to water limitation in *Brachypodium distachyon* and its descendent allotetraploid *B-hybridum* (Poaceae). *Evolution* **69** (10):2689-2704. doi:10.1111/evo.12776
- Maron JL, Crone E** (2006) Herbivory: effects on plant abundance, distribution and population growth. *Proc Biol Sci* **273** (1601):2575-2584. doi:10.1098/rspb.2006.3587
- Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J** (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann Bot* **89 Spec No**:895-905
- 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. doi:10.1038/nature08613
- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A Protein Phosphatase 2c Involved in ABA Signal-Transduction in Arabidopsis-Thaliana. *Science* **264** (5164):1452-1455. doi:DOI 10.1126/science.8197457
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KA, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R** (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **63** (6):1054-1062. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04302.x
- Miransari M** (2011) Soil microbes and plant fertilization. *Appl Microbiol Biot* **92** (5):875-885. doi:10.1007/s00253-011-3521-y
- Mittal A, Gampala SS, Ritchie GL, Payton P, Burke JJ, Rock CD** (2014) Related to ABA-Insensitive3(ABI3)/Viviparous1 and AtABI5 transcription factor coexpression in cotton enhances drought stress adaptation. *Plant biotechnology journal* **12** (5):578-589. doi:10.1111/pbi.12162
- 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. doi:10.1038/nature08583
- Moes D, Himmelbach A, Korte A, Haberer G, Grill E** (2008) Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **54** (5):806-819. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03454.x
- 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. doi:10.1007/s00425-004-1206-9
- Morison JI, Baker NR, Mullineaux PM, Davies WJ** (2008) Improving water use in crop production. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363** (1491):639-658. doi:10.1098/rstb.2007.2175
- 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 molecular biology* **60** (1):51-68. doi:10.1007/s11103-005-2418-5
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual review of plant biology* **56**:165-185. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046
- Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **34** (2):137-148

- Ng LM, Soon FF, Zhou XE, West GM, Kovach A, Suino-Powell KM, Chalmers MJ, Li J, Yong EL, Zhu JK, Griffin PR, Melcher K, Xu HE** (2011) Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** (52):21259-21264. doi:10.1073/pnas.1118651109
- Nicole MC, Hamel LP, Morency MJ, Beaudoin N, Ellis BE, Seguin A** (2006) MAP-ping genomic organization and organ-specific expression profiles of poplar MAP kinases and MAP kinase kinases. *BMC genomics* **7**:223. doi:10.1186/1471-2164-7-223
- 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. doi:10.1126/science.1181829
- 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 : for cell and molecular biology* **50** (6):935-949. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03107.x
- 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. doi:10.1126/science.142.3599.1592
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (29):12132-12137. doi:10.1073/pnas.1305919110
- Papacek M, Christmann A, Grill E** (2017) Interaction network of ABA receptors in grey poplar. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **92** (2):199-210. doi:10.1111/tpj.13646
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubiercomella 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. *The Plant cell* **6** (11):1567-1582
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, 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. doi:10.1126/science.1173041
- Parry AD, Blonstein AD, Babiano MJ, King PJ, Horgan R** (1991) Abscisic-acid metabolism in a wilty mutant of *Nicotiana glauca*. *Planta* **183** (2):237-243. doi:10.1007/BF00197794
- Pettengill EA, Parmentier-Line C, Coleman GD** (2012) Evaluation of qPCR reference genes in two genotypes of *Populus* for use in photoperiod and low-temperature studies. *BMC Res Notes* **5**:366. doi:10.1186/1756-0500-5-366
- Pilot G, Lacombe B, Gaymard F, Cherel I, Boucherez J, Thibaud JB, Sentenac H** (2001) Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *The Journal of biological chemistry* **276** (5):3215-3221. doi:10.1074/jbc.M007303200
- 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 physiology* **163** (1):441-455. doi:10.1104/pp.113.224162
- Pri-Tal O, Shaar-Moshe L, Wiseglass G, Peleg Z, Mosquna A** (2017) Non-redundant functions of the dimeric ABA receptor BdPYL1 in the grass *Brachypodium*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **92** (5):774-786. doi:10.1111/tpj.13714
- Pryce RJ** (1971) Lunularic acid, a common endogenous growth inhibitor of liverworts. *Planta* **97** (4):354-357. doi:10.1007/BF00390214
- 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**. doi:10.1186/1471-2148-8-286
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E** (2010) ABA perception and signalling. *Trends in plant science* **15** (7):395-401. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.006
- Ranney TG, Bir RE, Skroch WA** (1991) Comparative Drought Resistance among 6 Species of Birch (*Betula*) - Influence of Mild Water-Stress on Water Relations and Leaf Gas-Exchange. *Tree physiology* **8** (4):351-360
- Raschke K, Firn RD, Pierce M** (1975) Stomatal closure in response to xanthoxin and abscisic acid. *Planta* **125** (2):149-160. doi:10.1007/BF00388701
- Rejeb IB, Pastor V, Mauch-Mani B** (2014) Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants (Basel)* **3** (4):458-475. doi:10.3390/plants3040458

- Rizza F, Ghashghaie J, Meyer S, Matteu L, Mastrangelo AM, Badeck FW** (2012) Constitutive differences in water use efficiency between two durum wheat cultivars. *Field Crop Res* **125**:49-60. doi:10.1016/j.fcr.2011.09.001
- Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi A, Lumberas V, Gonzalez-Guzman M, Antoni R, Rodriguez PL, Baena-Gonzalez E** (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *The Plant cell* **25** (10):3871-3884. doi:10.1105/tpc.113.114066
- 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 molecular biology* **38** (5):879-883
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R** (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant Journal* **37** (4):578-588. doi:10.1111/j.1365-313X.2003.01985.x
- Rohde A** (2002) PtABI3 Impinges on the Growth and Differentiation of Embryonic Leaves during Bud Set in Poplar. *The Plant Cell Online* **14** (8):1885-1901. doi:10.1105/tpc.003186
- 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. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **37** (3):354-369
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M** (2004) Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant physiology* **134** (4):1439-1449. doi:10.1104/pp.103.037614
- Sakata Y, Komatsu K, Takezawa D** (2014) ABA as a Universal Plant Hormone. *Prog Bot* **75**:57-96. doi:10.1007/978-3-642-38797-5_2
- Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Tuskan GA** (2010) Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. *Biofuel Bioprod Bior* **4** (2):209-226. doi:10.1002/bbb.206
- 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. doi:10.1038/nature08591
- 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. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **60** (4):575-588. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03981.x
- 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. doi:10.1042/BJ20091221
- Schaller GE, Kieber JJ** (2002) Ethylene. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **1**:e0071. doi:10.1199/tab.0071
- Sheffield J, Wood EF** (2008) Global trends and variability in soil moisture and drought characteristics, 1950-2000, from observation-driven Simulations of the terrestrial hydrologic cycle. *J Climate* **21** (3):432-458. doi:10.1175/2007jcli1822.1
- Shen Q, Zhang P, Ho TH** (1996) Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *The Plant cell* **8** (7):1107-1119
- Sirichandra C, Davature M, Turk BE, Zivy M, Valot B, Leung J, Merlot S** (2010) The Arabidopsis ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PloS one* **5** (11):e13935. doi:10.1371/journal.pone.0013935
- Smith SE, Facelli E, Pope S, Smith FA** (2010) Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* **326** (1-2):3-20. doi:10.1007/s11104-009-9981-5
- 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 physiology* **122** (3):967-976. doi:DOI 10.1104/pp.122.3.967
- Street NR, Skogstrom O, Sjodin A, Tucker J, Rodriguez-Acosta M, Nilsson P, Jansson S, Taylor G** (2006) The genetics and genomics of the drought response in Populus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **48** (3):321-341. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02864.x
- Sun L, Wang YP, Chen P, Ren J, Ji K, Li Q, Li P, Dai SJ, Leng P** (2011) Transcriptional regulation of SIPYL, SIPP2C, and SISnRK2 gene families encoding ABA signal core components during

- tomato fruit development and drought stress. *Journal of experimental botany* **62** (15):5659-5669. doi:10.1093/jxb/err252
- Sun TP** (2008) Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **6**:e0103. doi:10.1199/tab.0103
- 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 : for cell and molecular biology* **61** (1):25-35. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04025.x
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30** (12):2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu L, Li QB, Cline K, McCarty DR** (2003) Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **35** (1):44-56
- Tischer SV** (2016) Charakterisierung der ABA Rezeptorkomplexe. Technische Universität München
- Tischer SV, Wunschel C, Papacek M, Kleigrewe K, Hofmann T, Christmann A, Grill E** (2017) Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1706593114
- Tougan K, Komatsu K, Bhyan SB, Sakata Y, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Takezawa D** (2010) Evolutionarily Conserved Regulatory Mechanisms of Abscisic Acid Signaling in Land Plants: Characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-Like Type 2C Protein Phosphatase in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant physiology* **152** (3):1529-1543. doi:10.1104/pp.110.153387
- Tsilo TJ, Hareland GA, Ohm JB, Anderson JA** (2013) Polymeric proteins and their association with grain yield in hard red spring wheat lines. *Euphytica* **194** (2):187-196. doi:10.1007/s10681-013-0912-4
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroove S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehrling J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D** (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313** (5793):1596-1604. doi:10.1126/science.1128691
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S** (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455** (7210):195-200. doi:10.1038/nature07272
- 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 and Cell Physiology* **51** (11):1821-1839. doi:10.1093/pcp/pcq156
- 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 of the United States of America* **106** (41):17588-17593. doi:10.1073/pnas.0907095106
- 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. *The Plant cell* **5** (11):1529-1539. doi:10.1105/tpc.5.11.1529
- Valio IFM, Burdon RS, Schwabe WW** (1969) New Natural Growth Inhibitor in Liverwort *Lunularia Cruciata* (L) Dum. *Nature* **223** (5211):1176-&. doi:DOI 10.1038/2231176a0
- Viger M, Smith HK, Cohen D, Dewoody J, Trewin H, Steenackers M, Bastien C, Taylor G** (2016) Adaptive mechanisms and genomic plasticity for drought tolerance identified in European black poplar (*Populus nigra* L.). *Tree physiology* **36** (7):909-928. doi:10.1093/treephys/tpw017

- Vigliarolo T, Guida L, Millo E, Fresia C, Turco E, De Flora A, Zocchi E** (2015) Abscisic Acid Transport in Human Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **290** (21):13042-13052. doi:10.1074/jbc.M114.629501
- Vlad F, Droillard MJ, Valot B, Khafif M, Rodrigues A, Brault M, Zivy M, Rodriguez PL, Merlot S, Lauriere C** (2010) Phospho-site mapping, genetic and in planta activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **63** (5):778-790. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04281.x
- 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. *The Plant cell* **21** (10):3170-3184. doi:10.1105/tpc.109.069179
- Wall GW, Brooks TJ, Adam R, Cousins AB, Kimball BA, Pinter PJ, LaMorte RL, Triggs L, 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 Phytol* **152** (2):231-248. doi:DOI 10.1046/j.0028-646X.2001.00260.x
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218** (1):1-14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5
- Weng JK, Ye ML, Li B, Noel JP** (2016) Co-evolution of Hormone Metabolism and Signaling Networks Expands Plant Adaptive Plasticity. *Cell* **166** (4):881-893. doi:10.1016/j.cell.2016.06.027
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmullig T** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (18):10487-10492. doi:10.1073/pnas.171304098
- Wiedorn K** (2015) Interaction analysis of ABA receptors and co-receptors in *Populus canescens*. Technische Universität München
- Wunschel C** (2017) Biochemische Charakterisierung des ABA Rezeptorkomplexes. Technische Universität München
- 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. *The Journal of biological chemistry* **287** (1):794-802. doi:10.1074/jbc.M111.313106
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH** (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* **125** (7):1347-1360. doi:10.1016/j.cell.2006.06.011
- 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. *The Plant cell* **24** (5):2184-2199. doi:10.1105/tpc.112.095935
- Xue T, Wang D, Zhang S, Ehlting 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. doi:10.1186/1471-2164-9-550
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual review of plant biology* **57**:781-803. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444
- Yamamoto H, Oritani T** (1996) Stereoselectivity in the biosynthetic conversion of xanthoxin into abscisic acid. *Planta* **200** (3):319-325
- Yang M, Song SH, Liu GM, Chen KF, Tian XJ, Zhao ZJ, Hu SN, Yu J** (2010) A comprehensive analysis of protein phosphatases in rice and Arabidopsis. *Plant Syst Evol* **289** (3-4):111-126. doi:10.1007/s00606-010-0336-8
- Yang Z, Liu J, Tischer SV, Christmann A, Windisch W, Schnyder H, Grill E** (2016) Leveraging abscisic acid receptors for efficient water use in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113** (24):6791-6796. doi:10.1073/pnas.1601954113
- 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. *Nature structural & molecular biology* **16** (12):1230-1236. doi:10.1038/nsmb.1730
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61** (4):672-685. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x

- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2006) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant physiology* **140** (1):115-126. doi:10.1104/pp.105.070128
- Yoshikawa H, Ichiki Y, Sakakibara K, Tamura H, Suiko M** (2002) The biological and structural similarity between lunularic acid and abscisic acid. *Biosci Biotech Bioch* **66** (4):840-846
- Yu J, Yang L, Liu X, Tang R, Wang Y, Ge H, Wu M, Zhang J, Zhao F, Luan S, Lan W** (2016) Overexpression of Poplar Pyrabactin Resistance-Like Abscisic Acid Receptors Promotes Abscisic Acid Sensitivity and Drought Resistance in Transgenic Arabidopsis. *PloS one* **11** (12):e0168040. doi:10.1371/journal.pone.0168040
- Yu JL, Ge HM, Wang XK, Tang RJ, Wang Y, Zhao FG, Lan WZ, Luan S, Yang L** (2017) Overexpression of Pyrabactin Resistance-Like Abscisic Acid Receptors Enhances Drought, Osmotic, and Cold Tolerance in Transgenic Poplars. *Front Plant Sci* **8**. doi:ARTN 1752 10.3389/fpls.2017.01752
- Zeevaert JAD, Creelman RA** (1988) Metabolism and Physiology of Abscisic-Acid. *Annu Rev Plant Phys* **39**:439-473. doi:DOI 10.1146/annurev.arplant.39.1.439
- Zhang F, Wei Q, Shi J, Jin X, He Y, Zhang Y, Luo Q, Wang Y, Chang J, Yang G, He G** (2017) Brachypodium distachyon BdPP2CA6 Interacts with BdPYLs and BdSnRK2 and Positively Regulates Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Front Plant Sci* **8**:264. doi:10.3389/fpls.2017.00264
- Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH** (2006) Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature protocols* **1** (2):641-646. doi:10.1038/nprot.2006.97
- 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** (2012) Complex structures of the abscisic acid receptor PYL3/RCAR13 reveal a unique regulatory mechanism. *Structure* **20** (5):780-790. doi:10.1016/j.str.2012.02.019
- Zhao Y, Chan Z, Gao J, Xing L, Cao M, Yu C, Hu Y, You J, Shi H, Zhu Y, Gong Y, Mu Z, Wang H, Deng X, Wang P, Bressan RA, Zhu JK** (2016) ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113** (7):1949-1954. doi:10.1073/pnas.1522840113
- Zhao Y, Chan Z, Xing L, Liu X, Hou YJ, Chinnusamy V, Wang P, Duan C, Zhu JK** (2013) The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell research* **23** (12):1380-1395. doi:10.1038/cr.2013.149
- 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 physiology* **134** (1):361-369. doi:10.1104/pp.103.030734
- Zhu JK** (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* **167** (2):313-324. doi:10.1016/j.cell.2016.08.029
- Zuckerkindl E, Pauling L** (1965) Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. *Evolving Genes and Proteins*:69

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Papacek
Geburtsdatum und –ort	17.04.1986 in Weiden (Oberpfalz)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung/ akademischer Werdegang

Seit 01/2013	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erwin Grill
10/2010 – 11/2012	Technische Universität München Master Studiengang Horticultural Sciences Abschluss: Master of Science
10/2006 – 04/2010	Universität Regensburg Bachelor Studiengang Biologie Abschluss: Bachelor of Science
09/1997 – 06/2005	Besuch des Kepler Gymnasiums Weiden Abschluss: Abitur

Publikationen

Papacek M, Christmann A, Grill E (2017) Interaction network of ABA receptors in grey poplar. *Plant Journal* 92(2):199-210. doi:10.1111/tpj.13646

Tischer SV, Wunschel C, Papacek M, Kleigrewe K, Hofmann T, Christmann A, Grill E (2017) Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 114(38):10280-10285. doi:10.1073/pnas.1706593114

Unterholzner SJ, Rozhon W, Papacek M, Ciomas J, Lange T, Kugler KG, Mayer KF, Sieberer T, Poppenberger B (2015) Brassinosteroids are master regulators of gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (8):2261-72. doi:10.1105/tpc.15.00433

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Erwin Grill bedanken, dass er mir die Chance gab, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen und das damit verbundene Projekt zu bearbeiten. Ich danke ihm für die immer ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung.

Beate Seeliger möchte ich für ihr einzigartiges Engagement für den Lehrstuhl und alle seiner Mitarbeiter danken. Ohne dich würde es viele Probleme geben, nicht nur bei bürokratischen Sachen.

Ein riesiges Kompliment an die morgendliche Kaffeerunde und allen Festangestellten, insbesondere Lisa B. und Chrisi, für die immer gute Zusammenarbeit am Lehrstuhl. Ihr macht den Lehrstuhl zu dem was er ist. Vielen lieben Dank für die unbeschreibliche Zeit!

Spezieller Dank gilt meiner Laborkollegin Düschi, ohne die die ganze Arbeit nur halb so spaßig und effizient wäre! Auch Christian W. möchte ich nicht nur für die Büronachbarschaft herzlich danken.

Den Botany Allstars & Friends vielen Dank für die immer gute Atmosphäre am Institut, den wissenschaftlichen Ratschlägen, der Freizeitgestaltung und dafür, dass ihr jene seid, mit denen man gerne Grill-, Poker-, oder Kinoabende verbringt.

Zum Schluß noch ein großes Dankeschön den wichtigsten Personen in meinem Leben, meiner Familie und Johannes. Danke für eure großartige Unterstützung, dass ihr mir das alles ermöglicht habt und immer an mich geglaubt habt!