



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Botanik

**Die Funktion des Transkriptionsfaktors JAM2 in der Signaltransduktion
von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana***

Susan Ibe

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. Kay H. Schneitz
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. habil. Alexander Christmann
2. Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer

Die Dissertation wurde am 01.10.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.01.2020 angenommen.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1. Pflanzenhormone	5
1.1.1 Historie und Funktion der Abscisinsäure	6
1.1.2 ABA-Biosynthese und -Katabolismus	7
1.1.3 ABA-Signaltransduktion	9
1.2. Transkriptionsfaktoren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.2.1 bHLH-Transkriptionsfaktoren	13
1.2.2 Die Gruppe der JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE-Transkriptionsfaktoren	17
1.2.3 Die Funktion von JAM1 und MYC2 im ABA-Signalweg	21
1.3. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Ergebnisse	24
2.1. Interaktion zwischen AHR11 und Kandidatenproteinen im <i>Yeast two-hybrid</i>	24
2.1.1 An der Interaktion zwischen AHR11 und TPL/TPRs beteiligte Domänen	26
2.1.2 An der Interaktion zwischen AHR11 und JAM2 beteiligte Domänen	33
2.2 Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL in einem P2H	35
2.3 Einfluss von AHR11, TPL/TPRs und MYC2/JAMs auf den ABA-Signalweg in Protoplasten ..	39
2.3.1 Charakterisierung von AHR11	40
2.3.2 Charakterisierung von TPL/TPRs	43
2.3.3 Charakterisierung von MYC2/JAMs	44
2.3.4 Einfluss von AHR11 und TPL/TPRs auf die durch JAM2-induzierte ABA-Antwort	48
2.4 Einfluss von AHR11 und JAM2 auf den ABA-Signalweg in transgenen Keimlingen	49
2.4.1 Überprüfung von <i>AHR11</i> - und <i>JAM2</i> -Überexpressionslinien und Erzeugung von <i>JAM2</i> -Knockout-Linien über CRISPR/Cas9	50

2.4.2	<i>In vivo</i> Luciferase-Imaging mit ABA-Reporterlinien für <i>AHR11</i> und <i>JAM2</i>	52
2.4.3	Genexpression ABA-regulierter Gene in <i>AHR11</i> - und <i>JAM2</i> -Linien	55
2.5	Physiologische Charakterisierung von <i>AHR11</i> und <i>JAM2</i>	60
2.5.1	Keimung	60
2.5.2	Wurzelwachstum.....	64
2.6	Funktionelle Einordnung von <i>JAM2</i> in den ABA-Signalweg.....	69
2.6.1	Interaktion zwischen <i>JAM2</i> und den RCARs	69
2.6.2	Einfluss von SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6 auf die <i>JAM2</i> -vermittelte ABA-Antwort ..	71
2.6.3	Einfluss der ABFs auf die <i>JAM2</i> -vermittelte ABA-Antwort.....	73
2.6.4	Funktion von <i>JAM2</i> als Transkriptionsfaktor im ABA-Signalweg.....	81
3.	Diskussion.....	94
3.1	Modell des <i>JAM2</i> - <i>AHR11</i> - <i>TPL/TPR</i> -Komplexes	94
3.1.1	Domänen der Interaktion von <i>JAM2</i> und <i>AHR11</i>	97
3.1.2	Domänen der Interaktion von <i>AHR11</i> und <i>TPL/TPRs</i>	99
3.1.3	Funktion des <i>JAM2</i> - <i>AHR11</i> - <i>TPL/TPR</i> -Komplexes im ABA-Signalweg	102
3.2	<i>JAM2</i> -Zielgene und deren Regulation	107
3.2.1	Die G-Box als DNA-Bindestelle	112
3.2.2	Expressions-Regulation über das <i>ABA-response element</i>	117
3.3	Abgrenzung des Einflusses von <i>JAM2</i> und <i>JAM1</i> oder <i>MYC2</i> auf die ABA-Antwort.....	119
3.4	Integration von <i>JAM2</i> in die ABA-Antwort	120
4.	Material und Methoden	126
4.1.	Materialien	126
4.1.1	Chemikalien und Kits	126
4.1.2	Geräte	126
4.1.3	Software	127
4.1.4	Mikroorganismen und deren Kultivierung	127
4.1.5	Pflanzenlinien und deren Kultivierung.....	130
4.1.6	Enzyme	130
4.1.7	Oligonukleotide	131
4.1.8	Plasmide	131
4.2	Physiologische Methoden.....	131
4.2.1	Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Samen	131

4.2.2	Keimungs-Assay	132
4.2.3	Wurzelwachstums-Assay	133
4.2.4	Quantifizierung ABA-abhängiger Luciferase-Aktivität in Keimlingen	133
4.2.5	Floral-Dip von <i>Arabidopsis thaliana</i>	134
4.2.6	Isolierung von Mesophyll-Protoplasten	135
4.2.7	Transfektion von Protoplasten	136
4.2.8	Messung der β -D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten	137
4.2.9	Messung der Luciferase-Aktivität in Protoplasten	137
4.3	Molekularbiologische Methoden	138
4.3.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	138
4.3.2	Hitzeschock-Transformation von <i>Escherichia coli</i>	138
4.3.3	Herstellung elektrokompeter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	138
4.3.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	139
4.3.5	Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	139
4.3.6	Polymerasekettenreaktion	139
4.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	140
4.3.8	Klonierungsmethoden	140
4.3.9	Sequenzierung	141
4.3.10	DNA-Isolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	141
4.3.11	RNA-Isolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	141
4.3.12	Synthese der komplementären DNA	142
4.3.13	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	142
4.3.14	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	143
4.3.15	<i>Yeast two-hybrid</i>	144
5.	Anhang	145
5.1	Weiterführende Ergebnisse	145
5.1.1	Y2H-Wachstumskontrollen von Interaktionsstudien mit AHR11, JAM2 und TPL/TPRs.	145
5.1.2	Y2H-Wachstumskontrollen von Interaktionsstudien mit MYC2, JAMs und RCARs	147
5.2	Verwendete Oligonukleotide	148
5.3	Verwendete Plasmide	153
6	Literaturverzeichnis	157
	Lebenslauf	185

Danksagung..... 186

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung von Pflanzenhormonen nach chemischen Ursprung und Einfluss auf das pflanzliche Wachstum.....	5
Abbildung 2: Strukturformel der Abscisinsäure.....	6
Abbildung 3: Biosynthese der Abscisinsäure.....	8
Abbildung 4: Katabolismus der Abscisinsäure.....	9
Abbildung 5: ABA-Signalweg in der Zelle.....	10
Abbildung 6: Das bHLH-Motiv in Arabidopsis.....	15
Abbildung 7: Unterscheidung zwischen Gruppe A und B bHLHs anhand der BR.....	16
Abbildung 8: Phylogenetischer Baum der bHLHs der Gruppe III _d und III _e	17
Abbildung 9: Expression der JAMs und MYC2.....	18
Abbildung 10: Funktion von JAMs und MYC2 im JA-Signalweg.....	20
Abbildung 11: Expressionsrate der JAMs sowie MYC2 unter abiotischem Stress oder ABA.....	21
Abbildung 12: Hypothetisches Modell zur Genregulation über den JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplex.	24
Abbildung 13: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und Kandidatenproteinen.....	26
Abbildung 14: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und TPL/TPR-Varianten.....	27
Abbildung 15: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Varianten mit deletierten EAR-Motiven.....	29
Abbildung 16: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Fragmenten.....	30
Abbildung 17: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11-RD-Varianten und TPL/TPRs.....	32
Abbildung 18: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen TPR2 und AHR11-Varianten mit Deletion der CR sowie eines oder beider EAR-Motive.....	33
Abbildung 19: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und JAM2-Fragmenten.....	34
Abbildung 20: Y2H-Interaktionsanalyse von JAM2 mit AHR11-Fragmenten.....	35
Abbildung 21: Analyse der Interaktion zwischen JAMs im P2H.....	36
Abbildung 22: Analyse der Interaktion zwischen NINJA und TPL im P2H.....	38
Abbildung 23: Analyse der Interaktion zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL im P2H.....	39
Abbildung 24: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch AHR11 in Col-0-Protoplasten.....	40
Abbildung 25: Induktion der <i>AHR11</i> -abhängigen Genexpression in <i>AHR11</i> -Mutanten-Protoplasten.....	42
Abbildung 26: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression in Col-0 und <i>AHR11</i> -Mutanten.....	43
Abbildung 27: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch TPL/TPRs in Col-0-Protoplasten.	44
Abbildung 28: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch MYC2 und JAMs in Col-0-Protoplasten.....	45
Abbildung 29: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch JAM2 in Col-0 und <i>aba2-1</i> -Protoplasten.....	46

Abbildung 30: Vergleich der Induktion des <i>RD29B</i> -Promotors und des artifiziellen Promotors <i>p8xABRE</i>	47
Abbildung 31: Einfluss von <i>AHR11</i> auf die <i>JAM2</i> -induzierte ABA-Antwort.....	48
Abbildung 32: Einfluss von <i>TPL/TPRs</i> auf die <i>JAM2</i> -induzierte ABA-Antwort.....	49
Abbildung 33: Genexpression von <i>JAM2</i> und <i>AHR11</i> in Überexpressionslinien.....	50
Abbildung 34: CRISPR/Cas9-Knockout-Linie von <i>JAM2</i>	51
Abbildung 35: <i>In vivo</i> Luciferase-Imaging von <i>JAM2</i> - und <i>AHR11</i> -Überexpressions-Keimlingen bzw. -Knockout-Keimlingen.....	52
Abbildung 36: Expression von <i>LUC</i> in <i>JAM2</i> - und <i>AHR11</i> -Linien.....	54
Abbildung 37: <i>In vivo</i> Luciferase-Imaging in <i>AHR11</i> - <i>JAM2</i> -Knockout-Keimlingen.....	55
Abbildung 38: Expression von ABA-regulierten Genen in <i>AHR11</i> -Linien.....	57
Abbildung 39: Expression von ABA-regulierten Genen in <i>JAM2</i> -Linien.....	59
Abbildung 40: Keimung von <i>AHR11</i> -Linien unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA.....	62
Abbildung 41: Keimung von <i>JAM2</i> -Linien unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA.....	63
Abbildung 42: Relatives Wurzelwachstum von <i>ahr11</i> unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA.....	65
Abbildung 43: Relatives Wurzelwachstum von <i>AHR11</i> -Überexpressionslinien und <i>d476</i> unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA.....	67
Abbildung 44: Relatives Wurzelwachstum von <i>JAM2</i> -Überexpressionslinien und <i>jam2</i> unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA.....	68
Abbildung 45: Analyse der Interaktion zwischen <i>MYC2</i> / <i>JAMs</i> und <i>RCARs</i>	70
Abbildung 46: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch <i>JAM2</i> in <i>snrk2</i> -Protoplasten..	72
Abbildung 47: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch <i>JAM2</i> in <i>abf2/abf3/abf4</i> -Protoplasten.....	73
Abbildung 48: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch <i>JAM2</i> in <i>abf</i> -Protoplasten.....	75
Abbildung 49: Analyse einer <i>JAM2</i> - <i>ABF</i> -Interaktion.....	76
Abbildung 50: Versuch zur Wiederherstellung der <i>JAM2</i> -induzierten ABA-Antwort durch Co-Expression von <i>ABF2</i> , <i>ABF3</i> oder <i>ABF4</i> in <i>abf2/abf3/abf4</i> -Protoplasten.....	77
Abbildung 51: Versuch zur Wiederherstellung der <i>JAM2</i> -induzierten ABA-Antwort durch Co-Expression von <i>pABF3::ABF3</i> in <i>abf2/abf3/abf4</i> -Protoplasten.....	78
Abbildung 52: Aktivierung der <i>ABFs</i> durch ABA und <i>JAM2</i>	79
Abbildung 53: Einfluss von <i>JAM2</i> auf die <i>ABF1</i> -vermittelte Genexpression.....	81
Abbildung 54: Studien zur Bindung von <i>JAM2</i> an <i>pTAT1</i> bzw. <i>pRD29B</i>	82
Abbildung 55: Regulation der ABA-Antwort über die DNA-Bindefähigkeit von <i>JAM2</i>	83
Abbildung 56: Expression von <i>ABF3</i> und <i>ABI5</i> in <i>JAM2</i> -Linien.....	85
Abbildung 57: Expression von <i>SnRK2.3</i> in <i>JAM2</i> -Linien.....	86
Abbildung 58: Expression von <i>RCARs</i> in <i>JAM2</i> -Linien. Expressionsanalyse von <i>RCARs</i> über qPCR in <i>pATHB6::LUC</i> , <i>JAM2</i> -Überexpressionslinien sowie <i>jam2</i>	89
Abbildung 59: Expression von <i>PP2Cs</i> der Gruppe A in <i>JAM2</i> -Linien.....	91

Abbildung 60: Studien zur Bindung von JAM2 an Promotoren von regulatorischen Komponenten des ABA-Signalwegs.	92
Abbildung 61: Interaktoren von AHR11.	94
Abbildung 62: Domänen von AHR11, die Ziel einer posttranslationalen Modifikation sind.	96
Abbildung 63: Interaktionsdomänen von JAM2 und AHR11.	97
Abbildung 64: Interaktionsdomänen der TPL/TPRs mit AHR11.	100
Abbildung 65: Hypothetisches Modell zur hypersensitiven Reaktion durch AHR11.	105
Abbildung 66: Hypothetisches Modell zur Regulation der ABA-Antwort durch JAM2, AHR11 und die TPL/TPRs.	106
Abbildung 67: JAM2-regulierte Gene.	109
Abbildung 68: Übersicht über ABI5-, MYB21- bzw. REV-regulierte Gene.	110
Abbildung 69: Das bHLH-Motiv und die DNA-Bindung von JAM2.	113
Abbildung 70: Promotor-Ausschnitt des <i>RD29B</i>	118
Abbildung 71: Interaktionspartner von JAM2.	120
Abbildung 72: Interaktionsnetzwerk von JAM2 zu Komponenten des ABA-Signalwegs.	122
Abbildung 73: Modell zur Funktion von JAM2 im ABA-Signalweg.	125
Abbildung 74: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Varianten mit deletierten EAR-Motiven.	145
Abbildung 75: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Fragmenten.	145
Abbildung 76: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen AHR11-RD-Varianten und TPL/TPRs.	146
Abbildung 77: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen TPR2 und AHR11-Varianten mit deletierter konservierter Region sowie ein oder beider EAR-Motive.	146
Abbildung 78: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und JAM2-Fragmenten.	146
Abbildung 79: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse von JAM2 mit AHR11-Fragmenten. ...	147
Abbildung 80: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen MYC2/JAMs und RCARs. ..	147

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Promotoranalyse der Kernkomponenten des ABA-Signalwegs auf G-Box-Motive.....	84
Tabelle 2: G-Box-Varianten in den durch JAM2-gebundenen Promotoren.....	114
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	126
Tabelle 4: Für die Erstellung der Daten verwendete Software.....	127
Tabelle 5: Verwendete Organismen..	128
Tabelle 6: Antibiotika für die Anzucht von <i>E. coli</i> oder <i>A. tumefaciens</i>	128
Tabelle 7: Verwendete Pflanzenlinien und deren Bezugsquelle.....	130
Tabelle 8: Mengen an Sorbit bzw. Mannit für MS _{0,5xZucker} -Medium mit verschiedenen Wasserpoten- tialen.....	132
Tabelle 9: Einstellungen der CCD-Kamera für die Lumineszenzdetektion.....	134
Tabelle 10: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.....	142
Tabelle 11: Zusammensetzung eines Hefe-Transformationsansatzes.....	144
Tabelle 12: Oligonukleotide für Klonierungen oder Sequenzierungen.....	148
Tabelle 13: Oligonukleotide für die qPCR.....	151
Tabelle 14: <i>E. coli</i> -Glycerinkulturen mit den Plasmiden für die Interaktionsanalyse im Y2H.....	153
Tabelle 15: <i>E. coli</i> -Glycerinkulturen mit den Plasmiden für die transiente Transformation in Proto- plasten.....	155

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
% (w/v)	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
3-AT	3-Amino-1,2,3-triazole
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
aa	Aminosäuren
ABA	Abscisinsäure
ABA1	ABSCISIC ACID-DEFICIENT 1
ABA2	ABSCISIC ACID-DEFICIENT 2
ABA3	ABSCISIC ACID-DEFICIENT 3
ABA-GE	Abscisinsäure-Glucoseester
ABC	ADENOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING CASSETTE
ABF	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR
ABI	ABSCISIC ACID-INSENSITIVE
ABR	ABSCISIC ACID RESPONSIVE PROTEIN
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
ABRE	<i>abscisic acid responsive element</i>
AD	Aktivierungsdomäne
AEBSF	4-(2-Amino-ethyl)benzensulfonylfluorid
AFP	ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 BINDING PROTEIN
AGRIS	<i>Arabidopsis Gene Regulatory Information Server</i>
AHG	ABSCISIC ACID-HYPERSENSITIVE GERMINATION
AHR11	ABSCISIC ACID-HYPERSENSITIVE RESPONSE 11
AIB	ABSCISIC ACID-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR
AOS	ALLENE OXIDE SYNTHASE
AP2	APETALA2
ApE	<i>A plasmid Editor</i>
AREB	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ATHB	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN
ATP	Adenosintriphosphat
Aux/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
BD	DNA-Bindedomäne
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
bp	Basenpaare
BR	<i>basic region</i>
bZIP	<i>basic-leucine zipper</i>
Cas9	CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS-ASSOCIATED PROTEIN 9
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	<i>coding sequence</i>
CE	<i>coupling element</i>
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1
Col-0	Columbia
CPK23	CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 23
CPS	<i>counts per second</i>
CR	konservierte Region
CRISPR	CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS
CT	<i>cycle threshold</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTLH	<i>C-terminal to LisH</i>
CYP707A1	CYTOCHROME P450 FAMILY 707 SUBFAMILY A POLYPEPTIDE 1
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DREB	DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAR	<i>ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	EARLY METHIONINE-LABELLED
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERF	ETHYLENE RESPONSE FACTOR
et al.	und andere
G-ABRE	G-Box-artiges <i>abscisic acid responsive element</i>
GAL4	GALACTOSE METABOLISM 4
GAL4_UAS	<i>GALACTOSE METABOLISM 4 upstream activating sequence</i>
GAL4BD	GALACTOSE METABOLISM 4-DNA-Bindedomäne
GLP10	GERMIN-LIKE PROTEIN 10
GORK	GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K ⁺ CHANNEL
GUX1	GLUCURONIC ACID SUBSTITUTION OF XYLAN 1
HAB	HYPERSENSITIVE TO ABSCISIC ACID
HAI	HIGHLY ABSCISIC ACID-INDUCED PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2C GENE
HAT	HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER PROTEIN
HD-ZIP	<i>homeodomain-leucine zipper</i>
JA-Ile	(+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucin
JAM	JASMONATE-ASSOCIATED MYELOCYTOMATOSIS-RELATED 2-LIKE
JAS	Jasmonat-assoziiert
JAZ	JASMONATE ZINC-FINGER PROTEIN EXPRESSED IN INFLORESCENCE MERISTEM-DOMAIN
JID	JASMONATE ZINC-FINGER PROTEIN EXPRESSED IN INFLORESCENCE MERISTEM-DOMAIN-Interaktionsdomäne
KAT1	K ⁺ -Influxkanal
LAR	<i>Luciferase Assay Reagent</i>
LisH	<i>lissencephaly homology</i>
LOX2	LIPOXYGENASE 2
LSMT-L	LYSINE METHYLTRANSFERASE-LIKE
LUC	Luciferase
LV	Leervektor
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Me-JA	Methyl-Jasmonat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Murashige-Skoog
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
MYB	MYELOBLASTOSIS DOMAIN PROTEIN
MYC2	MYELOCYTOMATOSIS-RELATED 2
NAC	NO APICAL MERISTEM/ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR/CUP-SHAPED COTYLEDON
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
NINJA	NOVEL INTERACTOR OF JASMONATE ZINC-FINGER PROTEIN EXPRESSED IN INFLORESCENCE MERISTEM-DOMAIN
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NOT9B	NEGATIVE ON TATA 9B
NTR1	NITRATE TRANSPORTER 1
NYC1	NON-YELLOW COLORING 1
OST1	OPEN STOMATA 1
P2H	Protoplasten-Zwei-Hybrid-System
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PAT	PHOSPHINOTHRICIN-ACETYL-TRANSFERASE
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDF1.2	PLANT DEFENSIN 1.2
PEG	Polyethylenglycol
PP2C	PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2C
PTR	PEPTIDE TRANSPORTER

PYL	PYRABACTIN RESISTANCE 1-LIKE
PYR	PYRABACTIN RESISTANCE 1
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
QRR	Glutamin-reiche Region
RAB	RESPONSIVE TO ABSCISIC ACID
RARTF	<i>Rikagaku Kenkyūjo Arabidopsis Transcription Factor Database</i>
RAV1	RELATED TO ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3/VIVIPAROUS1 1
RCAR	REGULATORY COMPONENT OF ABSCISIC ACID RECEPTOR
RD	Repressordomäne
RD22	RESPONSIVE TO DEHYDRATION 22
RD22BP1	BINDING PROTEIN OF THE DEHYDRATION-RESPONSIVE 22 PROMOTER 1
RD29B	RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29B
REV	REVOLUTA
RFU	<i>relative fluorescence unit</i>
RLU	<i>relative luminescence unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN/CULLIN/F-BOX PROTEIN
SCN1	SUPERCENTIPEDE 1
SDM	<i>site directed mutagenesis</i>
sgRNA	<i>single guide</i> Ribonukleinsäure
SINAT	SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS THALIANA
SIZ	SCAFFOLD ATTACHMENT FACTOR A/B/ACINUS/PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED SIGNALTRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIP- TION/L-METHIONINE SULFOXIMINE INTERACTING-ZINC FINGER
SLAC1	SLOW ANIONEN CHANNEL-ASSOCIATED 1
SnRK2	SUCROSE-NONFERMENTING KINASE1-RELATED PROTEIN KINASES 2
SUMO	SMALL-UBIQUITIN-LIKE MODIFIER
TAA1	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1
TAT1	TYROSINE AMINOTRANSFERASE 1
T-DNA	Transfer-DNA
TIP41L	TYPE 2A PHOSPHATASE-ASSOCIATED PROTEIN 42 INTERACTING PRO- TEIN OF 41 KILODALTON-LIKE PROTEIN
TPL	TOPLESS
TPR	TOPLESS RELATED PROTEIN
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBC9	UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 9
UBI10	UBIQUITIN 10
UV	Ultraviolet
VP16	Aktivierungsdomäne des VIRION PROTEIN 16 aus <i>Herpes simplex</i>
VSP	VEGETATIVE STORAGE PROTEIN
WD	Tryptophan/Asparaginsäure
WRKY	Tryptophan/Arginin/Lysin/Tyrosin
\bar{x}	Mittelwert
Y1H	<i>Yeast one-hybrid</i>
Y2H	<i>Yeast two-hybrid</i>
YUC	YUCCA
ZIM	ZINC-FINGER PROTEIN EXPRESSED IN INFLORESCENCE MERISTEM
Aminosäuren	
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin

Abkürzungsverzeichnis

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

Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
D	Guanin, Adenin oder Thymin
G	Guanin
H	Adenin, Cytosin oder Thymin
K	Guanin oder Thymin
M	Adenin oder Cytosin
N	Guanin, Adenin, Cytosin oder Thymin
R	Purine, Adenin oder Guanin
S	Guanin oder Cytosin
T	Thymin
W	Adenin oder Thymin
Y	Pyrimidine, Cytosin oder Thymin

Zusammenfassung

ABSCISIC ACID-HYPERSENSITIVE RESPONSE 11 (AHR11) ist ein Protein mit noch unbekannter Funktion in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). Eine Läsion im Gen *AHR11* in der Mutante *ahr11* führte jedoch zu einer Hypersensitivität gegenüber dem Phytohormon Abscisinsäure (ABA). In einem *Yeast two-hybrid* (Y2H)-Screen wurde JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE (JAM) 2 als potentieller Interaktionspartner von AHR11 bestimmt. JAM2 zählt zu den *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Transkriptionsfaktoren und ist als negativer Regulator im Jasmonat-Signalweg bekannt. Im Gegensatz zu den nahe verwandten bHLHs JAM1 und MYELOCYTOMATOSIS-RELATED 2 (MYC2) – für die ein positiver regulatorischer Einfluss auf den ABA-Signalweg gezeigt wurde – war für JAM2 noch keine entsprechende Funktion bekannt. Als weitere Interaktionspartner von AHR11 wurden im Y2H-Screen TOPLESS (TPL) und TOPLESS RELATED (TPR) 2 gefunden. TPL/TPRs sind als generelle Repressoren bekannt, die zumeist über *ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression* (EAR)-Motive an Transkriptionsfaktoren oder Proteine, die mit Transkriptionsfaktoren interagieren, binden. Die Bindung führt dabei zur Unterdrückung der Zielgen-Expression. Eine solche Funktion der TPL/TPRs wurde im ABA-Signalweg bereits gezeigt. Das führte zu der Vermutung, dass JAM2 zusammen mit AHR11 und TPL bzw. TPR2 einen Komplex bildet, der einen regulatorischen Einfluss auf den ABA-Signalweg nimmt.

In dieser Studie konnte sowohl mit einem ABA-Reportersystem in Protoplasten als auch an Keimlingen einer ABA-Reporterlinie gezeigt werden, dass JAM2 einen positiven Einfluss auf den ABA-Signalweg hat. Der JAM2-Effekt ist jedoch abhängig von ABA und Kernkomponenten des ABA-Signalwegs. Eine direkte Interaktion zu den REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTORS (RCARs) oder den ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTORS (ABFs) konnte nicht gezeigt werden. Die Überexpression von JAM2 sorgte aber für den Anstieg der Expression einiger Kernkomponenten des ABA-Signalwegs wie *RCAR13*, *ABSCISIC ACID-HYPERSENSITIVE GERMINATION (AHG) 1* und *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE (ABI) 5*. JAM2 nimmt dabei keine gleichwertige Position zu den ABFs im ABA-Signalweg ein, sondern fördert deren Aktivität. Die homologen bHLHs JAM1, JAM3 und MYC2 konnten JAM2 in seiner Funktion im ABA-Signalweg nicht ersetzen. Des Weiteren konnte auch keine Interaktion dieser Homologen zu AHR11 gezeigt werden. In Y2H-Interaktionsstudien stellte sich heraus, dass für die Interaktion von JAM2 und AHR11 der N- und C-Terminus (1–274 aa und 296–590 aa) von JAM2 und der C-Terminus (555–1168 aa) von AHR11 entscheidend sind. Um die Interaktion von JAM2 und AHR11 in Pflanzenzellen überprüfen zu können, wurde ein Protoplasten-basiertes Zwei-Hybrid-System (P2H) etabliert. Während bekannte

Interaktionen, wie die Dimerbildung von JAM2, im P2H bestätigt werden konnten, gelang es damit nicht, in Protoplasten eine Interaktion von JAM2 und AHR11 nachzuweisen.

In weiterführenden Y2H-Studien stellte sich heraus, dass AHR11 neben TPL und TPR2 auch mit den homologen Proteinen TPR1, TPR3 und TPR4 in Interaktion treten kann. Die Interaktion der TPL/TPRs mit AHR11 erfolgt – bis auf TPR2 – ausschließlich über deren N-terminale *liscencephaly homology* (LisH)-Domäne. TPR2 interagiert auch über den C-Terminus, der Tryptophan-Asparaginsäure (WD)-Wiederholungen enthält. Auf der anderen Seite erfolgt die Interaktion von AHR11 mit den TPL/TPRs über verschiedene Bereiche. So konnte ein partielles EAR-Motiv mit der Sequenz ²³⁹WDLN²⁴² in der konservierten Region von AHR11 als Bereich für die Interaktion mit TPL und TPR4 bestimmt werden. Eine Interaktion zwischen AHR11 und den TPL/TPRs konnte im P2H nicht verifiziert werden.

Um einen möglichen Einfluss von AHR11 und den TPL/TPRs auf die JAM2-vermittelte Aktivierung des ABA-Signalwegs zu bestimmen, wurde JAM2 zusammen mit AHR11 oder einem der TPL/TPRs und dem ABA-Reportersystem in Protoplasten transient exprimiert. Während die TPL/TPRs die JAM2-vermittelte ABA-Antwort leicht förderten, hatte AHR11 keinen Einfluss. Ein positiver Einfluss von JAM2 konnte zudem auf die ABA-vermittelte Inhibierung der Keimung und des Wurzelwachstums bestimmt werden. AHR11 zeigte jedoch keinen nennenswerten Einfluss auf diese physiologischen Prozesse. Ebenso verhielt es sich bei der Expressionsanalyse von ABA-regulierten Genen in Überexpressions- und Knockout-Linien von JAM2 bzw. AHR11. Während JAM2 die Expression von *RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29B* (*RD29B*) induzierte und die von *CYTOCHROME P450 FAMILY 707 SUBFAMILY A POLYPEPTIDE (CYP707A) 1* reprimierte, hatte AHR11 keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene. Die Ausbildung eines Komplexes zwischen JAM2, AHR11 und den TPL/TPRs für die Regulation der ABA-Antwort wird nach den hier vorliegenden Ergebnissen als eher unwahrscheinlich eingeschätzt. Für JAM2 wird angenommen, dass es im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen sowohl direkt als auch indirekt die Expression von Genen reguliert, die wiederum für Proteine mit einer Funktion im ABA-Signalweg kodieren. Die direkte Regulation erfolgt über die Bindung der basischen Region des bHLH-Motivs von JAM2 an eine G-Box im Promotor eines Gens. Für die indirekte Regulation spielen vermutlich Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle, an denen JAM2 beteiligt ist.

Summary

ABSCISIC ACID-HYPERSENSITIVE RESPONSE 11 (AHR11) is a protein with unknown function in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). However, a lesion in the *AHR11* gene in the mutant *ahr11* resulted in a hypersensitive response to the phytohormone abscisic acid (ABA). In a yeast two-hybrid (Y2H) screen, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE (JAM) 2 was identified as a potential interaction candidate of AHR11. JAM2 is a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor and is known to be a negative regulator in the jasmonate signaling pathway. For the close relatives JAM1 and MYELOCYTOMATOSIS-RELATED 2 (MYC2) a positive regulatory influence on ABA signaling was shown whereas for JAM2 in contrast no such function has been reported. Further interaction partners of AHR11 uncovered in the Y2H screen were TOPLESS (TPL) and TOPLESS RELATED (TPR) 2. TPL/TPRs are known as general repressors that bind to transcription factors or proteins that interact with transcription factors, mostly via ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression (EAR) motifs. The binding leads to the suppression of target gene expression. Such a function of the TPL/TPRs has already been demonstrated in the ABA signaling pathway. This led to the assumption that JAM2 and AHR11 together with TPL or TPR2 form a complex that exerts a regulatory influence on the ABA signaling pathway.

In this study it could be shown that JAM2 has a positive influence on the ABA signaling pathway both with an ABA reporter system in protoplasts and with seedlings of an ABA reporter line. However, this JAM2 effect is dependent on ABA and core components of the ABA signaling pathway. A direct interaction with REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTORS (RCARs) or ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTORS (ABFs) could not be shown. The overexpression of JAM2, however, caused an increase in the expression of some of the core components of the ABA signaling pathway like *RCAR13*, *ABSCISIC ACID-HYPERSENSITIVE GERMINATION (AHG) 1* and *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE (ABI) 5*. JAM2 does not occupy a position equivalent to the ABFs in the ABA signaling pathway, but rather promotes their activity. The homologues JAM1, JAM3, and MYC2 were unable to substitute JAM2 for its function in the ABA signaling pathway. Furthermore, no interaction of the homologues with AHR11 could be shown. In Y2H interaction studies, the N- and C-terminus (1–274 aa and 296–590 aa) of JAM2 and the C-terminus (555–1168 aa) of AHR11 were found to be required for the interaction between JAM2 and AHR11. In order to verify the interaction between JAM2 and AHR11 in plant cells, a protoplast-based two-hybrid system (P2H) was established. With this P2H, protein-protein interactions such as JAM2 dimer formation could be demonstrated, however, an interaction between JAM2 and AHR11 could not be confirmed.

Further Y2H studies revealed that AHR11 does not only interact with TPL and TPR2 but also with the homologous proteins TPR1, TPR3, and TPR4. Except for TPR2 the interaction of the TPL/TPRs with AHR11 occurs exclusively through their N-terminal lissencephaly homo-logy (LisH) domain. TPR2 also interacted via the C-terminus containing tryptophan-aspartic acid (WD) repeats. On the other hand, different regions of the AHR11 protein are involved in interaction with the TPL/TPRs. For instance, a partial EAR motif with the sequence ²³⁹WDLN²⁴² in the conserved region of AHR11 was found to be required for an interaction between AHR11 and TPL or TPR4. An interaction between AHR11 and TPL/TPRs could not be confirmed in the P2H.

To assess the potential impact of AHR11 and TPL/TPRs on JAM2-mediated activation of the ABA signaling pathway, JAM2 was expressed transiently in protoplasts together with the ABA reporter system and AHR11 or one of the TPL/TPRs. While the TPL/TPRs slightly promoted the JAM2-mediated ABA response, AHR11 had no effect. A positive influence of JAM2 on ABA-mediated inhibition of germination and root growth could be shown. However, AHR11 did not show any significant impact on these physiological processes. No effect of AHR11 was also observed on expression of ABA-regulated genes in overexpression and knockout lines of JAM2 and AHR11, respectively. While JAM2 induced the expression of *RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29B (RD29B)* and inhibited expression of *CYTOCHROME P450 FAMILY 707 SUBFAMILY A POLYPEPTIDE (CYP707A) 1*, AHR11 had no influence on the expression of these genes. According to the current results, the formation of a complex between JAM2, AHR11 and the TPL/TPRs to regulate ABA responses is considered rather unlikely. In cooperation with other proteins, JAM2 is thought to both directly and indirectly regulate the expression of genes that code for proteins with a function in the ABA signaling pathway. Direct regulation occurs via binding of the basic region of the bHLH motif of JAM2 to a G box in the promoter of a gene. An indirect regulation presumably requires protein-protein interactions which involve JAM2.

1. Einleitung

1.1. Pflanzenhormone

Pflanzenhormone sind niedermolekulare Verbindungen, die ihren Ursprung im sekundären Metabolismus haben und in der Entwicklung sowie in der Reaktion auf Umweltreize eine wesentliche Rolle einnehmen (Iten et al. 1999; Wang und Irving 2011). Eine Einteilung der Pflanzenhormone kann über den chemischen Ursprung oder aufgrund der Funktion vorgenommen werden (Abbildung 1).

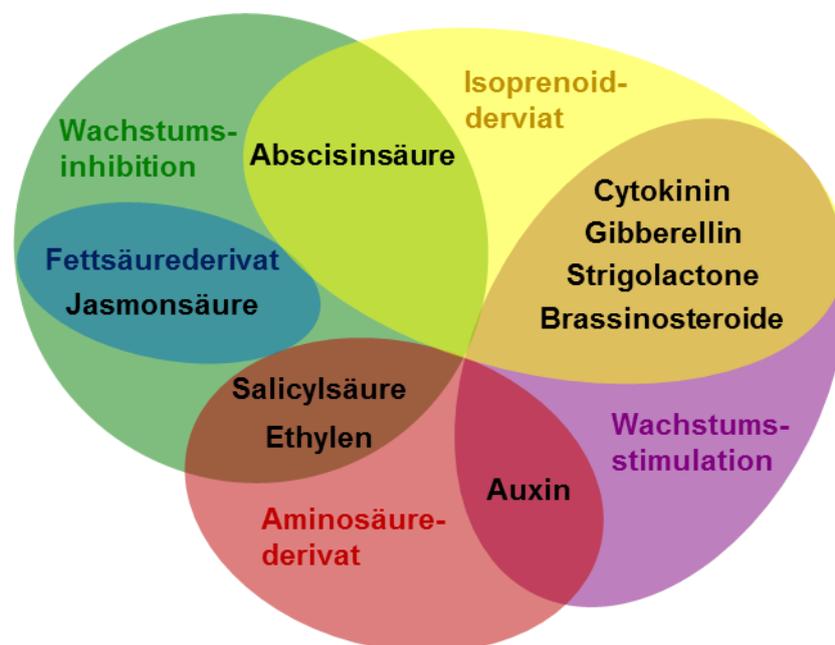


Abbildung 1: Klassifizierung von Pflanzenhormonen nach chemischen Ursprung und Einfluss auf das pflanzliche Wachstum.

Anhand des chemischen Ursprungs können Pflanzenhormone in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe leitet sich von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ab, zu denen Jasmonsäure (JA) gehört (Schaller und Stintzi 2009), die zweite Gruppe von Aminosäuren – Auxine von Tryptophan (Zhao 2010), Ethylen von Methionin (Wang et al. 2002) und Salicylsäure von Phenylalanin (Chen et al. 2009) – und die dritte Gruppe von Isoprenoiden, zu denen ABA, Brassinosteroide, Cytokine, Gibberelline und Strigolactone zählen (Pulido et al. 2012). Bezogen auf die Funktion unterscheidet man zwischen wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Hormonen (Iten et al. 1999; Saint Germain et al. 2013; Waldie et al. 2014; Sun et al. 2016), die während des gesamten Lebenszyklus einer Pflanze in Interaktion stehen. Das bedeutet, dass Mitglieder einer oder beider Gruppen gleichzeitig an einem Reaktionsweg beteiligt sein können und synergistisch oder antagonistisch auf diesen Reaktionsweg einwirken

(Jaillais und Chory 2010; Wang und Irving 2011). Antagonistische Effekte sind zum Beispiel zwischen Gibberellin und ABA während Entwicklungsprozessen wie der Dormanz, der Keimung, dem Wurzelwachstum, der Blüte und des Blattwachstums beschrieben. Weitere Antagonistische Effekte treten während der Reaktion auf Kälte-, Hitze- und Salzstress auf (Sun und Gubler 2004; Liu und Hou 2018). Synergistische Effekte haben Brassinosteroide und Auxine auf die Hypocotyl-Elongation (Nemhauser et al. 2004; Jaillais und Chory 2010). Für ABA und JA wurden zum einen synergistische Effekte auf den Schluss der Stomata beschrieben als auch synergistische sowie antagonistische auf die Abwehr von Pathogenen (Adie et al. 2007; Bodenhausen und Reymond 2007; Munemasa et al. 2007; Kazan und Manners 2008). Auf das wachstumshemmende Hormon ABA sowie einer Verbindung zum JA-Signalweg soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.1.1 Historie und Funktion der Abscisinsäure

Abscisinsäure ((S)-5-(1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-cyclohex-2-en-1-yl)-3-methyl-*cis,trans*-penta-2,4-diensäure; Abbildung 2) ist eine schwache Säure (pK_s 4,8) und zählt zu den Sesquiterpenen (Cornforth et al. 1965a; Ohkuma et al. 1965; Finkelstein und Rock 2002). ABA kann nicht nur in Pflanzen vorgefunden werden sondern auch in Pilzen, in Bakterien und in den Metazoa (Wasilewska et al. 2008; Hartung 2010). Erste Isolationen von ABA erfolgten aus Giersch, Birke, Ahorn, Baumwolle und weiteren Pflanzen unter den damaligen Bezeichnungen „ β -Inhibitor“, „Dormin“ oder „Abscisin II“ (Bennet-Clark et al. 1953; Eagles und Wareing 1963; Ohkuma et al. 1963; Robinson et al. 1963; Eagles und Wareing 1964; Lane und Bailey 1964). Erst später stellte sich heraus, dass es sich bei allen drei Wachstumsinhibitoren um dieselbe Substanz handelt (Cornforth et al. 1965b; Milborrow 1967). Der heutige Name lässt sich auf die damals zugeschriebene Funktion als Abzissions-beschleunigende Substanz zurückführen (Ohkuma et al. 1963). Cracker und Abeles (1969) klärten aber später auf, dass ABA die Abzission fördert, indem sie die Ethylenproduktion beschleunigt und die Aktivität von Cellulasen erhöht.

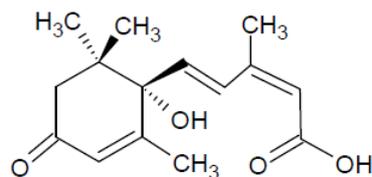


Abbildung 2: Strukturformel der Abscisinsäure.

ABA ist sowohl an der Regulation von Entwicklungsprozessen beteiligt als auch an der Reaktion auf Umweltreize. Der Einfluss bezieht sich dabei auf die Reifung und die Dormanz des

Samens (Khan 1968; Karssen et al. 1983; Holdsworth et al. 1999), die Dormanz von Knospen (El-Antably et al. 1967; Zheng et al. 2018), Zellteilung und -elongation (Zeevaart und Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998), die Induktion der Blüte (Evans 1966; Shu et al. 2018), den Schluss der Stomata (Jones und Mansfield 1970; Kim et al. 2010), die Initiation und das Wachstum von Blättern, die Wasserhomöostase und damit verbunden Wurzelwachstum, Xylembildung sowie Suberisierung (Yoshida et al. 2019). Zu den Umweltreizen zählen Trockenheit (Zhu 2002; Christmann et al. 2006), Salinität (Zeevaart und Creelman 1988; Barrero et al. 2006), Kälte (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 2000; Gusta et al. 2005), Verwundung (Delessert et al. 2004; Savatin et al. 2014) und Ultraviolett (UV)-Strahlung (Cutler et al. 2010; Finkelstein 2013). In den folgenden Abschnitten soll näher auf die Biosynthese und den Abbau sowie die Signaltransduktion von ABA eingegangen werden.

1.1.2 ABA-Biosynthese und -Katabolismus

Die Synthese von ABA erfolgt vorrangig im Leitgewebe und das Hormon kann zu den Zielorten sowohl über das Phloem als auch über das Xylem transportiert werden. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass eine lokale Produktion von ABA in den Blättern durch niedrige Wasserpotentiale im Bereich der Wurzel ausgelöst werden kann (Christmann et al. 2005; Christmann et al. 2007; Finkelstein 2013). Die Synthese innerhalb der Zelle beginnt mit dem 2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Weg in den Plastiden. Dabei werden Isoprene hergestellt, die dann über mehrere Kondensationsreaktionen zu Carotinoiden zusammengesetzt werden (Abbildung 3). Katalysiert wird die Reaktion durch Geranylgeranyldiphosphat-Synthase und Phytoen-Synthase (Ruiz-Sola und Rodríguez-Concepción 2012; Finkelstein 2013). Phytoen, das erste Carotinoid in der Reihe, wird wiederum über vier Dehydrierungsreaktionen zu Lycopon umgewandelt. Lycopon wird entweder zu α - oder zu β -Carotin zyklisiert, aber nur β -Carotin wird für die weitere Synthese von ABA benötigt. Durch die β -Carotin-Hydroxylase wird im weiteren Verlauf Zeaxanthin katalysiert. Zeaxanthin wiederum wird mithilfe der Zeaxanthin-Exoxidase zu Violaxanthin umgesetzt. In den Mutanten *abscisic acid-deficient (aba) 1* ist dieser Umsatz blockiert, wodurch sich Zeaxanthin anreichert und die ABA-Synthese gestört ist. Die Synthese kommt jedoch nicht vollkommen zum Erliegen, was wiederum auf einen alternativen Syntheseweg hindeutet (Rock und Zeevaart 1991; Barrero et al. 2005; Finkelstein 2013). Die letzten Schritte der Carotinoid-Synthese umfassen die Bildung von 9-*cis*-Violaxanthin und 9'-*cis*-Neoxanthin. Beide werden durch die 9-*cis*-Epoxy-carotinoid-Dioxygenase gespalten, wodurch Xanthoxin entsteht, das ins Cytoplasma entlassen wird. Aus Xanthoxin wird dann im Cytoplasma in mehreren Oxidationsschritten ABA synthetisiert. In einem ersten Schritt wird durch die Short-Chain-Dehydrogenase/Reductase Abscisinaldehyd gebildet. In der Mutante *aba2-1* ist dieser Schritt blockiert, weshalb nur noch etwa 9 % der üblichen Menge an ABA über

Nebenwege produziert wird (González-Guzmán et al. 2002; Finkelstein 2013; Tischler et al. 2017). Der letzte Schritt der Synthese wird durch die Abscisinaldehyd-Oxidase katalysiert, die dazu einen Molybdän-Cofaktor benötigt. Für die Biosynthese des Molybdän-Cofaktors ist eine Molybdän-Cofaktor-Sulfurase notwendig, deren Locus in *aba3* mutiert ist (Xiong et al. 2001; Finkelstein 2013). Für ABA gibt es zwei Stereoisomere, *2-cis*, *4-trans* ABA bzw. *S-(+)-ABA* und *2-trans*, *4-trans* ABA bzw. *trans-ABA*. Letztere Form entsteht durch UV-Licht-Exposition und ist inaktiv (Cutler et al. 2010). Die enantiomeren Formen *R-(-)-ABA* und *(-)-trans-ABA* kommen nicht in Pflanzen vor.

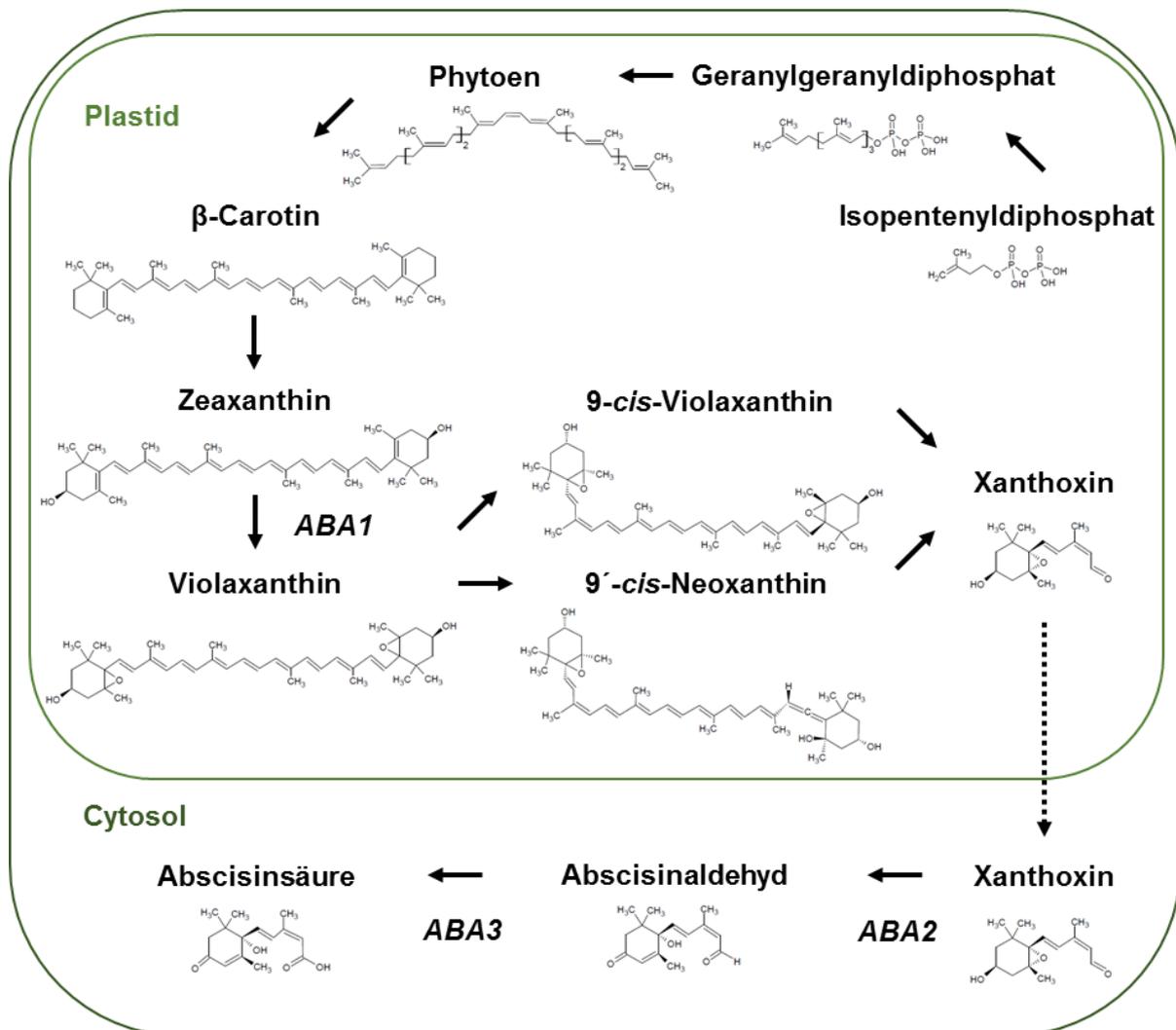


Abbildung 3: Biosynthese der Abscisinsäure. Die Biosynthese von Abscisinsäure erfolgt in den Plastiden und im Cytoplasma. Die wichtigsten Zwischenprodukte sind dargestellt. *ABA1*, *ABA2* und *ABA3* sind Gene, die in ABA-Mangel-Mutanten betroffen sind. Die Abbildung wurde erstellt in Anlehnung an Finkelstein (2013).

Die Inaktivierung von ABA kann über zwei Wege erfolgen (Abbildung 4). Der erste Weg umfasst die Hydroxylierung durch Monooxygenasen des Typs P-450. Die dafür notwendigen Enzyme werden durch die vier Mitglieder der Familie CYP707A kodiert. Durch die Hydroxylierung entsteht zum größten Anteil 8'-Hydroxy-ABA und zu einem geringeren auch 9'-Hydroxy-ABA.

Die Intermediate werden zu Dihydrophaseinsäure bzw. Neophaseinsäure isomerisiert (Kushiro et al. 2004; Saito et al. 2004; Okamoto et al. 2011; Finkelstein 2013). 7'-Hydroxy-ABA wird auch gebildet, die dafür notwendigen Enzyme wurden jedoch noch nicht beschrieben. Der zweite Weg umfasst die Veresterung zu ABA-Glucoseester (ABA-GE), wodurch ABA gespeichert oder transportiert werden kann. Arabidopsis enthält dazu acht Glycosyltransferasen (Lim et al. 2005). Die Speicherung von ABA-GE erfolgt in der Vakuole oder im Apoplast (Finkelstein 2013).

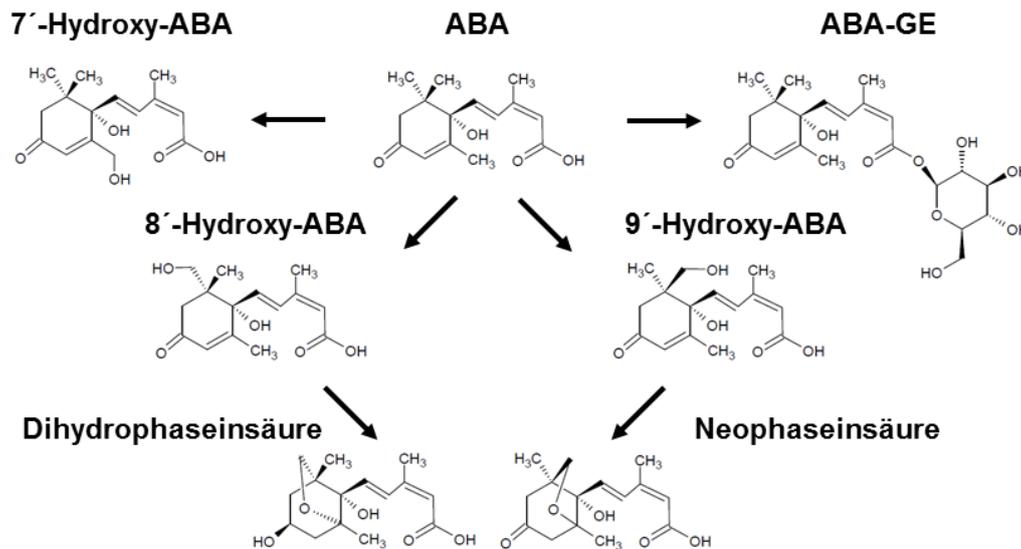


Abbildung 4: Katabolismus der Abscisinsäure. ABA kann durch Glycosylierung oder Hydroxylierung inaktiviert werden. Dabei entsteht im ersten Fall ABA-Glucoseester und im zweiten Fall 7'-, 8'- bzw. 9'-Hydroxy-ABA. 8'-Hydroxy-ABA und 9'-Hydroxy-ABA werden über weitere Reaktionen noch zu Dihydrophaseinsäure bzw. Neophaseinsäure umgesetzt. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Okamoto et al. (2011) erstellt.

1.1.3 ABA-Signaltransduktion

Für die Regulation von physiologischen Prozessen muss ABA entweder in die Zelle gelangen oder aus internen Speichern freigesetzt werden (Abbildung 5). Im Apoplast liegt ABA zumeist nicht geladen vor und kann leicht die Plasmamembran durchdringen. Wird in Folge von Umweltreizen der pH-Wert aber alkalischer, dann geht mehr ABA in die geladene Form über und die Diffusion wird verringert (Boursiac et al. 2013; Finkelstein 2013). Eine zweite Möglichkeit, die Plasmamembran zu überwinden, ergibt sich durch Transporter. In die Plasmamembran sind ADENOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING CASSETTE (ABC)- und NI-TRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER (NTR1/PTR)-Transporter eingelagert, die den Im- und Export von ABA ermöglichen (Kang et al. 2010; Kuromori et al. 2010; Kuromori et al. 2011; Kanno et al. 2012; Kang et al. 2015). Die Freisetzung aus internen Speichern erfolgt über β -Glucosidasen. Diese spalten den Glucoserest von der Speicherform ABA-GE ab und setzen

ABA frei. Dies geschieht im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und in der Vakuole (Lee et al. 2006; Xu et al. 2012).

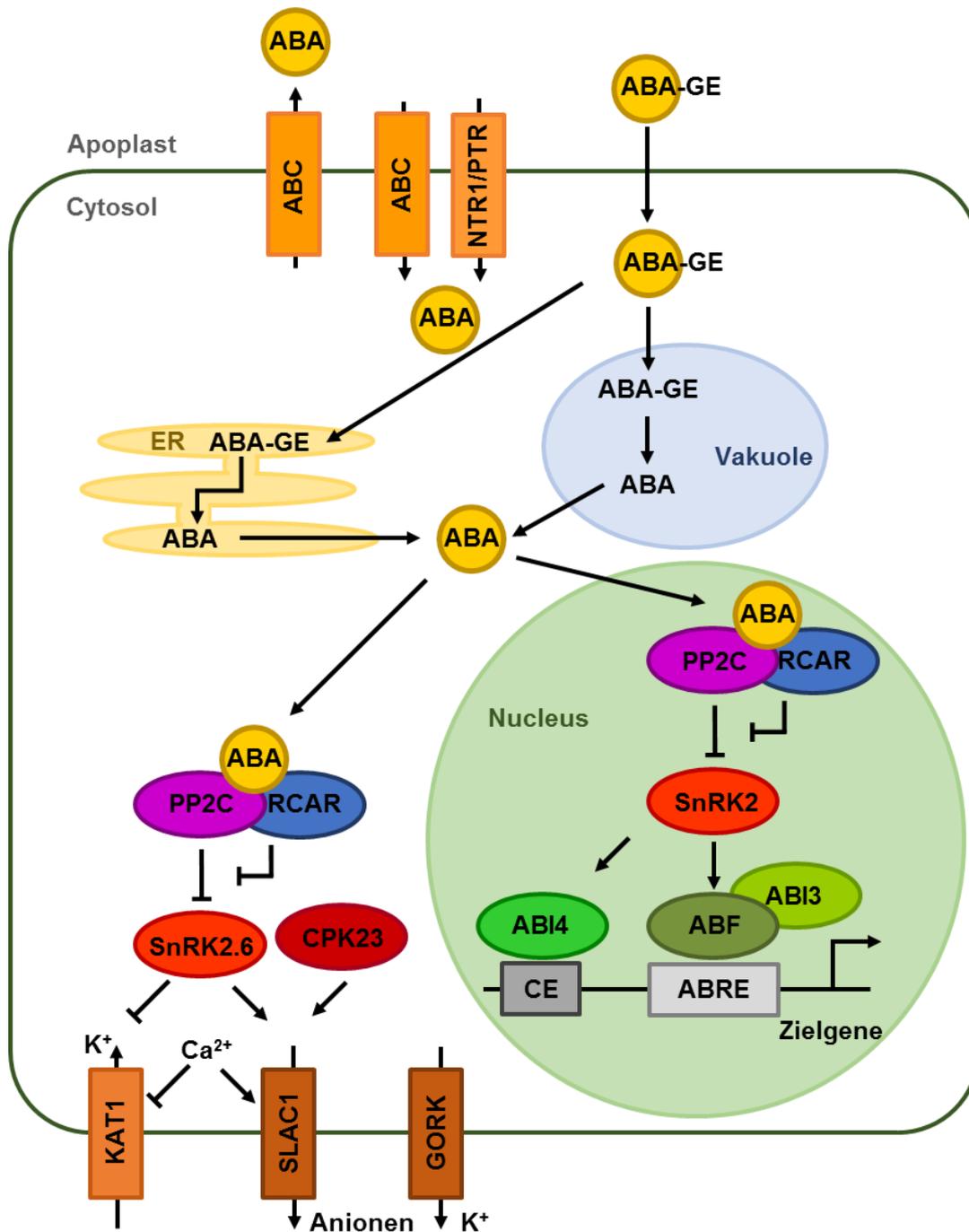


Abbildung 5: ABA-Signalweg in der Zelle. ABA wird über Transporter in die Zelle aufgenommen und abgegeben. Wie ABA-GE aus dem Apoplast wieder in die Zelle kommt, ist noch nicht genau bekannt. ABA kann direkt an ein RCAR binden, von ABA-GE muss erst im ER oder in der Vakuole – wo es auch gespeichert werden kann – durch β -Glucosidasen der Glucoseresit abgespalten werden. Der ABA-RCAR-Komplex bildet mit einer PP2C den ternären Komplex. Dadurch werden die SUCROSE-NONFERMENTING KINASE 1-RELATED PROTEIN KINASES 2 (SnRK2s) nicht mehr von den PP2Cs dephosphoryliert und können Ionenkanäle in der Plasmamembran und Transkriptionsfaktoren im Kern regulieren. Durch die Depolarisation der Membran werden K^+ -Effluxkanäle, wie GUARD CELL OUTWARD RECTIFYING K^+ CHANNEL (GORK), aktiviert und entlassen K^+ in den Apoplasten. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Raghavendra et al. (2010), Roelfsema et al. (2012) und Ma et al. (2018) erstellt.

Das in der Zelle vorhandene ABA muss durch einen Rezeptor gebunden werden (Abbildung 5). Dies erfolgt über die ABA-Rezeptoren, die als PYRABACTIN RESISTANCE 1 (PYR1), PYR1-LIKE (PYL) bzw. RCARs bezeichnet werden – hier im Folgenden nur noch als RCARs benannt – und in drei Unterfamilien eingeteilt werden (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Von den insgesamt 14 beschriebenen RCARs können alle ABA binden (Fujii et al. 2009; Fuchs et al. 2014), wobei Mitglieder der Unterfamilie 1 die größte Affinität zu ABA zeigten (Ma et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2009; Yin et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010). Die Bindung erfolgt über eine offene Bindetasche, die durch zwei β -Faltblätter verschlossen wird, wenn ABA gebunden ist (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009). Durch das Schließen der Bindetasche verändert sich die Konformation der RCARs, wodurch eine Interaktion mit den Co-Rezeptoren, den PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2Cs (PP2Cs) der Gruppe A, ermöglicht wird. Die PP2Cs der Gruppe A enthalten neun Mitglieder und sind Mg^{2+} - und Mn^{2+} -abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (Xue et al. 2008; Shi 2009; Fuchs et al. 2013). In Abwesenheit von ABA dephosphorylieren sie die SnRK2s, wodurch diese inhibiert sind und der ABA-Signalweg inaktiv ist. Durch die Interaktion der PP2Cs mit den RCARs wird die Phosphataseaktivität blockiert. Die SnRK2s können dadurch in einen aktiven Zustand übergehen und nachfolgende Komponenten des Signalwegs regulieren (Umezawa et al. 2009; Fujii et al. 2009; Fuchs et al. 2013). SnRK2s sind Serin/Threonin-Proteinkinasen und umfassen zehn Mitglieder (Hardie 1999; Kulik et al. 2011). Der aktive Zustand der SnRK2s wird durch Phosphorylierung im Aktivierungs-Loop erlangt (Belin et al. 2006; Boudsocq et al. 2007; Vlad et al. 2010; Xie et al. 2012). In den Schließzellen wird durch SnRK2.6/SRK2E/OPEN STOMATA 1 (OST1) der K^+ -Influxkanal (KAT1) inhibiert und der Anionen-Kanal (SLOW ANIONEN CHANNEL-ASSOCIATED 1, SLAC1) aktiviert (Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2002; Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009; Sato et al. 2009). Neben SnRK2.6 nehmen auch Ca^{2+} und CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 23 (CPK23), die Ca^{2+} -abhängig ist, einen vergleichbaren Einfluss auf die Ionenkanäle (Siegel et al. 2009; Geiger et al. 2010; Raghavendra et al. 2010; Hedrich und Geiger 2017). SLAC1 entlässt durch die Aktivierung Anionen, wie zum Beispiel Chlorid und Nitrat, das zur Depolarisierung der Membran führt (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008; Geiger et al. 2009). Durch die Depolarisation werden auch K^+ -Effluxkanäle – zum Beispiel GORK – aktiviert, die K^+ in den Apoplast entlassen (Ache et al. 2000; Becker et al. 2003; Hosy et al. 2003). Der Verlust an Ionen sorgt für einen Wasserausstrom, der Turgor sinkt und das Stoma wird geschlossen (Roelfsema et al. 2012). Im Zellkern werden die ABFs/ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEINS (AREBs), die zur Gruppe der *basic-leucine zipper* (bZIP)-Transkriptionsfaktoren zählen und zu denen auch ABI5 gehört, durch die SnRK2s phosphoryliert, worauf sie als Dimer an das *abscisic acid responsive element* (ABRE) in Promotoren ABA-regulierter Gene binden können (Finkelstein et al. 2005; Fujii et al. 2007; Fujita et al. 2009; Nakashima et al. 2009; Yoshida et al. 2010; Fujita et al.

2011). Weitere transkriptionelle Regulatoren binden an die ABFs direkt – wie der B3-Domäne-Transkriptionsfaktor ABI3 an ABI5 – oder binden an das *coupling element* (CE) – wie der APE-TALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF)-Transkriptionsfaktor ABI4 (Nakamura et al. 2001; Raghavendra et al. 2010; Reeves et al. 2011; Skubacz et al. 2016). Aus der Beschreibung des ABA-Signalwegs wird deutlich, welchen entscheidenden Einfluss Transkriptionsfaktoren auf die Umsetzung eines hormonellen Stimulus haben. Im nächsten Abschnitt soll deshalb eine Übersicht über Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* gegeben werden.

1.2. Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*

Transkriptionsfaktoren werden als Proteine definiert, die an spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen (*cis*-Elemente) in einem Promotor binden und dadurch aktivierend oder reprimierend auf die Transkription eines Gens wirken (Riechmann et al. 2000; Riechmann 2002; Riaño-Pachón et al. 2007). Demzufolge bestehen Transkriptionsfaktoren zumeist aus einer DNA-Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungs- oder Repressordomäne (AD bzw. RD; Riechmann 2002; Mitsuda und Ohme-Takagi 2009). Prinzipiell kann zwischen zwei Typen von Transkriptionsfaktoren unterschieden werden. Zum einen zwischen den generellen Transkriptionsfaktoren, die zusammen mit der Ribonukleinsäure (RNA)-Polymerase den basalen Transkriptionsapparat formen, und zum anderen den spezifischen Transkriptionsfaktoren, die *up*- oder *downstream* des basalen Transkriptionsapparats an die DNA binden und die Initiation der Transkription beeinflussen (Riaño-Pachón et al. 2007). Letztere können direkt mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren oder indirekt über Cofaktoren (Riechmann 2002). Sie werden benötigt, um die Transkription von Genen zu regulieren, indem ihre eigene Expression zum Beispiel nur in einem bestimmten Gewebe, einem speziellen Zelltyp, temporär oder durch einen Stimulus erfolgt (Riechmann 2002).

Das Genom von *Arabidopsis* enthält mehr als 27000 Protein-kodierende Gene (Cheng et al. 2017), von denen laut den Datenbanken *Arabidopsis Gene Regulatory Information Server* (AGRIS) und *Rikagaku Kenkyūjo Arabidopsis Transcription Factor Database* (RARTF) etwa 7 % für Transkriptionsfaktoren kodieren (Davuluri et al. 2003; Guo et al. 2005; Iida et al. 2005; Palaniswamy et al. 2006; Mitsuda und Ohme-Takagi 2009; Yilmaz et al. 2011). Anhand der BD können Transkriptionsfaktoren in Familien eingeteilt werden. Der Vergleich der beiden Datenbanken ergibt in Summe 62 verschiedene Transkriptionsfaktor-Familien, von denen 40 Familien in beiden Datenbanken vorkommen (Davuluri et al. 2003; Iida et al. 2005; Palaniswamy et al. 2006; Yilmaz et al. 2011). Ein Teil der Transkriptionsfaktoren kann aufgrund zu geringer Sequenz-Übereinstimmung zu anderen Transkriptionsfaktoren oder bisher nicht beschriebener Domänen nicht in Familien eingeordnet werden. Ein Unterschied in der Anzahl an

Transkriptionsfaktor-Familien ergibt sich erstens aus der unterschiedlichen Definition von Transkriptionsfaktoren und zweitens aus der variierenden Einteilung in Transkriptionsfaktor-Familien und Transkriptionsfaktor-Unterfamilien (Guo et al. 2005; Mitsuda und Ohme-Takagi 2009). Ein Beispiel zu erstens sind die AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA)-Proteine, die von RARTF jedoch nicht von AGRIS als Transkriptionsfaktoren gezählt werden, obwohl sie keine DNA-Bindedomäne besitzen, aber mit den AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)-Transkriptionsfaktoren interagieren (Guilfoyle et al. 1998; Riechmann et al. 2000; Mitsuda und Ohme-Takagi 2009). Zu zweitens kann die GOLDEN2 (G2)/TYPE-B PHOSPHOACCEPTING RESPONSE REGULATOR (ARR-B)/PI STARVATION RESPONSE 1 (PSR1)- Familie – kurz GARP-Familie – von RARTF angeführt werden, die bei AGRIS in die zwei Familien G2-like und ARR-B unterteilt wird.

Während ein Teil der für Arabidopsis beschriebenen Transkriptionsfaktor-Familien auch in den drei eukaryotischen Modellorganismen *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* (z.B. bZIP, MINI CHROMOSOME MAINTENANCE 1/AGAMOUS/DEFICIENS/ SERUM RESPONSE FACTOR (MADS), bHLH, CYS2-HIS2 ZINC FINGER (C2H2 (Zn)) vorkommt, ist etwa die Hälfte der beschriebenen Transkriptionsfaktor-Familien spezifisch für Arabidopsis (z.B. ARF, NO APICAL MERISTEM/ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR/CUP-SHAPED COTYLEDON (NAC), Tryptophan/Arginin/Lysin/Tyrosin (WRKY)). Zu den drei größten Familien in Arabidopsis zählen MYELOBLASTOSIS DOMAIN PROTEIN (MYB, 12,4 %), AP2/ERF (9,3 %) und bHLH (9 %) (Riechmann et al. 2000). Auf die zuletzt genannte Familie soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.2.1 bHLH-Transkriptionsfaktoren

bHLH-Transkriptionsfaktoren wirken als transkriptionelle Regulatoren während der Entwicklung, in Stresssituationen und in verschiedenen Hormon-Signalwegen. Sie sind zum Beispiel beteiligt an der Zelldifferenzierung, der Trichom-Entwicklung, der Eisen-Homöostase, der Anthocyan-Biosynthese, dem Phytochrom-Signalweg sowie den ABA- und JA-Signalwegen (Payne et al. 2000; Schiefelbein 2003; Duek und Fankhauser 2005; Niu et al. 2011; Liang und Yang 2015; Tian et al. 2015; Wang et al. 2015b; Liang et al. 2017). bHLH-Transkriptionsfaktoren sind gekennzeichnet durch eine *basic region* (BR), nach der zwei amphipatische α -Helices folgen, die durch einen flexiblen Loop voneinander getrennt werden. Erste Beschreibungen dieses Motivs wurden an Faktoren, die den humanen Immunglobulin-Enhancer binden, sowie DAUGHTERLESS und weiteren Proteinen aus *Drosophila* vorgenommen (Murre et al. 1989). Im Genom von *A. thaliana* wurden bisher 162 Gene vorgefunden, die für einen bHLH-

Transkriptionsfaktor kodieren (Bailey et al. 2003). Diese wurden von Heim et al. (2003) durch phylogenetische Analysen in 12 Unterfamilien gegliedert. Die Einordnung in Unterfamilien erfolgte aufgrund einer ähnlichen Anzahl an Introns in konservierten Positionen, der prognostizierten Proteinelänge und der Position des bHLH-Motivs innerhalb des Proteins. Die weitere Einteilung in Gruppen wurde nach der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen außerhalb der DNA-Bindedomäne vorgenommen (Heim et al. 2003). Dies führt in Summe zu 24 Unterfamilien und Gruppen (Heim et al. 2003). Toledo-Ortiz et al. (2003) teilten die bHLH-Transkriptionsfaktoren ebenfalls über phylogenetische Analysen in 21 Unterfamilien ein.

Das bHLH-Motiv (Abbildung 6) umfasst in etwa 60 Aminosäuren. Über die ersten 17 Aminosäuren erstreckt sich in Arabidopsis die BR, die im Mittel sechs basische Aminosäuren enthält. Die BR in Arabidopsis ist somit vier Aminosäuren länger als üblich. Dies liegt an der größeren Distanz der ersten beiden basischen Aminosäuren im Vergleich zum konservierten E¹³ (Atchley et al. 1999; Toledo-Ortiz et al. 2003). Der sich dadurch ergebende Unterschied in der Zählweise der Aminosäuren im bHLH-Motiv führt zu differierenden Angaben in der Literatur, was einen Vergleich erschwert. Daher wird im Folgenden nur noch die auf Toledo-Ortiz et al. (2003) bezogene Zählweise angewendet und Informationen aus der Literatur an diese Zählweise angepasst. Die beiden Helices bestehen meist aus etwa 15 Aminosäuren und enthalten überwiegend hydrophobe Aminosäuren (Atchley et al. 1999; Toledo-Ortiz et al. 2003). Der Loop variiert in der Länge zwischen 6–14 Aminosäuren und weist keine vergleichbare Konservierung in der Zusammensetzung der Aminosäuresequenz zu den anderen Strukturen auf (Heim et al. 2003; Toledo-Ortiz et al. 2003). Dies führt auch zu einer Diskrepanz in den Angaben über die Zugehörigkeit von Aminosäuren zum Loop oder zu den Helices. Während Toledo-Ortiz et al. (2003) Aminosäuren 37–41 noch zum Loop zählt, ordnet Heim et al. (2003) diese bereits der zweiten Helix zu.

Die bHLH-Domäne erfüllt zwei Funktionen. Eine Funktion ist die DNA-Bindung, die vorwiegend über die BR zustande kommt. Die zweite Funktion ist die Dimerisierung mit anderen bHLHs, für die die HLH-Domäne sorgt (Murre et al. 1989; Ferré-D'Amaré et al. 1993; Ellenberger et al. 1994; Ferré-D'Amaré et al. 1994; Massari und Murre 2000). Auf beide Elemente der bHLH-Domäne soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

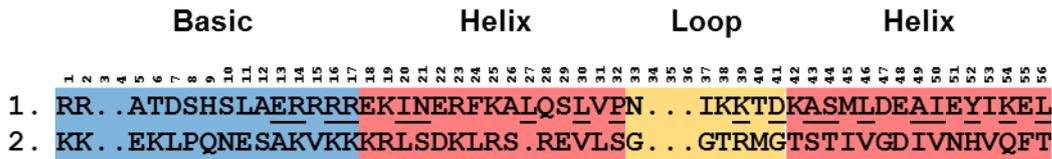


Abbildung 6: Das bHLH-Motiv in Arabidopsis. Die am häufigsten (1.) und zweithäufigsten (2.) vorkommenden Aminosäuren im bHLH-Motiv von Arabidopsis sind aufgeführt und beziehen sich auf die Angaben von Heim et al. (2003) und Toledo-Ortiz et al. (2003). In der Sequenz sind Punkte (.) angegeben, wenn von keiner der beiden Quellen eine eindeutige Zuordnung für die jeweilige Position getroffen wurde. Eine Ausnahme bildet der Punkt an Position 27 in der Sequenz der zweithäufigsten Aminosäuren, weil Leucin (L) in allen bHLHs vorzufinden ist und es dadurch keine zweitrangige Aminosäure an dieser Position gibt. Aminosäuren, die sowohl bei Heim et al. (2003) als auch bei Toledo-Ortiz et al. (2003) zu 50 % in den Alignments vorkommen, sind unterstrichen. Die Zahlen oberhalb der Sequenz geben die Position innerhalb des bHLH-Motivs an. Die Zählweise und die Zuordnung der Abschnitte beziehen sich auf Toledo-Ortiz et al. (2003).

bHLH-Transkriptionsfaktoren können anhand ihrer DNA-Bindfähigkeit und weiteren Eigenschaften in sechs Gruppen (A-F) eingeteilt werden (Dang et al. 1992; Atchley und Fitch 1997; Ledent und Vervoort 2001). Alle Gruppen – bis auf Gruppe D – sind in der Lage DNA zu binden. Mitglieder aus der Gruppe D – meist einfach als HLH bezeichnet – enthalten keine oder nur wenige basische Aminosäuren und weisen zudem ein häufiges Vorkommen von Prolin (P) an Position 8 und 13 auf (Atchley und Fitch 1997). In Arabidopsis können etwa 18 % der bHLHs zu dieser Gruppe gezählt werden. Die fünf weiteren Gruppen sind nach E-Box bindenden (A und B) und nicht E-Box-bindenden bHLHs (C, E und F) eingeteilt. bHLHs der Gruppe C enthalten eine PERIOD CIRCADIAN PROTEIN/ARYL HYDROCARBON RECEPTOR NUCLEAR TRANSLOCATOR PROTEIN/SINGLE-MINDED PROTEIN (PAS)-Domäne, die Protein-Protein-Interaktion ermöglicht, und binden an NACGTG oder NGCGTG. Gruppe E werden bHLHs zugeordnet, die eine Tryptophan/Arginin/Prolin/Tryptophan (WRPW)-Sequenz enthalten und an eine N-Box (CACGGC oder CACGAC) binden, und Gruppe F enthält bHLHs mit einer COLLIER/OLFACTORY 1/EARLY B-CELL FACTOR (COE)-Domäne, die an TCCCNN-GGGA binden können (Travis et al. 1993; Fisher und Caudy 1998; Ledent und Vervoort 2001; Treiber et al. 2010). bHLHs, die Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Gruppe C, E oder F zeigen, wurden in Arabidopsis bisher nicht gefunden (Ledent und Vervoort 2001; Toledo-Ortiz et al. 2003). Gruppe A und B vereint ein Glutamat (E) an Position 13 und ein R an Position 16 (Abbildung 7). Beide Aminosäuren sind notwendig für die Bindung der E-Box (CANNTG). Gruppe A kann aufgrund eines bestimmten Aminosäure-Musters an Position 9, 12 und 17 an die Sequenz CAGCTG, die auch als nicht-G-Box bezeichnet wird, binden. An Position 12 steht ein R und an 9 bzw. 17 eine weitere beliebige Aminosäure. Des Weiteren sind meist an Position 23 nur kleine aliphatische Aminosäuren (Alanin (A), Glycin (G)) vorzufinden (Dang et al. 1992; Atchley und Fitch 1997; Atchley et al. 1999). Zur Gruppe A zählen in etwa 11 % der E-Box-bindenden bzw. 40 % der DNA-bindenden bHLHs in Arabidopsis (Toledo-Ortiz et al. 2003). Gruppe B hat ein 9-12-17-Muster mit einer basischen Aminosäure (Histidin (H) oder Lysin (K))

an Position 9 und einem R an Position 17. Die Aminosäure an Position 12 kann variieren. Dieses Muster ermöglicht Gruppe B an die palindromische G-Box (CACGTG) zu binden (Dang et al. 1992; Atchley und Fitch 1997; Atchley et al. 1999). Zur Gruppe B zählen mit 89 % die meisten der DNA-bindenden bHLHs aus Arabidopsis. Neben den Gruppen A und B gibt es in Arabidopsis noch eine Gruppe an bHLH-Transkriptionsfaktoren, die aufgrund der Zusammensetzung der BR an DNA binden müsste, aber nicht die für eine E-Box-Bindung essentiellen Aminosäuren vorweisen kann. Die Anzahl der nicht-E-Box-bindenden bHLHs beträgt etwa 7 % (Toledo-Ortiz et al. 2003).

	<i>basic region</i>				
	9	12	13	16	17
Gruppe A:	x	R	E	R	x
Gruppe B:	H _k	x	E	R	R

Abbildung 7: Unterscheidung zwischen Gruppe A und B bHLHs anhand der BR. E¹³ und R¹⁶ der BR beider Gruppen sind für die Bindung einer E-Box notwendig. Durch Position 9, 12 und 13 fällt die Unterscheidung in der Bindung einer nicht-G-Box (CAGCTG, Gruppe A) und einer G-Box (CACGTG, Gruppe B).

Anhand der Aminosäuren in der BR können den vorherigen Ausführungen zu Folge relativ genaue Aussagen über potentielle Zielsequenzen eines bHLH-Transkriptionsfaktors getroffen werden. Für die Dimerisierung können solche Aussagen mithilfe der Aminosäuresequenz der HLH-Domäne bisher noch nicht formuliert werden. Die Dimerisierung von bHLH-Transkriptionsfaktoren ist für die Ausübung der Funktion als Transkriptionsfaktor entscheidend, da von einem Monomer immer nur eine Halbseite (CAN) der E-Box (CANNTG) gebunden werden kann und erst als Dimer ein funktionaler Komplex entsteht (Ellenberger et al. 1994; Shimizu et al. 1997). Erstaunlich ist, dass L²⁷ der ersten Helix in allen bHLH-Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis vorzufinden ist (vgl. Abbildung 6). Ein weiteres hochkonserviertes L – zu etwa 93–94 % je nach Studie – in pflanzlichen bHLH-Transkriptions-faktoren lässt sich an Position 56 in der zweiten Helix vorfinden (Heim et al. 2003; Toledo-Ortiz et al. 2003). Für beide Leucine konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Funktion in der Dimerisierung einnehmen (Carretero-Paulet et al. 2010). Neben diesen beiden Leucinen spielen auch weitere hydrophobe Aminosäuren, wie Isoleucin und Valin, in der HLH-Domäne eine Rolle in der Stabilisierung des Dimers (Ferré-D´Amaré et al. 1993; Ciarapica et al. 2003; Heim et al. 2003; Pires und Dolan 2010). Auf eine Gruppe an bHLHs, die in der Lage sind Homodimere auszubilden und untereinander auch Heterodimere bilden, soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

1.2.2 Die Gruppe der JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE-Transkriptionsfaktoren

Auf der Suche nach JA-responsiven Genen wurde der Transkriptionsfaktor bHLH017 gefunden, der 30 % Ähnlichkeit zu MYC2 auf Ebene der Aminosäuresequenz zeigte. Aufgrund der Ähnlichkeit zu MYC2 wurde dieser als JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE 1 (JAM1) bezeichnet (Sasaki-Sekimoto et al. 2013). Aus Vergleichen der Aminosäuresequenz von bHLH-Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis ging hervor, dass JAM1 drei nahe Verwandte besitzt – bHLH003, bHLH013 und bHLH014 – die alle zur Gruppe d der Unterfamilie III (Abbildung 8) der bHLH-Transkriptionsfaktoren gehören (Heim et al. 2003) – nicht zu verwechseln mit den zuvor aufgeführten Gruppen zur DNA-Bindenspezifität. Die Gruppe III d wiederum zeigt große Gemeinsamkeiten zur Gruppe III e, zu der MYC2, MYC3, MYC4 und MYC5 gehören. Dies ist auch der Publikation von Toledo-Oritz et al. (2003) zu entnehmen, mit dem Unterschied, dass die Transkriptionsfaktoren der Gruppe III d und III e hier als Unterfamilie 8 zusammengefasst werden. Da bHLH003 und bHLH013 die größte Ähnlichkeit mit 43 % bzw. 47 % zu JAM1 aufwiesen, wurden diese als JAM3 und JAM2 benannt (Sasaki-Sekimoto et al. 2013). Die kodierende Sequenz der bHLH-Transkriptionsfaktoren JAM1, JAM2 und JAM3 befindet sich auf dem zweiten, ersten bzw. vierten Chromosom des Arabidopsis-Genoms (Theologis et al. 2000; Heim et al. 2003; Yamada et al. 2003).

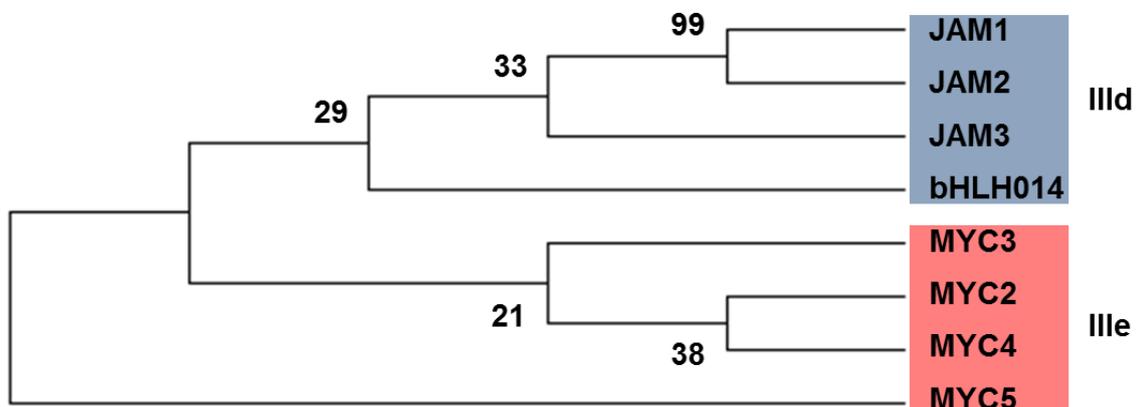


Abbildung 8: Phylogenetischer Baum der bHLHs der Gruppe III d und III e. Mitglieder der Gruppe III d und III e sind blau bzw. rot hinterlegt. Die Bezeichnung der Gruppen bezieht sich auf die Einordnung der bHLHs von Heim et al. (2003). Der Baum wurde mit der Neighbor-Joining-Methode in MEGA-X erstellt (Saitou und Nei 1987; Kumar et al. 2018). Dabei kam die Poisson-Correction-Methode mit paarweiser Deletion und der Bootstrap-Test mit 1000 Replikaten zur Anwendung (Zuckerlandl und Pauling 1965; Felsenstein 1985). Der Prozentsatz, zu dem die Replikatbäume für die zugehörigen bHLHs im Bootstrap-Test wiedergefunden wurden, wird neben den Zweigen angezeigt.

Die drei JAMs werden in verschiedenen Geweben exprimiert (Tominaga-Wada et al. 2011; Song et al. 2013; Fonseca et al. 2014), besonders in den Stomata (Abbildung 9). Innerhalb der Zelle sind sie im Zellkern lokalisiert, wobei JAM2 und JAM3 auch im Cytoplasma vorzufinden sind (Song et al. 2013; Fonseca et al. 2014). Die Behandlung mit Jasmonat (JA) führt nicht

zu einer Änderung der Lokalisation (Fonseca et al. 2014), jedoch kann durch Methyl-Jasmonat (Me-JA) die Expressionsrate von MYC2 und JAM1 gleichermaßen erhöht werden (vgl. Abbildung 9; Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Fonseca et al. 2014). Aufgrund der Sequenz-Ähnlichkeit zu MYC2 wurde vermutet, dass die JAMs mit MYC2 dimerisieren können. Jedoch konnte eine Interaktion mit MYC2 nicht gezeigt werden (Nakata et al. 2013; Nakata und Ohme-Takagi 2013). Die JAMs sind aber in der Lage Homodimere und untereinander Heterodimere auszubilden (Nakata und Ohme-Takagi 2013; Fonseca et al. 2014; Sasaki-Sekimoto et al. 2014; Huang et al. 2018).

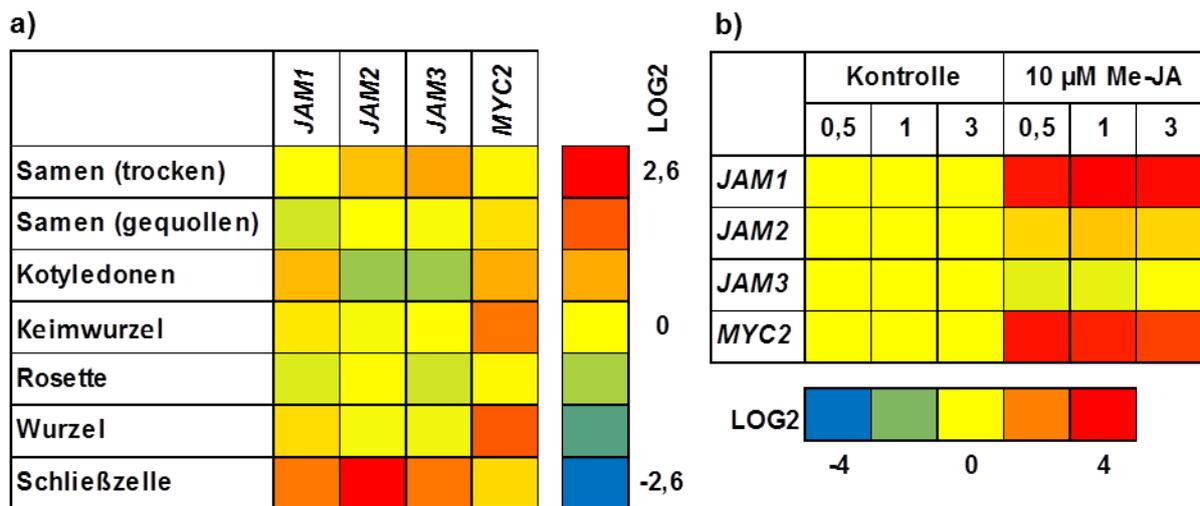


Abbildung 9: Expression der JAMs und MYC2. Die Expressionsdaten in verschiedenen Geweben (a) und unter Me-JA-Einfluss (b) wurden dem Arabidopsis eFP Browser entnommen (Nakabayashi et al. 2005; Winter et al. 2007; Bassel et al. 2008; Yang et al. 2008). Die Expression jedes Gens wurde relativ zum eigenen Kontrollwert dokumentiert. Das Alter des trockenen Samens beträgt zwei Monate nach der Ernte. Die Quellung erfolgte über 24 h. Die Kotyledonen und die Keimwurzel besaßen ein Alter von 7 d. Die Rosette und die Wurzel waren zum Zeitpunkt der Messung 14 d bzw. 17 d alt. Die Expression in der Schließzelle wurde in der fünf Wochen alten Pflanze bestimmt. Die Zahlen in (b) geben die Zeit (h) ab Beginn der Hormon-Exposition an. Für die Messung wurden 7 d alte Keimlinge verwendet.

MYC2 interagiert mit JASMONATE ZINC-FINGER PROTEIN EXPRESSED IN INFLORESCENCE MERISTEM (ZIM)-DOMAIN (JAZ)-Proteinen, Repressoren des JA-Signalwegs (Chini et al. 2007; Thines et al. 2007; Melotto et al. 2008; Chini et al. 2009). Aus einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der JAMs mit Mitgliedern der Gruppe IIIe der bHLH-Transkriptionsfaktoren ging hervor, dass diese alle eine JAZ-Interaktionsdomäne (JID) enthalten (Fernández-Calvo et al. 2011). Interaktionsstudien zwischen JAMs und JAZ1–12 in Hefe bzw. *in planta* ergaben, dass JAM1 mit allen zwölf JAZ-Proteinen interagieren kann, JAM2 mit allen außer JAZ7 und JAM3 mit allen außer JAZ7 sowie JAZ12 (Song et al. 2013; Fonseca et al. 2014; Sasaki-Sekimoto et al. 2014). Weitere Analysen zeigten, dass die N-terminale JID-Domäne von JAM2 essentiell ist für die Interaktion mit JAZ-Proteinen (Song et al. 2013). Über JAZ8 und JAZ11 konnte im Gegenzug gezeigt werden, dass die Jasmonat-assoziierte (JAS)-Domäne der JAZ-Proteine für die Interaktion mit den JAMs wichtig ist (Song et al. 2013).

Aufgrund der Ähnlichkeit zu MYC2 und der Interaktion mit JAZ-Proteinen wurde angenommen, dass die JAMs eine Rolle im Jasmonat-Signalweg spielen. Transfer (T)-DNA-Insertionslinien für jedes einzelne JAM zeigten aber keinen Einfluss auf JA-regulierte Prozesse, wie Fruchtbarkeit, JA-inhibiertes Wurzelwachstum oder JA-induzierte Anthocyan-Akkumulation (Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Song et al. 2013). Erst Doppel-Mutanten bzw. Triple-Mutanten zeigten beispielsweise einen Unterschied in der Anthocyan-Akkumulation oder im Wurzelwachstum im Vergleich zum Wildtyp (Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Song et al. 2013). Des Weiteren konnte auch eine Veränderung der Me-JA-induzierten Expression von Anthocyan-Biosynthese-Genen, wie *DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE (DFR)*, *LEUCOANTHOCYANIDIN DIOXYGENASE (LDOX)* oder *URIDINDIPHOSPHAT-GLUCOSE:FLAVONOID 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE (UF3GT)*, JA-Stoffwechsel-Genen, wie *ALLENE OXIDE SYNTHASE (AOS)*, *CYP94B3*, *JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE (JMT)* und *SULFOTRANSFERASE 2A (ST2A)*, und Genen der pflanzlichen Abwehr, wie *ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 19 (ANAC019)*, *ERF1* und *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN (VSP) 2*, dokumentiert werden (Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Song et al. 2013). Da die JAMs erst in Kombination einen negativen Einfluss auf JA-regulierte Prozesse zeigten, wurde für die JAMs eine redundante Funktion angenommen, die sich antagonistisch zu der von MYC2 verhält (Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Song et al. 2013; Fonseca et al. 2014).

Für den JA-Signalweg wird den Ergebnissen nach folgendes Szenario angenommen: In Abwesenheit von JA interagieren JAZs mit MYC2 und JAMs (Abbildung 10). JAZs verhindern die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA oder rekrutieren CO-Repressoren, wie TPL oder TPRs, die die Aktivierung der Transkription unterdrücken. Die Bindung der Co-Repressoren erfolgt entweder direkt an die JAZ-Proteine oder über NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA), das als Linker fungiert (Pauwels et al. 2010; Pauwels und Goossens 2011; Chini et al. 2016). Durch Umweltreize oder Entwicklungsprozesse wird die bioaktive Form (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-iso-leucin (JA-Ile) gebildet, die durch CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) des S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN/CULLIN/F-BOX PROTEIN (SCF)^{COI1}-Komplexes gebunden wird. SCF^{COI1} geht daraufhin eine Interaktion mit den JAZs ein. Die JAZs werden durch den SCF^{COI1}-Komplex ubiquitiniert und anschließend durch das 26S-Proteasom abgebaut. MYC2 wird dadurch aus der Reprimierung entlassen und die Transkription wird eingeleitet (Chini et al. 2007; Thines et al. 2007; Fonseca et al. 2009; Yan et al. 2009; Sheard et al. 2010; Wasternack und Hause 2013; Chini et al. 2016; Durand et al. 2016; Goossens et al. 2016; Goossens et al. 2017). Wie auch MYC2 binden JAMs vorzugsweise an eine G-Box (Fonseca et al. 2014). Es ist daher möglich, dass die JAMs mit MYC2 um ein und dieselbe Bindestelle im Promotor von JA-regulierten Genen konkurrieren (Goossens et al. 2017). Im

Gegensatz zu MYC2 enthalten die JAMs aber keine kanonische Aktivierungsdomäne und wirken in Aktivierungsassays reprimierend auf die Expression (Nakata et al. 2013; Nakata und Ohme-Takagi 2013; Song et al. 2013; Goossens et al. 2017). Es wird daher angenommen, dass die JAMs nicht die RNA-Polymerase rekrutieren können, um die Transkription einzuleiten, und dadurch die Expression von Zielgenen des JA-Signalwegs unterdrücken (Fonseca et al. 2014; Goossens et al. 2017).

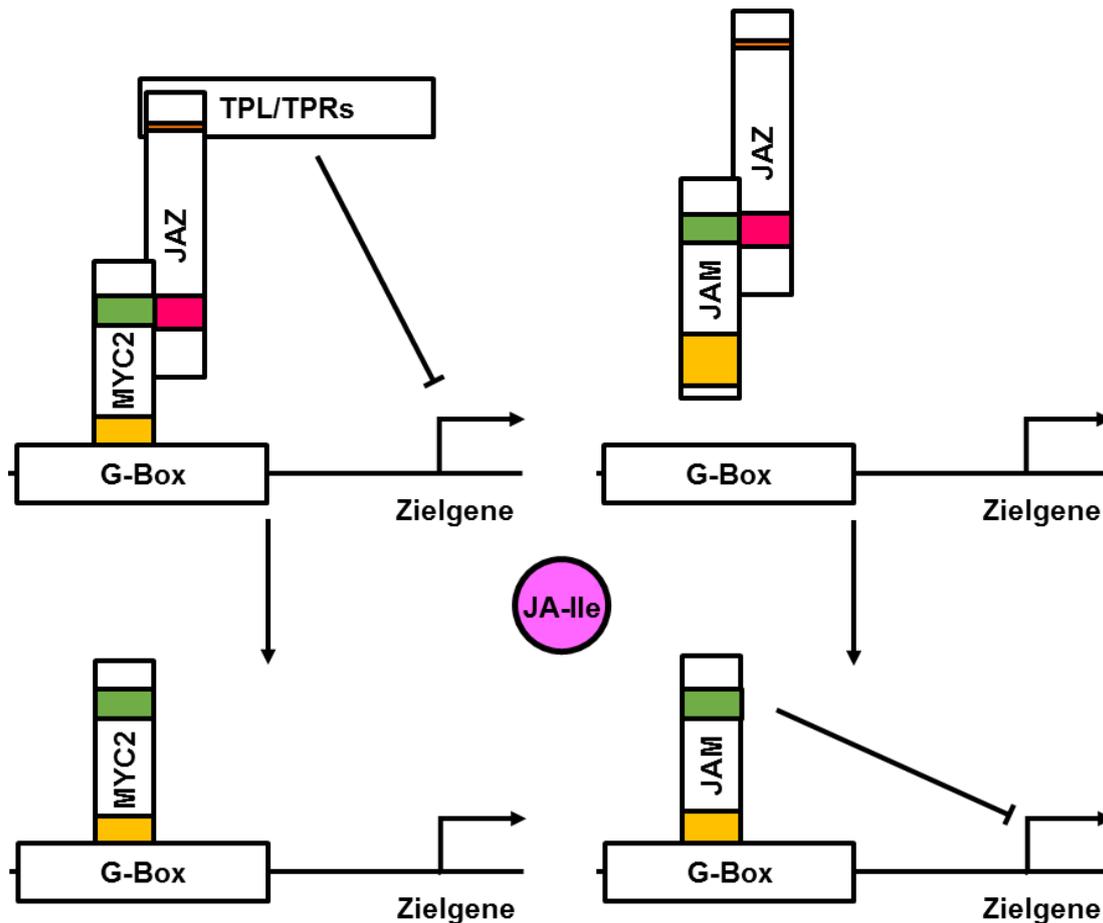


Abbildung 10: Funktion von JAMs und MYC2 im JA-Signalweg. In Abwesenheit von JA-Ile interagiert TPL über EAR-Motive (orange) mit JAZs und verhindert dadurch die Expression von MYC2-Zielgenen. Des Weiteren verhindern JAZs über die Interaktion mit JAMs deren reprimierende Wirkung auf die Expression. Die Interaktion zwischen JAZ und MYC2 bzw. JAMs erfolgt über die JID-Domäne (grün) bzw. JAS-Domäne (pink). In Anwesenheit von JA-Ile werden die JAZs abgebaut, wodurch MYC2 und die JAMs ihre positive bzw. negative Funktion im JA-Signalweg ausüben können. Die Abbildung ist den Darstellungen von Goossens et al. (2017) nachempfunden.

1.2.3 Die Funktion von JAM1 und MYC2 im ABA-Signalweg

Erste Beschreibungen über die Funktion von MYC2 und JAM1 gehen aber nicht auf den JA-Signalweg zurück, sondern auf den ABA-Signalweg. MYC2 wurde zuvor als BINDING PROTEIN OF THE DEHYDRATION-RESPONSIVE 22 PROMOTER 1 (RD22BP1) benannt und JAM1 als ABSCISIC ACID-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR (AIB) bezeichnet. Wie die Namen bereits andeuten, wurde MYC2 auf der Suche nach Proteinen, die den Promotor von *RESPONSIVE TO DEHYDRATION 22 (RD22)* binden, gefunden und JAM1 aufgrund der Induktion der Expression durch ABA (Abe et al. 1997; Li et al. 2007). Für MYC2 konnte gezeigt werden, dass es an die Sequenz CACATG im Promotor von *RD22* bindet (Abe et al. 1997). Die Expressionsmuster von MYC2 und JAM1 unter ABA oder abiotischem Stress sind ähnlich (Abbildung 11). Beide werden durch Dehydrierung, Osmotika – wie Polyethylenglycol (PEG) oder Mannit – oder Salz induziert, jedoch nicht durch Kälte und Hitze (Abe et al. 1997; Hoth 2002; Li et al. 2007). Die nahe verwandten JAM2 und JAM3 hingegen weisen wie schon unter Me-JA kein vergleichbares Expressionsmuster zu JAM1 und MYC2 auf.

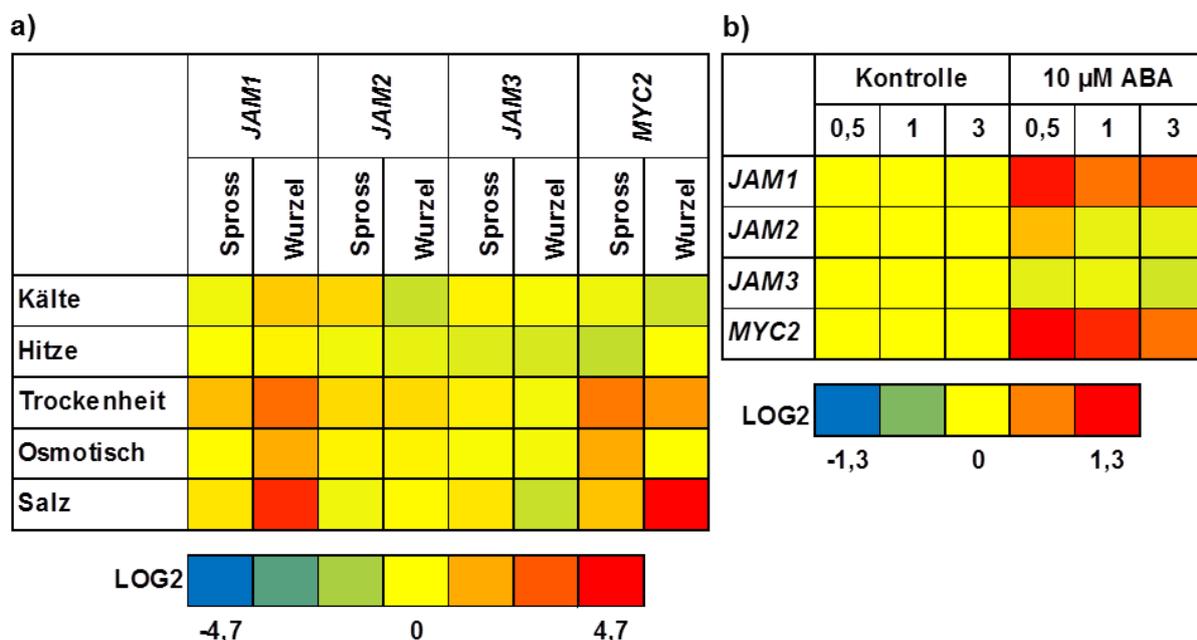


Abbildung 11: Expressionsrate der JAMs sowie MYC2 unter abiotischem Stress oder ABA. Die Expressionsdaten unter abiotischem Stress (a) oder ABA-Einfluss (b) wurden dem Arabidopsis eFP Browser entnommen (Kilian et al. 2007; Winter et al. 2007). Die Expression jedes Gens wurde relativ zum eigenen Kontrollwert dokumentiert. Für die Bestimmung der Expressionsrate unter abiotischem Stress wurden 18 d alte Pflanzen verwendet. Die Messung erfolgte über 24 h mit jeweils bis zu neun Messpunkten. Hier wurde ein repräsentativer Messzeitpunkt für Spross bzw. Wurzel dargestellt: Kälte (kontinuierlich 4° C) 24 h, Hitze (3 h 38 °C, dann 25 °C) 3 h, Trockenheit (15 min Luftstrom mit ca. 10 % Verlust an Frischgewicht) 0,5 h, Osmotisch (300 mM Mannit) 1 h, Salz (150 mM NaCl) 6 h. Die Zahlen in (b) geben die Zeit (h) ab Beginn der Hormon-Exposition an. Für die Messung wurden 7 d alte Keimlinge verwendet.

MYC2 und JAM1 werden aber nicht nur durch ABA induziert, sondern wirken auch als transkriptionelle Aktivatoren auf den ABA-Signalweg und haben einen Einfluss auf ABA-regulierte Prozesse. So konnte gezeigt werden, dass Knockdown-Linien von *JAM1* weniger sensitiv auf die inhibierende Wirkung von ABA im primären Wurzelwachstum reagierten. Überexpressionslinien von *JAM1* wiesen hingegen ein gegensätzliches Verhalten auf. Des Weiteren konnte auch eine verstärkte Toleranz gegenüber Trockenstress in transgenen Linien von *JAM1* bestimmt werden (Li et al. 2007). Die Überexpression von MYC2 führte zu einer verringerten Keimungsrate in Verbindung mit ABA, während die Funktionsverlustmutante sich als insensitiv gegenüber ABA im Keimungsverhalten erwies. Ebenso konnten in Verbindung mit MYC2 die Expression ABA-induzierbarer Zielgene, wie *RD22* und *ALCOHOL DE-HYDROGENASE 1 (ADH1)*, ausgelöst werden (Abe et al. 2003; Anderson et al. 2004). Aleman et al. (2016) konnte zudem zeigen, dass MYC2 mit RCAR9 interagieren kann und die Interaktion in Anwesenheit von ABA sogar verstärkt wird.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Von Huang (2014) wurde aus einer *A. thaliana*-Mutantenpopulation die ABA-hypersensitive Mutante *ahr11* isoliert. Mittels *map-based cloning* und *next generation sequencing* konnte die Hypersensitivität der Mutante auf eine Läsion im Gen *AHR11* (AT5G13590), dessen Funktion bis dahin unbekannt war, zurückgeführt werden. Um die Funktion von AHR11 im ABA-Signalweg einzuordnen, wurde zunächst ein Y2H-Screen zur Suche nach potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt (Huang 2014). Dabei wurden JAM2 (AT1G01260), TPL (AT1G15750) und TPR2 (AT3G16830) als potentielle Interaktionspartner gefunden. Für TPL wurde eine Interaktion mit den ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 BINDING PROTEIN (AFPs) gezeigt, die eine Rolle im ABA-Signalweg spielen (Garcia et al. 2008; Pauwels et al. 2010; Causier et al. 2012a). Für JAM2 selber war noch keine Verbindung zum ABA-Signalweg bekannt, jedoch für die JAM2-verwandten Proteine JAM1 und MYC2 (Abe et al. 1997; Li et al. 2007).

In dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen AHR11, JAM2, TPL und TPR2 über physikalische und funktionelle Interaktionsstudien verifiziert werden. Des Weiteren sollte auch eine mögliche Interaktion von AHR11 mit JAM2- bzw. TPL-verwandten Proteinen überprüft werden und Interaktionsdomänen zwischen den Proteinen bestimmt werden. Zur physikalischen Interaktionsbestimmung sollte zudem ein dem Y2H ähnliches Zwei-Hybrid-System in Protoplasten, das Protoplasten-Zwei-Hybrid-System (P2H), etabliert werden. Funktionelle Interaktionsstudien für AHR11, JAM2 und TPL/TPRs sollten mit einem ABA-Reportersystem in Mesophyll-Protoplasten durchgeführt werden. Des Weiteren sollte auch mit einer ABA-Reporterlinie der Einfluss von AHR11 und JAM2 auf den ABA-Signalweg getestet werden. Da für *JAM2* keine

T-DNA-Insertionslinie in der *coding sequence* (CDS) erhältlich war, sollte über CRISPR/Cas9-Mutagenese zunächst eine Knockout-Linie für *JAM2* erzeugt werden.

Für das Phytohormon ABA ist eine regulatorische Funktion bei Wachstumsprozessen – wie Keimung und Wurzelelongation – bekannt (Zeevaart und Creelman 1988; Hilhorst und Karsen 1992; Himmelbach et al. 1998; Cutler et al. 2010). Es sollte untersucht werden, ob AHR11 und *JAM2* in Verbindung mit ABA diese Wachstumsprozesse beeinflussen. Abschließend sollte versucht werden, ein Modell zur Position und Rolle von *JAM2* im ABA-Signalweg aufzustellen.

2. Ergebnisse

2.1. Interaktion zwischen AHR11 und Kandidatenproteinen im *Yeast two-hybrid*

In der vorangegangenen Dissertation von Huang (2014) wurden über einen Y2H-Screen JAM2, TPL und TPR2 als potentielle Interaktionspartner von AHR11 bestimmt. JAM2 zählt zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren und kann an eine G-Box (CACGTG) im Promotor eines Gens binden (Fonseca et al. 2014). TPL/TPRs sind Co-Repressoren die direkt oder indirekt mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren interagieren und so die Expression von Zielgenen unterdrücken (Causier et al. 2012a). Huang (2014) stellte anhand ihrer Ergebnisse ein Modell zur Wirkweise des JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplexes auf, das vergleichbar mit den Modellen für die Auxin- und Jasmonat-regulierte Transkription ist (Abbildung 12).

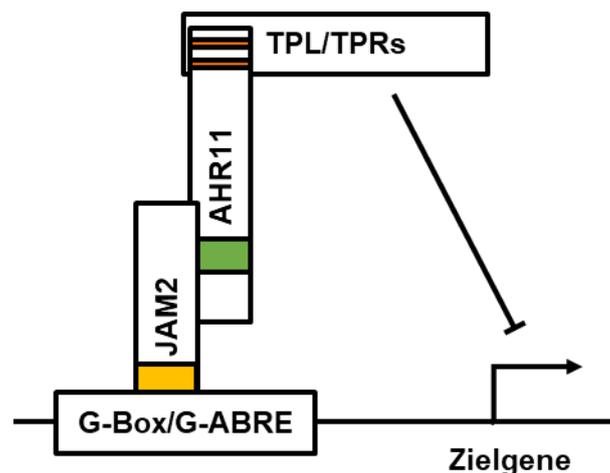


Abbildung 12: Hypothetisches Modell zur Genregulation über den JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplex. Der bHLH-Transkriptionsfaktor JAM2 bindet über die BR (gelb) an eine G-Box (CACGTG) oder an ein G-Box-artiges *ABA-responsive element* (G-ABRE, CACGTGGC) und reguliert die Transkription von Zielgenen. AHR11 nimmt die Position eines Adapters ein und interagiert sowohl mit JAM2 über einen C-terminalen Sequenzabschnitt (Aminosäuren 552–804, grün) als auch mit TPL/TPR2 über ein oder beide EAR-Motive (EAR1, ²⁰⁸LNL²¹²; EAR2, ³¹⁴LSLGL³¹⁸; orange). Durch die Co-Repressoren TPL/TPR2 wird die Transkription von JAM2-regulierten Genen verhindert. Modell von Huang (2014, modifiziert).

In diesen beiden Modellen kommt es in Folge eines hormonellen Stimulus (Indol-3-essigsäure bzw. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucin) zu einem Abbau der Repressor-Proteine (Aux/IAA bzw. JAZ), die als Adapter zwischen dem Transkriptionsfaktor (ARFs bzw. MYC2) und den Co-Repressoren TPL/TPRs fungieren. Die Transkriptionsfaktoren werden daraufhin freigesetzt und die Transkription von Zielgenen wird aktiviert (Pauwels et al. 2010). In dem Modell von Huang (2014) rekrutiert AHR11 TPL/TPR-Proteine, die an AHR11 über EAR-Motive binden können, woraufhin die Transkription von JAM2-regulierten Genen unterdrückt wird.

In dieser Arbeit sollte das von Huang (2014) aufgestellte Modell überprüft werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob AHR11 auch eine Interaktion zu JAM2- bzw. TPL/TPR2-verwandten Proteinen zeigt. Zu den nächsten Verwandten von JAM2 zählen JAM1, JAM3 und entfernter auch MYC2, das namensgebend für die Gruppe der JAM-Transkriptionsfaktoren war (Sasaki-Sekimoto et al. 2013). Zur Familie der TOPLESS und TOPLESS-verwandten Proteinen gehören neben TPL und TPR2 auch TPR1, TPR3 und TPR4 (Long et al. 2006). Die Interaktion zwischen AHR11 und den Kandidatenproteinen wurde zunächst in einem von Huang (2014) unabhängigen Y2H getestet. Dafür wurde die CDS von AHR11 mit der CDS der Aktivierungsdomäne (AD; kodiert im *pGAD424*) und die CDS der Kandidatenproteine mit der CDS der DNA-Bindedomäne (BD; kodiert im *pBRIDGE*) von GALACTOSE METABOLISM 4 (GAL4) fusioniert (Bartel et al. 1993; Tirode et al. 1997). Die entstandenen Konstrukte wurden sequenziert und in den Hefestamm AH109 transformiert (James et al. 1996). Der Erfolg der Doppeltransformation wurde auf Medium ohne Leucin und Tryptophan (-L/-W) getestet. Kommt es zu einer Interaktion zwischen den beiden Fusionsproteinen, dann wird das Reportergen für Histidin abgelesen und es ist auch ein Wachstum auf Histidin-freiem Medium (-L/-W/-H) möglich (Gietz et al. 1997). Ein Wachstum auf Histidin-freiem Medium kann auch durch die Autoaktivität eines Fusionsproteins hervorgerufen werden. Um eine mögliche Autoaktivität auszuschließen, wurden als Kontrolle alle Konstrukte, die für ein Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne kodieren, mit dem Konstrukt, das nur für die Aktivierungsdomäne ohne Fusionspartner kodiert, transformiert und umgekehrt.

Der Test auf Autoaktivität zeigte, dass sich bis auf BD-MYC2 keines der Fusionsproteine autoaktiv verhielt (Abbildung 13). Eine Aussage über eine mögliche Interaktion zwischen BD-MYC2 und AD-AHR11 kann somit nicht getroffen werden. Die von Huang (2014) gezeigte Interaktion von AHR11 zu den Kandidatenproteinen JAM2, TPL und TPR2 konnte bestätigt werden. Eine Interaktion zu den JAM2-verwandten Proteinen JAM1 und JAM3 konnte im Gegensatz zu den TPL/TPR2-verwandten Proteinen TPR1, TPR3 und TPR4 nicht gezeigt werden. Im Folgenden wurde analysiert, welche Sequenzabschnitte für die Interaktion zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL/TPRs notwendig sind.

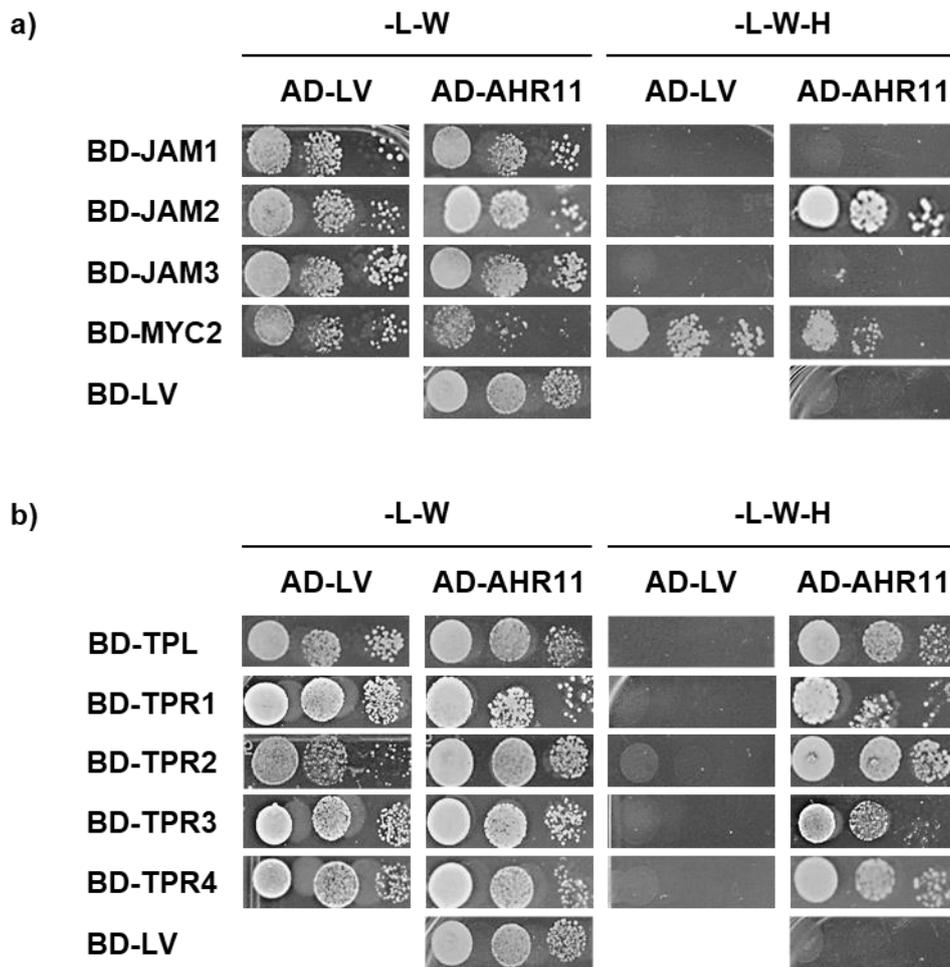


Abbildung 13: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und Kandidatenproteinen. a) Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und JAM2-verwandten Proteinen. AHR11 wurde für die Interaktionsanalyse mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) und die Kandidatenproteine mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert. Eine Hefeeinzelkolonie wurde in 100 µl ddH₂O resuspendiert und 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan (-L/-W, Wachstumskontrolle) und SD-Medium zusätzlich ohne Histidin (-L/-W/-H, Interaktionstest) aufgetropft und für 3 d bei 30 °C inkubiert. b) Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und TPL/TPR2-verwandten Proteinen. Der Versuch erfolgte wie unter a) beschrieben.

2.1.1 An der Interaktion zwischen AHR11 und TPL/TPRs beteiligte Domänen

TPL/TPR-Proteine bilden eine Unterklasse der Groucho/Tup1-Co-Repressoren und bestehen aus einer N-terminalen LisH-Domäne gefolgt von einer *C-terminal to LisH* (CTLH)-Domäne sowie zentralen als auch C-terminal lokalisierten WD-Wiederholungen (Abbildung 14, a). Die LisH-Domäne dient als Dimerisierungsmotiv und die CTLH-Domäne als Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Liu und Karmarkar 2008).

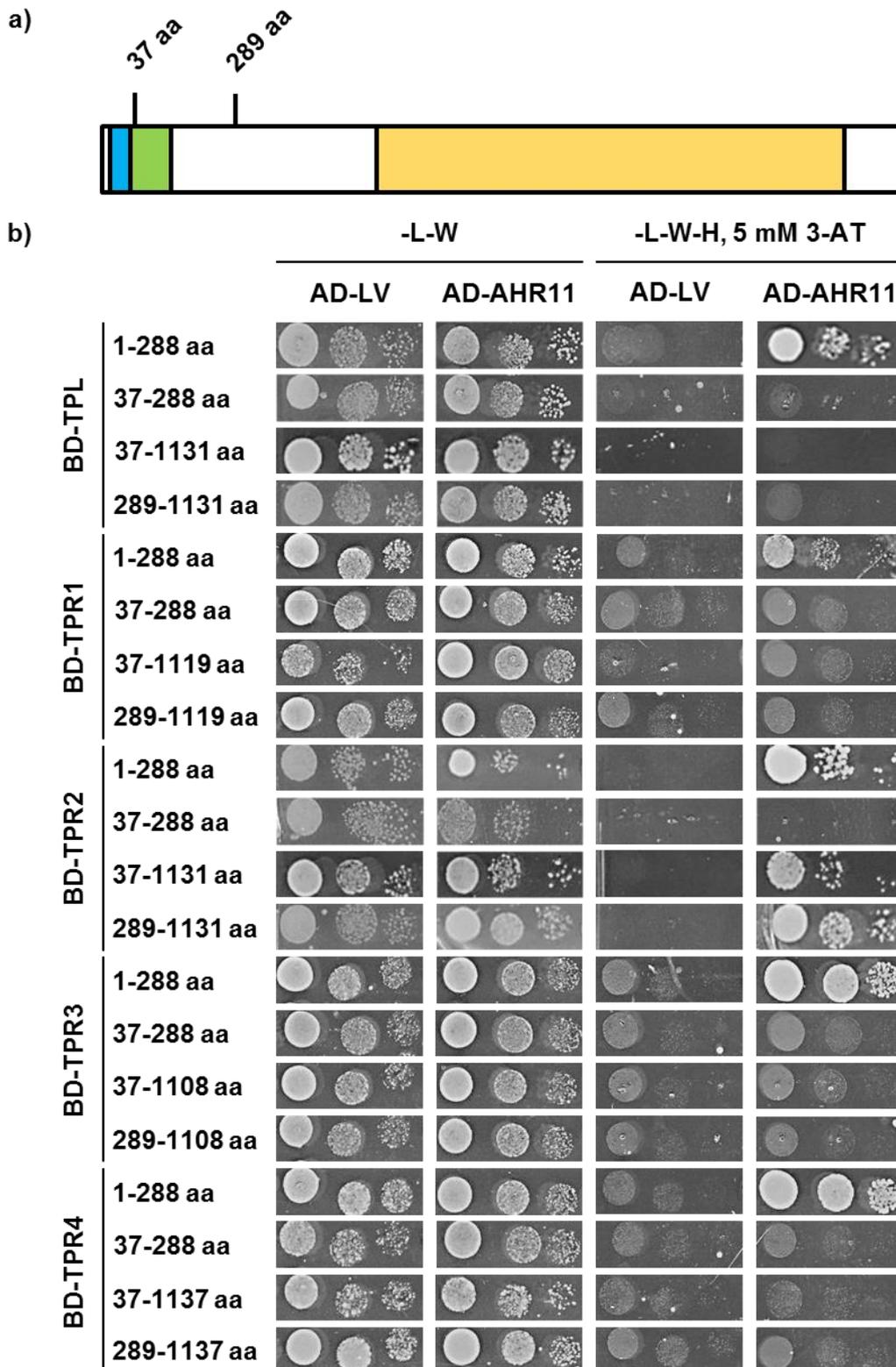


Abbildung 14: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und TPL/TPR-Varianten. a) Schematische Darstellung der TPL/TPRs. Die TPL/TPRs besitzen eine LisH-Domäne (Aminosäuren 4–36, hellblau), eine CTLH-Domäne (Aminosäuren 34–92, grün) und zentrale sowie C-terminale WD-Wiederholungen (gelb), die Angaben stammen von UniProt (The UniProt Consortium 2018). b) Y2H von AD-AHR11 mit BD-TPL/TPR-Varianten. Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben. Dem selektiven Medium (-L/-W/-H) wurde zusätzlich 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT, Endkonzentration 5 mM) zugesetzt.

Die Interaktion zwischen TPL und Proteinen mit EAR-Motiven erfolgt über die LisH-Domäne (Kieffer et al. 2006) oder die CTLH-Domäne (Szemenyei et al. 2008; Krogan et al. 2012; Wang et al. 2013a). Es ist daher anzunehmen, dass die Interaktion der TPRs zu Proteinen mit EAR-Motiven über die gleichen Domänen erfolgt. Um die Interaktionsdomäne der TPL/TPRs für die Interaktion mit AHR11 zu bestimmen, wurden die Proteine in vier Fragmente zerlegt (vergleiche Kieffer et al. 2006) und mit der GAL4-BD fusioniert. Das erste Fragment (Aminosäuren 1–288) enthält die LisH- und CTLH-Domäne, das zweite Fragment (Aminosäuren 37–288) die CTLH, das dritte Fragment (Aminosäuren 37–1131 von TPL/TPR2, Aminosäuren 37–1119 von TPR1, Aminosäuren 37–1108 von TPR3 und Aminosäuren 37–1137 von TPR4) die CTLH-Domäne und die WD-Wiederholungen und das vierte Fragment (Aminosäuren 289–1131 von TPL/TPR2, Aminosäuren 289–1119 von TPR1, Aminosäuren 289–1108 von TPR3 und Aminosäuren 289–1137 von TPR4) nur die WD-Wiederholungen. Eine Interaktion im Y2H war für alle TPL/TPRs bis auf TPR2 nur mit dem ersten Fragment möglich (Abbildung 14, b). Ein Verlust der LisH-Domäne führte somit im Gegensatz zu den anderen Domänen zu einem Ausbleiben der Interaktion der TPL/TPRs mit AHR11. Im Fall von TPR2 war neben der Interaktion über das erste Fragment auch eine Interaktion mit dem dritten und vierten Fragment zu AHR11 möglich. Für die Interaktion zwischen TPR2 und AHR11 sind demzufolge neben der LisH-Domäne auch die zentralen und C-terminalen WD-Wiederholungen entscheidend.

Huang (2014) zeigte im Y2H-Screen die Interaktion eines AHR11-Fragments (Aminosäuren 1–554) mit TPL und TPR2. Sie vermutete daraufhin, dass für die Interaktion zwischen AHR11 und den TPL/TPRs eines oder beide der N-terminalen EAR-Motive (EAR1, Aminosäuren 208–212; EAR2, Aminosäuren 314–318) von AHR11 essentiell sind (Abbildung 15, a). Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die EAR-Motive von AHR11 mittels *site directed mutagenesis* (SDM) deletiert und die Interaktion im Y2H getestet. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 74) dargestellt. TPL, TPR2 und TPR4 interagierten mit AHR11 unabhängig davon, ob eine oder beide EAR-Motive deletiert wurden. TPR1 und TPR3 zeigten bereits nach der Deletion eines EAR-Motivs keine Interaktion mehr mit AHR11 (Abbildung 15, b). Die EAR-Motive scheinen somit nicht für die Interaktion zwischen AHR11 und TPL, TPR2 bzw. TPR4 notwendig zu sein, jedoch für die Interaktion mit TPR1 und TPR3. Um den möglichen Interaktionsbereich zwischen AHR11 und TPL, TPR2 bzw. TPR4 einzuschränken sowie den Interaktionsbereich zwischen AHR11 und TPR1 und TPR3 zu bestätigen, wurden von AHR11 verschiedene Fragmente erzeugt.

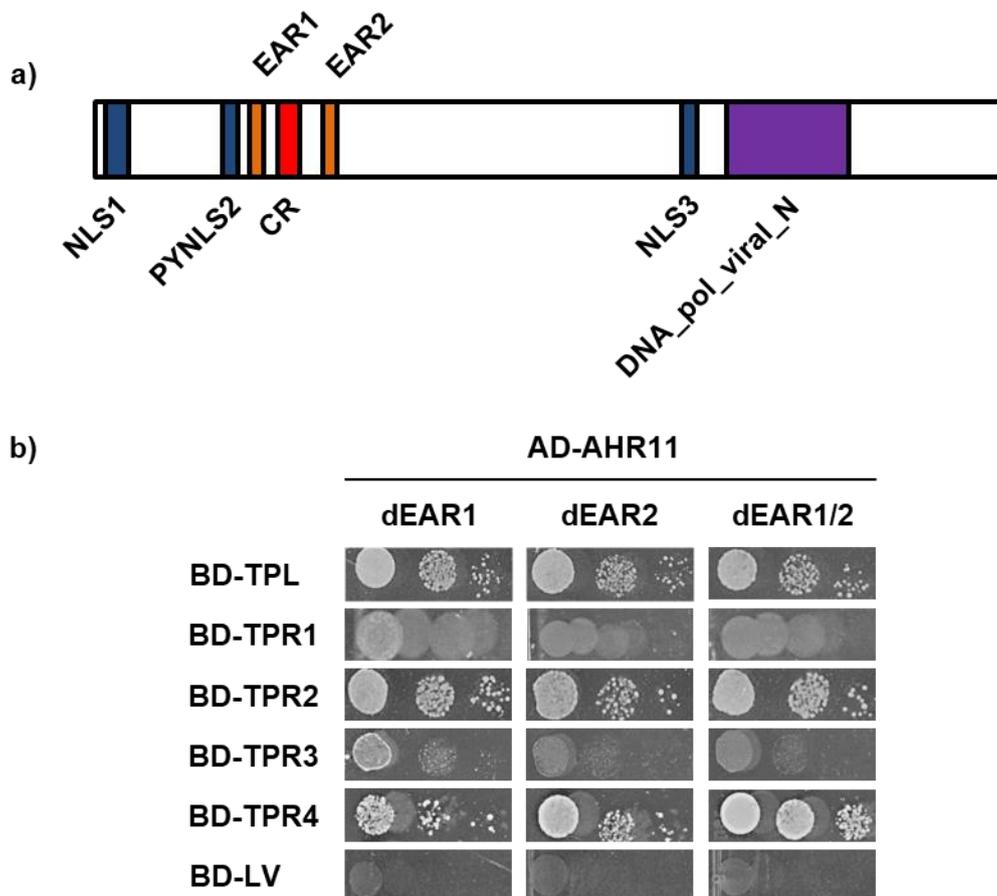


Abbildung 15: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Varianten mit deletierten EAR-Motiven. a) Schematische Darstellung des Proteins AHR11. Huang (2014) kartierte drei *nuclear localisation signals* (NLS1, Aminosäuren 18–29; PYNLS2, Aminosäuren 194–199; NLS3, Aminosäuren 793–799; blau), zwei EAR-Motive (EAR1, Aminosäuren 208–212; EAR2, Aminosäuren 314–318; orange) und eine potentielle DNA-Bindedomäne (DNA_pol_viral_N, Aminosäuren 840–994; lila). Zwischen den beiden EAR-Motiven befindet sich die konservierte Region (CR, Aminosäuren 235–249; rot), ein Sequenzabschnitt in AHR11 und den bisher bekannten sieben Orthologen in Dikotylen. b) Y2H von BD-TPL/TPRs mit AD-Varianten von AHR11, in denen ein oder beide EAR-Motive deletiert wurden, auf selektivem Medium (-L/-W/-H, 1 mM 3-AT). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 74) dargestellt.

Für die Einschränkung des Interaktionsbereichs wurden von AHR11 dreizehn verschiedene Fragmente erzeugt, die sich zum Teil an den für den Y2H-Screen von Huang (2014) verwendeten Fragmenten orientieren (Fragment 1–247 aa, 1–554 aa) und mit der GAL4-AD fusioniert wurden (Abbildung 16, a). Das AHR11-Fragment 1–247 aa entspricht dem Rumpfprotein in der Mutante *ahr11*, das von Huang (2014) kartiert wurde und für den hypersensitiven Phänotyp der Mutante verantwortlich gemacht wird. Das Rumpfprotein *ahr11* enthält anstelle eines W²⁴⁸ ein Stopcodon. Das AHR11-Fragment 1–673 aa entspricht einer Splice-Variante von AHR11. Die Wachstumskontrollen (-L/-W) des Y2H (Abbildung 16) ist im Anhang (Abbildung 75) dargestellt.

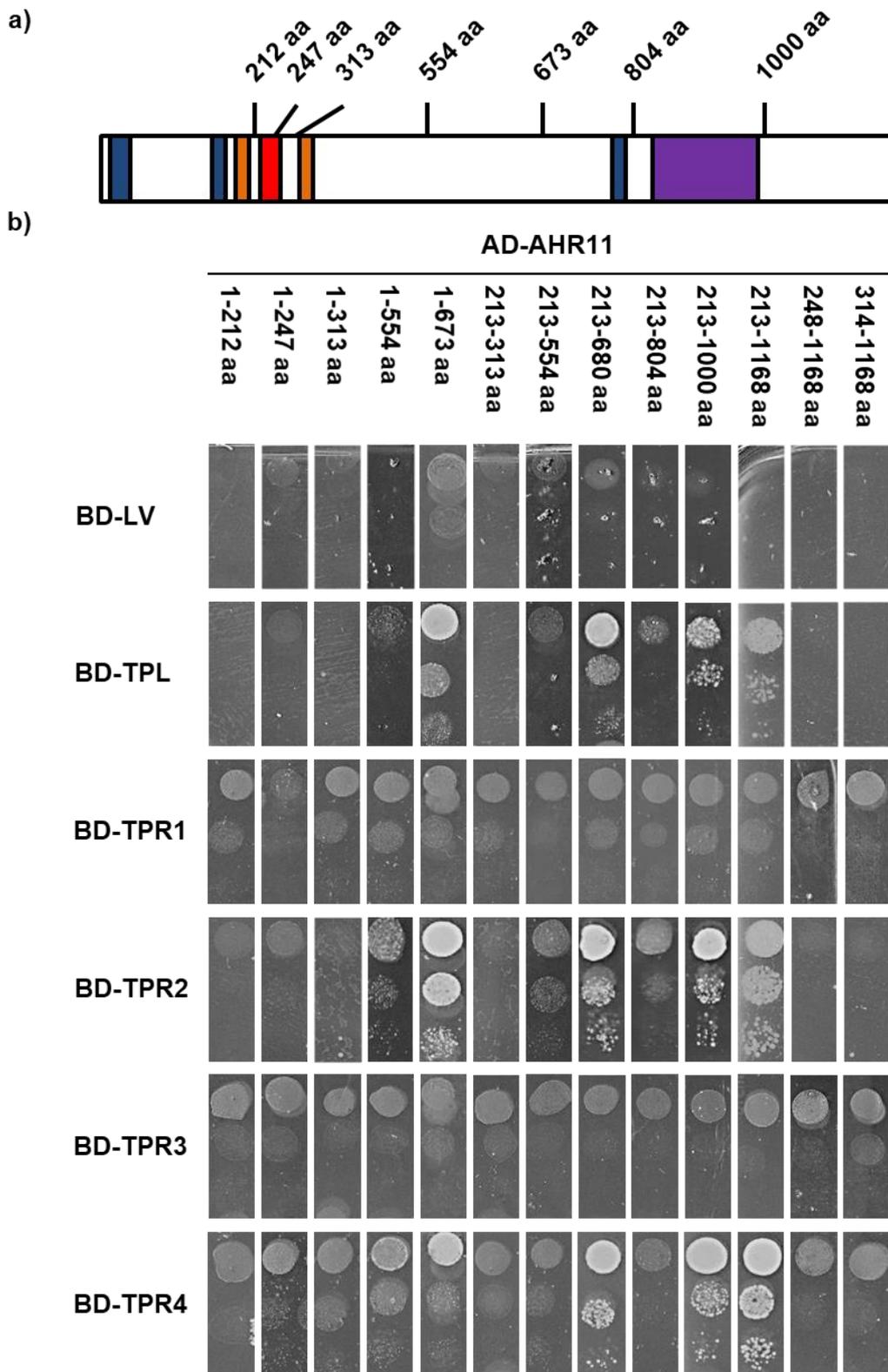


Abbildung 16: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Fragmenten. a) Schematische Darstellung des Proteins AHR11 und der Aminosäureabschnitte, die für die Fragmentierung des Proteins AHR11 gewählt wurden. b) Y2H von BD-TPL/TPRs mit AD-AHR11-Fragmenten auf selektivem Medium (-L/-W/-H). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 75) dargestellt.

TPR1 und TPR3 interagierten entgegen den Erwartungen mit keinem Fragment von AHR11 (Abbildung 16, b). TPL, TPR2 und TPR4 interagierten nur mit den Fragmenten 1–673 aa, 213–680 aa, 213–1000 aa und 213–1168 aa. Eine weitere N-terminale Verkürzung von AHR11 bis zur Aminosäure 247 führte zu keiner Interaktion. C-terminal kann AHR11 bis auf Aminosäure 673 verkürzt werden, ohne dass die Interaktion verloren geht. Eine Interaktion von TPL bzw. TPR2 mit dem AHR11-Fragment 1–554 aa konnte nicht bestätigt werden. Für die Interaktion zwischen AHR11 und TPL, TPR2 bzw. TPR4 scheint also der Bereich zwischen Aminosäuren 213–673 entscheidend zu sein, auch wenn das Ausbleiben der Interaktion mit dem Fragment 213–804 aa dagegenspricht. Um eine mögliche Interaktionsdomäne zu bestimmen, wurde in dem genannten Bereich nach potentiellen Repressordomänen gesucht, an die TPL/TPRs binden könnten.

In den Aminosäuresequenzen der Interaktoren der TPL/TPRs sind neben EAR-Motiven (definiert als (L/FDLN(L/F)xP, darin enthalten LxLxL, DLNxP, DLNxxP und FDLNI) auch die Repressordomänen (R/K)LFGV und TLxLF zu finden (Ohta et al. 2001; Matsui et al. 2008; Ikeda et al. 2009; Ikeda und Ohme-Takagi 2009; Kagale et al. 2010; Causier et al. 2012a). Es konnte gezeigt werden, dass neben dem klassischen LxLxL-Motiv auch andere Repressordomänen (DLNxxP, R/KLFGV) für die Interaktion mit TPL verantwortlich sein können (Szemenyei et al. 2008; Causier et al. 2012a). In der Aminosäuresequenz (Abschnitt 213–673 aa) von AHR11 ist eine partielle Repressordomäne in der CR (²⁴⁰DLN²⁴⁵TM²⁴⁵) und zwei weitere zwischen der konservierten Region und dem EAR2 (RD1, ³⁰⁰TLMQF³⁰⁴; RD2, ³⁰⁵DNHVNP³¹⁰) enthalten (Abbildung 17, a). Die konservierte Region und die zwei weiteren partiellen Repressordomänen in AHR11 wurden mittels SDM deletiert und anschließend auf Interaktion mit den TPL/TPRs im Y2H getestet. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 76) dargestellt.

Die Deletion der RD1 führte zu keinem Interaktionsverlust von AHR11 zu einem der TPL/TPRs und die Deletion der RD2 führte im Fall von TPR1 und TPR3 zum Interaktionsverlust (Abbildung 17, b). Die Entfernung der konservierten Region führte für alle TPL/TPRs bis auf TPR2 zu einem Ausbleiben der Interaktion. Für TPR1 und TPR3 scheinen somit neben den EAR-Motiven auch die CR und die RD2 von AHR11 für eine Interaktion im Y2H entscheidend zu sein, während für die Interaktion mit TPL und TPR4 nur die CR verantwortlich ist. Im Folgenden wurden von der partiellen Repressordomäne in der CR einzelne Aminosäuren über SDM ausgetauscht, um das Interaktionsmotiv zwischen AHR11 und TPL, TPR1, TPR3 bzw. TPR4 abzugrenzen. Es stellte sich heraus, dass die Sequenz ²³⁹WDLN²⁴² für die Interaktion zwischen AHR11 und TPL/TPR4 entscheidend ist und die umliegenden Aminosäuren ohne Interaktionsverlust verändert werden können (Abbildung 17, c). TPR1 und TPR3 interagierten mit keiner Variante. Da fast jede Veränderung im Protein AHR11 zu einem Interaktionsverlust mit TPR1

und TPR3 geführt hat, liegt die Vermutung nahe, dass es sich in diesen Fällen um keine echte Interaktion mit AHR11 handelt.

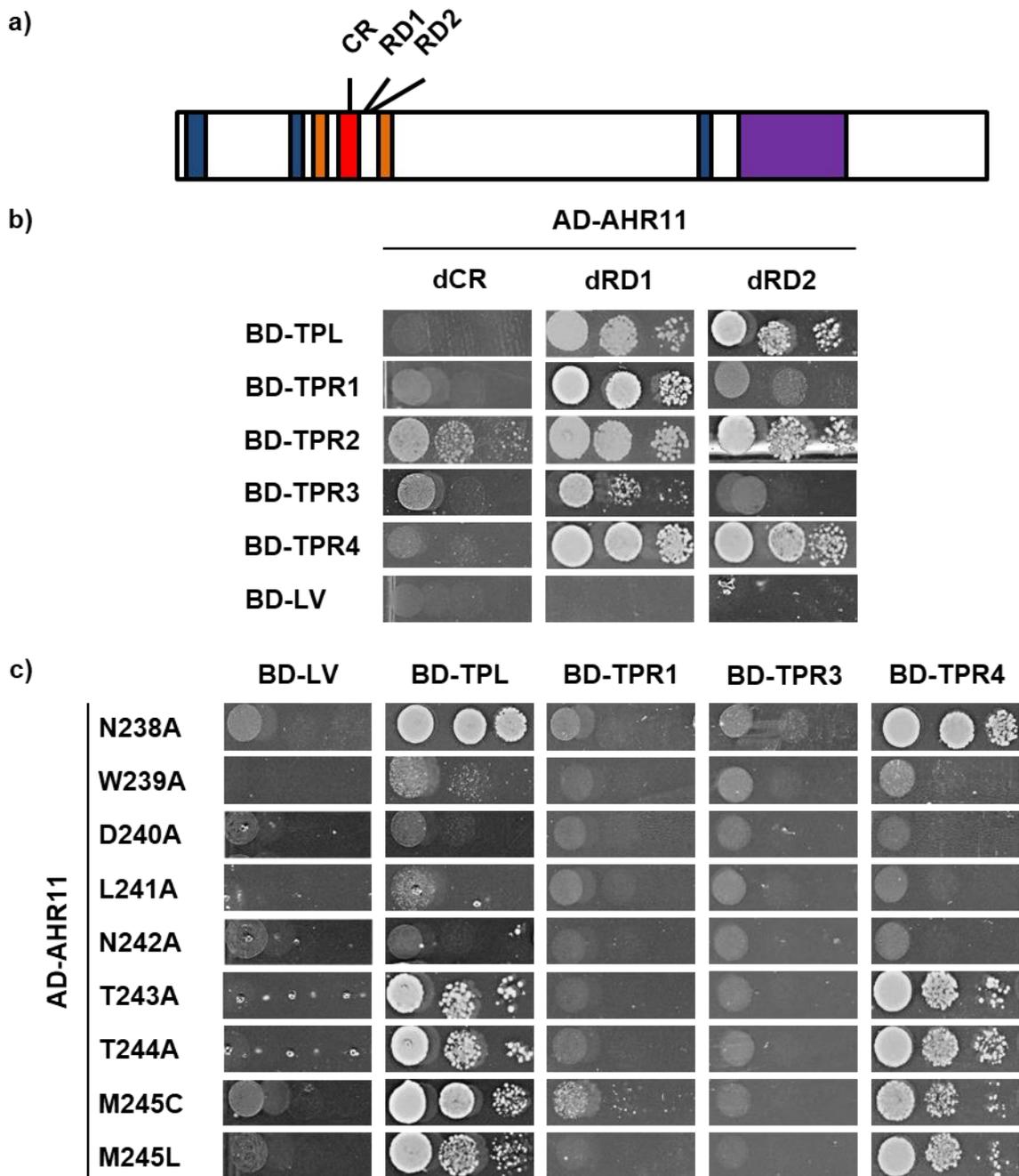


Abbildung 17: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11-RD-Varianten und TPL/TPRs. a) Schematische Darstellung des Proteins AHR11 sowie der Position der konservierten Region (CR, rot), die eine partielle Repressordomäne ($^{240}\text{DLN}^{\text{TTM}245}$) enthält, und der zwei weiteren partiellen Repressordomänen RD1 ($^{300}\text{TLMQF}^{\text{304}}$) und RD2 ($^{305}\text{DNHVNP}^{\text{310}}$). b) Y2H von BD-TPL, BD-TPR2 und BD-TPR4 mit AD-AHR11-RD-Varianten auf selektivem Medium (-L/-W/-H, 1 mM 3-AT). c) Y2H von BD-TPL und BD-TPR4 mit AD-AHR11-Varianten, in denen einzelne Aminosäuren der partiellen RD ($^{240}\text{DLN}^{\text{242}}$) und umliegende Aminosäuren ausgetauscht wurden, auf selektivem Medium (-L/-W/-H, 1 mM 3-AT). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 76) dargestellt.

Während für TPL und TPR4 die Interaktionsdomäne von AHR11 bestimmt wurde, konnte für TPR2 keine Zuordnung mit den bisherigen Fragmenten – bis auf die Einschränkung des Bereichs 213–673 aa – getroffen werden. Es stellt sich die Frage, ob für die Interaktion von TPR2 zu AHR11 nicht nur eine Domäne essentiell ist. Um dies zu überprüfen, wurden sowohl eines oder beide EAR-Motive als auch die konservierte Region über SDM deletiert. Die erzeugten AD-AHR11-dEAR-dCR-Varianten wurden im Y2H auf Interaktion mit TPR2 getestet. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 77) dargestellt. Es zeigte sich, dass bereits die Deletion eines EAR-Motivs und der konservierten Region zu einem Verlust der Interaktion von AHR11 mit TPR2 führt (Abbildung 18). TPR2 benötigt demzufolge für die Interaktion mit AHR11 sowohl die EAR-Motive als auch die konservierte Region. Es ist aber auch möglich, dass der eigentliche Interaktionsbereich aufgrund der Deletionen nicht mehr für TPR2 zugänglich ist.

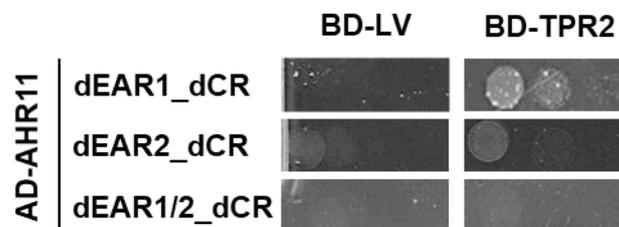


Abbildung 18: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen TPR2 und AHR11-Varianten mit Deletion der CR sowie eines oder beider EAR-Motive. Y2H von BD-TPR2 und AD-AHR11-Varianten (Deletion der CR sowie eines oder beider EAR-Motive) auf selektivem Medium (-L/-W/-H, 1 mM 3-AT). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 77) dargestellt.

2.1.2 An der Interaktion zwischen AHR11 und JAM2 beteiligte Domänen

Das Protein JAM2 umfasst 590 Aminosäuren und enthält neben der bHLH-Domäne (Abbildung 19, a) ein NLS, eine Glutamin-reiche Region (QRR) und eine JID (Heim et al. 2003; Fernández-Calvo et al. 2011; Song et al. 2013; Sasaki-Sekimoto et al. 2014; The UniProt Consortium 2018). Die bHLH-Domäne ist wahrscheinlich für die DNA-Bindung und die Dimerisierung mit anderen bHLH-Proteinen notwendig, während das NLS vermutlich für den Transport in den Kern benötigt wird. Über die JID erfolgt die Interaktion von JAM2 mit JAZ1–6 und JAZ8–11 (Song et al. 2013). Die Funktion der QRR wurde bisher nicht beschrieben. Für die Bestimmung des Interaktionsbereichs von JAM2 mit AHR11 wurden sieben Fragmente von JAM2 erzeugt, die N- oder C-terminal verkürzt wurden, und über SDM eine Variante mit deletierter QRR. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) des Y2H (Abbildung 19) ist im Anhang (Abbildung 78) dargestellt. Keines der Fragmente – bis auf die Variante mit der deletierten QRR von JAM2 – interagierte mit AHR11 (Abbildung 19, b). Für die Interaktion zwischen AHR11 und JAM2 ist

die QRR somit nicht entscheidend, aber sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus von JAM2 müssen vorhanden sein.

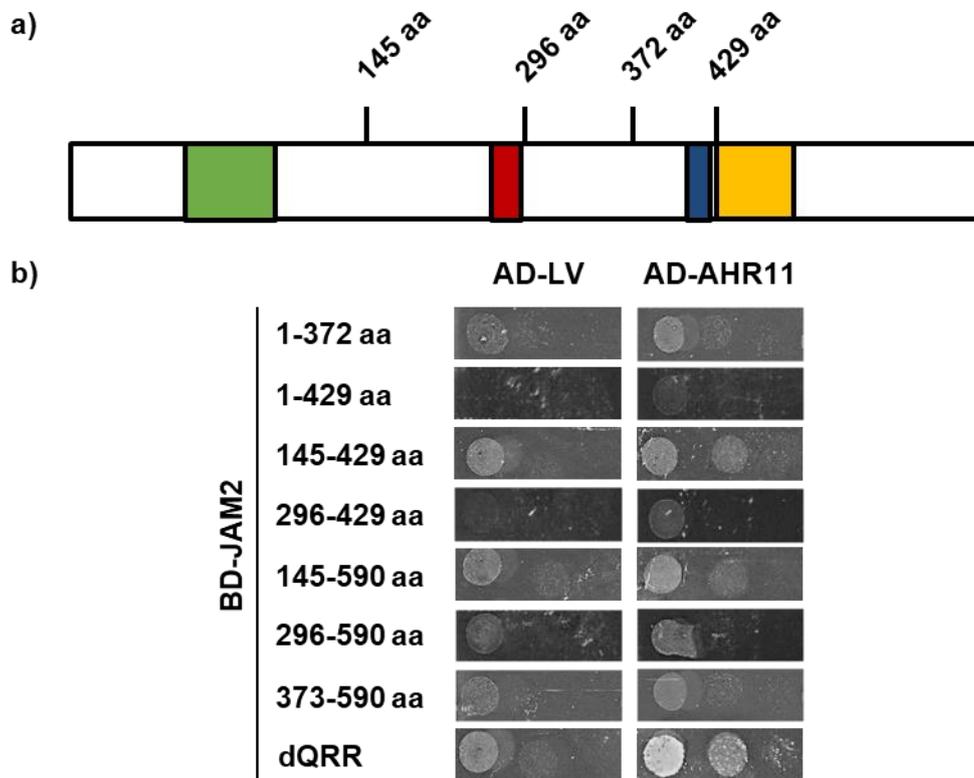


Abbildung 19: Y2H-Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und JAM2-Fragmenten. a) Schematische Darstellung des Proteins JAM2. JAM2 besteht aus einer JID (Aminosäuren 76–138, grün; Fernández-Calvo et al. 2011; Song et al. 2013), einer QRR (Aminosäuren 275–295, rot; The UniProt Consortium 2018), einem NLS (Aminosäuren 406–424, blau; Sasaki-Sekimoto et al. 2014) und der bHLH-Domäne (Aminosäuren 429–478, gelb; The UniProt Consortium 2018). b) Y2H von AD-AHR11 und BD-JAM2-Fragmenten und einer BD-JAM2-Variante mit deletierter QRR auf selektivem Medium (-L/-W/-H). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 78) dargestellt.

Huang (2014) zeigte eine Interaktion zwischen JAM2 und einem Fragment von AHR11 (Aminosäuren 552–804). Um den Interaktionsbereich von AHR11 mit JAM2 weiter einzuschränken, wurde ein Y2H mit zehn verschiedenen Fragmenten von AHR11 durchgeführt (Abbildung 20, a). Die verwendeten Fragmente orientierten sich zum Teil an denen von Huang (2014) im Y2H-Screen verwendeten (Fragment 1–247 aa, 1–554 aa, 805–1168 aa). Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 79) dargestellt. Die Interaktion zwischen dem Fragment 552–804 und JAM2 konnte mit dem hier verwendeten Fragment (555–804 aa) nicht reproduziert werden (Abbildung 20, b). Eine Interaktion von JAM2 konnte nur mit dem Fragment 555–1168 aa gezeigt werden. Eine N- oder C-terminale Verkürzung des Fragments führte zu einem Verlust der Interaktion. Der Interaktionsbereich zwischen AHR11 und JAM2 konnte somit nicht weiter eingeschränkt werden.

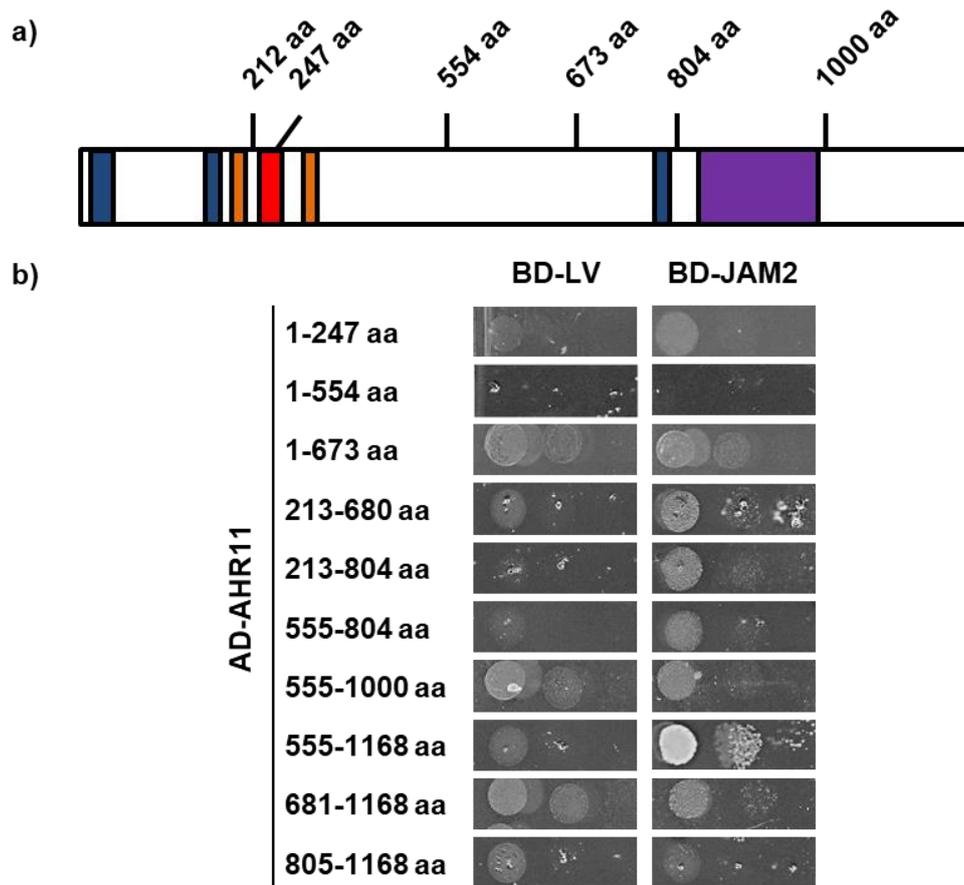


Abbildung 20: Y2H-Interaktionsanalyse von JAM2 mit AHR11-Fragmenten. a) Schematische Darstellung des Proteins AHR11 und der ausgewählten Aminosäuren für die Erzeugung der Fragmente. b) Y2H zwischen BD-JAM2 und AD-AHR11-Fragmenten auf selektivem Medium (-L/-W/-H). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 79) dargestellt.

2.2 Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL in einem P2H

Die im Y2H vorgefundenen Interaktionen zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL sollten über eine unabhängige Interaktionsanalyse überprüft werden. Dazu wurde am Lehrstuhl ein dem Y2H ähnliches Zwei-Hybrid-System in Protoplasten etabliert (Abbildung 21, a). Für einen P2H wird die CDS der zu testenden Proteine entweder mit der CDS der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4BD, N-terminal) aus *S. cerevisiae* oder der CDS der Aktivierungsdomäne des VIRION PROTEIN 16 (VP16, C-terminal) aus *Herpes simplex* fusioniert (Giniger et al. 1985; Triezenberg et al. 1988). Die erzeugten Konstrukte werden zusammen mit einem Reporter und einem internen Standard in Protoplasten transfiziert. Als interner Standard wurde eine Fusion aus dem konstitutiv aktiven 35S-Promotor vom Blumenkohlmosaikvirus und der CDS der β -Glucuronidase aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gewählt (Odell et al. 1985; Jefferson et al. 1987; Benfey und Chua 1990). Der interne Standard dient als Kontrolle auf Transfektion sowie zur Normalisierung der Reporteraktivität. Der Reporter besteht aus der *GAL4 upstream activating sequence* (GAL4_UAS), über einen Minimalpromotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus

fusioniert mit der CDS der Luciferase (*LUC*) aus *Photinus pyralis* (Luehrsen et al. 1992). Die GAL4BD-Fusion kann an die GAL4_UAS binden (Giniger et al. 1985; Bram et al. 1986). Kommt es zu einer Interaktion zwischen den Fusionspartnern der GAL4BD und der VP16, dann treten die VP16-Domäne und die GAL4BD in räumliche Nähe und die Transkription des Reportergens wird eingeleitet (Sadowski et al. 1988; Chang et al. 1999). Die Interaktionsstärke kann in Folge anhand der Reporteraktivität ausgewertet werden.

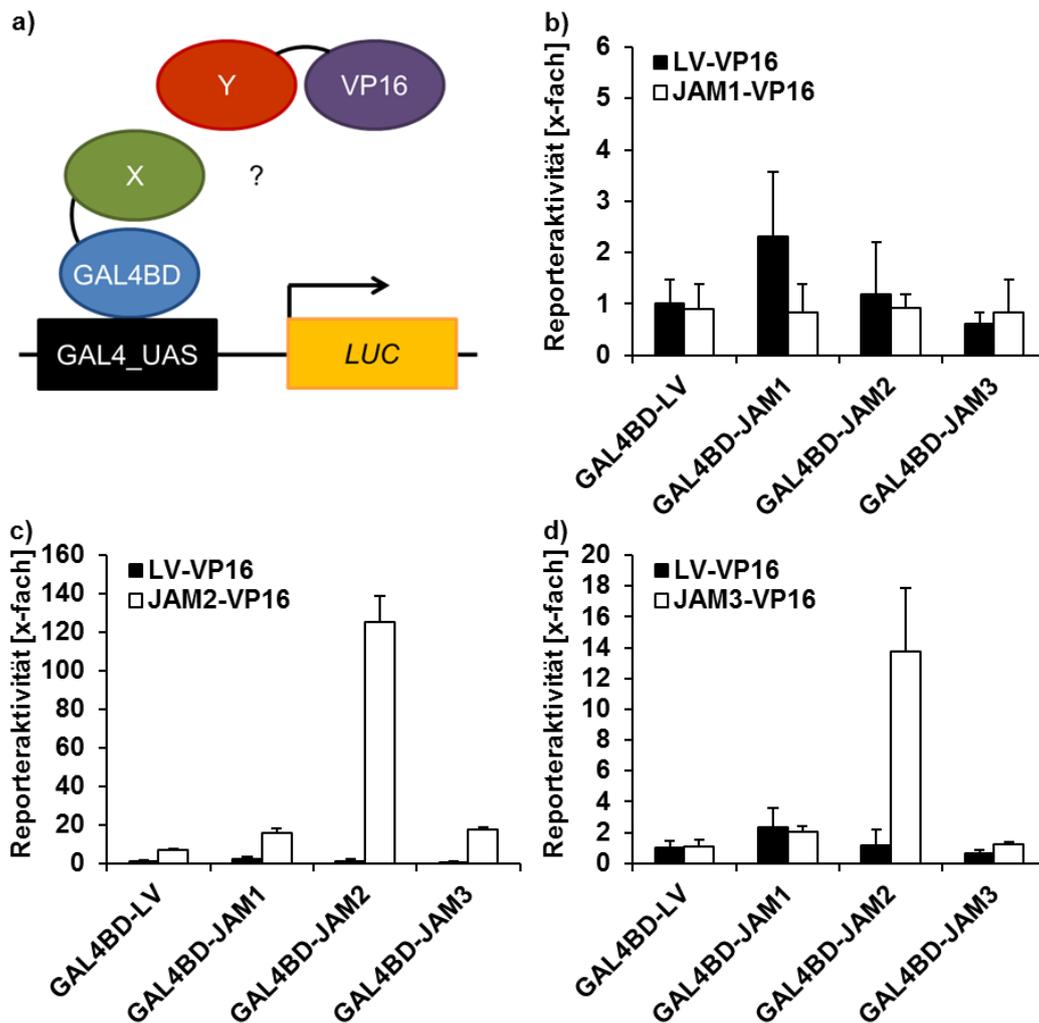


Abbildung 21: Analyse der Interaktion zwischen JAMs im P2H. a) Schematische Darstellung des P2H (Details siehe Text). b-d) P2H mit JAM1, JAM2 und JAM3. Columbia (Col-0)-Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g } p35S::GUS$, $4 \mu\text{g } pGAL4_UAS::LUC$, $3 \mu\text{g}$ Effektor-VP16 ($p35S::JAM-VP16$; $p35S::MCS-VP16$, LV-VP16) und $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-Effektor ($p35S::GAL4BD-JAM$; $p35S::GAL4BD-MCS$, GAL4BD-LV) transformiert und für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als *counts per second* (CPS) gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als *relative fluorescence units* (RFU, d. h. Änderung der gemessenen Fluoreszenz pro Sekunde), bezogen. Der Messwert mit $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-LV und LV-VP16 ($1,1$ kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten – dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) – und wurden mindestens einmal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden nicht erfüllt.

Um die Funktionalität des Systems zu testen, wurde zunächst ein P2H für bereits beschriebene Interaktionen mit JAM2 bzw. TPL durchgeführt. Aus der Literatur geht hervor, dass JAM1

sowie JAM2 im Y2H, im *Pull-Down* sowie im *TAP tagging Assay* Homodimere formen und JAM3 mit JAM1 bzw. JAM2 Heterodimere bilden kann. Eine Homodimerisierung von JAM3 konnte nur im Y2H und im *TAP tagging Assay* gezeigt werden und eine Heterodimerisierung von JAM1 mit JAM2 konnte nur im Y2H und im *Pull-Down* nachgewiesen werden (Nakata und Ohme-Takagi 2013; Fonseca et al. 2014; Sasaki-Sekimoto et al. 2014; Huang et al. 2018). Die Homodimerisierung von JAM2 und die Ausbildung von Heterodimeren von JAM2 mit JAM1 bzw. JAM3 konnte im P2H bestätigt werden (Abbildung 21, b-d). JAM2-VP16 zeigte eine 125-fache Induktion der Reporteraktivität in Verbindung mit GAL4BD-JAM2, eine 18-fache Induktion der Reporteraktivität in Verbindung mit GAL4BD-JAM3 und eine 16-fache in Verbindung mit GAL4BD-JAM1. Die Reporteraktivität mit der Kontrolle GAL4BD-LV war 7-fach. GAL4BD-JAM2 führte in Verbindung mit JAM3-VP16 zu einer 14-fachen Induktion der Reporteraktivität. Die Reporteraktivität mit der Kontrolle GAL4BD-LV lag bei eins. Eine Homodimerisierung von JAM1 (0,8-fach) bzw. von JAM3 (1,3-fach) konnte nicht gezeigt werden. Eine Heterodimerisierung von JAM1 mit JAM3 konnte nur gezeigt werden, wenn JAM1 mit der GAL4BD fusioniert war und JAM3 mit der VP16. In diesem Fall wurde eine 2-fache Reporteraktivität erzielt. Wurde JAM1 aber mit der VP16 fusioniert, dann konnte keine Reporteraktivität ausgelöst werden. Die in der Literatur beschriebene Heterodimerisierung der JAMs und die Homodimerisierung von JAM2 können somit auch im P2H gezeigt werden. Jedoch scheint die VP16-Domäne einen Einfluss auf die Interaktion mit JAM1 zu nehmen.

Für TPL wurde die Interaktion zu NINJA im Y2H und *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC)-Test beschrieben (Pauwels et al. 2010). Diese Interaktion wurde nun ebenfalls im P2H getestet und konnte nicht bestätigt werden. NINJA-VP16 führte mit GAL4BD-TPL im Vergleich zu GAL4BD-LV nur zu einer 1,7-fachen Induktion der Reporteraktivität. Ein Wechsel der Fusionsdomänen (TPL-VP16 und GAL4BD-NINJA) führte zu ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 22). Für einen *Mammalian two-hybrid* zwischen NINJA aus *A. thaliana* und TPL aus *Oryza sativa* wurde Gleiches beschrieben. Nur eine C-terminale Verkürzung von OsTPL auf ein Fragment von 209 aa, das nur noch die LisH und die CTLH-Domäne enthält, führte zu einer Interaktion (Ke et al. 2015). Der P2H wurde daraufhin mit einer C-terminal verkürzten Variante von TPL-VP16 (N-TPL-VP16, 1–288 aa) wiederholt und führte mit GAL4BD-NINJA zu einer 18-fachen Induktion der Reporteraktivität im Vergleich zur Kontrolle GAL4BD-LV. Die Interaktion zwischen NINJA und TPL kann im P2H somit nur über eine verkürzte Variante von TPL gezeigt werden.

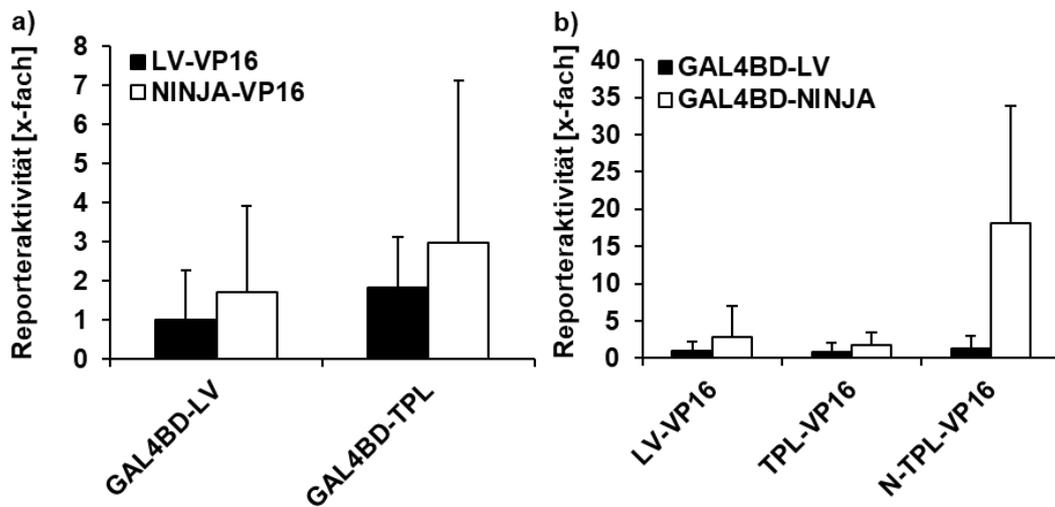


Abbildung 22: Analyse der Interaktion zwischen NINJA und TPL im P2H. Col-0-Protoplasten ($10^5/100\ \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3\ \mu\text{g}$ $p35S::GUS$, $4\ \mu\text{g}$ $pGAL4_UAS::LUC$, $3\ \mu\text{g}$ Effektor-VP16 ($p35S::TPL\text{-VP16}$; $p35S::N\text{-TPL}\text{-VP16}$, 1–288 aa von TPL; $p35S::NINJA\text{-VP16}$; $p35S::MCS\text{-VP16}$, LV-VP16) und $3\ \mu\text{g}$ GAL4BD-Effektor ($p35S::GAL4BD\text{-TPL}$; $p35S::GAL4BD\text{-NINJA}$; $p35S::GAL4BD\text{-MCS}$, GAL4BD-LV) transformiert und für 16 ± 1 h bei $25\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit $3\ \mu\text{g}$ GAL4BD-LV und LV-VP16 (a, 3,5 kCPS/RFU; b, 3,1 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden mindestens zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Da für JAM2 und TPL bereits beschriebene Interaktionen im P2H erfolgreich gezeigt werden konnten, wurde der P2H auch für die im Y2H gezeigten Interaktionen von AHR11 mit JAM2 bzw. TPL angewendet. AHR11-VP16 führte mit GAL4BD-TPL zu einer 6,7-fachen Reporterinduktion und mit GAL4BD-JAM2 zu einer 2-fachen Induktion der Reporteraktivität (Abbildung 23, a). Jedoch zeigte AHR11-VP16 bereits mit GAL4BD-LV eine 3,5-fache Induktion des Reporters, sodass für AHR11-VP16 keine Interaktion zu GAL4BD-TPL und -JAM2 im P2H gezeigt werden konnte. Ein Wechsel der Fusionsdomäne zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL sowie ein P2H mit der verkürzten Variante von TPL führte auch nicht zu einer Induktion der Reporteraktivität (Abbildung 23, b). Die Interaktion zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL konnte im P2H somit nicht bestätigt werden.

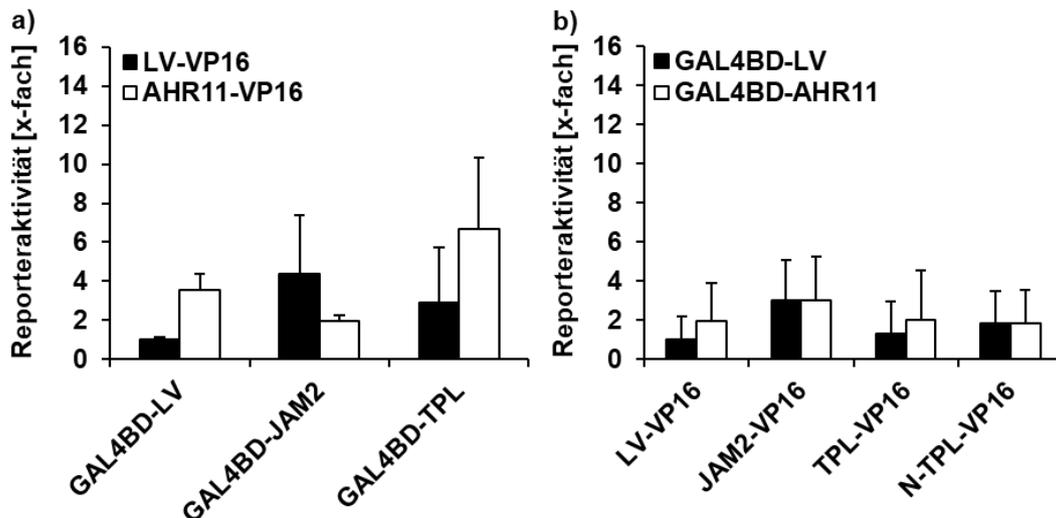


Abbildung 23: Analyse der Interaktion zwischen AHR11 und JAM2 bzw. TPL im P2H. Col-0-Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ $p35S::GUS$, $4 \mu\text{g}$ $pGAL4_UAS::LUC$, $3 \mu\text{g}$ Effektor-VP16 ($p35S::TPL\text{-VP16}$; $p35S::N\text{-TPL-VP16}$; $p35S::AHR11\text{-VP16}$; $p35S::JAM2\text{-VP16}$; $p35S::MCS\text{-VP16}$, LV-VP16) und $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-Effektor ($p35S::GAL4BD\text{-TPL}$; $p35S::GAL4BD\text{-AHR11}$; $p35S::GAL4BD\text{-JAM2}$; $p35S::GAL4BD\text{-MCS}$, GAL4BD-LV) transformiert und für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-LV und LV-VP16 (a, 1 kCPS/RFU; b, 3,1 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden mindestens einmal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung für a) wurden nicht erfüllt. In b) ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus biologischen Replikaten dargestellt. Die statistische Auswertung in b) erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

2.3 Einfluss von AHR11, TPL/TPRs und MYC2/JAMs auf den ABA-Signalweg in Protoplasten

Für die Untersuchung des Einflusses von JAM2, AHR11 und TPL/TPRs auf den ABA-Signalweg wurde das am Lehrstuhl etablierte ABA-Reportersystem in Mesophyll-Protoplasten von Arabidopsis gewählt (Sheen 2001; Yoo et al. 2007). Das ABA-Reportersystem setzt sich aus zwei grundlegenden Komponenten zusammen: einem ABA-induzierbaren Promotor gekoppelt mit einem Reporter gen und einem internen Standard als Kontrolle auf Transfektion sowie zur Normalisierung der ABA-induzierten Reporteraktivität. Als ABA-induzierbarer Promotor wurde der Promotor des Gens *RD29B* gewählt, der mit der CDS der Luciferase aus *Photinus pyralis* fusioniert wurde (Luehrsen et al. 1992; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993a). Der interne Standard besteht wie im P2H aus dem konstitutiv aktiven 35S-Promotor vom Blumenkohlmosaikvirus und der CDS der β -Glucuronidase aus *E. coli* (Odell et al. 1985; Jefferson et al. 1987; Benfey und Chua 1990). Um den Einfluss eines Effektors auf den ABA-Signalweg zu ermitteln, wurde die CDS des Effektors mit dem 35S-Promotor fusioniert und zusammen mit dem ABA-Reportersystem in Mesophyll-Protoplasten transfiziert. Die anschließende Inkubation der Mesophyll-Protoplasten erfolgte mit oder ohne ABA-Zugabe.

2.3.1 Charakterisierung von AHR11

Um einen reprimierenden Einfluss von AHR11 auf den ABA-Signalweg zu untersuchen, wurde die CDS von AHR11 mit dem 35S-Promotor fusioniert und zusammen mit den ABA-Reporter-system in Col-0-Protoplasten transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der für die Klonierung verwendete Vektor (Leervektor, LV) parallel eingesetzt.

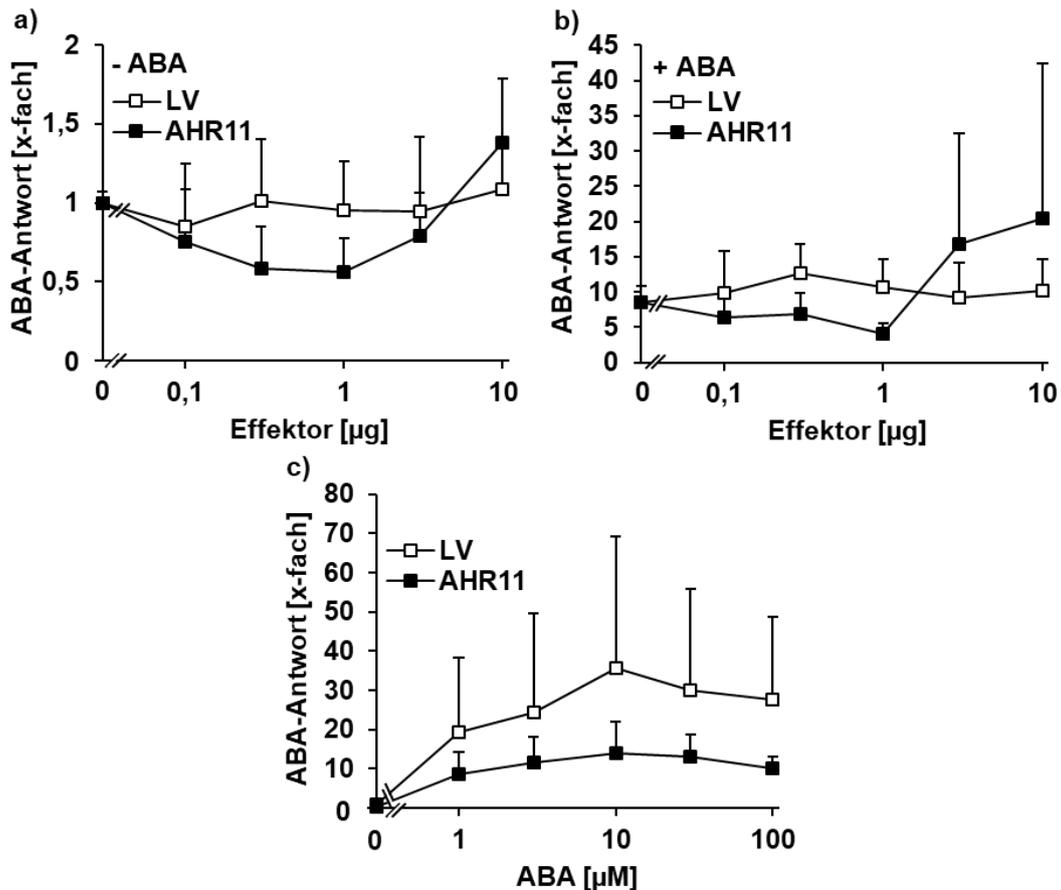


Abbildung 24: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch AHR11 in Col-0-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis-Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und $3 \mu\text{g}$ (c) oder steigenden Mengen (a, b) an Effektor (*p35S::AHR11*; *p35S::MCS*, LV) transfiziert. Die Protoplasten wurden ohne Zugabe von ABA (a), mit $3 \mu\text{M}$ (b) oder steigenden Konzentrationen an ABA (c) versetzt und für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und $3 \mu\text{g}$ LV (c, $14,1$ kCPS/RFU) bzw. ohne ABA und ohne Effektor (a und b, $2,5$ kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden in Bezug auf AHR11 zweimal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden für a) und b) nicht erfüllt. In c) ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Es wurde sowohl untersucht, ob die Menge an AHR11 einen Einfluss auf die ABA-abhängige Reporteraktivität hat, als auch, ob die Zugabe von ABA einen Einfluss auf die von AHR11 ausgelöste ABA-abhängige Reporteraktivität hat. Die durch AHR11 ausgelöste Reporteraktivität war vergleichbar mit der durch den LV (Abbildung 24). Eine Erhöhung der eingesetzten

Menge an AHR11 führte zu keiner Reprimierung der Reporteraktivität. Ebenso hatte die Variation der exogenen ABA keinen Einfluss auf die durch AHR11-abhängige Reporteraktivität. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen, die Huang (2014) in Col-0-Protoplasten erzielte.

AHR11 zeigte in Col-0-Protoplasten keinen reprimierenden Effekt auf den ABA-Signalweg. Um auszuschließen, dass eine Überexpression von AHR11 auf den ABA-Signalweg in Col-0-Protoplasten keinen Einfluss hat, weil die intern vorhandene Menge an AHR11 bereits genügt, um eine Reprimierung des Signalwegs auszulösen und sich dadurch eine konstitutive Expression von AHR11 nicht weiter auswirkt, wurde der Versuch in der Mutante *ahr11* und der T-DNA-Knockout-Linie d476 wiederholt. Die Linie *ahr11* wurde über eine Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS) erzeugt und trägt anstelle eines W^{248} ein Stopcodon, wodurch anstelle des Vollängenproteins AHR11 nur noch ein Rumpfprotein erzeugt wird, das für die hypersensitive Reaktion der Linie auf ABA verantwortlich gemacht wird (Huang 2014). Die T-DNA-Knockout-Linie d476 (GK-476H03) wurde vom *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) bezogen und trägt im zweiten Exon des Gens *AHR11* eine T-DNA-Insertion (Abbildung 25, a).

Auch in den Protoplasten der Linien *ahr11* und d476 verhielt sich AHR11 vergleichbar zum LV. Die Erhöhung der eingesetzten Menge an Effektor-DNA von AHR11 führte weder in *ahr11*- noch in d476-Protoplasten zu einer Reduktion der ABA-abhängigen Reporteraktivität (Abbildung 25, b-e). Auch in Gegenwart von exogener ABA ließ sich keine AHR11-abhängige Reduktion der Reporteraktivität beobachten. Huang (2014) setzte in *ahr11*- bzw. d476-Protoplasten 10 µg Effektor-DNA von AHR11 bzw. LV ein, um den Einfluss von AHR11 zu bestimmen. Zusätzlich behandelte sie die Protoplasten mit 10 µM ABA. Sie stellte dabei in Anwesenheit von AHR11 eine Reduktion der Reporteraktivität um 47–68 % in *ahr11*-Protoplasten und eine um 66 % in d476-Protoplasten fest. Diese Ergebnisse sind mit den hier erzielten Ergebnissen – unter Einsatz von 10 µg Effektor-DNA von AHR11 bzw. LV und 3 µM ABA – vergleichbar. Auch hier konnte eine Reduktion um 68 % und 56 % in *ahr11*- bzw. d476-Protoplasten in Anwesenheit von AHR11 im Vergleich zum LV erzielt werden. Erst unter Betrachtung der Titration der Effektor-DNA wird offensichtlich, dass 10 µg LV in Anwesenheit von 3 µM exogener ABA im Vergleich zur Kontrolle (Protoplasten ohne Effektor-DNA und mit 3 µM ABA behandelt) zu einer zweifachen Steigerung der Reporteraktivität führt und dadurch der reprimierende Effekt von AHR11 in *ahr11*- bzw. d476-Protoplasten, der von Huang (2014) ermittelt wurde, zu erklären ist.

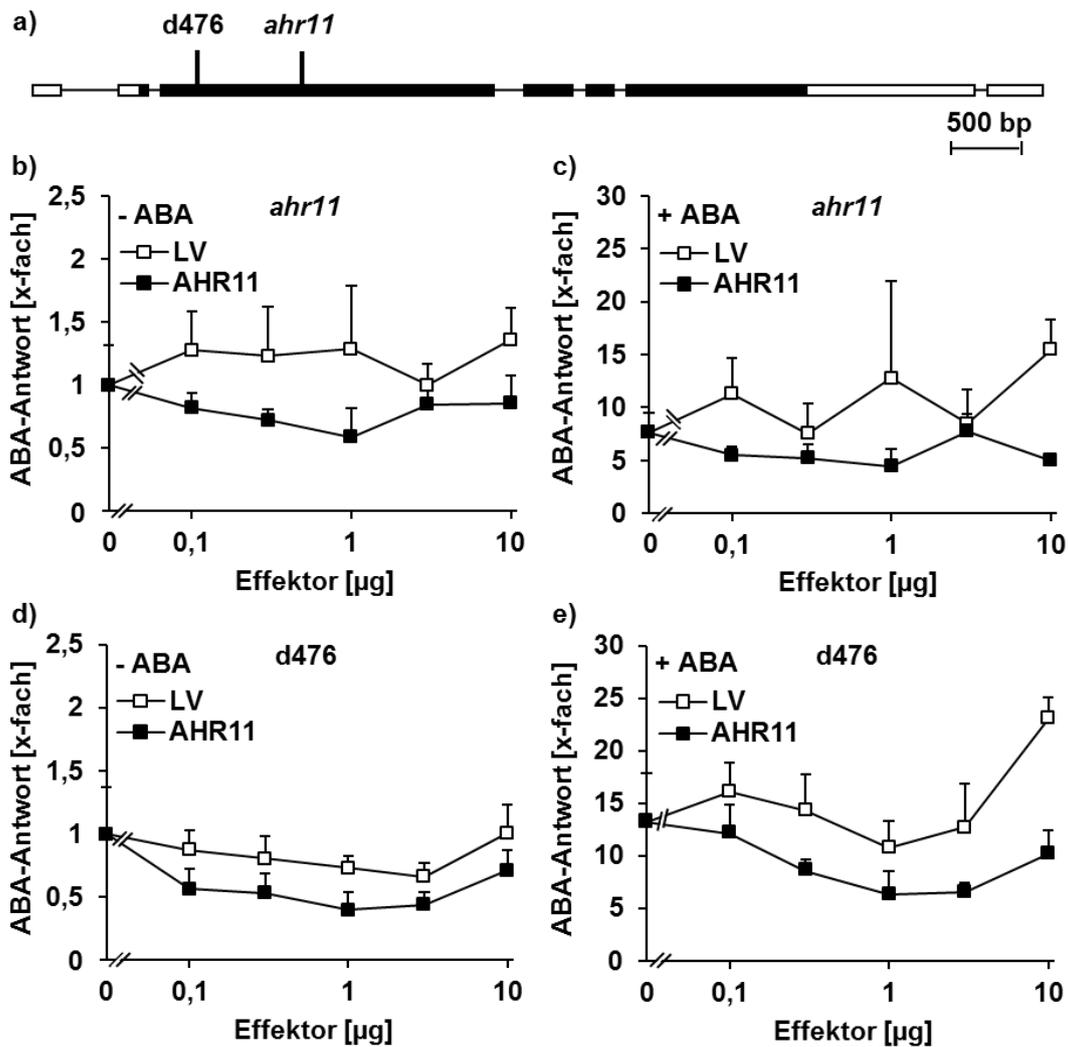


Abbildung 25: Induktion der *AHR11*-abhängigen Genexpression in *AHR11*-Mutanten-Protoplasten. a) Schematische Darstellung von *AHR11* (*At5g13590*). Die weißen Boxen, die schwarzen Boxen und die Linie stehen für die untranslatierte Region, Exons bzw. Introns. Die Insertionsstelle der T-DNA in der Knockout-Linie *d476* und die EMS-induzierte Mutation (*W²⁴⁸* zu Stopcodon) in *ahr11* sind gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 500 Basenpaare (bp). Abbildung modifiziert nach Huang (2014). b-e) Für die Protoplasten wurden die Linie *ahr11* (b, c) und die T-DNA-Insertionslinie *d476* (d, e) verwendet. Die Transfektion erfolgte wie zuvor beschrieben. Es wurden steigende Mengen an Effektor (*p35S::AHR11*; *p35S::MCS*, LV) eingesetzt und die Protoplasten wurden ohne ABA (b, d) oder mit 3 μM ABA (c, e) inkubiert. Der Messwert ohne ABA und ohne Effektor (b und c: 6,2 kCPS/RFU; d und e: 10,8 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$). Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden nicht erfüllt.

Huang (2014) zeigte, dass *ahr11*-Protoplasten und Col-0-Protoplasten ohne die Zugabe von ABA eine ähnliche ABA-abhängige Reporteraktivität (Col-0: 10 kCPS/RFU; *ahr11*: 12,6 kCPS/RFU) aufweisen. Erst durch die Zugabe von ABA verhielten sich *ahr11*-Protoplasten im Vergleich zu Col-0-Protoplasten hypersensitiv und wiesen mit 10 μM exogener ABA eine bis zu sechsfach höhere ABA-abhängige Reporteraktivität auf. Dieses Ergebnis konnte nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den von Huang (2014) ermittelten Ergebnissen verhielten sich die *AHR11*-Mutanten-Protoplasten von *ahr11* und *d476* hier schon ohne die Zugabe von ABA hypersensitiv im Vergleich zu Col-0-Protoplasten und wiesen eine 2,8-fach höhere ABA-abhängige Reporteraktivität auf (Abbildung 26). In der Titration hingegen verhielten

sich die *AHR11*-Mutanten-Protoplasten eher insensitiv im Vergleich zu Col-0-Protoplasten und wiesen mit 10 μM exogener ABA eine um 45 % für d476 bzw. 67 % für *ahr11* geringere ABA-abhängige Reporteraktivität auf.

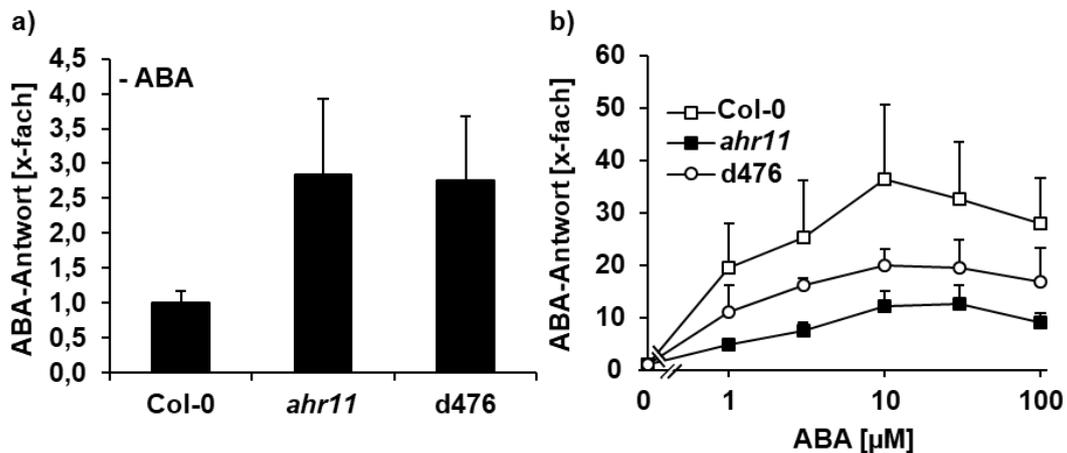


Abbildung 26: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression in Col-0 und *AHR11*-Mutanten. Für die Protoplasten wurden Col-0 und die *AHR11*-Mutanten *ahr11* und d476 verwendet. Die Transfektion erfolgte wie zuvor beschrieben, aber ohne die Zugabe von Effektor-DNA. a) ABA-abhängige Reporteraktivität in Col-0-, *ahr11*- und d476-Protoplasten ohne Zugabe von ABA. Der Messwert für Col-0 ohne exogene ABA (20,1 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. b) Titration von ABA mit Col-0-, *ahr11*- und d476-Protoplasten. Die Messwerte ohne exogene ABA (Col-0: 20,1 kCPS/RFU; *ahr11*: 57,3 kCPS/RFU; d476: 55,5 kCPS/RFU) wurden auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

2.3.2 Charakterisierung von TPL/TPRs

Ein möglicher Einfluss der TPL/TPRs auf den ABA-Signalweg wurde über das ABA-Reportersystem getestet. Dazu wurde die CDS der TPL/TPRs mit dem 35S-Promotor fusioniert und zusammen mit dem ABA-Reportersystem in Col-0-Protoplasten transfiziert. Als Negativkontrolle diente auch hier der für die Klonierung verwendete Vektor (LV). Um einen möglichen Einfluss von ABA auf die Aktivität der TPL/TPRs zu untersuchen, wurden die Protoplasten ohne und mit 3 μM exogener ABA inkubiert. Ohne exogene ABA lösten TPR1, TPR2 und TPR3 eine 1,1- bis 1,6-fache bzw. TPL und TPR4 eine 0,8- bis 0,9-fache Reporteraktivität im Vergleich zum LV aus (Abbildung 27, a). Durch die Zugabe von ABA blieb der Einfluss von TPR1, TPR2 und TPR3 (1,1- bis 1,7-fach) auf die Reporteraktivität gleich, TPL und TPR4 verringerten jedoch die Reporteraktivität weiter auf 0,6- bis 0,7-fach im Vergleich zum LV (Abbildung 27, b). Die Messungen der Reporteraktivität von TPR1, TPR2 und zum Teil auch TPR3 unterlagen größeren Schwankungen. Ein Einfluss von TPR1, TPR2 und TPR3 auf den ABA-Signalweg ist somit nur sehr gering oder nicht vorhanden. TPL und TPR4 haben unter Zugabe von ABA einen reprimierenden Effekt auf den ABA-Signalweg.

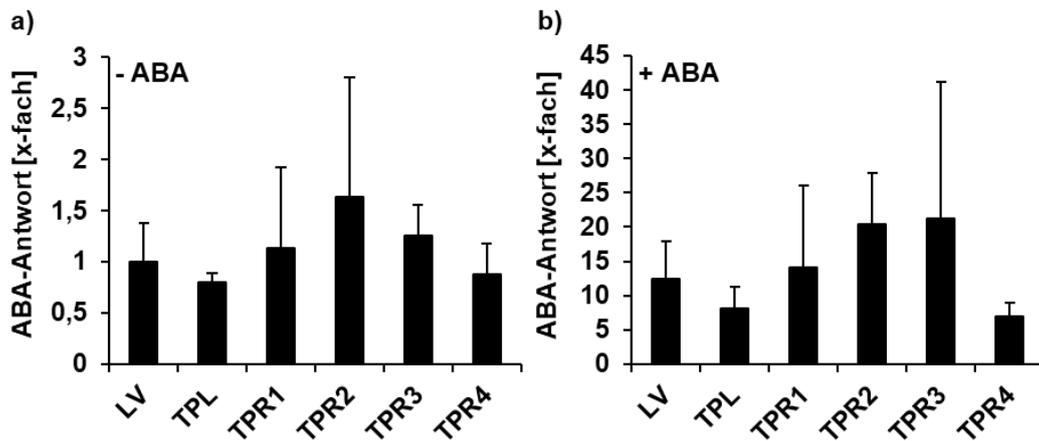


Abbildung 27: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch TPL/TPRs in Col-0-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis-Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und $3 \mu\text{g}$ Effektor (*p35S::TPL/TPR*; *p35S::MCS*, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne Zugabe von ABA (a) bzw. mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und $3 \mu\text{g}$ LV (a, 3,2 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden einmal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden nicht erfüllt.

2.3.3 Charakterisierung von MYC2/JAMs

MYC2 und JAM1 wurden vor ihrer Beschreibung im Jasmonat-Signalweg zunächst zu den ABA-Signalelementen gezählt und als RD22BP1 bzw. AIB bezeichnet. Die Expression beider Transkriptionsfaktoren ist in der Anwesenheit von ABA hochreguliert und sie wirken als positive Regulatoren der ABA-Antwort im Wurzelwachstum oder der Samenkeimung (Abe et al. 1997; Hoth 2002; Abe et al. 2003; Li et al. 2007). Ein möglicher Einfluss von MYC2 und JAM1 sowie den homologen JAM2 und JAM3 auf das ABA-Reportersystem in Protoplasten sollte getestet werden. Dazu wurde die CDS der vier bHLHs mit dem 35S-Promotor fusioniert und zusammen mit dem ABA-Reportersystem in Col-0-Protoplasten transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Klonierungsvektor (LV). Die Protoplasten wurden mit $3 \mu\text{M}$ exogener ABA oder ohne ABA-Zugabe inkubiert. Ohne Zugabe von ABA lösten JAM1, JAM3 und MYC2 eine 50 bis 70 % geringere bzw. JAM2 eine 5,3-fach höhere Reporteraktivität als der LV aus (Abbildung 28, a). Durch die Zugabe von ABA konnten JAM1, JAM3 und MYC2 ebenfalls nur eine 20 bis 90 % geringere Reporteraktivität als der LV auslösen. JAM2 hingegen führte in Verbindung mit ABA zu einer 4,7-fach höheren Reporteraktivität (Abbildung 28, b). Ein positiver Effekt von MYC2 und JAM1 konnte mit dem ABA-Reportersystem in Protoplasten somit nicht gezeigt werden. MYC2, JAM1 und JAM3 verhielten sich auf das ABA-Reportersystem reprimierend. Jedoch konnte für JAM2 eine aktivierende Wirkung unter Zugabe von ABA gezeigt werden.

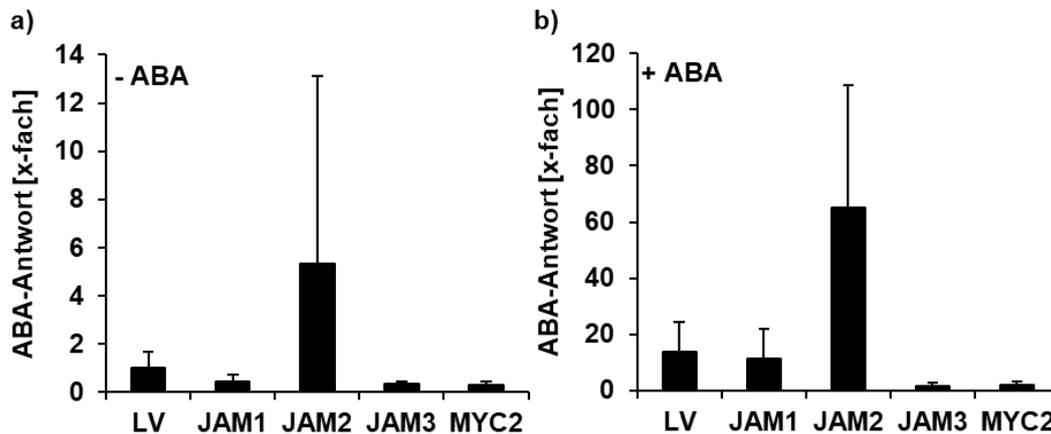


Abbildung 28: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch MYC2 und JAMs in Col-0-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Col-0-Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und $3 \mu\text{g}$ Effektor (*p35S::MYC2/JAMs*; *p35S::MCS*, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne Zugabe von ABA (a) bzw. mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und $3 \mu\text{g}$ LV (a, 2,7 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Um den Einfluss von JAM2 auf das ABA-Reportersystem weiter zu charakterisieren wurde JAM2 zum einen in Protoplasten von Col-0 sowie der ABA-defizienten Mutante *aba2-1* titriert und zum anderen mit steigenden Konzentrationen exogener ABA in *aba2-1*-Protoplasten inkubiert. Die ABA-defiziente Mutante *aba2-1* enthält nur noch 9 % der endogenen ABA im Vergleich zu Col-0 (Tischer et al. 2017) und eignet sich deshalb besonders, um den Einfluss von ABA auf die durch JAM2 ausgelöste ABA-Antwort zu untersuchen. Die Titration von JAM2 in Col-0-Protoplasten zeigte, dass $0,1 \mu\text{g}$ Effektor-DNA eine etwa zweifache Induktion des ABA-abhängigen Reporters – im Vergleich zur gleichen Menge LV – auslöst und, dass durch die weitere Erhöhung der Effektor-DNA auf $10 \mu\text{g}$ die Reporteraktivität bis zu 3,9-fach ohne exogene ABA und bis zu 7,1-fach mit exogener ABA ansteigt (Abbildung 29, a und b). Die Titration von JAM2 in *aba2-1*-Protoplasten ohne exogene ABA führt zu keiner Induktion der ABA-abhängigen Reporteraktivität (0,2- bis 1,7-fach im Vergleich zum LV). Erst die Zugabe von $3 \mu\text{M}$ ABA kann die durch JAM2 ausgelöste ABA-Antwort retten und führt mit einer 2,5-fachen Reporteraktivität für $0,1 \mu\text{g}$ Effektor-DNA von JAM2 im Vergleich zum LV bzw. 6,6-fachen für $10 \mu\text{g}$ Effektor-DNA von JAM2 zu einer mit Col-0-Protoplasten vergleichbaren Induktion (Abbildung 29, c und d).

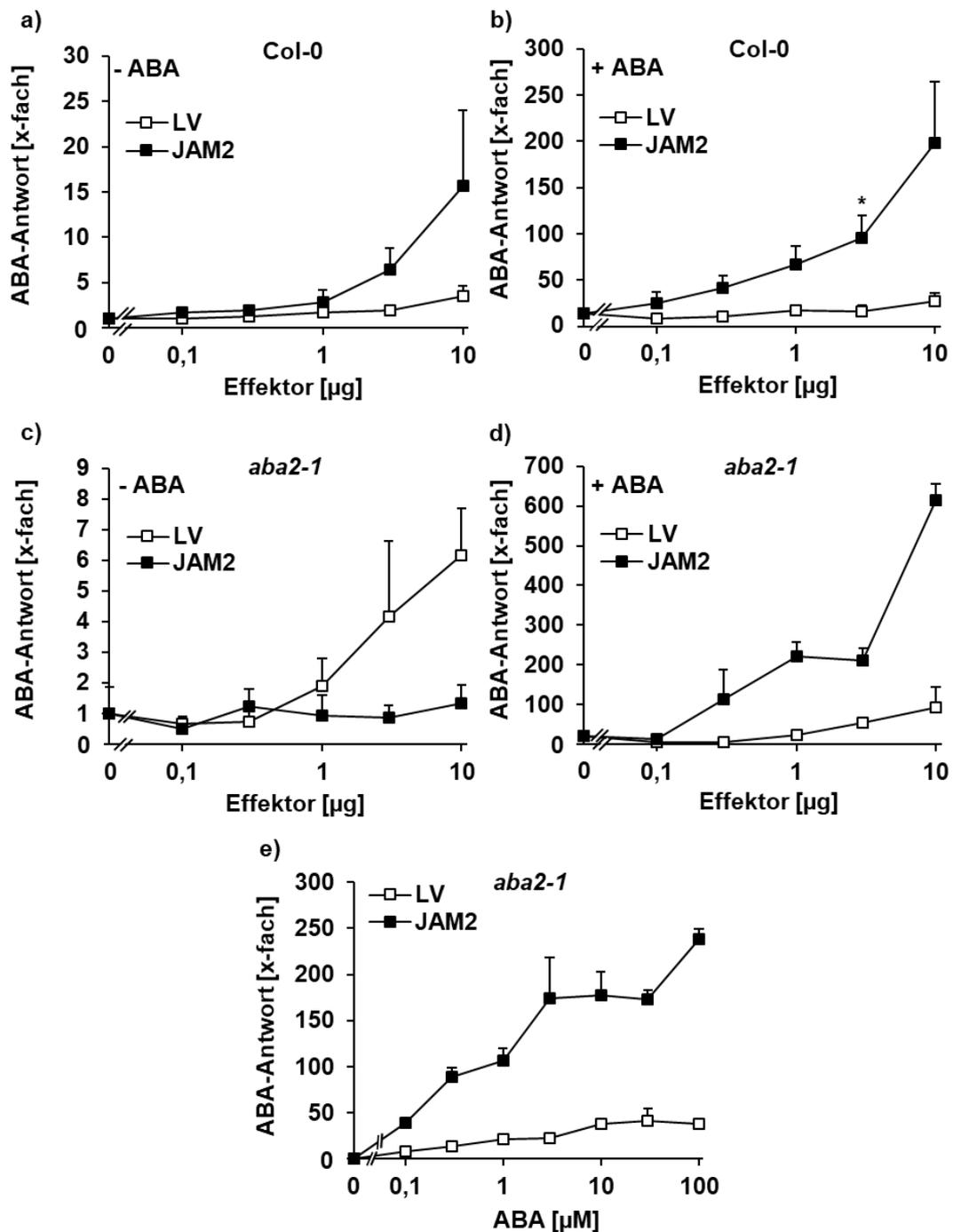


Abbildung 29: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch JAM2 in Col-0 und *aba2-1*-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Col-0- (a, b) bzw. *aba2-1*-Blättern (c, d, e) wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und steigenden Mengen (a, b, c, d) oder $3 \mu\text{g}$ (e) Effektor (*p35S::JAM2*; *p35S::MCS*, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne Zugabe von ABA (a, c), mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b, d) bzw. steigenden Konzentrationen an exogener ABA (e) für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und Effektor (a und b, $1,6 \text{ kCPS/RFU}$; c und d, $0,3 \text{ kCPS/RFU}$) bzw. ohne ABA und $3 \mu\text{g}$ LV (e, $5,2 \text{ kCPS/RFU}$) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden in Bezug auf JAM2 zweimal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden für c), d) und e) nicht erfüllt. In a) und b) ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten dargestellt. Die statistische Auswertung (a, b) erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu einem signifikanten Ergebnis (b, * $p < 0,05$).

Die Titration mit steigenden Konzentrationen an ABA und gleichbleibender Menge an JAM2 zeigte, dass bereits 0,1 μM ABA zu einer 5,1-fachen Induktion der JAM2-bedingten ABA-Antwort führt und, dass die Induktion durch eine Erhöhung exogener ABA im Vergleich zum LV nur auf bis zu 7,8-fach mit 3 μM ABA gesteigert werden kann (Abbildung 29, e). Die ABA-Antwort in Protoplasten kann somit durch JAM2 dosisabhängig beeinflusst werden, jedoch ist dieser Effekt abhängig von ABA.

Neben dem ABA-induzierbaren Reporterkonstrukt mit dem *RD29B*-Promotor sollte auch ein Reporterkonstrukt mit dem artifiziellen *8xABRE*-Promotor auf die Induktion durch JAM2 getestet werden. Der artifizielle Promotor *p8xABRE* enthält achtmal eine Sequenzvariante (TA-CGTGGC) des ABRE (C/T)ACGTGGC, an das die bZIP-Transkriptionsfaktoren der ABF-Familie binden und dadurch eine ABA-Antwort auslösen können (Choi et al. 2000; Czap 2015). Die gleiche Sequenzvariante des ABRE ist auch im *pRD29B* enthalten, jedoch im Gegensatz zum *p8xABRE* nur einmal. Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit der Effektor-DNA in Col-0-Protoplasten transfiziert und mit oder ohne exogene ABA inkubiert. Der Test ergab, dass JAM2 ohne exogene ABA das Reporterkonstrukt mit *pRD29B* 7,5-fach und mit *p8xABRE* 4,5-fach induziert (Abbildung 30). Durch die Zugabe von 3 μM ABA konnte die Induktion von *pRD29B::LUC* auf 3,1-fach und für *p8xABRE::LUC* auf 29,2-fach gesteigert werden. JAM2 kann somit auch neben dem *RD29B*-Promotor auch den artifiziellen Promotor *p8xABRE* induzieren. Für die JAM2-Wirkung auf den *pRD29B* scheint damit das Vorhandensein von ABRE-Elementen entscheidend zu sein.

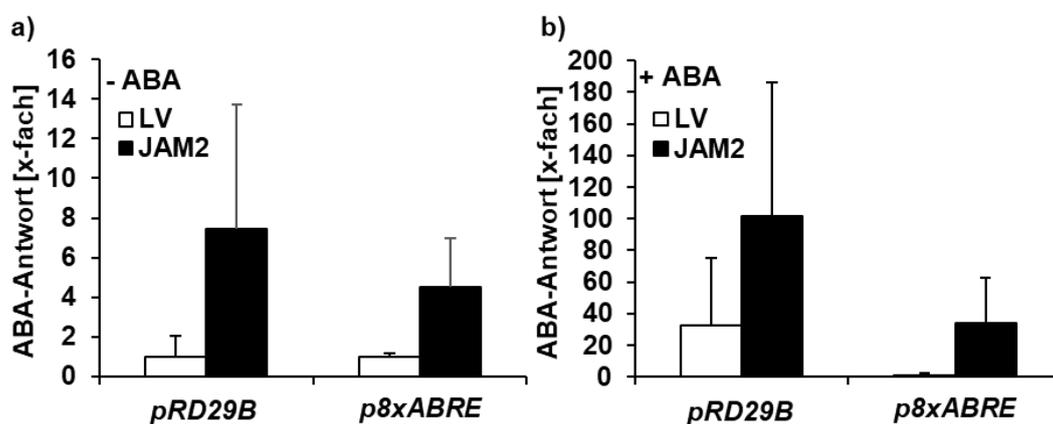


Abbildung 30: Vergleich der Induktion des *RD29B*-Promotors und des artifiziellen Promotors *p8xABRE*. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Col-0-Blättern wurden mit 3 μg *p35S::GUS*, 3 μg Effektor (*p35S::JAM2*; *p35S::MCS*, LV) und 4 μg *pRD29B::LUC* oder *p8xABRE::LUC* transfiziert. Die Protoplasten wurden ohne Zugabe von ABA (a) oder mit 3 μM ABA (b) für 16 ± 1 h bei 25 °C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und LV (*pRD29B*, 9,4 kCPS/RFU; *p8xABRE*, 1,8 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

2.3.4 Einfluss von AHR11 und TPL/TPRs auf die durch JAM2-induzierte ABA-Antwort

Nach dem hypothetischen Modell zur Genregulation über den JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplex von Huang (2014) wurde erwartet, dass AHR11 und die TPL/TPRs reprimierend auf die JAM2-induzierte ABA-Antwort wirken. Um dies zu überprüfen, wurde JAM2-Effektor-DNA mit AHR11- bzw. TPL/TPR-Effektor-DNA in Col-0-Protoplasten kotransfiziert und mit oder ohne exogene ABA inkubiert. Die durch JAM2-induzierte ABA-Antwort stieg mit zunehmender Menge an LV oder AHR11-Effektor-DNA ohne exogene ABA um 1,1- bis 4,9-fach bzw. 1,7- bis 2,4-fach an (Abbildung 31). Die Zugabe von 3 μM ABA führte auch zu einem Anstieg mit LV oder AHR11-Effektor-DNA um 1,7- bis 3,1-fach bzw. 1,1- bis 2,4-fach. LV und AHR11 haben den Ergebnissen zu Folge einen ähnlichen Einfluss auf die durch JAM2-induzierte ABA-Antwort. Ein reprimierender Einfluss von AHR11 auf die durch JAM2-induzierte ABA-Reporterantwort mit dem ABA-Reportersystem in Protoplasten konnte somit nicht gezeigt werden.

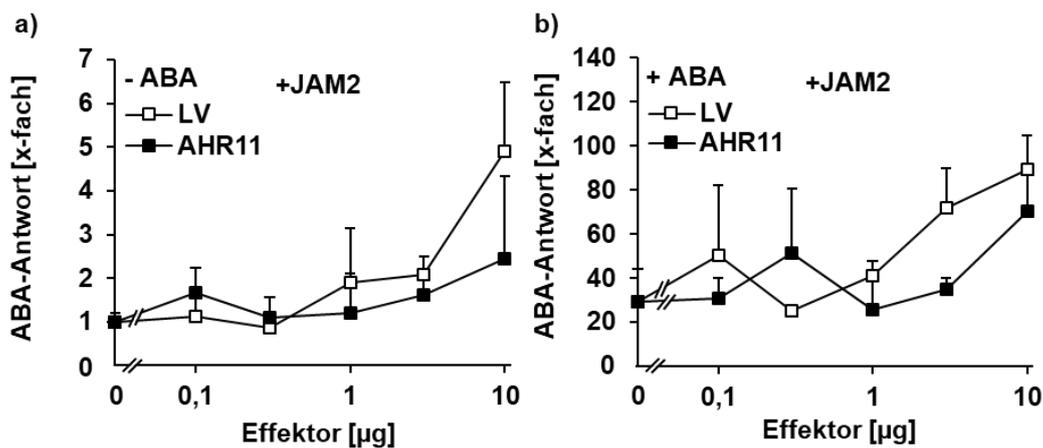


Abbildung 31: Einfluss von AHR11 auf die JAM2-induzierte ABA-Antwort. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Col-0-Blättern wurden mit 3 μg *p35S::GUS*, 4 μg *pRD29B::LUC*, 3 μg *p35S::JAM2* und steigenden Mengen an Effektor (*p35S::AHR11*; *p35S::MCS*, LV) transfiziert. Die Protoplasten wurden ohne Zugabe von ABA (a) bzw. mit 3 μM ABA (b) für 16 \pm 1 h bei 25 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und 3 μg JAM2 (a, 4,3 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden für AHR11 in Verbindung mit JAM2 zweimal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden nicht erfüllt.

Die TPL/TPRs führten ohne exogene ABA zu einer Induktion der JAM2-induzierten ABA-Antwort im Vergleich zum LV (Abbildung 32, a). TPR1 führte mit einer 1,8-fachen Steigerung zur geringsten Erhöhung. TPR3 und TPR4 steigerten die JAM2-induzierte ABA-Antwort um das 3-fache. Die höchste Steigerung konnte mit TPL und TPR2 verzeichnet werden, und zwar um das 5- bzw. 5,7-fache. Die Zugabe von 3 μM ABA resultierte mit TPR1–TPR4 in einer 2-fach und mit TPL in einer 3-fach höheren Induktion der JAM2-induzierten ABA-Antwort im Vergleich zum LV (Abbildung 32, b). Demzufolge konnte für die TPL/TPRs kein reprimierender Effekt auf

die JAM2-induzierte ABA-Antwort gezeigt werden. Die TPL/TPRs zeigten hingegen einen fördernden Einfluss auf die JAM2-induzierte ABA-Antwort.

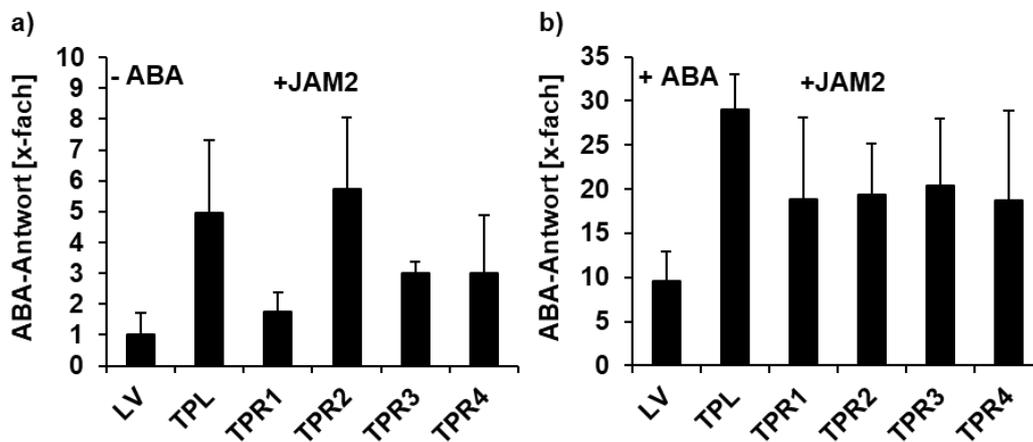


Abbildung 32: Einfluss von TPL/TPRs auf die JAM2-induzierte ABA-Antwort. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Col-0-Blättern wurden mit $3 \mu\text{g } p35S::GUS$, $4 \mu\text{g } pRD29B::LUC$, $3 \mu\text{g } p35S::JAM2$ und $3 \mu\text{g}$ Effektor ($p35S::TPL/TPRs$; $p35S::MCS$, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne Zugabe von ABA (a) bzw. mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und $3 \mu\text{g}$ LV (a, $28,4$ kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden einmal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden nicht erfüllt.

2.4 Einfluss von AHR11 und JAM2 auf den ABA-Signalweg in transgenen Keimlingen

Neben der Analyse mit dem ABA-Reportersystem in Mesophyll-Protoplasten kann die Wirkung von neuartigen Signalkomponenten auf den ABA-Signalweg auch mit einer ABA-Reporterlinie untersucht werden. Die ABA-Reporterlinie mit dem Hintergrund Col-0 trägt das Reportergen für Luciferase aus *Photinus pyralis*, das unter der Kontrolle des ABA-induzierbaren Promotors des Homeodomänen Proteins ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN (ATHB) 6 ($pATHB6::LUC$) steht (Himmelbach et al. 2002; Christmann et al. 2005). Die Wirkung von neuartigen Signalkomponenten kann in der ABA-Reporterlinie getestet werden, in dem Überexpressionslinien und Knockout-Linien für die entsprechende Komponente mit dem Hintergrund der Reporterlinie erzeugt werden. Die T-DNA-Insertionslinie d476 für *AHR11*, die Mutante *ahr11* sowie Überexpressionslinien für *AHR11* und *JAM2* lagen bereits mit dem Hintergrund der ABA-Reporterlinie vor (Christmann, Lehrstuhl für Botanik des WZW, unveröffentlicht). Für *JAM2* war keine T-DNA-Insertionslinie in der CDS erhältlich, weshalb über die *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)-Methode Knockout-Linien für *JAM2* erzeugt wurden.

2.4.1 Überprüfung von *AHR11*- und *JAM2*-Überexpressionslinien und Erzeugung von *JAM2*-Knockout-Linien über CRISPR/Cas9

Die Überexpressionslinien von *AHR11* (AHR11OE) und *JAM2* (JAM2OE) wurden auf ihre Überexpression mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) getestet. Das in den Linien ektopisch exprimierte *AHR11* bzw. *JAM2* steht unter der Kontrolle des 35S-Promotors und sollte dadurch konstitutiv exprimiert werden. Für die Analyse wurden Linien in der Generation T3 verwendet. Die AHR11OE und die JAM2OE wiesen eine 9- bis 30-fach bzw. eine 17- bis 56-fach höhere Expression an *AHR11* bzw. *JAM2* im Vergleich zum wildtypischen Gen in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* auf (Abbildung 33). Die AHR11OE und JAM2OE können somit als Überexpressionslinien bezeichnet werden.

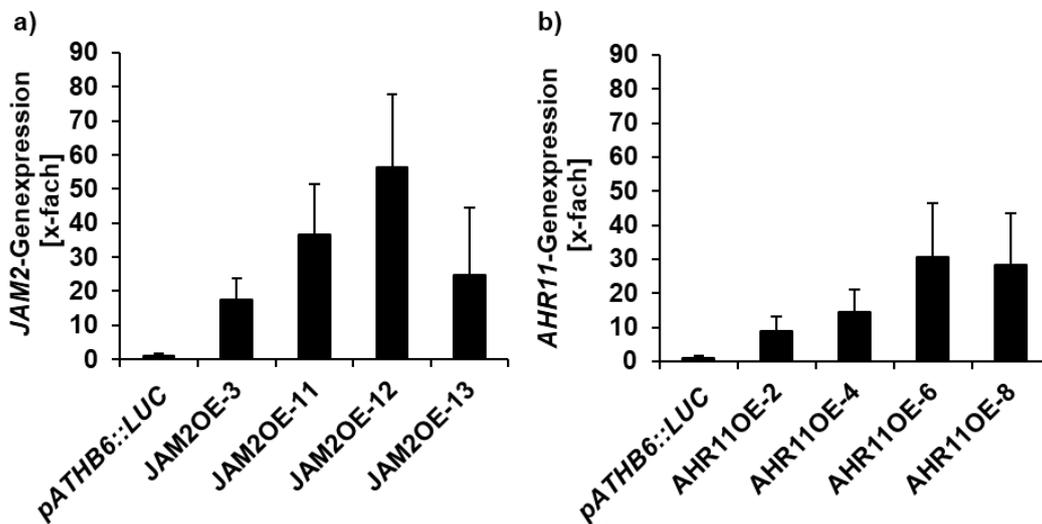


Abbildung 33: Genexpression von *JAM2* und *AHR11* in Überexpressionslinien. Expressionsanalyse von ektopisch exprimiertem *JAM2* (a) und *AHR11* (b) in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* über qPCR. Für die Analyse wurden die Referenzgene *UBIQUITIN 10 (UBI10)*, *UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 9 (UBC9)* und *TYPE 2A PHOSPHATASE-ASSOCIATED PROTEIN 42 INTERACTING PROTEIN OF 41 KILODALTON-LIKE PROTEIN (TIP41L)* verwendet. Die Expression des wildtypisch exprimierten *JAM2* bzw. *AHR11* in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Der CRISPR/Cas9-Knockout von *JAM2* wurde zum einen in die ABA-Reporterlinie eingebracht und zum anderen in die *AHR11*-Mutanten-Linien mit ABA-Reporter *pATHB6::LUC x d476* (d476) und *pATHB6::LUC x ahr11* (*ahr11*). Über die Doppelmutanten *jam2_d476* und *jam2_ahr11* sollte geklärt werden, ob die durch Huang (2014) beschriebene Hypersensitivität auf ABA in *ahr11* durch eine fehlende Reprimierung von *JAM2* durch *AHR11* hervorgerufen wird. Die Vektoren für die Generierung von CRISPR/Cas9-Knockouts wurden von Dr. Johannes Stuttmann (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt und das Vorgehen orientierte sich an Belhaj et al. (2015). Die CRISPR/Cas9-Knockouts von *JAM2*

enthalten nach 26 Nukleotiden die Insertion eines Adenins (Abbildung 34, a). Dies führt in Folge zu einer Verschiebung des Leserahmens und resultiert in einem Stopcodon nach weiteren 9 nt. In den *JAM2*-Knockouts wird dadurch nur ein 12 aa langes Rumpfprotein von *JAM2* gebildet. Aus den *jam2*-Linien wurde das eingebrachte CRISPR/Cas9-Konstrukt durch Rückkreuzung mit den jeweiligen Ausgangslinien entfernt. Der Erfolg der Auskreuzung wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) überprüft. Dafür wurden Primer erzeugt, die in der kodierenden Sequenz für die BASTA-Resistenz (*PHOSPHINOTHRICIN-ACETYL-TRANSFERASE*, *PAT*) des Konstrukts binden. Da nur für die Kontrolle ein PCR-Produkt erzeugt werden konnte, wird davon ausgegangen, dass in den Knockouts kein CRISPR/Cas9-Konstrukt mehr enthalten ist (Abbildung 34, b). Der Erhalt der homozygoten *jam2*-Mutationen in den rückgekreuzten Linien wurde durch Sequenzierung der *JAM2*-Sequenz überprüft. In den CRISPR/Cas9-Konstrukt-freien *jam2*-Linien wurden schließlich die kodierenden Sequenzen der *JAM2*-Homologen *JAM1* und *JAM3* sequenziert, wodurch bestätigt werden konnte, dass diese Sequenzen keine Off-Target-Mutation tragen.

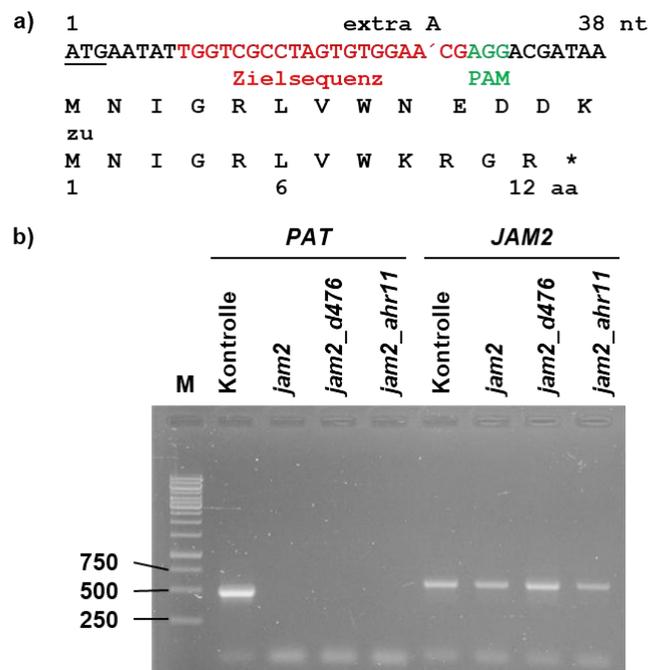


Abbildung 34: CRISPR/Cas9-Knockout-Linie von *JAM2*. a) Schematische Darstellung der Insertion in den CRISPR/Cas9-Knockout-Linien von *JAM2*. Dargestellt sind die ersten 38 nt der CDS von *JAM2* mit der daraus resultierenden Aminosäuresequenz. Das Startcodon ist unterstrichen. Die Zielsequenz (rot) für die *single guide* RNA (sgRNA) und das *protospacer adjacent motif* (PAM, grün) sind hervorgehoben. Die Wahl der Zielsequenz erfolgte mit dem Online-Programm CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>). Die CRISPR/Cas9-Knockout *jam2* enthält ein eingeschobenes Adenin (A) nach 26 nt, das zu einer Verschiebung des Leserasters führt und zu einem Stopcodon nach 34 nt. b) Agarose-Gelelektrophorese mit PCR-Produkten zur Kontrolle auf BASTA-Resistenz. Für den Nachweis wurde genomische DNA mit Hilfe der Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Methode aus den CRISPR/Cas9-Knockout-Linien von *JAM2* und einer Kontroll-Pflanze mit BASTA-Resistenz isoliert. Die PCR wurde mit Primern für das Gen *PAT*, das für die BASTA-Resistenz kodiert, und *JAM2* als Positiv-Kontrolle durchgeführt. Die erwarteten Fragmente für *JAM2* (595 bp) konnten in allen Linien gezeigt werden und die für *PAT* (490 bp) nur in der Kontroll-Pflanze. Als Längenstandard wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific verwendet.

2.4.2 *In vivo* Luciferase-Imaging mit ABA-Reporterlinien für *AHR11* und *JAM2*

Für das *in vivo* Luciferase-Imaging wurden fünf Tage alte Keimlinge der *AHR11*- und *JAM2*-Überexpressions- bzw. -Knockoutlinien auf $MS_{0,5xZucker}$ -Platten mit und ohne ABA überführt und für 17 ± 1 h inkubiert.

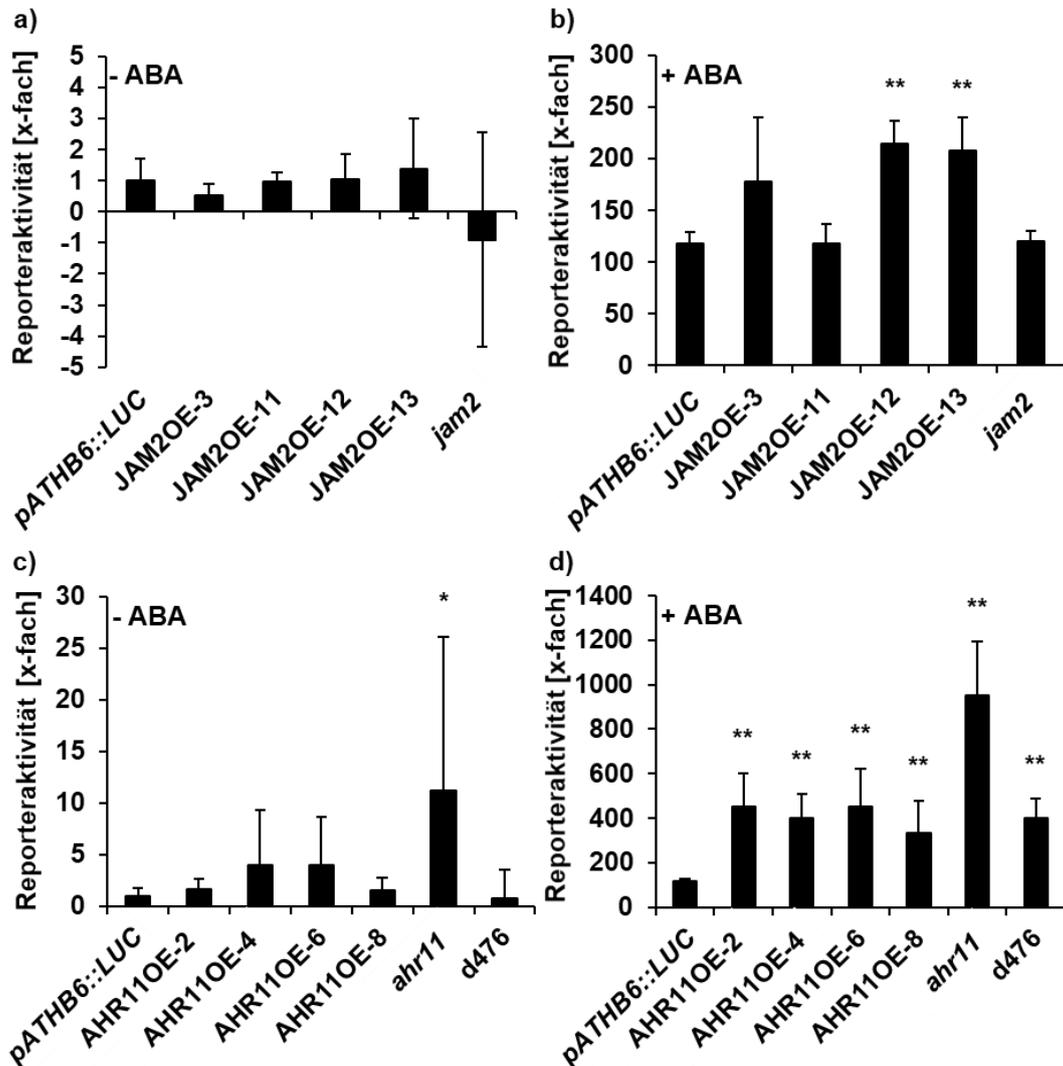


Abbildung 35: *In vivo* Luciferase-Imaging von *JAM2*- und *AHR11*-Überexpressions-Keimlingen bzw. -Knockout-Keimlingen. Fünf Tage alte Keimlinge (Stratifikation bei 4 °C für zwei Tage; Keimung bei 22 °C und Dauerlicht ($60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$)) wurden auf $MS_{0,5xZucker}$ -Platten ohne (a, c) oder mit 10 μM ABA (b, d) transferiert und für 17 ± 1 h unter Dauerlicht bei 22 °C inkubiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit einer *charge-coupled device* (CCD)-Kamera (ORCAII ERG; Hamamatsu City, Japan) und wurde mit der Software Simple PCI 6.6.0.0 (Compix, Cranberry Township, PA) ausgewertet. Die Luciferaseaktivität wurde als *CCD-relative luminescence unit* (CCD-RLU) gemessen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von sechs biologischen Replikaten ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils 15 Keimlingen. Der Messwert für *PATHB6::LUC* ohne ABA (0,5 kCCD-RLU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Die Messung ergab, dass ohne ABA die Reporteraktivität zwischen JAM2OE-Linien geringer oder vergleichbar (0,5- bis 1,4-fach) zu *pATHB6::LUC* war (Abbildung 35, a). *jam2* zeigte eine wesentlich geringere Reporteraktivität als *pATHB6::LUC*, die aber großen Messschwankungen unterlag. Die Behandlung mit ABA führte in den JAM2OE zu einer ein- bis 1,8-fach höheren Reporteraktivität im Vergleich zu *pATHB6::LUC* und im Fall von JAM2OE-12 und JAM2OE-13 zu einem signifikanten Ergebnis (** $p < 0,01$; Abbildung 35, b). Die Knockout *jam2* verhielt sich in Gegenwart von ABA hingegen wie *pATHB6::LUC*. Die AHR11OE-Linien wiesen ohne ABA bereits eine 1,5- bis 4-fach höhere Reporteraktivität als *pATHB6::LUC* auf (Abbildung 35, c). *ahr11* zeigte mit einer 11-fach höheren Reporteraktivität im Vergleich zu *pATHB6::LUC* ein signifikantes Ergebnis (* $p < 0,05$). Die Knockout d476 verhielt sich hingegen wie *pATHB6::LUC*. Durch ABA steigerte sich die Reporteraktivität für alle AHR11-Linien und es ergaben sich im Vergleich zu *pATHB6::LUC* signifikante Unterschiede (** $p < 0,01$; Abbildung 35, d).

Da die Messungen vor allem ohne ABA größeren Schwankungen unterlagen, wurde die Transkription des Reportergens *LUC* auch über qPCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass mit ABA-Zugabe die Induktion der Expression von *LUC* mit der Reporteraktivität von *LUC* in d476, AHR11OE- und JAM2OE-Linien vergleichbar ist (Abbildung 36). Nur die Induktion in *ahr11* bezogen zu *pATHB6::LUC* fällt mit 3,6-fach im Vergleich zur Reporteraktivität geringer aus. *jam2* zeigt zudem eine 0,5-fach geringere Induktion im Vergleich zu *pATHB6::LUC*. Ohne ABA zeigt nur *ahr11* eine 2-fache Induktion der Reporteraktivität, alle anderen Linien verhalten sich ähnlich zu *pATHB6::LUC*. Die von Huang (2014) für *ahr11* in Verbindung mit ABA gezeigte Hypersensitivität im *in vivo* Luciferase-Imaging konnte bestätigt werden. Auch für die T-DNA-Knockout-Linie d476 konnte eine hypersensitive Reaktion gezeigt werden. Die laut dem von Huang (2014) aufgestellten Modell vermutete insensitive Reaktion der AHR11OE-Linien konnte nicht gezeigt werden. Die AHR11OE-Linien verhielten sich wie *ahr11* und d476 hypersensitiv. Auch die JAM2OE-Linien verhielten sich leicht hypersensitiv, jedoch fiel die Reporteraktivität wesentlich geringer aus, als die der AHR11-Linien. Für *jam2* konnte nur über qPCR eine insensitive Reaktion gezeigt werden.

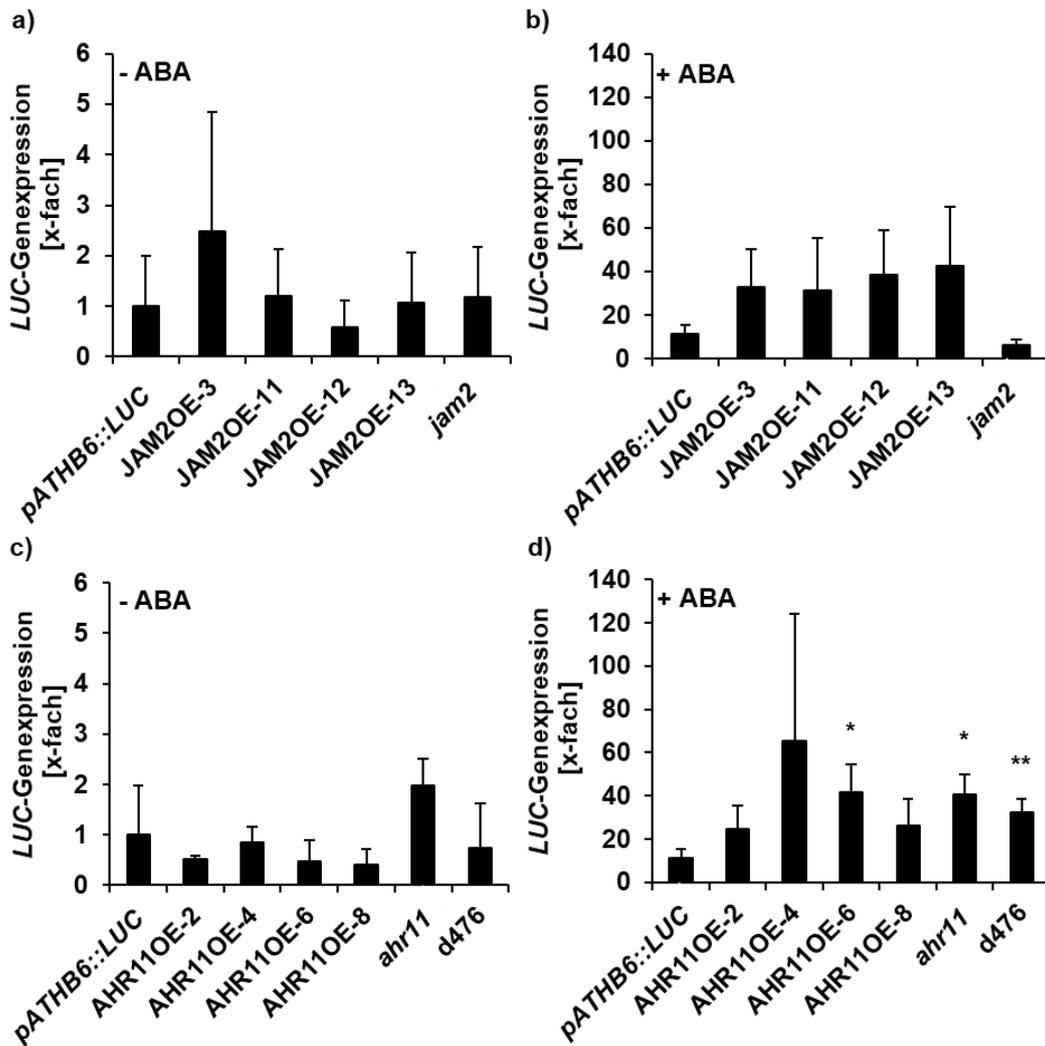


Abbildung 36: Expression von *LUC* in *JAM2*- und *AHR11*-Linien. Expressionsanalyse über qPCR von *LUC* in *pATHB6::LUC*, *JAM2*-Überexpressionslinien, *jam2*, *AHR11*-Überexpressionslinien, *ahr11* und *d476*. Fünf Tage alte Keimlinge (Stratifikation bei 4 °C für drei Tage; Keimung bei 22 °C und Dauerlicht (60 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$)) wurden auf $\text{MS}_{0,5\text{Zucker}}$ -Platten ohne (a, c) oder mit 10 μM ABA (b, d) transferiert und für 17 ± 1 h unter Dauerlicht bei 22 °C inkubiert. Als Referenzgene für die qPCR dienten *UBI10*, *UBC9* und *TIP41L*. Die Expression von *LUC* in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* ohne ABA-Exposition wurde auf eins gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Um zu testen, ob die hypersensitive Reaktion in *ahr11* von *JAM2* abhängig ist, wurden wie zuvor erwähnt Doppel-Knockouts von *JAM2* und *AHR11* (*jam2_ahr11* und *jam2_d476*) generiert. Auch diese Linien wurden im *in vivo* Luciferase-Imaging getestet. *jam2_ahr11* und *jam2_d476* wiesen ohne ABA eine 1,5-fache bzw. gleiche Reporteraktivität im Vergleich zu *pATHB6::LUC* auf (Abbildung 37). Die Reporteraktivität von *jam2_d476* und *d476* ohne ABA ist demzufolge vergleichbar. Die Reporteraktivität von *jam2_ahr11* fällt wesentlich geringer als die von *ahr11* aus, ist aber auch mit einer geringeren Messschwankung behaftet und verhält sich ähnlich zu den über qPCR für *ahr11* bestimmten Ergebnissen. Mit ABA konnte die Reporteraktivität im Vergleich zu *pATHB6::LUC* für *jam2_ahr11* um das 7-fache gesteigert werden und für *jam2_d476* um das 4-fache. Beide Linien weisen damit eine signifikant höhere

Reporteraktivität als *pATHB6::LUC* auf. Die für *jam2_ahr11* und *jam2_d476* gemessene Reporteraktivität entspricht der für *ahr11* und *d476* bestimmten. Die Hypersensitivität in *ahr11* und *d476* lässt sich somit nicht auf *JAM2* zurückführen.

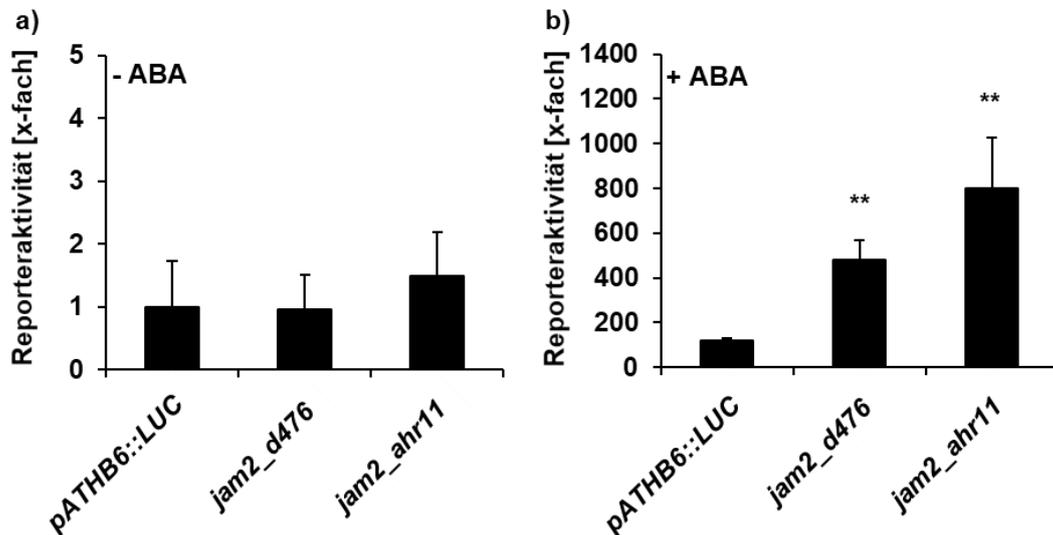


Abbildung 37: In vivo Luciferase-Imaging in *AHR11*-*JAM2*-Knockout-Keimlingen. Die Messung erfolgte wie zuvor in Abbildung 35 beschrieben. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert sechs biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils 15 Keimlingen. Der Messwert für *pATHB6::LUC* ohne ABA (0,5 kCCD-RLU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test (** $p < 0,01$).

2.4.3 Genexpression ABA-regulierter Gene in *AHR11*- und *JAM2*-Linien

Die Überexpression von *AHR11* oder *JAM2* führte in der ABA-Reporterlinie zu einer hypersensitiven Reaktion. Während der *JAM2*-Knockout zwar keinen Effekt hervorrief, löste der *AHR11*-Knockout ebenfalls eine hypersensitive Reaktion aus. Die *AHR11*- und *JAM2*-Linien wurden daraufhin auch auf eine Veränderung der Expressionsniveaus ABA-regulierter Gene analysiert. Dazu wurden fünf Tage alte Keimlinge wie auch im Luciferase-Imaging auf $MS_{0,5xZucker}$ -Platten ohne und mit 10 μ M ABA umgesetzt. Nach einer Inkubation von 17 ± 1 h wurden die Keimlinge für die RNA-Extraktion geerntet. Die Analyse erfolgte über qPCR. Gemessen wurde die Veränderung des Expressionsniveaus der ABA-Zielgene *RD22*, *RD29B* und *CYP707A1*, für die eine ABA-bedingte Steigerung der Expression gezeigt werden konnte (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993a, 1993b, 1993c; Saito et al. 2004).

Unter Kontrollbedingungen hatte weder die Überexpression noch der Knockout von *AHR11* einen deutlichen Einfluss auf das Expressionsniveau von *RD22*, *RD29B* und *CYP707A1* im Vergleich zur Referenz *pATHB6::LUC* (Abbildung 38, a, c und e). Die *AHR11*-Überexpressionslinien – bis auf *AHR11OE-6* – wiesen für *RD22* eine 1,1- bis 1,5-fach höhere Expression auf. *AHR11OE-6* zeigte eine um 10 % geringere Expression. In *ahr11* und *d476* war *RD22* um

36 % bzw. 18 % geringer exprimiert. Zwar zeigten AHR11OE-2 und AHR11OE-4 eine 3- bzw. 6-fach höhere Expression von *RD29B* als die Referenz *pATHB6::LUC*, jedoch waren die Messwerte mit hohen Schwankungen behaftet und die zwei weiteren Überexpressionslinien AHR11OE-6 und AHR11OE-8 zeigten diesen Effekt nicht, sondern nur eine 1,1- bis 1,2-fache Erhöhung des Expressionsniveaus. Während in der Knockout-Linie *ahr11* die Expression von *RD29B* 1,4-fach höher war, konnte für d476 nur eine 44 % geringere Expression gemessen werden. Für *CYP707A1* verhielt es sich ähnlich zu *RD29B*. AHR11OE-2 und AHR11OE-4 wiesen eine 1,3- bis 1,8-fach höhere Expression auf und die zwei weiteren Überexpressionslinien, *ahr11* und d476 wiesen ein um 19–50 % geringeres Expressionsniveau auf.

Die ABA-Exposition führte für *RD22*, *RD29B* und *CYP707A1* in der Referenz *pATHB6::LUC* zu der in der Literatur beschriebenen Steigerung des Expressionsniveaus (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1993b, 1993c; Saito et al. 2004). Hier stieg das Expressionsniveau für *RD22*, *CYP707A1* und *RD29B* um das 4,5-, 13,7- bzw. 381-fache an (Abbildung 38, b, d und f). Die Überexpression von *AHR11* in Verbindung mit ABA senkte die Expression von *RD22* um 30–55 % – außer in AHR11OE-4. AHR11OE-4 wies ein vergleichbares Expressionsniveau zu *pATHB6::LUC* auf. Auch die beiden Knockout-Linien *ahr11* und d476 führten zu einer 46 % bzw. 63 % geringeren Expression. Die Unterschiede zu *pATHB6::LUC* waren jedoch weder für die Überexpressionslinien noch für die Knockout-Linien signifikant. *RD29B* wies in allen *AHR11*-Überexpressionslinien bis auf AHR11OE-8 eine 1,3- bis 2,2-fach höhere Expression auf. In AHR11OE-8 war die Expression 5 % geringer als in *pATHB6::LUC*. In *ahr11* und d476 senkte sich das Expressionsniveau von *RD29B* um 14–31 %. Während *CYP707A1* in AHR11OE-4 und AHR11OE-6 eine 1,4- bis 1,9-fach höhere Expression aufwies, war das Expressionsniveau in AHR11OE-2 und AHR11OE-8 um 3 % bzw. 13 % geringer. Auch die Knockout-Linien wiesen eine um 15–24 % geringere Expression auf. Der Einfluss von *AHR11* auf das Expressionsniveau von *RD22*, *RD29B* bzw. *CYP707A1* war den Ergebnissen zufolge auch unter ABA-Exposition nur gering oder gar nicht vorhanden.

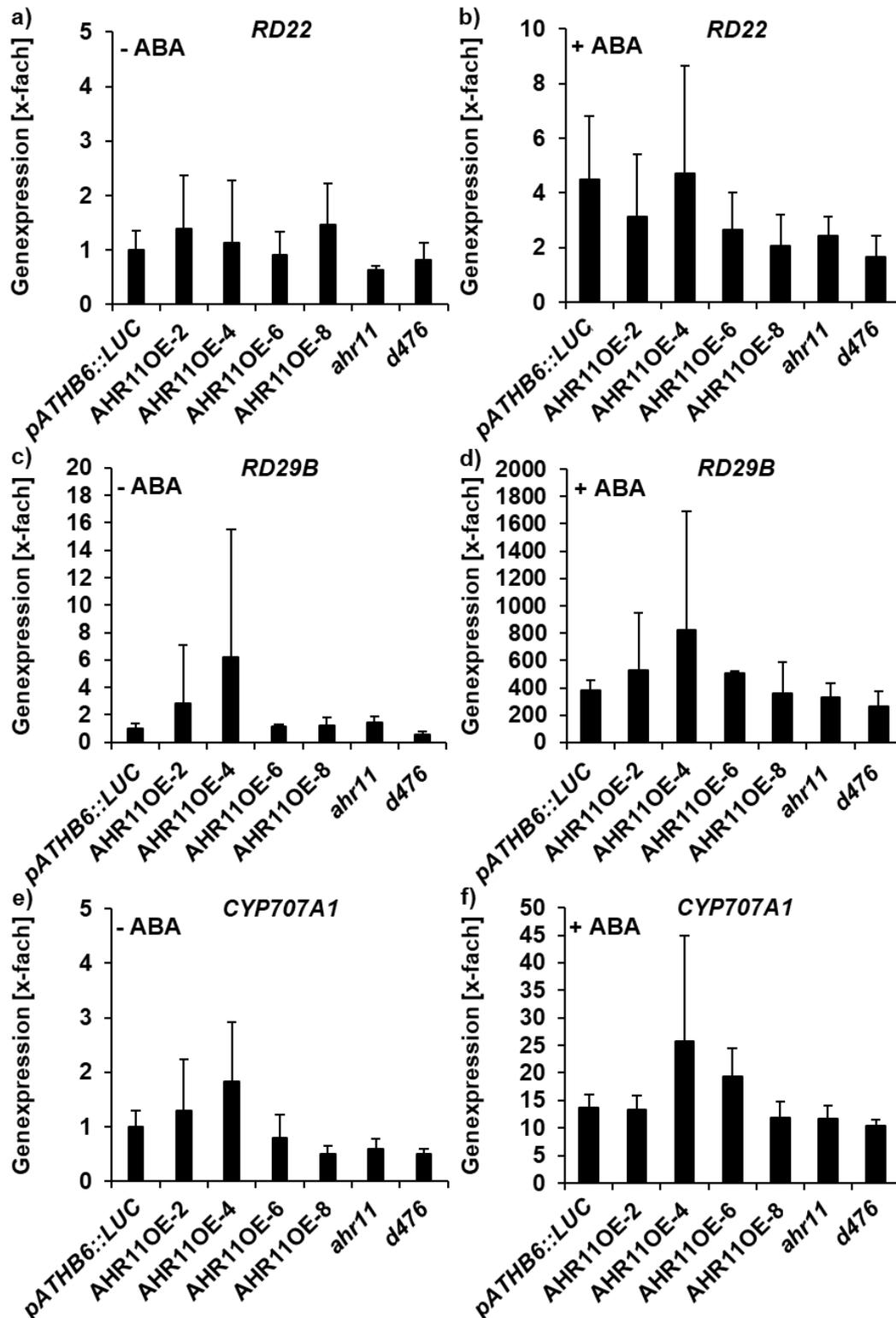


Abbildung 38: Expression von ABA-regulierten Genen in *AHR11*-Linien. Expressionsanalyse über qPCR von *RD22* (a, b), *RD29B* (c, d) und *CYP707A1* (e, f) in *pATHB6::LUC*, *AHR11*-Überexpressionslinien sowie *ahr11* und *d476*. Fünf Tage alte Keimlinge (Stratifikation bei 4 °C für drei Tage; Keimung bei 22 °C und Dauerlicht (60 $\mu\text{mol x m}^{-2} \text{x s}^{-1}$)) wurden auf $\text{MS}_{0,5\text{Zucker}}$ -Platten ohne (a, c und e) oder mit 10 μM ABA (b, d und f) transferiert und für 17 ± 1 h unter Dauerlicht bei 22 °C inkubiert. Als Referenzgene dienten *UBI10*, *UBC9* und *TIP41L*. Die Expression von *RD22*, *RD29B* bzw. *CYP707A1* in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* ohne ABA-Exposition wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Auch die Überexpressions- und Knockout-Linien von *JAM2* zeigten wie auch *AHR11* unter Kontrollbedingungen keinen Einfluss auf die Expression von *RD22* (Abbildung 39, a). Alle *JAM2*-Linien – bis auf *JAM2OE-12* und *JAM2OE-13* – wiesen eine zu *pATHB6::LUC* vergleichbare Expression von *RD22* auf. *JAM2OE-12* und *JAM2OE-13* zeigten eine 1,9-fach höhere bzw. eine um 32 % geringere Expression von *RD22*. Für *RD29B* wiesen die *JAM2*-Überexpressionslinien unter Kontrollbedingungen eine 1,4- bis 6,2-fach höhere Expression auf, während *jam2* ein 82 % niedrigeres Expressionsniveau zeigte (Abbildung 39, c). Die Unterschiede zu *pATHB6::LUC* sind aber nicht signifikant ($p > 0,05$). *CYP707A1* wies in den *JAM2*-Überexpressionslinien unter Kontrollbedingungen eine um 63–70 % signifikant (* $p < 0,05$) geringere Expression auf (Abbildung 39, e). Auch in *jam2* war die Expression von *CYP707A1* um 20 % geringer, aber nicht signifikant ($p > 0,05$). *JAM2* hat unter Kontrollbedingungen somit keinen Effekt auf die *RD22*-Expression. *JAM2* scheint sich jedoch auf die Expression von *RD29B* positiv auszuwirken, auch wenn die Messungen größeren Schwankungen unterliegen. Auf die Expression von *CYP707A1* scheint *JAM2*, einen reprimierenden Effekt zu haben, auch wenn der Knockout von *JAM2* keinen erheblichen Unterschied zu den Überexpressionslinien aufwies.

Die ABA-Exposition führte für *RD22* in den *JAM2*-Überexpressionslinien – bis auf *JAM2OE-12* – und *jam2* zu einer 12–20 % bzw. 43 % geringeren Expression. In *JAM2OE-12* wies *RD22* eine 1,1-fach höhere Expression auf (Abbildung 39, b). In den *JAM2*-Überexpressionslinien konnte unter ABA-Exposition eine 1,6- bis 3,4-fach höhere Expression an *RD29B* gemessen werden, während *jam2* ein um 23 % geringeres Expressionsniveau im Vergleich zu *pATHB6::LUC* aufwies (Abbildung 39, d). Aber auch hier ergaben sich wie auch schon unter Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede aufgrund der Messwertschwankungen. Für *CYP707A1* wiesen die *JAM2*-Überexpressionslinien unter ABA-Exposition eine um 18–50 % geringere Expression auf und *jam2* eine 1,2-fach höhere (Abbildung 39, f). Ein signifikanter Unterschied liegt hier aber nur für *JAM2OE-11* im Vergleich zu *pATHB6::LUC* vor. Ein Einfluss von *JAM2* auf die *RD22*-Expression kann demzufolge auch nicht unter ABA-Exposition beobachtet werden. Jedoch kann auch hier ein positiver Einfluss von *JAM2* auf die Expression von *RD29B* und ein negativer auf *CYP707A1* bestimmt werden.

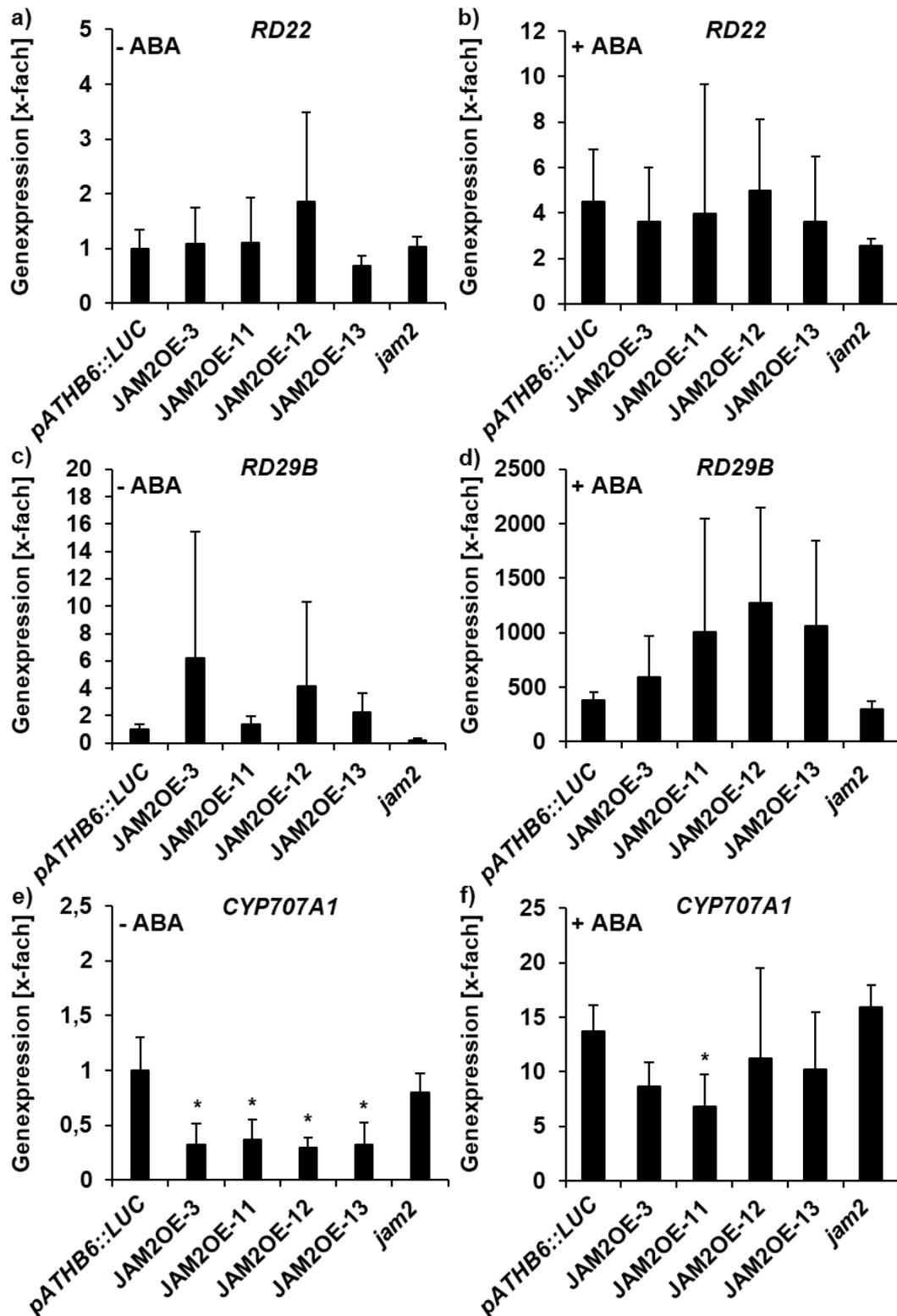


Abbildung 39: Expression von ABA-regulierten Genen in *JAM2*-Linien. Expressionsanalyse über qPCR von *RD22* (a, b), *RD29B* (c, d) und *CYP707A1* (e, f) in *pATHB6::LUC*, *JAM2*-Überexpressionslinien sowie *jam2*. Fünf Tage alte Keimlinge (Stratifikation bei 4 °C für drei Tage; Keimung bei 22 °C und Dauerlicht (60 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$)) wurden auf $\text{MS}_{0,5\text{xZucker}}$ -Platten ohne (a, c und e) oder mit 10 μM ABA (b, d und f) transferiert und für 17 ± 1 h unter Dauerlicht bei 22 °C inkubiert. Als Referenzgene dienten *UBI10*, *UBC9* und *TIP41L*. Die Expression von *RD22*, *RD29B* bzw. *CYP707A1* in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* ohne ABA-Exposition wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier bio-logischer Replikate ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (* $p < 0,05$).

2.5 Physiologische Charakterisierung von *AHR11* und *JAM2*

Das Phytohormon ABA hat eine regulatorische Funktion auf Wachstumsprozesse (Cutler et al. 2010). Es sorgt für die Aufrechterhaltung der Dormanz und verhindert ein vorzeitiges Keimen (Zeevaart und Creelman 1988; Hilhorst und Karssen 1992). ABA hat im Samen demzufolge eine antagonistische Rolle zu Gibberellinsäure, da die Beendigung der Dormanz durch eine verstärkte ABA-Degradation und eine ansteigende Gibberellinsäure-Biosynthese charakterisiert ist und schließlich zu einer Gibberellinsäure-bedingten Keimung führt (Finch-Savage und Leubner-Metzger 2006). Neben der inhibierenden Wirkung auf die Keimung reguliert ABA auch das Wurzelwachstum. Die Modulierung des Wurzelwachstums durch ABA ist konzentrationsabhängig. Während geringe Konzentrationen das Wurzelwachstum fördern (Dietrich et al. 2017; Li et al. 2017), inhibieren höhere Konzentrationen das Wachstum (Zeevaart und Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998). Die Inhibierung des Wurzelwachstums durch ABA erfolgt vor allem durch eine Förderung der Ethylenbiosynthese (Luo et al. 2014). Durch ABA-regulierte Reaktionen können neben der einfachen Zugabe von ABA auch durch Osmotika, wie zum Beispiel Mannit oder Sorbit, ausgelöst werden. Osmotika verringern das Wasserpotential im Medium. Die Wasseraufnahme der Pflanze wird dadurch erschwert und Bedingungen in Erde unter Wassermangel können simuliert werden (Verslues et al. 2006; Claeys et al. 2014). Im Folgenden soll untersucht werden, ob *AHR11* und *JAM2* einen Einfluss auf die ABA-regulierten Wachstumsprozesse wie Keimung und Wurzelwachstum haben.

2.5.1 Keimung

Die Keimung eines Samens beginnt nach Bewley (1997) mit der Wasseraufnahme, der sogenannten Quellung, und ist vollendet, wenn ein Teil des Embryos, meistens die Keimwurzel, die umgebende Struktur durchdringt. Wenn ein lebensfähiger Samen unter günstigen Bedingungen jedoch nicht in der Lage ist, die Keimung zu vollenden, dann spricht man laut Bewley (1997) von Dormanz. Um zu untersuchen, ob *JAM2* oder *AHR11* einen Einfluss auf die Keimung bzw. Dormanz haben, wurden synchronisierte Samen der *JAM2*- und *AHR11*-Linien sowie *pATHB6::LUC* auf $MS_{0,5 \times \text{Zucker}}$ -Medium ohne oder mit steigenden Konzentrationen an exogener ABA bzw. Sorbit ausgebracht. Mit dem Osmotikum Sorbit sollte Stress durch Wassermangel simuliert werden. Nach zwei Tagen Stratifikation der gequollenen Samen bei 4 °C und Inkubation über drei Tage bei 22 °C sowie Dauerlicht wurde die Keimungsrate bestimmt.

Die *AHR11*-Überexpressions-Linien, *ahr11* und d476 wiesen auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium eine Keimungsrate von 98,7–100 % auf und zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Keimungsrate von *pATHB6::LUC* (99,4 %, $p > 0,05$; Abbildung 40, a und b). Huang (2014) beobachtete fünf Wochen nach der Ernte des *ahr11*-Saatguts nur eine Keimungsrate von 65 %. Eine erhöhte Dormanz für *ahr11* konnte hier nach genanntem Zeitraum nicht bestätigt werden.

Zur Bestimmung der relativen Keimungsrate wurde die bestimmte Keimungsrate aller Linien auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium, die zwischen 96–100 % lag, auf 100 % gesetzt und die Keimungsrate unter ABA- oder Sorbit-Einfluss darauf bezogen. *ahr11* wies unter Einfluss von ABA (Abbildung 40, d) eine um bis zu 22 % (1 μ M ABA) geringere relative Keimungsrate als *pATHB6::LUC* auf, die aber nur mit 0,3 μ M ABA signifikant unterschiedlich (10,3 %, ** $p < 0,01$) zur relativen Keimungsrate von *pATHB6::LUC* war. Die *AHR11*-Überexpressionslinien zeigten hingegen einen gegensätzlichen Effekt (Abbildung 40, f) und keimten in Gegenwart von ABA im Medium bis zu 15,5 % (1 μ M ABA) stärker als *pATHB6::LUC*, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die relative Keimungsrate von d476 und *pATHB6::LUC* unter steigenden ABA-Konzentrationen unterschied sich dagegen nicht.

Unter Wassermangel – simuliert durch steigende Sorbitkonzentrationen – wies *ahr11* eine zu *pATHB6::LUC* nahezu vergleichbare relative Keimungsrate auf (Abbildung 40, c). Nur bei einem Wasserpotential von -0,2 MPa ergab sich ein signifikanter Unterschied (* $p < 0,05$) zu *pATHB6::LUC*. Auch die *AHR11*-Überexpressionslinien und d476 verhielten sich unter Wassermangel überwiegend vergleichbar (Abbildung 40, e) zu *pATHB6::LUC*. Erst bei einem Wasserpotential von -1,2 MPa war die relative Keimungsrate um 4,4–23 % höher verglichen mit *pATHB6::LUC*, aber nicht signifikant ($p > 0,05$).

Huang (2014) stellte fest, dass weder in Gegenwart von ABA noch bei Wassermangel durch Mannitzugabe ins Medium die Keimungsreaktion der *ahr11*-Mutante im Vergleich zu *pATHB6::LUC* verändert ist. Dies konnte hier für Wassermangel – jedoch hervorgerufen durch Sorbit – bestätigt und um die Ergebnisse der *AHR11*-Überexpressionslinien und d476 erweitert werden. Abweichend konnte hier ein negativer Einfluss von *AHR11* auf die ABA-bedingte Inhibierung der Keimung gezeigt werden, auch wenn dieser nur als gering zu bewerten ist.

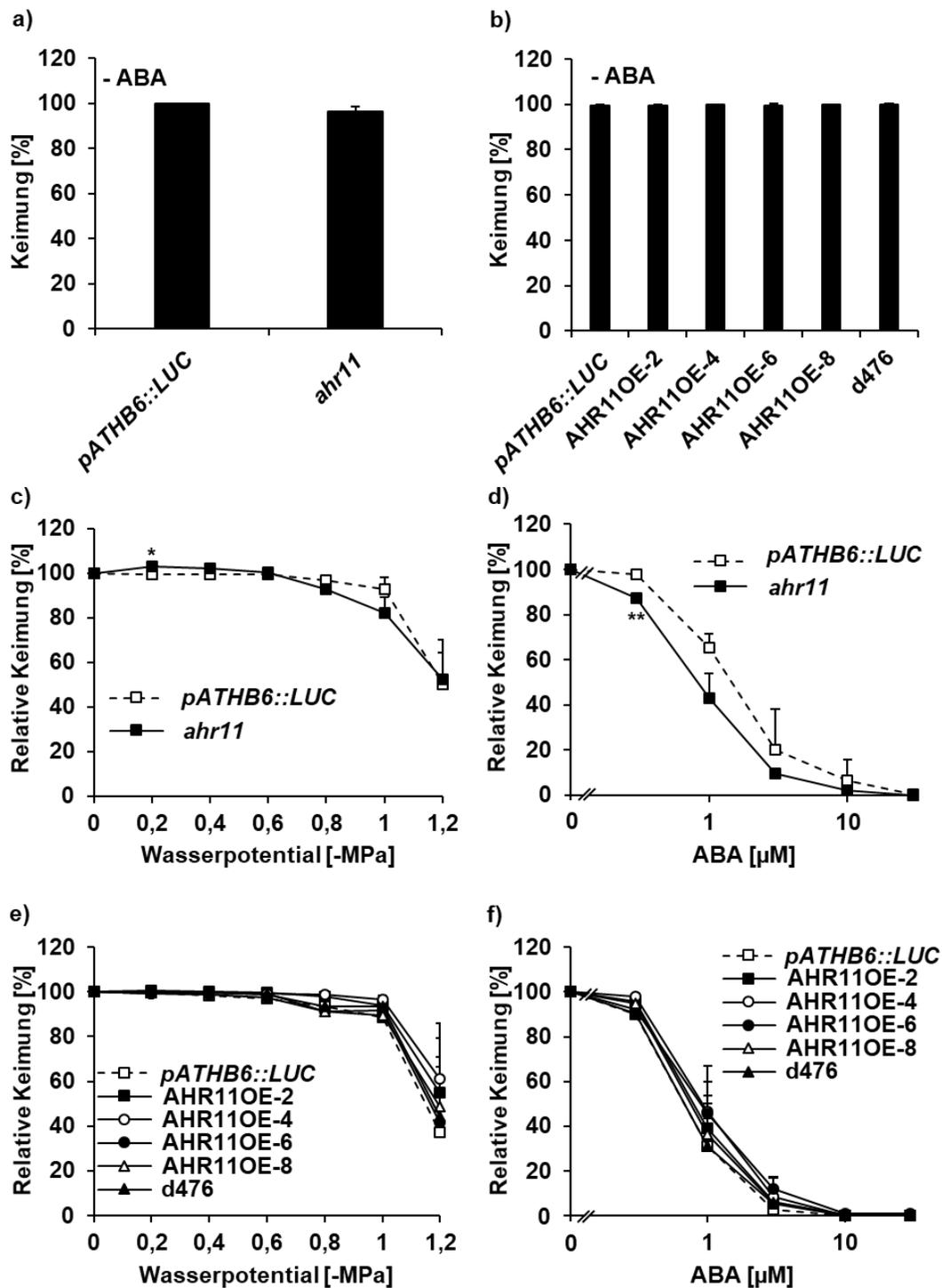


Abbildung 40: Keimung von AHR11-Linien unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA. Die AHR11-Linien und *pATHB6::LUC* wurden auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium ohne Zusatz (a, b), mit steigenden Konzentrationen an Sorbit (c, e) – zur Verringerung des Wasserpotentials – oder ABA (d, f) ausgebracht und für zwei Tage unter Licht und 4 °C stratifiziert. Nach drei weiteren Tagen Inkubation bei 22 °C und Dauerlicht ($60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) wurde die Keimungsrate bestimmt. Die relative Keimungsrate ergibt sich aus dem Verhältnis zur Keimungsrate (96,3–100 %, a und b) auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium ohne Zugabe von Sorbit oder ABA, die auf 100 % gesetzt wurde. Die dargestellten Messpunkte ergeben sich aus dem Mittelwert ($\bar{x} \pm s$) von drei biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten ($n \geq 50$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Die Keimungsrate der *JAM2*-Überexpressionslinien und *jam2* (98,7–100 % bzw. 100 %) auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium war mit der Keimungsrate von *pATHB6::LUC* (100 %) vergleichbar (Abbildung 41, a). Nur *JAM2OE-11* wies eine um 1,2 % signifikant geringere Keimungsrate (* $p < 0,05$) als *pATHB6::LUC* auf. Von einer erhöhten Dormanz durch *JAM2* ist deshalb nicht auszugehen.

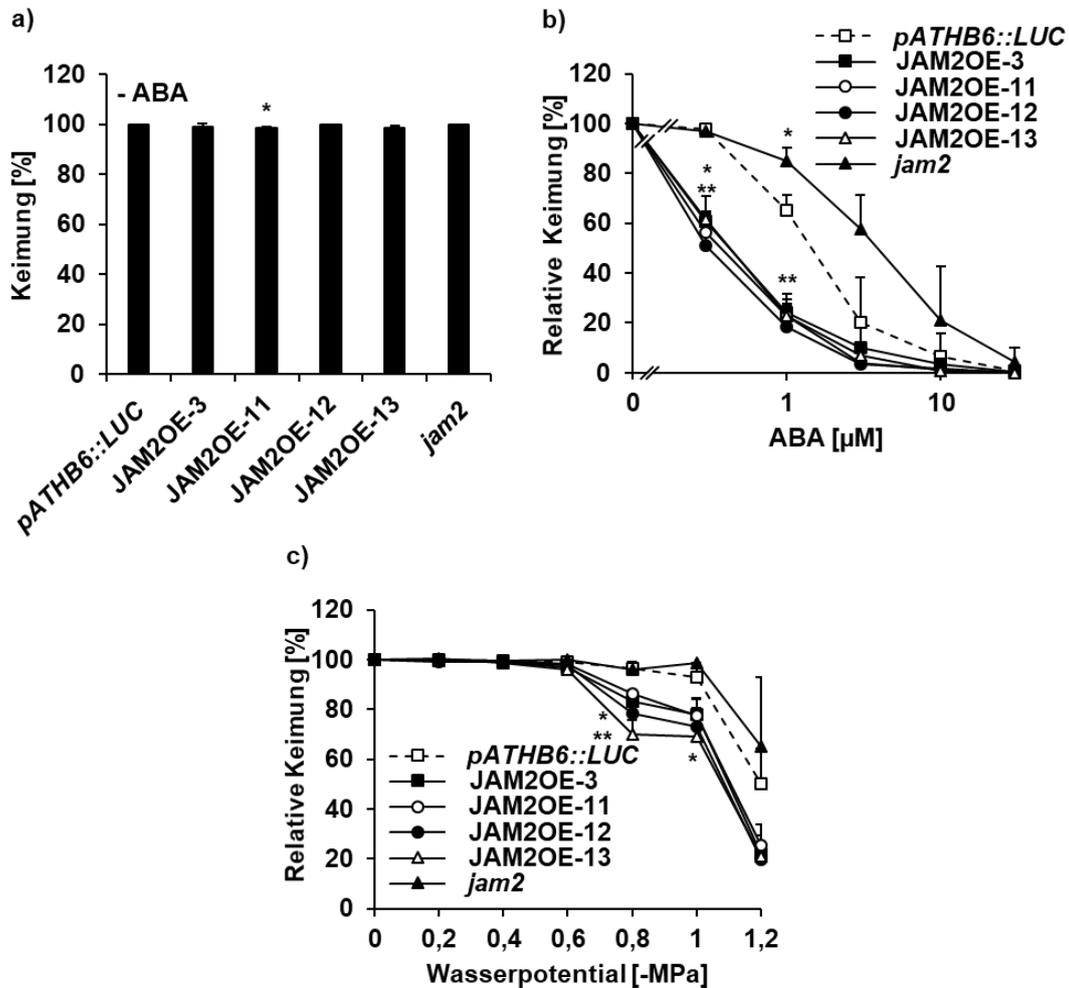


Abbildung 41: Keimung von *JAM2*-Linien unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA. Die *JAM2*-Linien und *pATHB6::LUC* wurden auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium ohne Zusatz (a), mit steigenden Konzentrationen an Sorbit (c) – zur Verringerung des Wasserpotentials – oder ABA (b) ausgebracht und für zwei Tage unter Licht und 4 °C stratifiziert. Nach drei weiteren Tagen Inkubation bei 22 °C und Dauerlicht ($60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) wurde die Keimungsrate bestimmt. Die relative Keimungsrate ergibt sich aus dem Verhältnis zur Keimungsrate (98,7–100 %, a) auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium ohne Zugabe von Sorbit oder ABA, die auf 100 % gesetzt wurde. Die dargestellten Messpunkte ergeben sich aus dem Mittelwert ($\bar{x} \pm s$) von drei biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten ($n \geq 50$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Die Keimungsrate auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium wurde auch hier für alle Linien auf 100 % gesetzt und die auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium mit ABA oder Sorbit bestimmte Keimungsrate darauf bezogen (Abbildung 41, b und c). Die *JAM2*-Überexpressionslinien wiesen bei einem Wasserpotential von -1,2 bis -0,8 MPa oder in Gegenwart von 0,3–30 μ M ABA eine geringere relative Keimungsrate auf als *pATHB6::LUC*. *jam2* hingegen zeigte bei einem Wasserpotential

von -1,2 bis -1 MPa oder 0,3–30 μM ABA eine höhere relative Keimungsrate. Die relative Keimungsrate war bei -1 MPa (* $p < 0,05$ für JAM2OE-12) und -0,8 MPa (* $p < 0,05$ für JAM2OE-3, -12 und -13; ** $p < 0,01$ für JAM2OE-11) bzw. 0,3 μM ABA (* $p < 0,05$ für JAM2OE-11, -12, -13; ** $p < 0,01$ für JAM2OE-3) und 1 μM ABA (* $p < 0,05$ für JAM2-Überexpressionslinien; ** $p < 0,01$ für *jam2*) sogar signifikant unterschiedlich zu *pATHB6::LUC*. Für JAM2 konnte damit kein Einfluss auf die Dormanz gezeigt werden, wohl aber ein positiver Einfluss auf die durch ABA- bzw. Wassermangel-bedingte Inhibierung der Keimung.

2.5.2 Wurzelwachstum

Um zu testen, ob *AHR11* oder *JAM2* einen generellen Effekt auf das Wurzelwachstum haben bzw. ABA oder Wassermangel einen *AHR11*- bzw. *JAM2*-bedingten Effekt auf das Wurzelwachstum hervorrufen können, wurde ein Wurzelwachstums-Versuch durchgeführt. Dazu wurden vier Tage alte Keimlinge der *AHR11*- und *JAM2*-Linien auf $\text{MS}_{0,5\text{xZucker}}$ -Medium ohne oder mit steigenden Konzentrationen an ABA bzw. Sorbit umgesetzt und für weitere drei Tage unter Dauerlicht bei 22 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Wurzelzuwachs ausgemessen. Auch hier wurde wie schon im Keimungs-Versuch Sorbit zur Simulierung von Wassermangel verwendet. Da der Reiz des Wassermangels nur über die Wurzel der Keimlinge wahrgenommen werden sollte, wurden das Hypokotyl und die Kotyledonen auf Parafilm aufgelegt.

Das Wurzelwachstum von *ahr11* wurde bereits von Huang (2014) untersucht. Sie stellte fest, dass *ahr11* unter Kontrollbedingungen im Gegensatz zu *pATHB6::LUC* eine um 0,6–0,9 mm längere Wurzel aufweist. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. In dem hier gezeigten Versuch (Abbildung 42, a) weist *ahr11* eine um 4,36 mm signifikant (** $p < 0,01$) kürzere Wurzel als *pATHB6::LUC* auf. Die Exposition gegenüber steigenden Konzentrationen an ABA (Abbildung 42, b) führte für beide Linien zunächst zu einer Förderung des Wurzelwachstums (0,3 μM ABA) und dann zu einer vergleichbaren Reduzierung (> 1 μM ABA) des Wurzelwachstums, das auch den Beobachtungen von Huang (2014) entspricht. Unter Wassermangel (Abbildung 42, c) – simuliert durch steigende Sorbit-Konzentrationen – weist *ahr11* ein um 11–24 % höheres Wurzelwachstum als *pATHB6::LUC* auf, das bei einem Wasserpotential von -0,4 MPa sogar signifikant (* $p < 0,05$) ist. Das Verhalten von *ahr11* auf Wassermangel ist gegensätzlich zu den Beobachtungen von Huang (2014). Sie stellte ein signifikant hypersensitives Verhalten von *ahr11* auf Wassermangel fest.

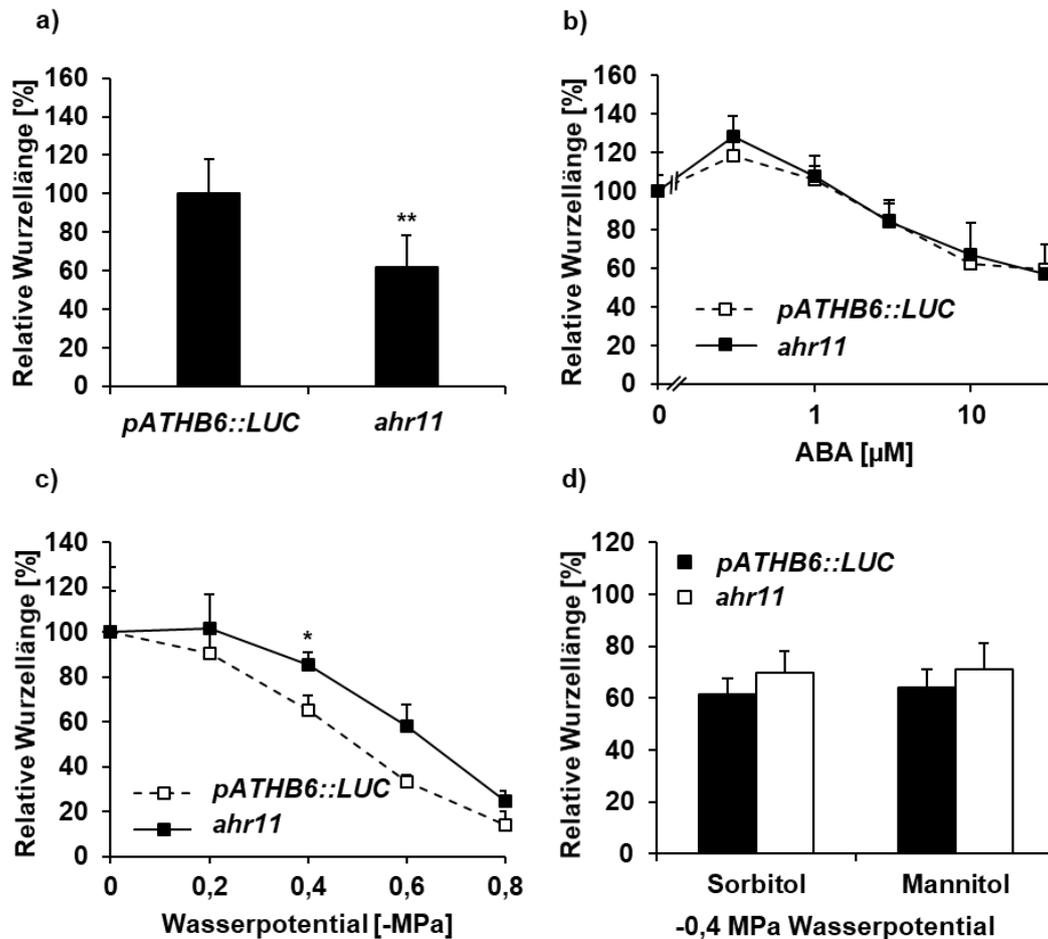


Abbildung 42: Relatives Wurzelwachstum von *ahr11* unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA. Vier Tage alte Keimlinge (Stratifikation bei 4 °C für zwei Tage; Keimung bei 22 °C und Dauerlicht ($60 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$)) von *pATHB6::LUC* und *ahr11* wurden auf $\text{MS}_{0,5\text{xZucker}}$ -Medium ohne (a) oder mit ABA bzw. Sorbit (c, d) oder Mannit (d) umgesetzt und für weitere drei Tage unter Dauerlicht bei 22 °C inkubiert. Der Zusatz von Sorbit bzw. Mannit wurde zur Simulation von Wassermangel verwendet. Das Hypocotyl und die Kotyledonen wurden auf Sorbit- oder Mannit-haltigem Medium auf Parafilm aufgelegt, damit der Reiz des simulierten Wassermangels nur über die Wurzel erfolgt. Die Dokumentation des Wurzelwachstums erfolgte mit dem HP Scanjet G4050 und das Ausmessen der Wurzellänge mit dem Programm ImageJ 1.48v. Die dargestellten Daten ergeben sich aus dem Mittelwert ($\pm s$) von drei (b, c, d) bzw. sechs (a) biologischen Replikaten mit jeweils $17 \leq n \leq 23$ Wurzeln. Die Wurzellänge von *pATHB6::LUC* (a, $11,46 \pm 2,02$ mm) auf $\text{MS}_{0,5\text{xZucker}}$ -Medium wurde auf 100 % gesetzt und die Wurzellänge von *ahr11* darauf bezogen bzw. die Wurzellänge beider Linien (b, *pATHB6::LUC* $11,61 \pm 0,95$ mm, *ahr11* $7,80 \pm 1,54$ mm; c, *pATHB6::LUC* $10,29 \pm 1,92$ mm, *ahr11* $6,25 \pm 1,82$ mm; d, *pATHB6::LUC* $12,59 \pm 1,16$ mm, *ahr11* $8,12 \pm 3,14$ mm) auf $\text{MS}_{0,5\text{xZucker}}$ -Medium wurde auf 100 % gesetzt und die jeweilige Wurzellänge auf $\text{MS}_{0,5\text{xZucker}}$ -Medium mit ABA, Sorbit oder Mannit darauf bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Im Versuch von Huang (2014) wurde Wassermangel über Mannit simuliert. In den letzten Jahren stellte sich aber heraus, dass Mannit von spezifischen Rezeptoren wahrgenommen werden kann, die einen Einfluss auf die Wachstumshemmung haben. Mannit wird oftmals von Pilzen abgegeben und induziert deshalb neben osmotischem Stress auch biotischen Stress (Claeys et al. 2014; Trontin et al. 2014). Um auszuschließen, dass das unterschiedliche Verhalten auf die Simulation des Wassermangels mit Mannit bzw. Sorbit zurückzuführen ist, wurde der Versuch für ein Wasserpotential von -0,4 MPa mit Mannit bzw. Sorbit (Abbildung 42, d) wiederholt. Dabei zeigte sich, dass sowohl Mannit als auch Sorbit zu einem etwa 7–8 % höheren Wurzelwachstum von *ahr11* im Vergleich zu *pATHB6::LUC* führt. Die Ergebnisse von Huang (2014) konnten somit nur in der Hinsicht bestätigt werden, dass das Wurzelwachstum von *ahr11* durch ABA nicht beeinflusst wird. Die Mutante *ahr11* zeigte hier unter Kontrollbedingungen ein wesentlich geringeres Wurzelwachstum als *pATHB6::LUC* und Wassermangel führte zu einer insensitiven Reaktion des Wurzelwachstums von *ahr11*.

Für die *AHR11*-Überexpressionslinien und d476 wurde noch kein Effekt auf das Wurzelwachstum beschrieben. Die *AHR11*-Überexpressionslinien und d476 wiesen unter Kontrollbedingungen (Abbildung 43, a) eine 0,40–1,61 mm bzw. 0,76 mm kürzere Wurzel als *pATHB6::LUC* auf. Das Ergebnis war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Unter ABA-Exposition (3 μ M ABA; Abbildung 43, b) reduzierte sich das Wurzelwachstum der *AHR11*-Überexpressionlinien um 35–37 % und für d476 um 23 %. Jedoch waren auch diese Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle *pATHB6::LUC*, die selber eine Reduktion des Wurzelwachstums um 39 % aufwies. Ähnliche Resultate wurden unter Wassermangel (Abbildung 43, c) erzielt. Auch hier zeigten die *AHR11*-Überexpressionslinien und d476 keinen signifikanten Unterschied im Wurzelwachstum zu *pATHB6::LUC*. Den hier dargestellten Ergebnissen zu Folge zeigt *AHR11* sowohl keinen generellen Einfluss auf das Wurzelwachstum als auch keinen durch ABA oder Wassermangel hervorgerufenen Effekt. Der in der Mutante *ahr11* beobachtete generelle Einfluss auf das Wurzelwachstum und das in Verbindung mit Sorbit gezeigte insensitive Wurzelwachstum können nicht direkt auf die Funktion von *AHR11* zurückgeführt werden.

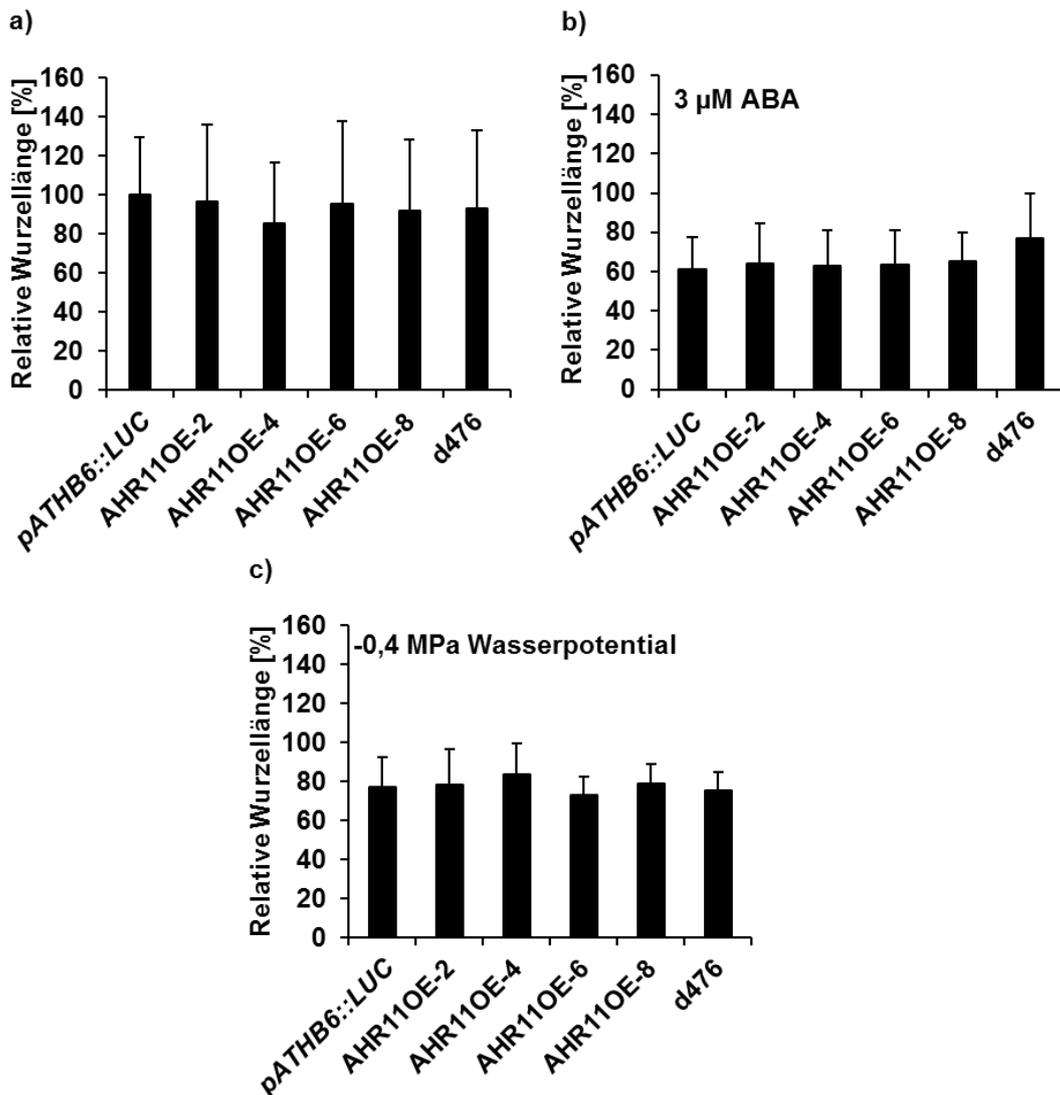


Abbildung 43: Relatives Wurzelwachstum von AHR11-Überexpressionslinien und d476 unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA. Die Bestimmung der relativen Wurzellänge erfolgte wie zuvor in Abbildung 42 beschrieben. Für die Analyse wurden Keimlinge der AHR11-Überexpressionslinien, von d476 und pATHB6::LUC auf MS_{0,5xZucker}-Medium ohne (a) oder mit ABA (b) bzw. Sorbit (c) umgesetzt. Die dargestellten Daten ergeben sich aus dem Mittelwert ($\pm s$) von drei biologischen Replikaten mit jeweils $15 \leq n \leq 22$ Wurzeln. Die Wurzellänge von pATHB6::LUC (a, $11,14 \pm 3,27$ mm) auf MS_{0,5xZucker}-Medium wurde auf 100 % gesetzt und die Wurzellänge der AHR11-Überexpressionslinien und d476 darauf bezogen bzw. die Wurzellänge aller Linien (b und c, pATHB6::LUC $11,14 \pm 3,27$ mm, AHR11OE-2 $10,76 \pm 4,35$ mm, AHR11OE-4 $9,53 \pm 3,41$ mm, AHR11OE-6 $10,64 \pm 4,72$ mm, AHR11OE-8 $10,23 \pm 4,05$ mm, d476 $10,38 \pm 4,39$ mm) auf MS_{0,5xZucker}-Medium wurde auf 100 % gesetzt und die jeweilige Wurzellänge auf MS_{0,5xZucker}-Medium mit ABA oder Sorbit darauf bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Nachdem eine physiologische Relevanz von JAM2 auf die Keimung gezeigt wurde, sollte nun untersucht werden, ob JAM2 auch einen Einfluss auf das Wurzelwachstum hat. Unter Kontrollbedingungen (Abbildung 44, a) wiesen die JAM2-Überexpressionslinien und jam2 ein nicht signifikant unterschiedliches Wurzelwachstum im Vergleich zu pATHB6::LUC auf.

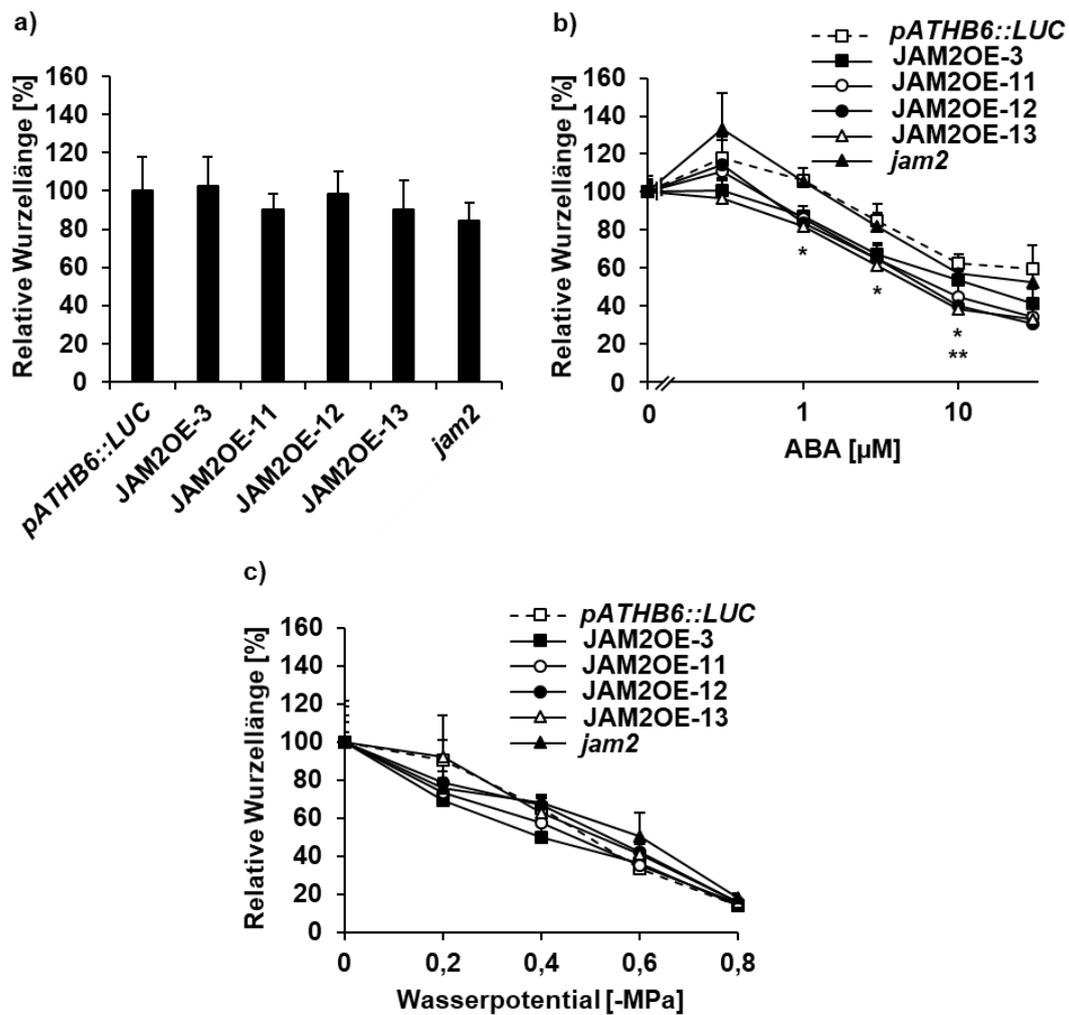


Abbildung 44: Relatives Wurzelwachstum von *JAM2*-Überexpressionslinien und *jam2* unter Stress durch Wassermangel oder in Gegenwart von ABA. Die Bestimmung der relativen Wurzellänge erfolgte wie zuvor in Abbildung 42 beschrieben. Die dargestellten Daten ergeben sich aus dem Mittelwert (\pm s) von drei (b und c) bzw. sechs (a) biologischen Replikaten mit jeweils $11 \leq n \leq 26$ Wurzeln. Die Wurzellänge von *pATHB6::LUC* (a, $11,46 \pm 2,02$ mm) auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium wurde auf 100 % gesetzt und die Wurzellänge der *JAM2*-Überexpressionslinien und *jam2* (a) darauf bezogen bzw. die Wurzellänge der jeweiligen Linien (b, *pATHB6::LUC* $11,61 \pm 0,96$ mm, *JAM2OE-3* $12,50 \pm 0,70$ mm, *JAM2OE-11* $10,84 \pm 0,50$ mm, *JAM2OE-12* $11,47 \pm 0,76$ mm, *JAM2OE-13* $11,49 \pm 0,30$ mm, *jam2* $10,04 \pm 0,59$ mm; c, *pATHB6::LUC* $10,29 \pm 1,92$ mm, *JAM2OE-3* $11,52 \pm 1,63$ mm, *JAM2OE-11* $11,01 \pm 0,27$ mm, *JAM2OE-12* $10,55 \pm 0,58$ mm, *JAM2OE-13* $10,12 \pm 2,20$ mm, *jam2* $9,05 \pm 0,93$ mm) auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium wurde auf 100 % gesetzt und die jeweilige Wurzellänge auf $MS_{0,5xZucker}$ -Medium mit ABA (b) oder Sorbit (c) darauf bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Unter Exposition gegenüber $0,3 \mu\text{M}$ ABA (Abbildung 44, b) konnte für die *JAM2*-Überexpressionslinien, *jam2* und *pATHB6::LUC* zunächst ein Anstieg des relativen Wurzelwachstums verzeichnet werden. Das relative Wurzelwachstum der *JAM2*-Überexpressionslinien lag aber insgesamt um 3–21 % unterhalb und das von *jam2* 15 % oberhalb des relativen Wurzelwachstums von *pATHB6::LUC* ($p > 0,05$). Eine Erhöhung der ABA-Konzentration führte zu einer Verringerung des Wurzelwachstums aller Linien. Wobei die *JAM2*-Überexpressionslinien ein zum Teil signifikant geringeres relatives Wurzelwachstum (9–29 %; * $p < 0,05$ für *JAM2OE-11*, -12 und -13 bei $1 \mu\text{M}$ ABA; * $p < 0,05$ für *JAM2OE-13* bei $3 \mu\text{M}$ ABA; * $p < 0,05$ für *JAM2OE-12*

und ** $p < 0,01$ JAM2OE-13 bei 10 μM ABA) als *pATHB6::LUC* aufwiesen. Das relative Wurzelwachstum von *jam2* war hingegen vergleichbar zu *pATHB6::LUC*. Unter Wassermangel (Abbildung 44, c) zeigten weder die JAM2-Überexpressionslinien noch *jam2* ein zu *pATHB6::LUC* signifikant unterschiedliches Wurzelwachstum. JAM2 hat den Ergebnissen zu Folge weder einen generellen Einfluss auf das Wurzelwachstum noch einen Einfluss in Zusammenhang mit Wassermangel, JAM2 erhöht aber womöglich in geringem Maß die Empfindlichkeit gegenüber exogener ABA.

2.6 Funktionelle Einordnung von JAM2 in den ABA-Signalweg

Nachdem JAM2 eine ABA-abhängige Aktivierung des ABA-Reportersystems in Protoplasten auslösen konnte, einen positiven Einfluss auf die ABA-abhängige Inhibierung der Keimung hatte, einen geringen Einfluss auf die ABA-vermittelte Inhibierung des Wurzelwachstums zeigte und zudem den ABA-abhängigen Reporter in transgenen Keimlingen induzieren konnte, sollte geklärt werden, an welcher Stelle JAM2 im ABA-Signalweg einzuordnen ist. Als Grundlage für die Einordnung diene die von Raghavendra et al. (2010) beschriebene ABA-Signalkaskade.

2.6.1 Interaktion zwischen JAM2 und den RCARs

Das oberste Glied in der ABA-Signalkaskade ist der ABA-Rezeptorkomplex, der aus einem RCAR und einer PP2C der Gruppe A geformt wird (Raghavendra et al. 2010). Da Aleman et al. (2016) eine Interaktion zwischen dem JAM2-verwandten MYC2 mit der ABA-Rezeptorkomponente RCAR9 zeigen konnten, stellte sich die Frage, ob JAM2 oder eines der beiden anderen JAMs ebenfalls mit RCAR9 interagieren kann. Daraufhin wurde ein Y2H mit den JAMs und RCAR9 durchgeführt. Als Kontrolle wurde die MYC2-RCAR9-Interaktion mitgeführt. Die Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 80, a) dargestellt. Die Interaktion zwischen MYC2 und RCAR9 konnte bestätigt werden (Abbildung 45, a). Ein erst nach zehn Tagen auftretendes Wachstum der Hefen auf -L-W-H ohne Zugabe von ABA konnte nicht bestätigt werden. Eine Interaktion von MYC2 und RCAR9 konnte hier bereits nach drei Tagen Inkubation gezeigt werden. Unter Zugabe von 10 μM ABA ergab sich lediglich ein stärkeres Wachstum der Hefen. Zwischen MYC2 und RCAR8 konnte wie schon bei Aleman et al. (2016) keine Interaktion gezeigt werden. Die Interaktionsanalyse zwischen den JAMs und RCAR9 ergab sowohl ohne als auch mit Zugabe von ABA keine Interaktion. Auch zu RCAR8 zeigte keines der JAMs eine Interaktion. Um zu überprüfen, ob JAM2 vielleicht zu einem der anderen RCARs eine Interaktion zeigt, wurde der Y2H mit den zwölf verbleibenden RCARs wiederholt. Die

Wachstumskontrolle (-L/-W) ist im Anhang (Abbildung 80, b) dargestellt. JAM2 zeigte aber auch mit den verbleibenden zwölf RCARs keine Interaktion (Abbildung 45, b). Die Interaktion mit einem RCAR scheint somit spezifisch für MYC2 zu sein. JAM2 kann den Ergebnissen zu Folge nicht über eine direkte Interaktion zu den RCARs in den ABA-Signalweg eingeordnet werden.

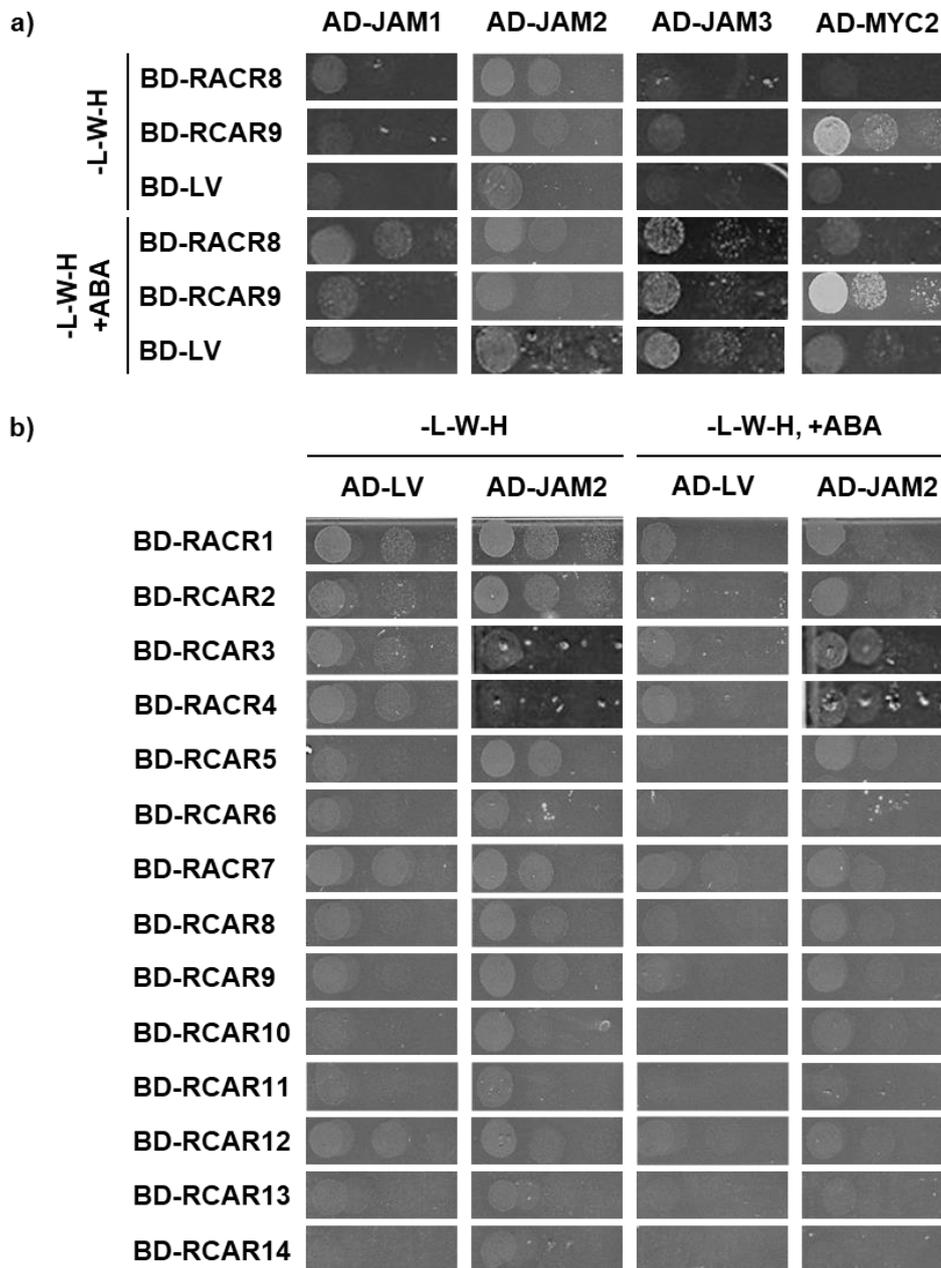


Abbildung 45: Analyse der Interaktion zwischen MYC2/JAMs und RCARs. a) Y2H-Interaktionsanalyse zwischen MYC2/JAMs und RCAR8 bzw. RCAR9. MYC2 bzw. die JAMs wurden für die Interaktionsanalyse mit der AD und die RCARs mit der BD fusioniert. Eine Hefe Einzelkolonie wurde in 100 µl ddH₂O resuspendiert und 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan (-L/-W, Wachstumskontrolle, siehe Abbildung 80 im Anhang) sowie auf SD-Medium zusätzlich ohne Histidin und ABA (-L-W-H, Interaktionstest) bzw. mit 10 µM ABA (-L-W-H, + ABA) aufgetropft und für 3 d bei 30 °C inkubiert. b) Y2H-Interaktionsanalyse zwischen JAM2 und RCARs. Der Versuch erfolgte wie unter a) beschrieben. Der Y2H (a, b) wurde zweimal unabhängig wiederholt.

2.6.2 Einfluss von SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6 auf die JAM2-vermittelte ABA-Antwort

Die Pflanzen-spezifischen Serin/Threonin-Kinasen der SnRK2-Familie lassen sich laut Kulik et al. (2011) in drei Gruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe zählen Kinasen, die nicht durch ABA aktiviert werden, zur Zweiten zählen Kinasen, die nicht oder wenig durch ABA aktiviert werden, und zur Dritten zählen Kinasen, die stark durch ABA aktiviert werden. Die dritte Gruppe umfasst SRK2D/SnRK2.2, SRK2I/SnRK2.3 sowie SRK2E/OST1/SnRK2.6 und wird über die PP2Cs der ABA-Signalkaskade negativ reguliert. Die Aktivierung der Kinase-Funktion der drei SnRK2s kommt durch eine ABA-vermittelte Inaktivierung der PP2Cs zustande und führt zu einer Aktivierung der nachfolgenden ABFs (Raghavendra et al. 2010). Um zu testen, ob die SnRK2s der Gruppe drei einen Einfluss auf die JAM2-vermittelte Aktivierung der ABA-Antwort haben, wurde das ABA-Reportersystem zusammen mit JAM2 in Protoplasten von *SnRK2*-Doppel-Knockouts (*snrk2.2/snrk2.3*, *snrk2.2/snrk2.6*, *snrk2.3/snrk2.6*) angewendet. Die Triple-Mutante aus *snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6* konnte für Protoplasten-Experimente nicht verwendet werden, da sich zu wenig Saatgut ergab.

Die transiente Expression von JAM2 in *snrk2.2/snrk2.3*, *snrk2.2/snrk2.6* und *snrk2.3/snrk2.6* führte ohne exogene Zugabe von ABA zu keiner JAM2-spezifischen Aktivierung der ABA-Antwort (Abbildung 46, a, c und e). Die Induktion durch JAM2 war überwiegend vergleichbar mit der des LV. 10 µg Effektor-DNA von JAM2 führten schließlich in *snrk2.2/snrk2.6* und *snrk2.3/snrk2.6* zu einer 51 % bzw. 10 % geringeren Induktion der ABA-Antwort als der LV und in *snrk2.2/snrk2.3* nur zu einer 1,3-fach höheren Induktion der ABA-Antwort als der LV. Durch Zugabe von ABA kam es in *snrk2.2/snrk2.3* und *snrk2.3/snrk2.6* zu einer JAM2-vermittelten Aktivierung der ABA-Antwort (Abbildung 46, b und f), die unabhängig von der Menge an eingesetzter Effektor-DNA immer 2- bis 5-fach höher als die durch den LV ausgelöste ABA-Antwort war. In *snrk2.2/snrk2.6* konnte durch Zugabe von ABA auch eine JAM2-vermittelte Aktivierung der ABA-Antwort ausgelöst werden (Abbildung 46, d), jedoch war diese im Vergleich zu ABA-Antwort in *snrk2.2/snrk2.3* und *snrk2.3/snrk2.6* um 75 % geringer. SnRK2.3 scheint demzufolge keine wesentliche Rolle für die JAM2-vermittelte Aktivierung der ABA-Antwort zu spielen. Jedoch reicht die alleinige Anwesenheit von SnRK2.2 oder SnRK2.6 aus, um eine JAM2-vermittelte Aktivierung der ABA-Antwort auszulösen.

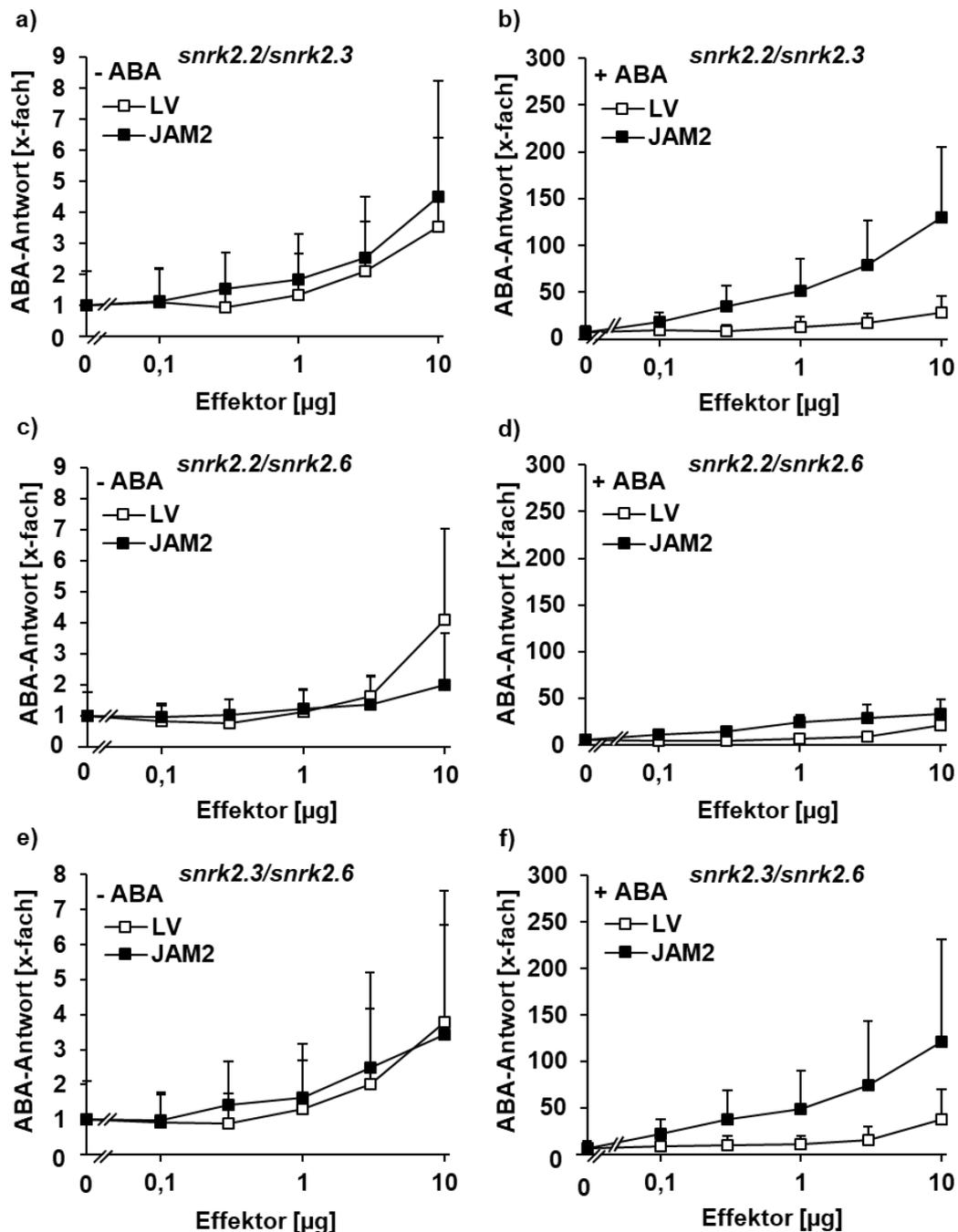


Abbildung 46: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch JAM2 in *snrk2*-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und steigenden Mengen an Effektor (*p35S::JAM2*; *p35S::MCS*, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne (a, c, e) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b, d, f) für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und Effektor (a und b, 4,4 kCPS/RFU; c und d, 4,2 kCPS/RFU; e und f 3,3 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

2.6.3 Einfluss der ABFs auf die JAM2-vermittelte ABA-Antwort

Das unterste Glied in der ABA-Signalkaskade bilden die ABFs, die zur Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren gehören. Sie werden durch die Phosphorylierung der SnRK2s aktiviert und leiten die ABA-induzierte Genexpression ein (Raghavendra et al. 2010). Aufgrund der positiven Wirkung von JAM2 auf die ABA-Antwort und die Abhängigkeit von SnRK2.2 und SnRK2.6, stellte sich die Frage, ob JAM2 eine gleichwertige Position neben den ABFs einnimmt. Von den fünf ABFs wirken vorwiegend ABF1–ABF4 auf die ABA-induzierte Genexpression (Yoshida et al. 2015). Um zu überprüfen, ob JAM2 eine gleichwertige Position zu den ABFs einnimmt, wurde Effektor-DNA von JAM2 zusammen mit dem ABA-Reporter-system in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten eingebracht. Dabei zeigte sich, dass JAM2 in den *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten keine ABA-Antwort auslösen kann (Abbildung 47, a). Mit 10 µg Effektor-DNA von JAM2 kam es nur zu einer 2-fachen Induktion der Reporteraktivität. Die Induktion von JAM2 entsprach zudem der durch den LV ausgelösten Reporteraktivität. Auch die Zugabe von exogener ABA führte zu keiner Induktion der JAM2-bedingten ABA-Antwort in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten. Die Reporteraktivität ausgelöst durch JAM2 oder den LV mit exogener ABA war vergleichbar mit der Reporteraktivität ohne ABA-Zugabe (Abbildung 47, b). Die in den *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten vorhandenen ABFs ABF1 und ABI5 scheinen für die JAM2-bedingte ABA-Antwort nicht entscheidend zu sein, aber ABF2, ABF3 und ABF4 oder auch nur eine der drei ABFs. JAM2 nimmt somit keine gleichwertige Position zu den ABFs in der ABA-Signalkaskade ein.

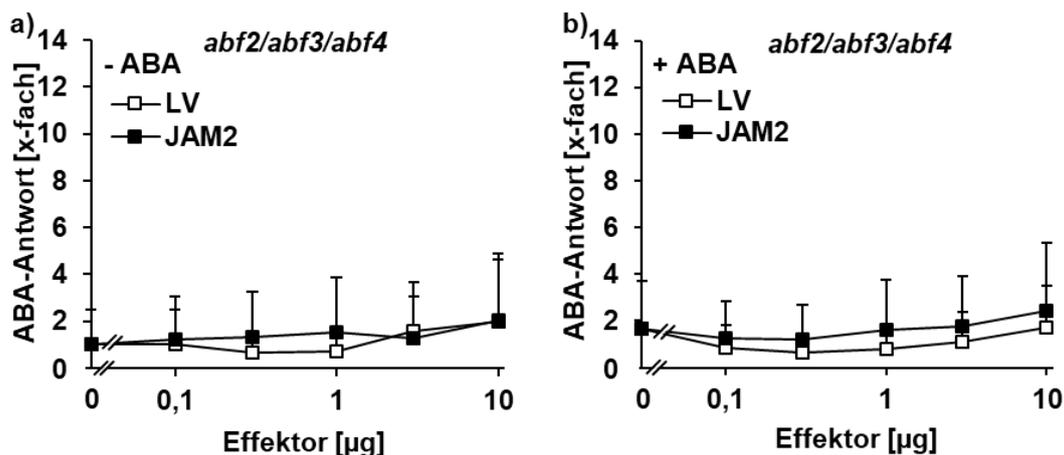


Abbildung 47: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch JAM2 in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und steigenden Mengen an Effektor (*p35S::JAM2*; *p35S::MCS*, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne (a) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und Effektor (a und b, $1,8 \text{ kCPS/RFU}$) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Um herauszufinden, ob eine oder alle der drei ABFs für die JAM2-bedingte ABA-Antwort notwendig sind, wurde der Versuch in Einzel-Knockouts von *ABF2-4* wiederholt. Dabei zeigte sich auch hier, dass ohne exogene Zugabe von ABA JAM2 in den *ABF*-Single-Knockouts (Abbildung 48, a, c und e) wie zuvor auch in den *SnRK2*-Doppel-Knockouts und in der *ABF*-Triple-Knockout keine ABA-Antwort auslösen kann. 10 µg der Effektor-DNA von JAM2 führten in *abf3*-Protoplasten zu keiner höheren Reporteraktivität als der LV. In *abf2*- und *abf4*-Protoplasten lösten 10 µg der Effektor-DNA von JAM2 zwar eine 2,1- bis 11-fach höhere Reporteraktivität als der LV aus, die Standardabweichung war für diesen Messpunkt aber auch relativ hoch. Durch die Zugabe von ABA konnte in *abf2*- und *abf4*-Protoplasten jedoch nicht in *abf3*-Protoplasten eine JAM2-bedingte ABA-Antwort ausgelöst werden (Abbildung 48, b, d und f). Mit 10 µg Effektor-DNA von JAM2 wurde in *abf2*- und *abf4*-Protoplasten eine 4,6-fach bzw. 6,9-fach höhere Reporteraktivität induziert als durch den LV. In *abf3*-Protoplasten war die durch JAM2 ausgelöste Reporteraktivität vergleichbar mit der des LV. Für die JAM2-bedingte ABA-Antwort sind somit nicht alle drei ABFs essentiell, sondern nur ABF3.

Aufgrund der Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass JAM2 nicht wie die ABFs direkt einen Einfluss auf den ABA-Signalweg hat, sondern über eine Interaktion zu ABF3 eine fördernde Funktion auf den ABA-Signalweg ausübt. Die Vermutung wurde über Interaktionsstudien im P2H überprüft. Dabei wurde nicht nur eine mögliche Interaktion zu ABF3 überprüft, sondern auch zu den vier weiteren ABFs. Der P2H wurde in *aba2-1*-Protoplasten durchgeführt, um gleichzeitig Effekte von geringen endogenen ABA-Gehalten auf eine mögliche Interaktion untersuchen zu können. Ohne exogene ABA zeigte JAM2 im P2H keine Interaktion mit ABF2, ABF3 und ABF4 und nur eine geringe Interaktion mit ABF1 und ABI5 (Abbildung 49, a). Die Reporteraktivität zwischen JAM2-VP16 und LV-VP16 mit GAL4BD-ABF2, GAL4BD-ABF3 oder GAL4BD-ABF4 unterschied sich nur gering (0,9- bis 2,0-fach). Mit GAL4BD-ABF1 und GAL4BD-ABI5 zeigte JAM2-VP16 eine 2,6- bis 2,7-fach höhere Reporteraktivität als LV-VP16. Jedoch sind die Ergebnisse für JAM2-VP16 und GAL4BD-ABF1 bzw. GAL4BD-ABI5 mit Vorsicht zu betrachten, da JAM2-VP16 auch mit GAL4BD-LV eine 2,5-fach höhere Reporteraktivität als LV-VP16 mit GAL4BD-LV auslöste. Des Weiteren wiesen die GAL4BD-ABF-Konstrukte mit LV-VP16 eine 1,4- bis 6,9-fach höhere Reporteraktivität auf als GAL4BD-LV mit LV-VP16, was auch für eine Autoaktivität seitens der ABFs spricht. Mit exogener ABA zeigten die ABFs eine deutliche Zunahme der Autoaktivität (Abbildung 49, b). Die Reporteraktivität war in der Kombination GAL4BD-ABF und LV-VP16 bei ABA-Zugabe 11- bis 57-fach höher als ohne ABA-Zugabe. JAM2-VP16 führte im Vergleich zu LV-VP16 mit exogener ABA zu einer 2,2- bis 3,4-fachen Steigerung der Reporteraktivität mit den GAL4BD-ABF1-4 und zu einer 3,4-fachen Steigerung mit GAL4BD-LV. Die Induktion der Reporteraktivität von GAL4BD-ABI5

mit JAM2-VP16 war 0,9-fach geringer als mit LV-VP16. Eine Interaktion zwischen JAM2 und den ABFs ist anhand des P2H nur für ABF1 und ABI5 zu vermuten.

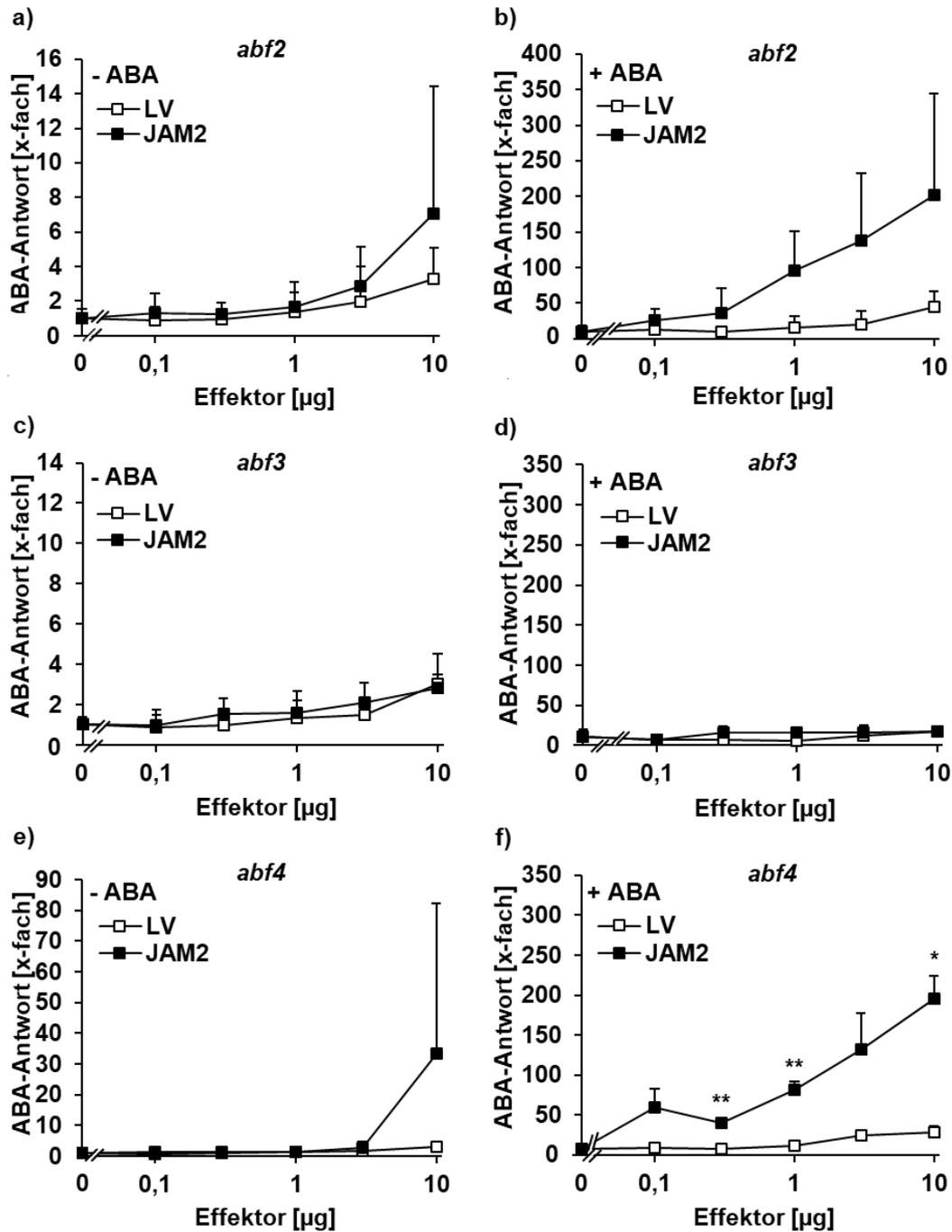


Abbildung 48: Induktion der ABA-abhängigen Genexpression durch JAM2 in *abf*-Protoplasten.

Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und steigenden Mengen an Effektor (*p35S::JAM2*; *p35S::MCS*, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne (a, c, e) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b, d, f) für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert ohne ABA und Effektor (a und b, 1,0 kCPS/RFU; c und d, 1,3 kCPS/RFU; e und f, 1,7 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte in f) zu signifikanten Ergebnissen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Um die Ergebnisse des P2H zu überprüfen, wurde zusätzlich ein Y2H mit JAM2 und den ABFs durchgeführt. Im Y2H zeigte JAM2 keine Interaktion zu den ABFs (Abbildung 49, c). Die Interaktion von JAM2 mit ABF1 und ABI5 aus dem P2H konnte somit nicht bestätigt werden. Auch die Vermutung, dass JAM2 über eine direkte Interaktion mit ABF3 die ABA-Antwort fördert, konnte weder über den P2H noch über den Y2H unterstützt werden.

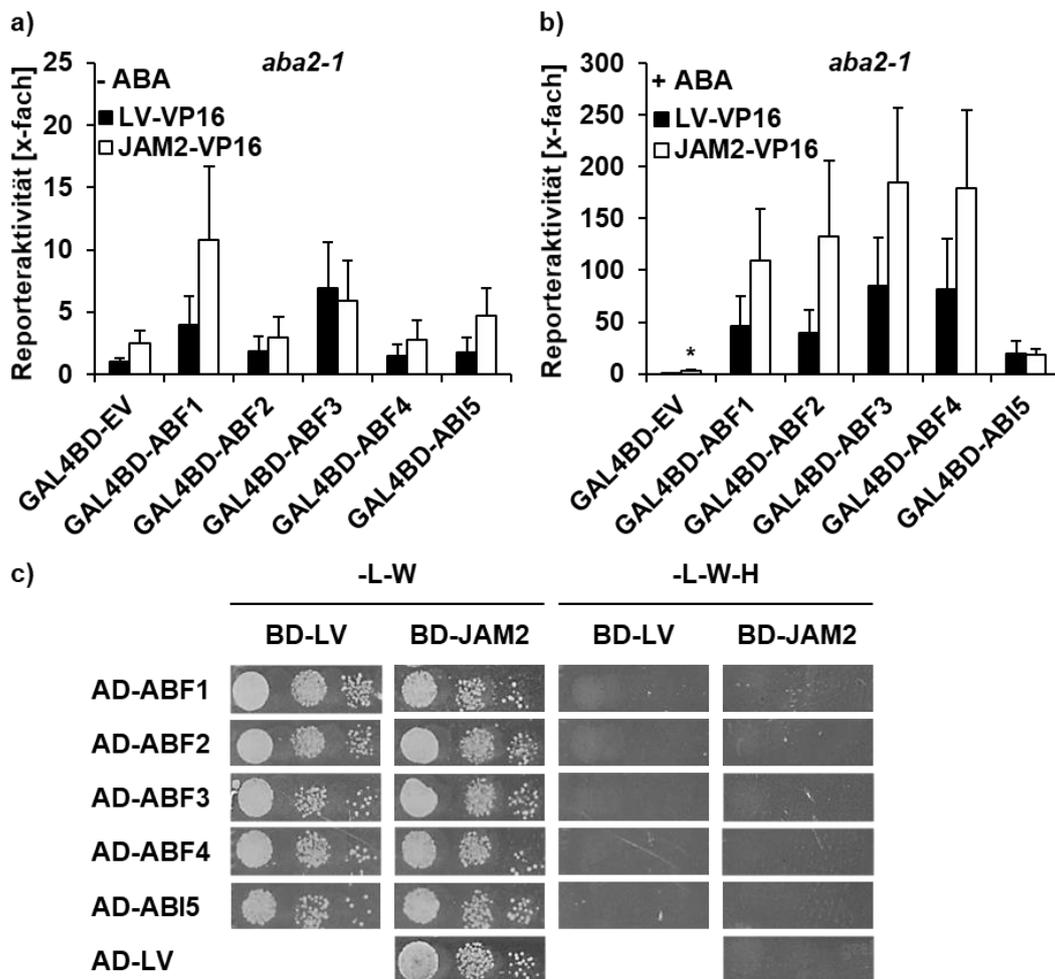


Abbildung 49: Analyse einer JAM2-ABF-Interaktion. a-b) P2H mit JAM2 und den ABFs. *aba2-1*-Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pGAL4_UAS::LUC*, $3 \mu\text{g}$ Effektor-VP16 (*p35S::JAM2-VP16*; *p35S::MCS-VP16*, LV-VP16) und $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-Effektor (*p35S::GAL4BD-ABF*; *p35S::GAL4BD-MCS*, GAL4BD-LV) transformiert und für 16 ± 1 h bei 25°C ohne (a) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-LV und LV-VP16 ohne ABA ($3,2$ kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden mindestens zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte in b) zu einem signifikanten Ergebnis ($* p < 0,05$). c) Y2H-Interaktionsanalyse zwischen JAM2 und den ABFs. JAM2 wurde für die Interaktionsanalyse mit der AD und die ABFs wurden mit der BD fusioniert. Eine Hefe einzelnkolonie wurde in $100 \mu\text{l}$ ddH₂O resuspendiert und 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan (-L/-W, Wachstumskontrolle) sowie auf SD-Medium zusätzlich ohne Histidin (-L/-W-H, Interaktionstest) aufgetropft und für 3 d bei 30°C inkubiert. Der Y2H wurde zweimal unabhängig wiederholt.

Wenn JAM2 die ABA-Antwort über eine direkte oder indirekte Interaktion zu den ABFs fördert, dann sollte die durch JAM2-bedingte ABA-Antwort durch das Einbringen von ABF2, ABF3 oder ABF4 in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten wiederhergestellt werden. Dieser Hypothese wurde mit dem ABA-Reportersystem nachgegangen. Wie schon zuvor wurde Effektor-DNA von JAM2 in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten titriert, nur dass zusätzlich in jeden Ansatz 0,3 µg Effektor-DNA von ABF2, ABF3, ABF4 oder LV zugegeben wurden. Durch die Expression von ABF2, ABF3 und ABF4 ergab sich eine starke Induktion der ABA-Antwort, die durch die Zugabe von ABA noch gesteigert werden konnte (vgl. die in Abbildung 50 angegebenen kCPS/RFU). Jedoch konnte durch die Zugabe von ABF2, ABF3 oder ABF4 in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten keine JAM2-vermittelte Stimulation der ABA-Antwort erzeugt werden (Abbildung 50). Eine JAM2-vermittelte ABA-Antwort über eine direkte oder indirekte Interaktion mit den ABFs scheint demzufolge eher unwahrscheinlich zu sein.

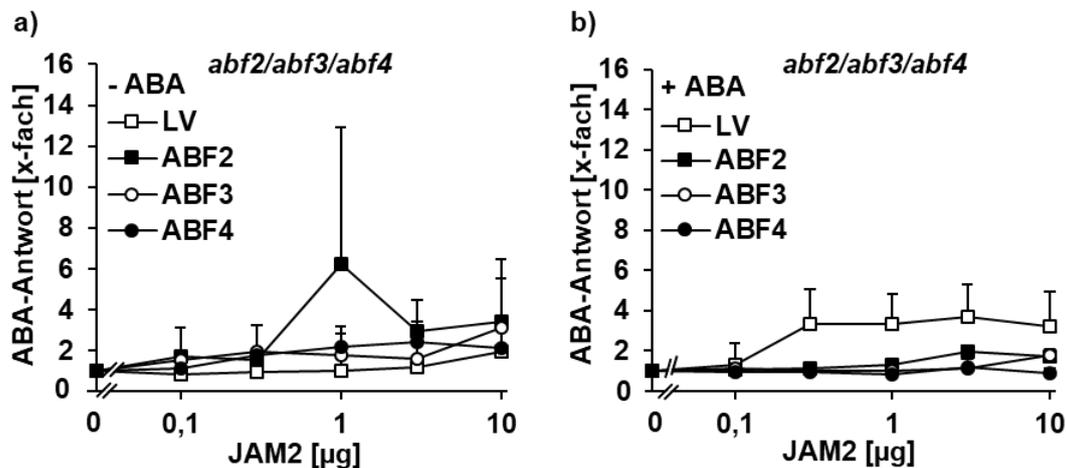


Abbildung 50: Versuch zur Wiederherstellung der JAM2-induzierten ABA-Antwort durch Co-Expression von ABF2, ABF3 oder ABF4 in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten *abf2/abf3/abf4*-Blättern wurden mit $3 \mu\text{g } p35S::GUS$, $4 \mu\text{g } pRD29B::LUC$, $0,3 \mu\text{g}$ Effektor ($p35S::ABF$; $p35S::MCS$, LV) und steigenden Mengen an $p35S::JAM2$ transformiert. Die Protoplasten wurden ohne (a) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) für $16 \pm 1 \text{ h}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit Effektor und ohne $p35S::JAM2$ (a: $0,7 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::MCS$, $17,7 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::ABF2$, $28,0 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::ABF3$, $50,0 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::ABF4$; b: $1,1 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::MCS$, $268,3 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::ABF2$, $723,2 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::ABF3$, $856,3 \text{ kCPS/RFU}$ mit $p35S::ABF4$) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Es stellt sich somit die Frage, ob JAM2 über die Wirkung als Transkriptionsfaktor eine regulatorische Funktion auf die ABA-Antwort ausübt, indem JAM2 zum Beispiel positiv auf die Transkription der ABFs einwirkt. Um dies zu überprüfen, wurde die ABF3-CDS beziehungsweise die ABF3-CDS unter der Kontrolle des endogenen Promotors ($pABF3$) zusammen mit JAM2 und dem ABA-Reportersystem in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten exprimiert. Sowohl ohne als auch mit exogener ABA konnte eine Wiederherstellung der JAM2-vermittelten Induktion der

ABA-Antwort beobachtet werden (Abbildung 51). Mit 10 μg Effektor-DNA von JAM2 und 0,3 μg von *pABF3::ABF3* wurde eine 12- bis 17-fache Steigerung der ABA-Antwort im Vergleich zur Kontrolle ohne JAM2 erzielt. Dies entsprach auch der Steigerung, die zuvor in Col-0-Protoplasten bestimmt wurde. Durch Zugabe des LV oder ABF3 kam es nur zu einer 2- bis 5-fachen Steigerung der ABA-Antwort. JAM2 scheint also positiv auf die Transkription von ABF3 zu wirken, wodurch die ABA-Antwort gefördert wird.

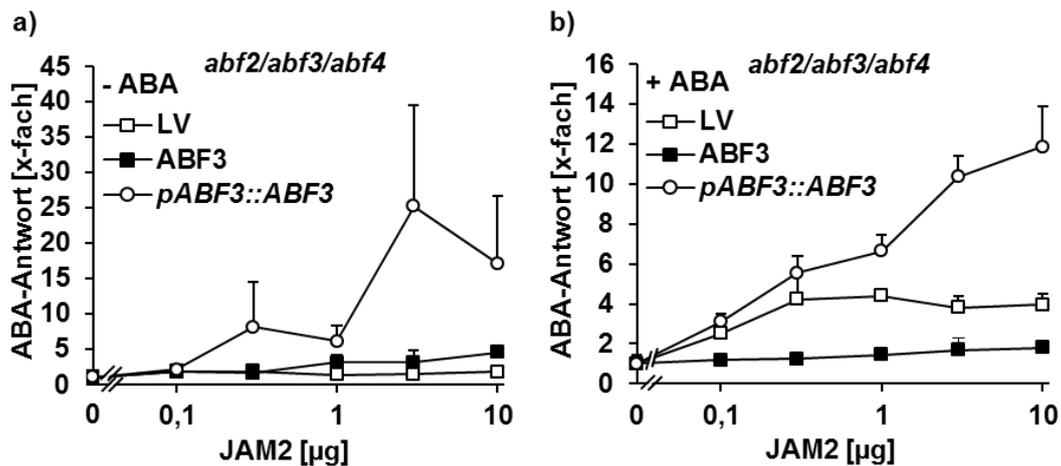


Abbildung 51: Versuch zur Wiederherstellung der JAM2-induzierten ABA-Antwort durch Co-Expression von *pABF3::ABF3* in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten *abf2/abf3/abf4*-Blättern wurden mit 3 μg *p35S::GUS*, 4 μg *pRD29B::LUC*, 0,3 μg Effektor (*p35S::ABF3*; *pABF3::pABF3*; *p35S::MCS*, LV) und steigenden Mengen an *p35S::JAM2* transformiert. Die Protoplasten wurden ohne (a) oder mit 3 μM ABA (b) versetzt und für 16 ± 1 h bei 25 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit Effektor und ohne *p35S::JAM2* (a: 1,0 kCPS/RFU mit *p35S::MCS*, 43,1 kCPS/RFU mit *p35S::ABF3*, 1,3 kCPS/RFU mit *pABF3::ABF3*; b: 3,3 kCPS/RFU mit *p35S::MCS*, 754 kCPS/RFU mit *p35S::ABF3*, 39,2 kCPS/RFU mit *pABF3::ABF3*) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden einmal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden nicht erfüllt.

Da JAM2 anscheinend keinen vergleichbaren Platz zu den ABFs im ABA-Signalweg einnimmt und eher oberhalb der Signalkette (*upstream*) als positiver Regulator auf die ABA-Antwort wirkt, ergab sich die Überlegung, ob die Anwesenheit von JAM2 zudem positiv auf die Aktivität der ABFs (*downstream*) wirkt. Um dies zu untersuchen, wurde der von Mitsuda und Ohme-Takagi (2009) beschriebene Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassay verwendet. Die CDS der Transkriptionsfaktoren – hier die ABFs – wurden dazu jeweils mit der CDS der GAL4BD unter Kontrolle des 35S-Promotors fusioniert und zusammen mit einem Reporter-Konstrukt (Abbildung 52, a), bestehend aus der Fusion der GAL4_UAS mit der CDS der Luciferase aus *Photinus pyralis*, in Protoplasten transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde der interne Standard mitgeführt. Hier wurde nicht nur untersucht, ob es sich im Fall der ABFs um Aktivatoren oder Repressoren handelt, sondern auch wie sich andere Faktoren, wie ABA oder JAM2, auf die Aktivität der ABFs auswirken.

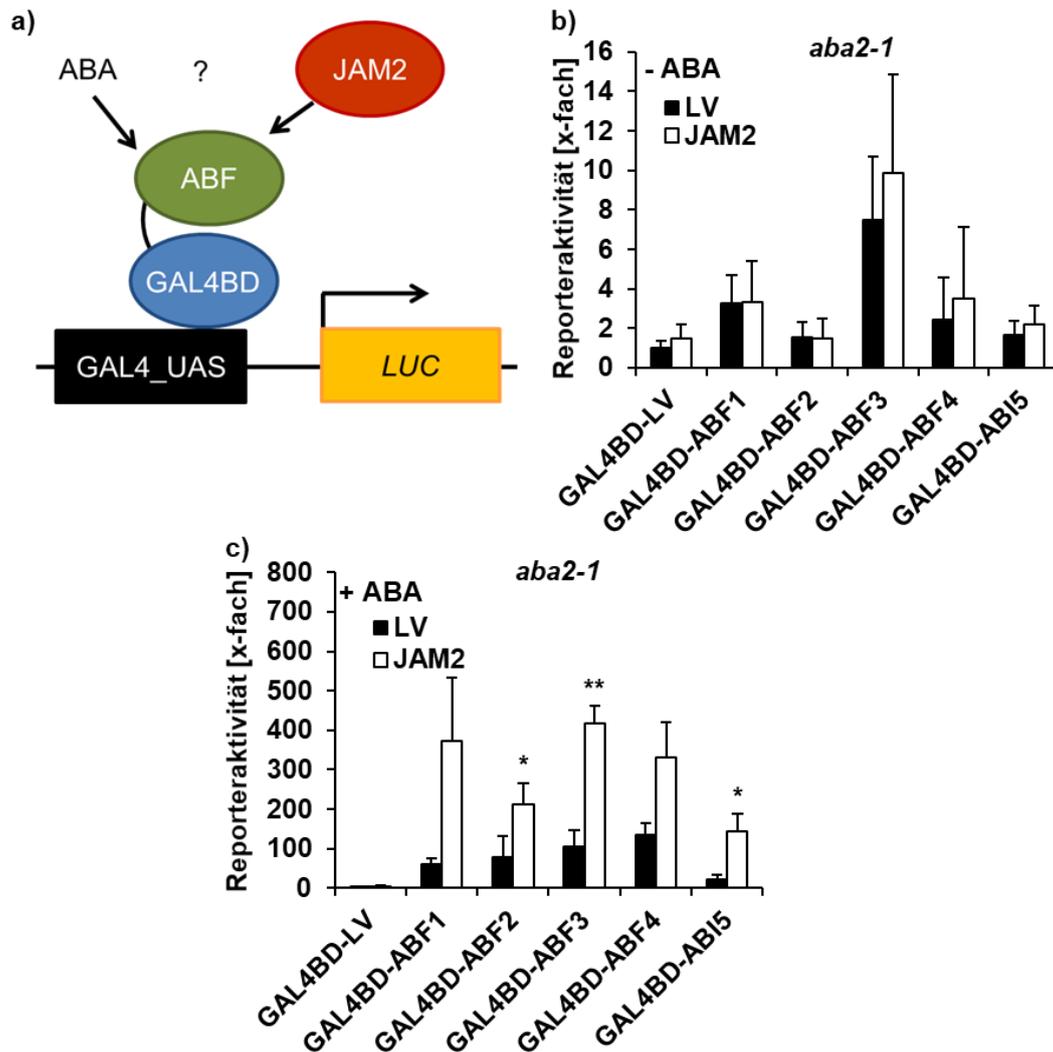


Abbildung 52: Aktivierung der ABFs durch ABA und JAM2. a) Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays (Details siehe Text). b-c) Aktivierungsassay in *aba2-1*-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g } p35S::GUS$, $4 \mu\text{g } pGAL4_UAS::LUC$, $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-Effektor ($p35S::GAL4BD-ABF$; $p35S::GAL4BD-MCS$, GAL4BD-LV) und $3 \mu\text{g}$ Effektor ($p35S::JAM2$; $p35S::MCS$, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne (a) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) für $16 \pm 1 \text{ h}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit GAL4BD-LV und LV ohne ABA (a und b, 2,1 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden mindestens zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte in c) zu signifikanten Ergebnissen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Um einen möglichen Einfluss von ABA besser berücksichtigen zu können, wurde der Versuch in Protoplasten der ABA-defizienten Mutante *aba2-1* durchgeführt. Ohne exogene ABA induzierten nur GAL4BD-ABF1 und GAL4BD-ABF3 den Reporter 3,3-fach bzw. 7,5-fach (Abbildung 52, b). Die anderen GAL4BD-ABFs ergaben vergleichbare Reporteraktivitäten zur Kontrolle GAL4BD-LV. Die Zugabe von JAM2 erhöhte die GAL4BD-ABF-bedingte Reporteraktivität in Abwesenheit exogener ABA nicht. Durch die Zugabe von ABA konnte die Reporteraktivität durch die GAL4BD-ABFs um das 14- bis 56-fache gesteigert werden (Abbildung 52, c). Eine weitere Steigerung der Reporteraktivität um das 2,4- bis 6,3-fache konnte durch JAM2

erzielt werden. JAM2 hat demzufolge einen positiven Einfluss auf die Aktivität der ABFs als Transkriptionsfaktor, die aber von ABA abhängig ist.

In Anbetracht der Tatsache, dass JAM2 im Transkriptionsfaktor-Aktivierungssassay mit den ABFs eine stimulierende Wirkung zeigte, nach den Ergebnissen des P2H jedoch nicht mit den ABFs interagiert, stellte sich die Frage, ob die im P2H erhaltenen Ergebnisse eine Folge der Fusion von JAM2 mit der aktivierend wirkenden VP16-Domäne sind. Im P2H ist nicht sichergestellt, dass die Reporteraktivität nur durch eine Interaktion der Kandidatenproteine hervorgerufen wird. Es ist möglich, dass es eine dritte Komponente gibt, die als Linker zwischen den Kandidatenproteinen wirkt, oder – im besonderen Fall der Interaktionsstudie mit Transkriptionsfaktoren – dass sich der VP16-fusionierte Transkriptionsfaktor auf die Expression einer dritten Komponente auswirkt, die wiederum einen Einfluss auf die Aktivität des GAL4BD-fusionierten Transkriptionsfaktors hat. Es wurde deshalb vermutet, dass die Fusion mit der VP16-Domäne eine potentielle negative regulatorische Funktion von JAM2 als Transkriptionsfaktor maskiert und deshalb keine Aktivierung im P2H zu sehen war.

Dieses Argument wurde mit Hilfe des *pGAL4_UAS::LUC*-Reporters für GAL4BD-ABF1 durch Co-Expression von sowohl JAM2 als auch JAM2-VP16 überprüft. Um einen generellen Einfluss von Fusionsproteinen auf die Aktivität von JAM2 zu überprüfen, wurde das Experiment durch Ansätze ergänzt, in denen JAM2 N- oder C-terminal mit *GREEN FLUO-RESCENT PROTEIN* (GFP) fusioniert war. Die verschiedenen JAM2-Varianten hatten ohne ABA einen fördernden Einfluss auf die GAL4BD-ABF1-bedingte Reporteraktivität (Abbildung 53). GFP-JAM2 sorgte mit einer 10,2-fachen Steigerung ohne ABA und 5,3-fachen Steigerung mit ABA für die höchste GAL4BD-ABF1-bedingte Reporteraktivität. Die übrigen Varianten führten zu einer schwächeren Steigerung (4- bis 5,3-fach ohne exogene ABA; 3,2- bis 4,4-fach mit exogener ABA). Die VP16-Domäne oder ein anderes Fusionsprotein beeinflussten demzufolge nicht die Aktivität von JAM2. Eine potentielle negative regulatorische Funktion von JAM2 scheint durch die VP16-Domäne auch nicht maskiert zu sein. Es konnte mit diesem Versuchsansatz jedoch nicht bestimmt werden, ob die Effekte durch eine Interaktion oder eine JAM2-vermittelte Regulation einer dritten Komponente hervorgerufen werden.

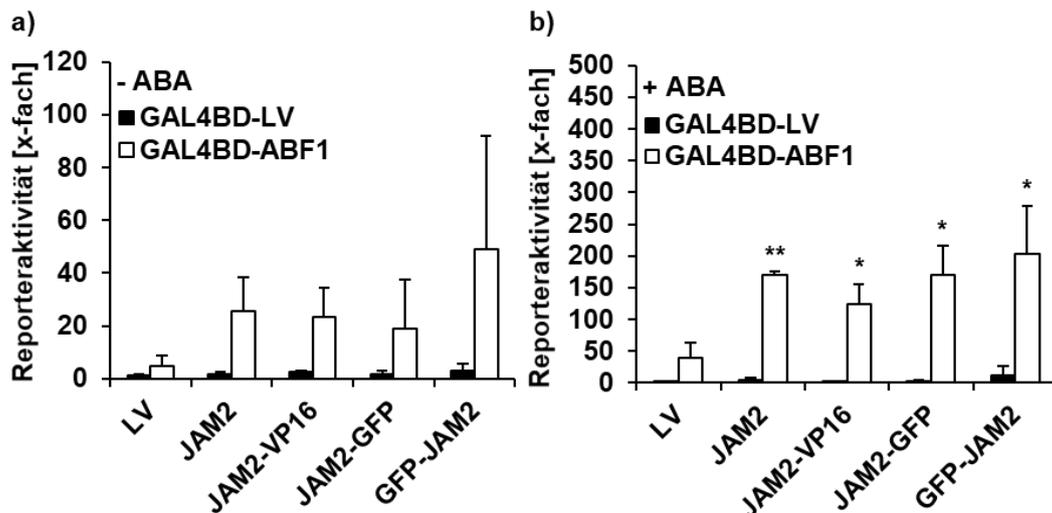


Abbildung 53: Einfluss von JAM2 auf die ABF1-vermittelte Genexpression. Aktivierungsassay in Col-0-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ $p35S::GUS$, $4 \mu\text{g}$ $pGAL4_UAS::LUC$, $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-Effektor ($p35S::GAL4BD-ABF1$; $p35S::GAL4BD-MCS$, GAL4BD-LV) und $3 \mu\text{g}$ Effektor ($p35S::JAM2$; $p35S::JAM2-VP16$; $p35S::JAM2-GFP$; $p35S::GFP-JAM2$; $p35S::MCS$, LV) transformiert. Die Protoplasten wurden ohne (a) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) versetzt und für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit $3 \mu\text{g}$ GAL4BD-LV und LV ohne ABA (a und b, $1,0$ kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden mindestens zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte in b) zu signifikanten Ergebnissen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

2.6.4 Funktion von JAM2 als Transkriptionsfaktor im ABA-Signalweg

Es konnte gezeigt werden, dass JAM2 ohne die ABFs keine ABA-Antwort auslösen kann und sich positiv auf die Aktivität der ABFs auswirkt. JAM2 sollte demzufolge keinen direkten Einfluss auf die Regulation von Zielgenen des ABA-Signalwegs, wie zum Beispiel *RD29B*, haben. Aus der Literatur ist bekannt, dass JAM2 über eine klassische G-Box an Promotoren binden kann (Fonseca et al. 2014). Eine klassische G-Box ist beispielsweise in dem JA-regulierten Gen *TYROSINE AMINOTRANSFERASE 1* (*TAT1*; CACGTG, Position 142–147 *upstream* des ATG) enthalten, an die auch die JAM2-verwandten MYC2 und JAM1 binden (Nakata et al. 2013). Im Promotor des ABA-regulierten Gens *RD29B*, der auch im ABA-Reportersystem Einsatz fand und der durch JAM2 induziert wurde, ist nur eine partielle G-Box (AACGTG, Position 323–328 *upstream* des ATG) enthalten, die sich gleichzeitig mit einem partiellen ABRE-Motiv (ACGTGGA, Position 321–327 *upstream* des ATG) überschneidet. Über Promotorbindungsstudien sollte überprüft werden, ob die JAM2-bedingte ABA-Antwort durch eine positive Regulation der ABFs hervorgerufen wurde oder ob JAM2 auch an den ABA-regulierten *RD29B*-Promotor binden kann. Die Promotorbindungsstudien wurden in Anlehnung zu Nakata et al. (2013) durchgeführt. Dafür wurde Effektor-DNA von JAM2-VP16 oder LV-VP16 zusammen mit Promotor-Reporter-Fusionen aus *pTAT1* bzw. *pRD29B* sowie der CDS der Luciferase aus

Photinus pyralis und dem internen Standard in Col-0-Protoplasten transfiziert (Abbildung 54). JAM2-VP16 führte in Verbindung mit *pTAT1* zu einer 40-fachen Induktion der Reporteraktivität im Vergleich zu LV-VP16. Die Mutation der G-Box in *pTAT1* zu AGGTCA – wie auch von Nakata et al. (2013) beschrieben – führte für JAM2-VP16 zu einer verminderten Aktivierung der Reporteraktivität und zwar um 76 %. JAM2-VP16 in Verbindung mit *pRD29B* führte nur zu einer 2,7-fachen Induktion der Reporteraktivität im Vergleich zu LV-VP16. JAM2 kann somit über die G-Box wie auch MYC2 und JAM1 an den *TAT1*-Promotor binden. Eine Bindung an den *RD29B*-Promotor konnte nicht gezeigt werden, was die Hypothese bestärkt, dass JAM2 oberhalb der ABA-Signalkaskade Einfluss auf die ABA-Antwort nimmt.

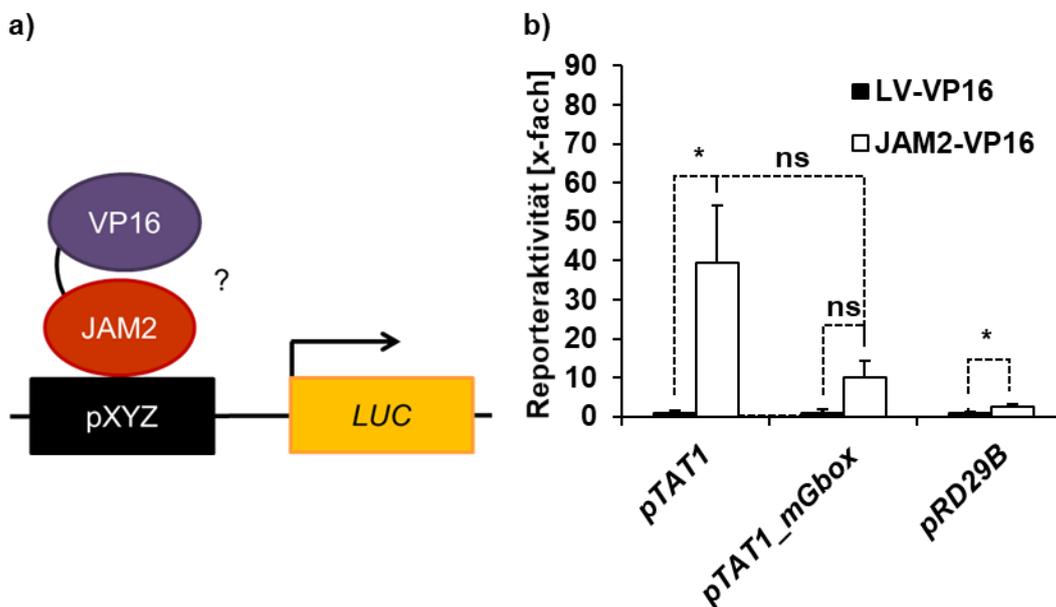


Abbildung 54: Studien zur Bindung von JAM2 an *pTAT1* bzw. *pRD29B*. a) Schematische Darstellung des Promotorbindungs-Assays mit JAM2 (Details siehe Text). b-c) Promotorbindungs-Assay in Col-0-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ Reporter-Konstrukt (*pTAT1::LUC*; *pTAT1_mGbox::LUC*; *pRD29B::LUC*) sowie $3 \mu\text{g}$ Effektor-VP16 (*p35S::JAM2-VP16*; *p35S::MCS-VP16*, LV-VP16) transfiziert und für 16 ± 1 h bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit LV-VP16 und Reporter-Konstrukt ($12,3$ kCPS/RFU mit *pTAT1*; $6,7$ kCPS/RFU mit *pTAT1_mGbox*; $1,0$ kCPS/RFU mit *pRD29B*) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden mindestens zweimal unabhängig wiederholt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zum Teil zu signifikanten Ergebnissen (nicht signifikant (ns) $p > 0,05$; * $p < 0,05$).

An dieser Stelle bleibt zu klären, ob JAM2 wirklich als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die ABA-Antwort nimmt. bHLH-Transkriptionsfaktoren binden an DNA über die BR im bHLH-Motiv (Massari und Murre 2000; Toledo-Ortiz et al. 2003). Um zu klären, ob JAM2 über DNA-Bindung die ABA-Antwort auslöst, wurde die BR deletiert und JAM2_dBR mit dem ABA-Reportersystem im Promotorbindungs-Assay auf Funktionalität überprüft (Abbildung 55). JAM2_dBR-VP16 war im Gegensatz zu JAM2-VP16 nicht mehr in der Lage, den Reporter über eine Bindung an *pTAT1* zu induzieren und die Induktion der Reporterantwort verringerte sich um 92 %

(Abbildung 55, a). Interessanterweise ging auch die Induktion der *pTAT1_mGbox*-Reporteraktivität um 62 % zurück. In *pTAT1_mGbox* scheinen demzufolge noch alternative Bindestellen für JAM2 vorhanden zu sein. Die Deletion der BR wirkt sich auch auf die JAM2-bedingte ABA-Antwort aus (Abbildung 55, b und c). JAM2_dBR kann im Gegensatz zu JAM2 keine Aktivierung der ABA-Antwort auslösen und zeigt vergleichbare oder geringere Induktionen als der LV. Auch eine Zugabe von ABA führte nicht zu einer Steigerung der Reporteraktivität. Die DNA-Bindefähigkeit von JAM2 ist den Ergebnissen nach essentiell für die JAM2-bedingte Aktivierung der ABA-Antwort.

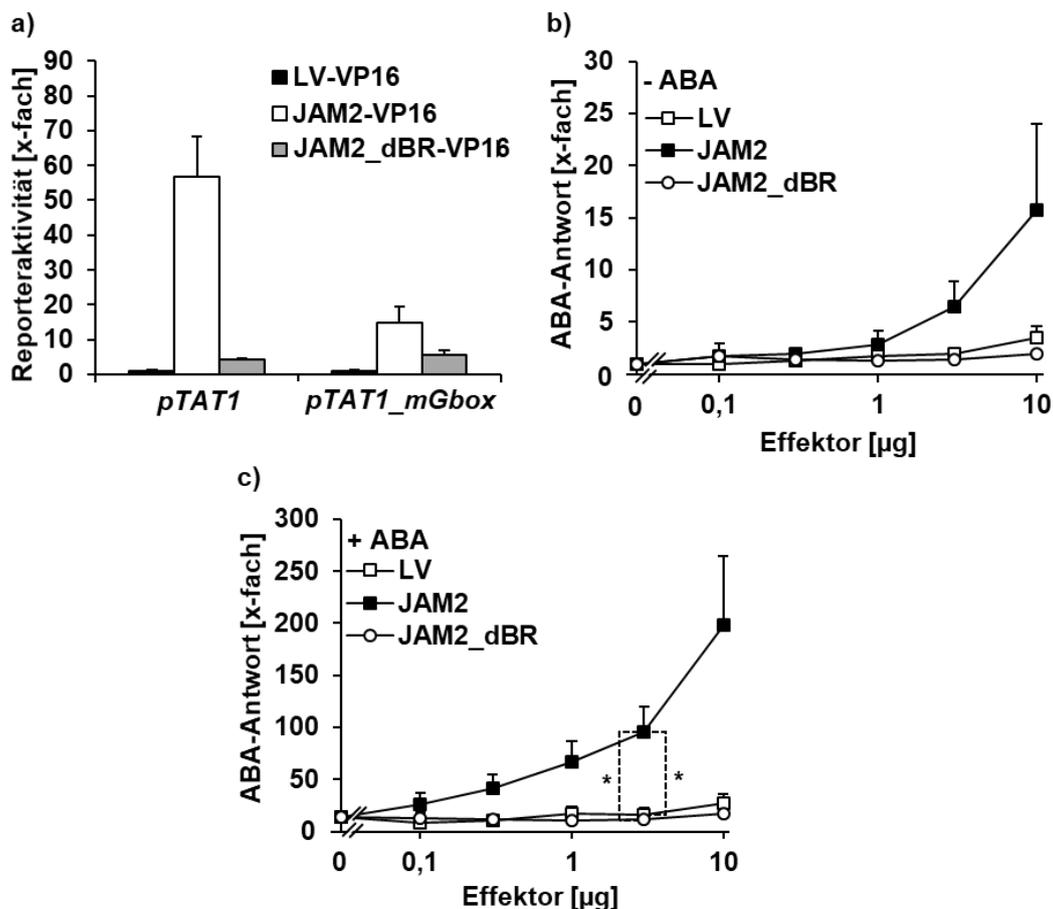


Abbildung 55: Regulation der ABA-Antwort über die DNA-Bindefähigkeit von JAM2. a) Promotorbindungs-Assay in Col-0-Protoplasten (vgl. Abbildung 54). Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden für a) mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ Reporter-Konstrukt (*pTAT1::LUC*; *pTAT1_mGbox::LUC*) sowie $3 \mu\text{g}$ Effektor-VP16 (*p35S::JAM2-VP16*; *p35S::JAM2_dBR-VP16*; *p35S::MCS-VP16*, LV-VP16) transformiert bzw. für b) und c) mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ *pRD29B::LUC* und steigenden Mengen an Effektor (*p35S::JAM2*; *p35S::JAM2_dBR*; *p35S::MCS*, LV) transformiert. Die Inkubation erfolgte für 16 ± 1 h bei 25°C ohne (a, b) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (c). Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit LV-VP16 und Reporter-Konstrukt (a: 5,4 kCPS/RFU mit *pTAT1*, 2,7 kCPS/RFU mit *pTAT1_mGbox*) bzw. der Messwert ohne ABA und Effektor (b und c, 1,6 kCPS/RFU) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden mindestens einmal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden für a) nicht erfüllt. Die statistische Auswertung für b) und c) erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte in c) zu signifikanten Ergebnissen (* $p < 0,05$).

Da gezeigt werden konnte, dass JAM2 über die Wirkung als Transkriptionsfaktor positiven Einfluss auf den ABA-Signalweg nehmen kann, wurde vermutet, dass JAM2 Komponenten des ABA-Signalwegs reguliert. Die Promotoren (bis 3000 bp *upstream* des ATG) der Kernkomponenten des ABA-Signalwegs wurden daraufhin auf G-Box-Motive analysiert. Auf allen Ebenen der Kernkomponenten – den ABFs, SnRK2s, RCARs und PP2Cs – konnten G-Box-Motive im Promotor vorgefunden werden (Tabelle 1). Die meisten der analysierten Promotoren enthielten eine (48 %) oder keine (32 %) G-Box, 10 % enthielten zwei G-Boxen und jeweils 3 % drei, vier bzw. fünf G-Boxen. Die Entfernung zum ATG betrug 22–2843 bp. Um einen Einfluss von JAM2 auf die Transkription der Kernkomponenten mit G-Box-Motiven im Promotor festzustellen, wurde die Expression dieser Kernkomponenten in Überexpressions- und Knockout-Linien von *JAM2* mittels qPCR überprüft.

Tabelle 1: Promotoranalyse der Kernkomponenten des ABA-Signalwegs auf G-Box-Motive. Für die Analyse wurden 3000 bp *upstream* des ATG der jeweiligen Signalkomponente mit dem Programm ApE auf G-Box-Motive (CACGTG) durchsucht. Treffer sind mit der Entfernung zum ATG in bp angegeben. Keine G-Box im analysierten Promotorbereich ist durch ein „-“ gekennzeichnet. HAB und HAI stehen für HYPERSENSITIVE TO ABSCISIC ACID bzw. HIGHLY ABSCISIC ACID-INDUCED PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2C GENE.

Signalkomponente	G-Box n bp <i>upstream</i> des ATG	
ABFs	<i>ABF1</i>	-
	<i>ABF2</i>	-
	<i>ABF3</i>	1360, 2843
	<i>ABF4</i>	-
	<i>ABI5</i>	349, 1154, 1165, 1211, 1687
SnRK2s	<i>SnRK2.2</i>	-
	<i>SnRK2.3</i>	593
	<i>SnRK2.6</i>	-
RCARs	<i>RCAR1</i>	1759
	<i>RCAR2</i>	272
	<i>RCAR3</i>	2055
	<i>RCAR4</i>	-
	<i>RCAR5</i>	-
	<i>RCAR6</i>	1811
	<i>RCAR7</i>	-
	<i>RCAR8</i>	800
	<i>RCAR9</i>	-
	<i>RCAR10</i>	2240
	<i>RCAR11</i>	-
	<i>RCAR12</i>	-
	<i>RCAR13</i>	546, 557
	<i>RCAR14</i>	22
PP2C	<i>ABI1</i>	-
	<i>ABI2</i>	-
	<i>HAB1</i>	1980
	<i>HAB2</i>	-
	<i>HAI1</i>	321, 1865, 2232, 2301
	<i>HAI2</i>	1805
	<i>HAI3</i>	-
	<i>AHG1</i>	114, 170, 2835
	<i>AHG3</i>	397, 2083

Für die qPCR-Analyse wurden fünf Tage alte Keimlinge auf $MS_{0,5xZucker}$ -Platten ohne und mit $10 \mu M$ ABA umgesetzt. Nach einer Inkubation von 17 ± 1 h wurden die Keimlinge für die RNA-Extraktion geerntet. Zunächst wurden die Transkriptionsfaktoren des ABA-Signalwegs *ABF3* und *ABI5* analysiert (Abbildung 56). Auf die Expression von *ABF3* hatte *JAM2* unter Kontrollbedingungen keinen Einfluss (Abbildung 56, a). Zwar wurde *ABF3* in den Überexpressionslinien und in der Knockout von *jam2* 46–61 % weniger exprimiert, jedoch schwankten die Messwerte der Referenz *pATHB6::LUC* erheblich.

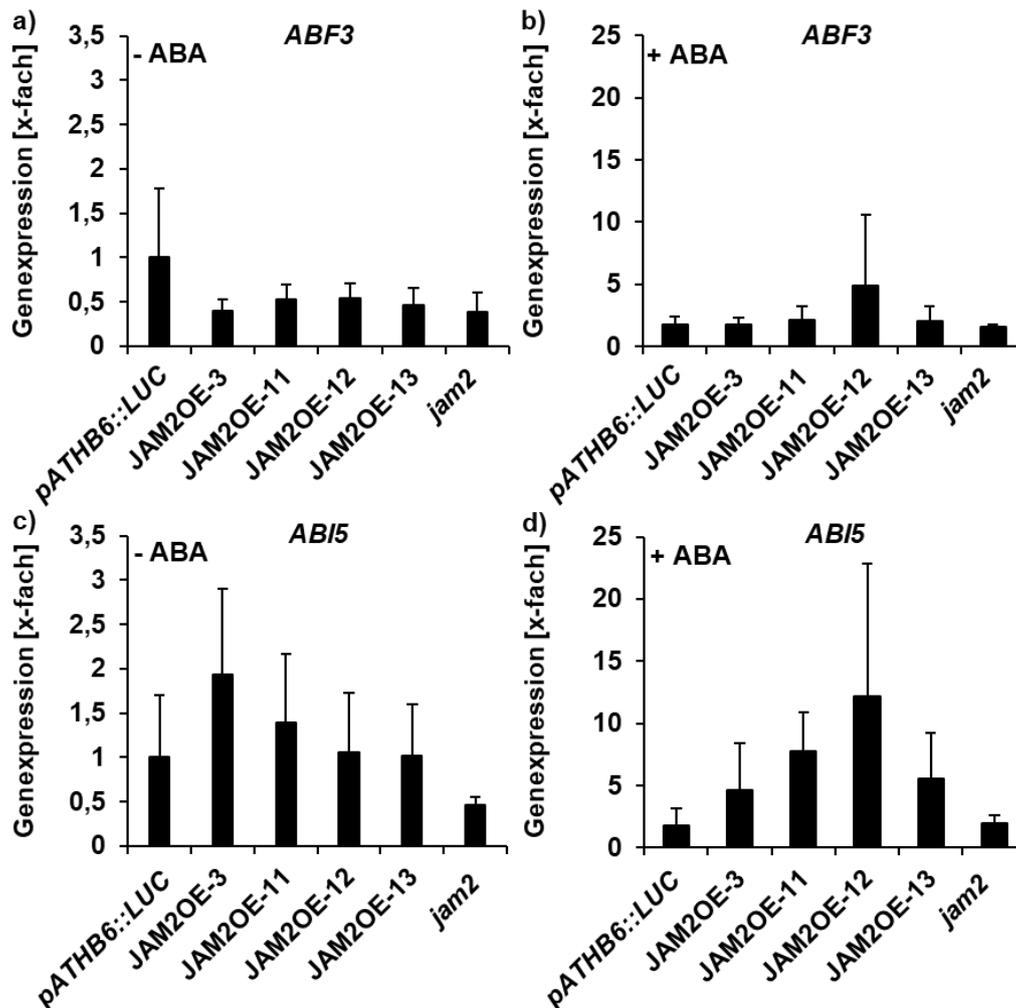


Abbildung 56: Expression von *ABF3* und *ABI5* in *JAM2*-Linien. Expressionsanalyse über qPCR von *ABF3* (a, b) und *ABI5* (c, d) in *pATHB6::LUC*, *JAM2*-Überexpressionslinien sowie *jam2*. Fünf Tage alte Keimlinge wurden auf $MS_{0,5xZucker}$ -Platten ohne (a und c) oder mit $10 \mu M$ ABA (b und d) transferiert und für 17 ± 1 h inkubiert. Als Referenzgene für die qPCR dienten *UBI10*, *UBC9* und *TIP41L*. Die Expression von *ABF3* bzw. *ABI5* in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* ohne ABA-Exposition wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu keinem signifikanten Ergebnis ($p > 0,05$).

Auf die Expression von *ABI5* hatte *JAM2* in den *JAM2*-Überexpressionslinien *JAM2OE-3* und *JAM2OE-11* einen 1,4- bis 1,9-fach steigernden Effekt, während *JAM2OE-12* und *JAM2OE-13* eine zu *pATHB6::LUC* vergleichbare Induktion aufwiesen (Abbildung 56, c). In der Knockout

jam2 war die Expression von *ABI5* um 54 % gesenkt. Die ABA-Exposition führte lediglich zu einer 1,7-fachen Steigerung der Expression von *ABF3* und *ABI5* in der Referenz *pATHB6::LUC* (Abbildung 56, b und d). *JAM2* hatte unter ABA-Exposition keinen weiteren Einfluss auf die Expression von *ABF3*. *ABI5* war in den *JAM2*-Überexpressionslinien 2,6- bis 6,8-fach stärker exprimiert und in *jam2* vergleichbar zu *pATHB6::LUC*. *JAM2* nahm somit unter den hier gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die *ABF3*-Expression, jedoch konnten auf die *ABI5*-Expression geringe Einflüsse von *JAM2* gemessen werden.

In der Promotoranalyse wurden von den zehn beschriebenen *SnRK2*s nur die Promotoren von *SnRK2.2*, *SnRK2.3* und *SnRK2.6* analysiert, da nur diese laut Kulik et al. (2011) eine wesentliche Rolle im ABA-Signalweg spielen. Von diesen drei *SnRK2*s enthält nur der Promotor von *SnRK2.3* eine G-Box. Unter Kontrollbedingungen ist *SnRK2.3* in allen *JAM2*-Überexpressionslinien – außer *JAM2OE-12* – 9–26 % geringer exprimiert (Abbildung 57). *SnRK2.3* war in *JAM2OE-12* auf demselben Expressionsniveau wie in *pATHB6::LUC*. In *jam2* war *SnRK2.3* um 31 % geringer exprimiert als in *pATHB6::LUC*. Die ABA-Exposition führte in *pATHB6::LUC* zu keiner Steigerung der *SnRK2.3*-Expression. Zwar zeigte *JAM2OE-12* eine um 1,4-fach signifikant (* $p < 0,05$) höhere Expression als *pATHB6::LUC*. Aber die Expression der anderen *JAM2*-Linien war ansonsten mit *pATHB6::LUC* vergleichbar. Den Ergebnissen zufolge hatte weder *JAM2* noch ABA einen Einfluss auf die Expression von *SnRK2.3*.

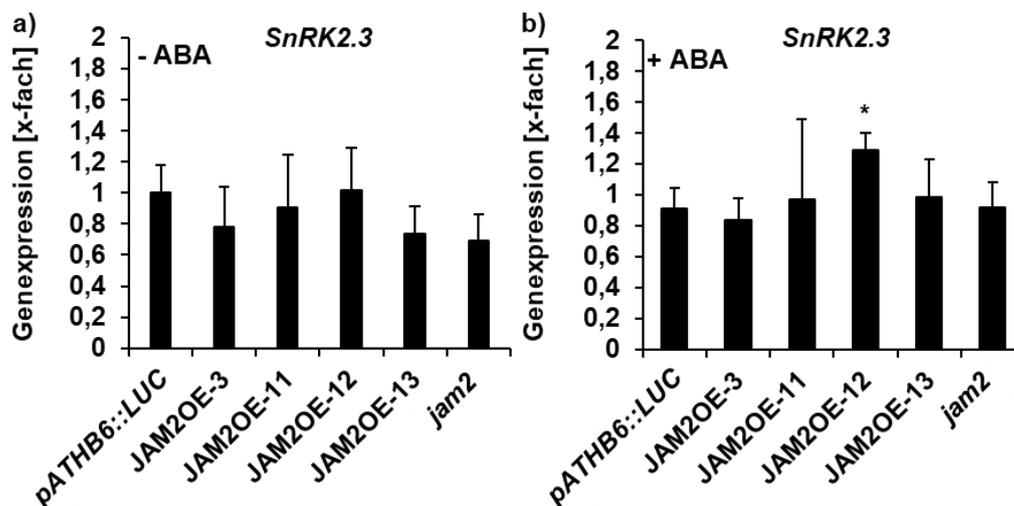


Abbildung 57: Expression von *SnRK2.3* in *JAM2*-Linien. Expressionsanalyse über qPCR von *SnRK2.3* in *pATHB6::LUC*, *JAM2*-Überexpressionslinien sowie *jam2*. Fünf Tage alte Keimlinge wurden auf $MS_{0,5 \times Zucker}$ -Platten ohne (a) oder mit 10 μ M ABA (b) transferiert und für 17 ± 1 h inkubiert. Als Referenzgene für die qPCR dienten *UBI10*, *UBC9* und *TIP41L*. Die Expression von *SnRK2.3* in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* ohne ABA-Exposition wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (* $p < 0,05$).

Von den 14 beschriebenen *RCARs* (Ma et al. 2009) enthalten acht *RCARs* ein bis zwei G-Boxen im Promotor. Diese acht *RCARs* wurden auf eine Expressions-Regulation durch *JAM2* untersucht. Dabei konnte nur eine Regulation von *RCAR13* durch *JAM2* beobachtet werden (Abbildung 58). Unter Kontrollbedingungen wies *RCAR13* in den *JAM2*-Überexpressionslinien – außer in *JAM2OE-13* – eine 1,6- bis 3,6-fach höhere Expression auf als in der Referenz *pATHB6::LUC*. In *JAM2OE-13* war *RCAR13* signifikant um 35 % (* $p < 0,05$) geringer exprimiert. In *jam2* war *RCAR13* ebenfalls schwächer exprimiert, jedoch nur um 13 %. Unter ABA-Exposition wurde *RCAR13* in *pATHB6::LUC* 7,5-fach stärker exprimiert. Interessanterweise werden alle anderen hier analysierten *RCARs* unter ABA-Einfluss 19–95 % geringer exprimiert. In den *JAM2*-Überexpressionslinien konnte die Expression von *RCAR13* gegenüber der Expression in *pATHB6::LUC* noch um das 2,7- bis 4,1-fache gesteigert werden, während *jam2* eine 82 % geringere Expression aufwies. *JAM2* hat somit neben der positiven Wirkung auf die Expression von *ABI5* auch einen positiven Einfluss auf *RCAR13*.

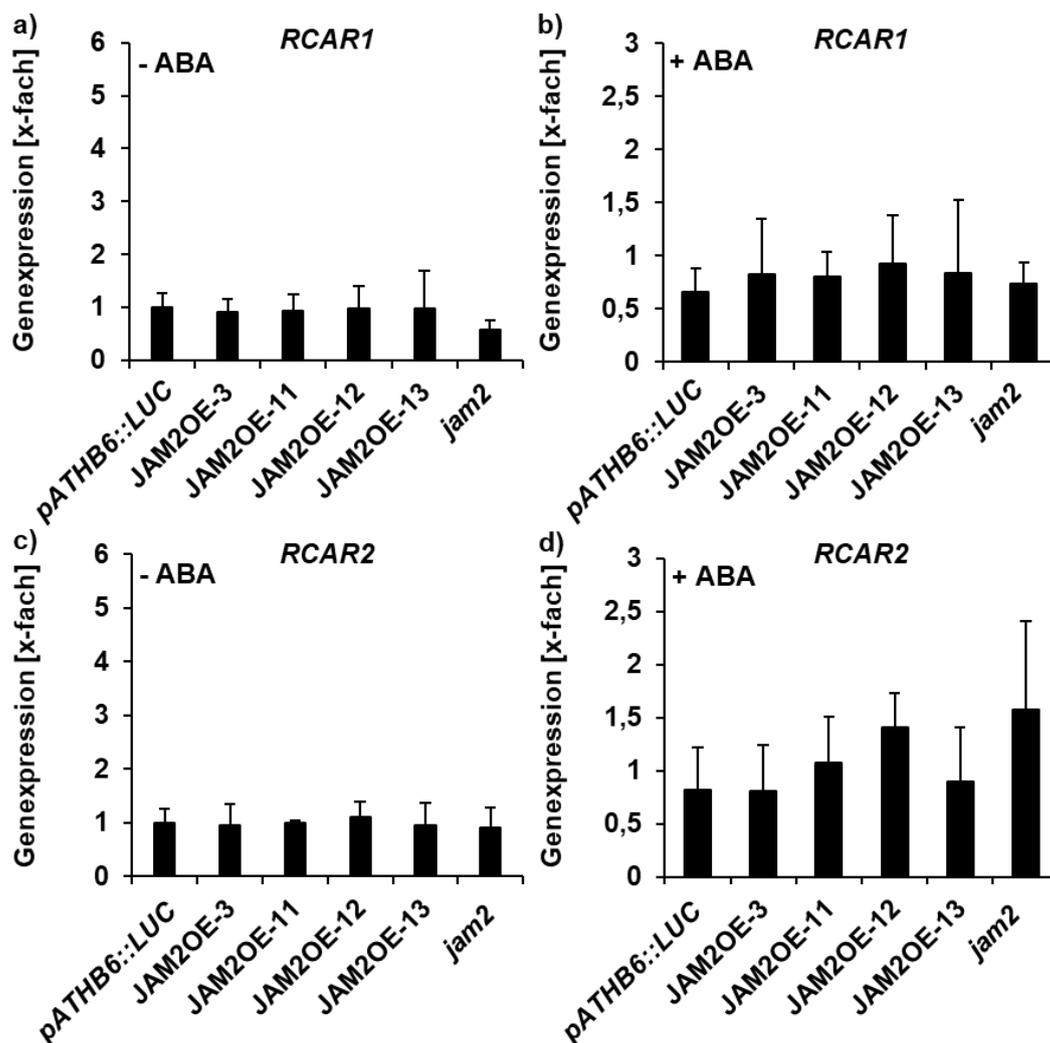


Abbildung 58: Expression von *RCARs* in *JAM2*-Linien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

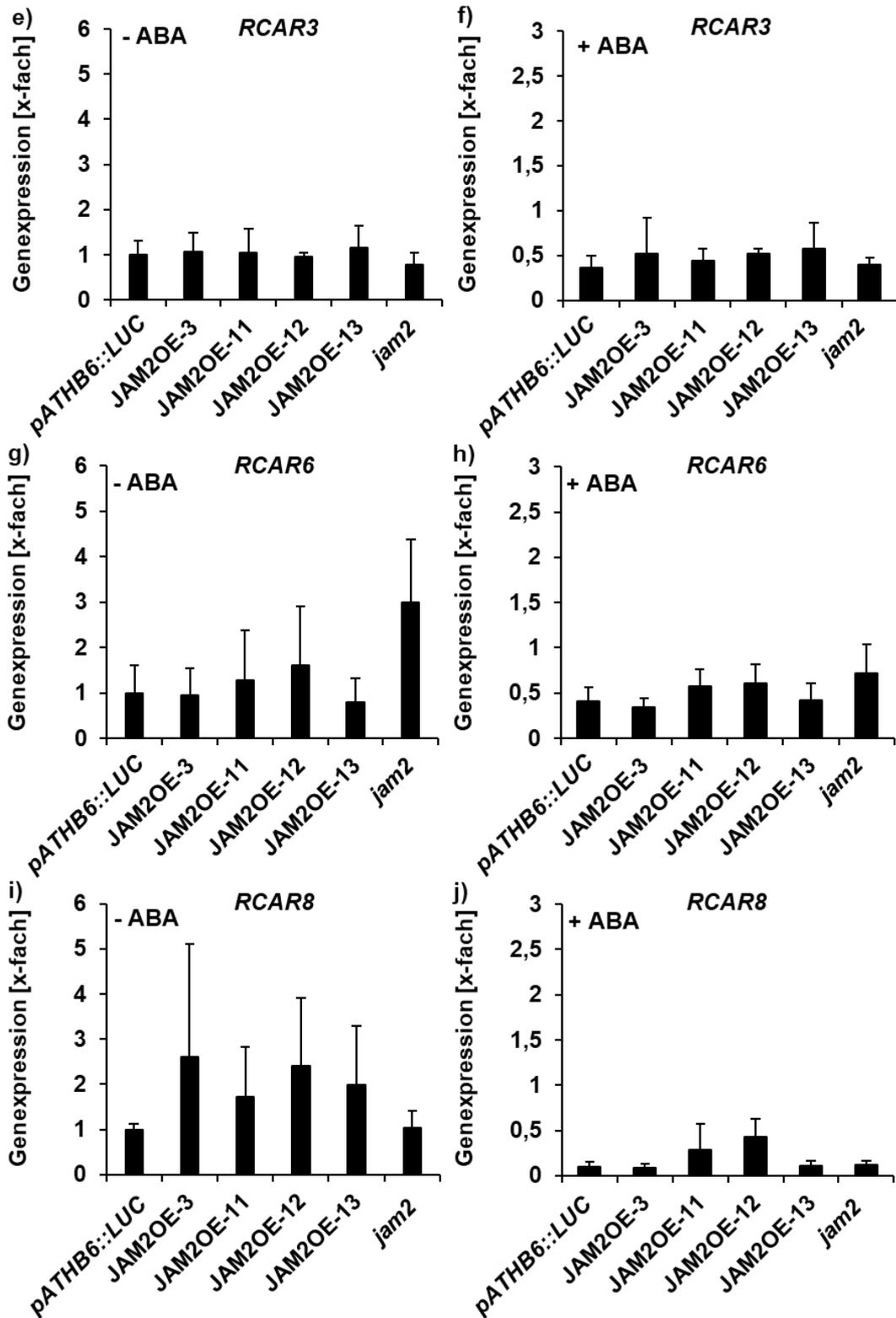


Abbildung 58: Expression von RCARs in JAM2-Linien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

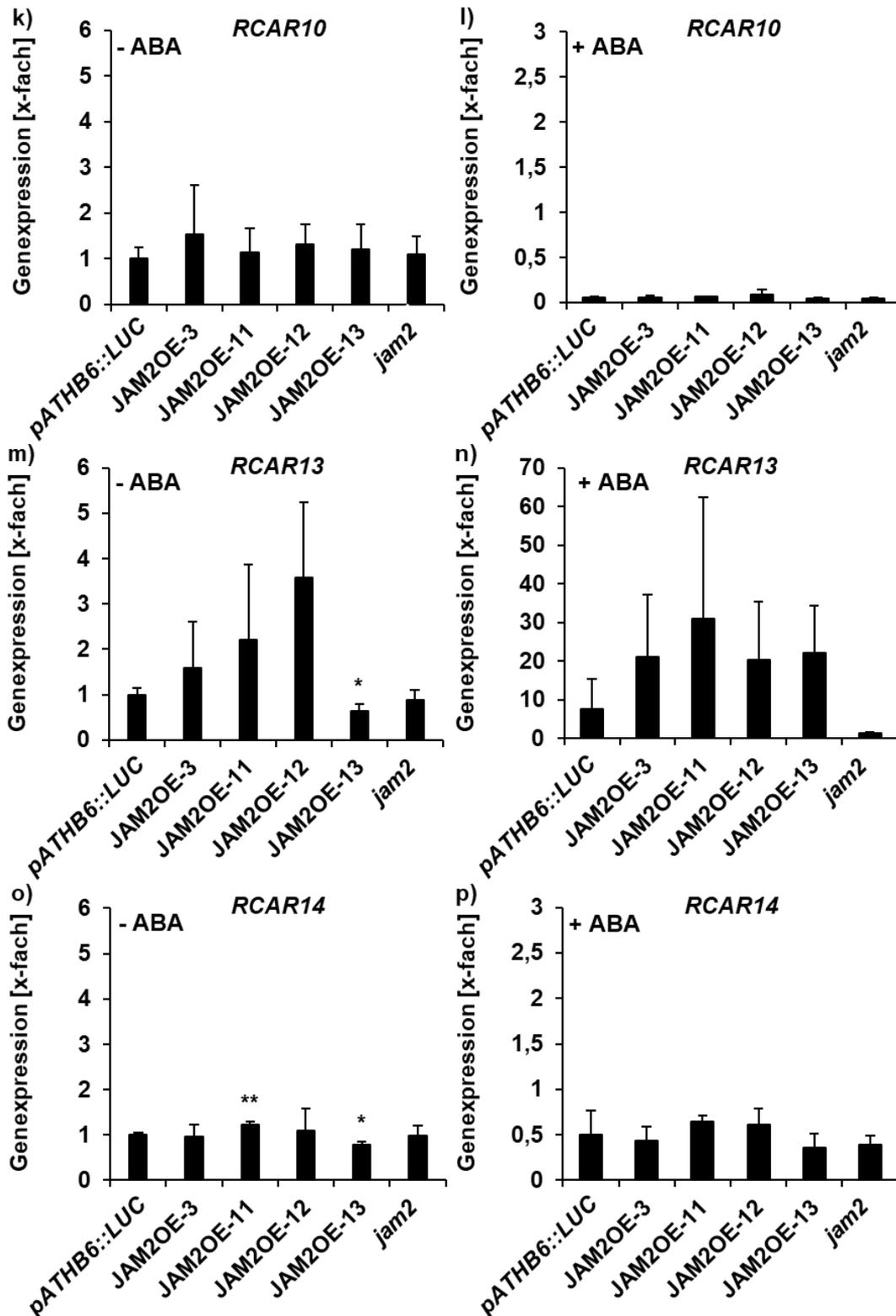


Abbildung 58: Expression von RCARs in JAM2-Linien. Expressionsanalyse von RCARs über qPCR in *pATHB6::LUC*, JAM2-Überexpressionslinien sowie *jam2*. Fünf Tage alte Keimlinge wurden auf MS_{0,5xZucker}-Platten ohne (a, c, e, g, i, k, m, o) oder mit 10 µM ABA (b, d, f, h, j, l, n, p) transferiert und für 17 ± 1 h inkubiert. Als Referenzgene für die qPCR dienten *UBI10*, *UBC9* und *TIP41L*. Die Expression der RCARs in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* ohne ABA-Exposition wurde auf eins gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Von den neun beschriebenen PP2C-Mitgliedern der Gruppe A (Fuchs et al. 2013) enthalten fünf Mitglieder im Promotor eine bis fünf G-Boxen. Von diesen fünf PP2Cs konnte nur für *AHG1* eine Regulation der Expression durch *JAM2* bestimmt werden (Abbildung 59). Unter Kontrollbedingungen wurde *AHG1* in *jam2* und den *JAM2*-Überexpressionslinien – außer in *JAM2OE-12* – um 26–63 % weniger exprimiert als in der Referenz *pATHB6::LUC*. In *JAM2OE-12* war das Expressionsniveau von *AHG1* 1,2-fach höher als in *pATHB6::LUC*. Durch ABA-Exposition wurde die Expression aller gemessenen PP2Cs in *pATHB6::LUC* um 2,5- bis 141-fach gesteigert. Die Expression von *AHG1* wurde um das 2,7-fache gesteigert. In den *JAM2*-Überexpressionslinien konnte die Expression von *AHG1* noch weiter gesteigert werden und zwar um das 2,2- bis 3,5-fache im Vergleich zu *pATHB6::LUC*. Der Unterschied im Expressionsniveau war dabei in *JAM2OE-11* zu *pATHB6::LUC* signifikant (* $p < 0,05$). In *jam2* war das Expressionsniveau um 42 % geringer. Somit konnte auch für *AHG1* eine positive Regulation der Expression durch *JAM2* gezeigt werden. *JAM2* wirkt sich demnach positiv auf die Expression auf Ebene der Transkriptionsfaktoren, der ABA-Rezeptoren und der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen der Gruppe A aus.

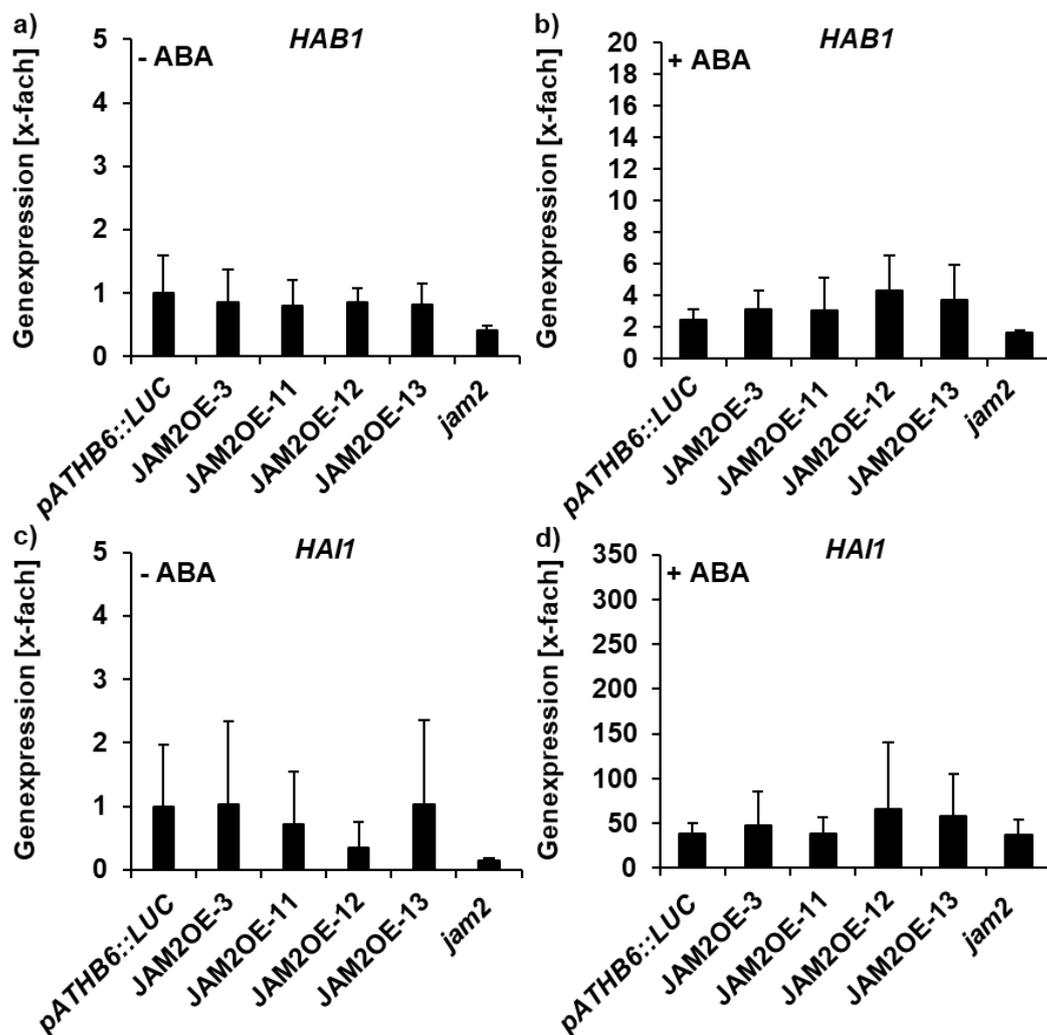


Abbildung 59: Expression von PP2Cs der Gruppe A in *JAM2*-Linien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

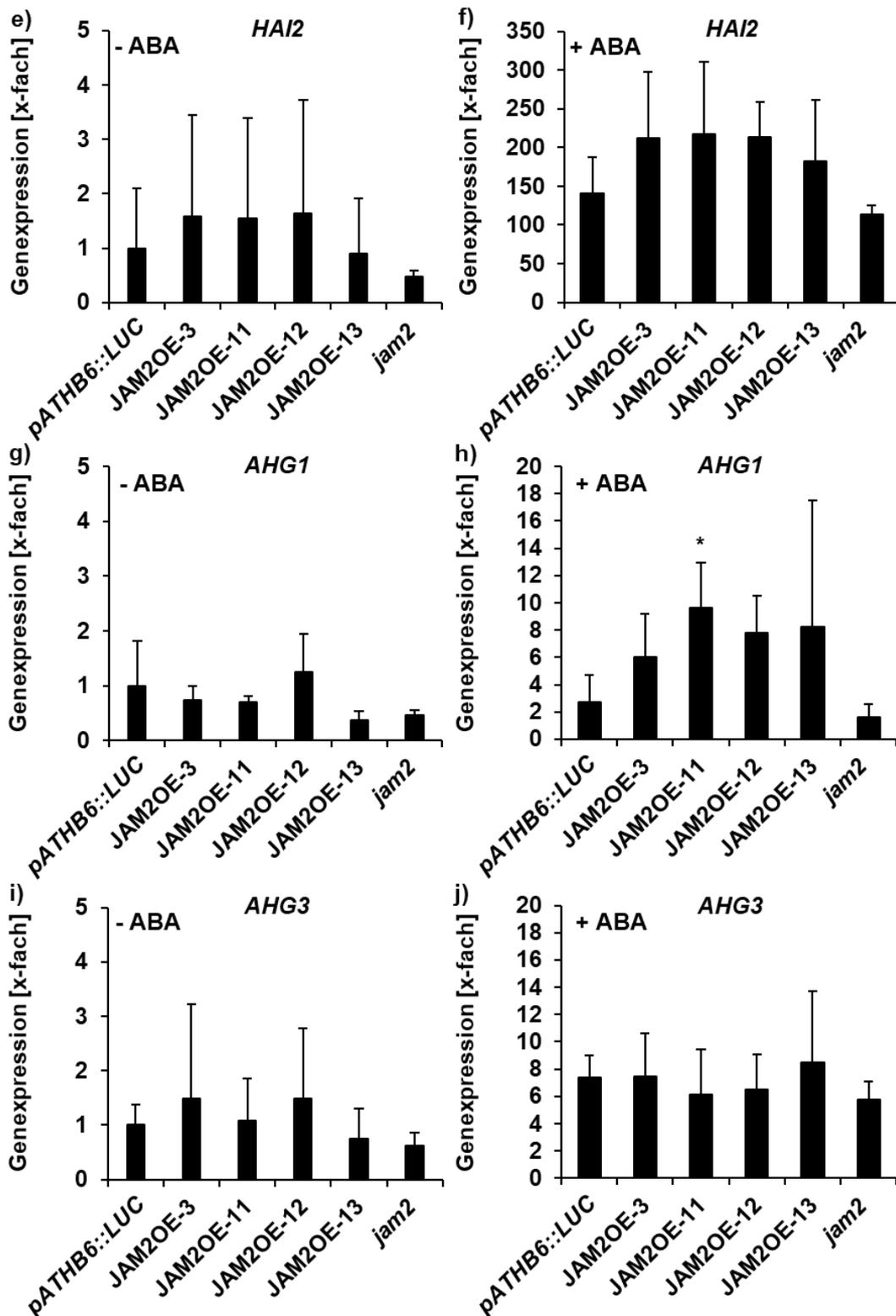


Abbildung 59: Expression von PP2Cs der Gruppe A in JAM2-Linien. Expressionsanalyse von PP2Cs der Gruppe A über qPCR in *pATHB6::LUC*, JAM2-Überexpressionslinien sowie *jam2*. Fünf Tage alte Keimlinge wurden auf $MS_{0,5 \times \text{Zucker}}$ -Platten ohne (a, c, e, g, i) oder mit $10 \mu\text{M}$ ABA (b, d, f, h, j) transferiert und für 17 ± 1 h inkubiert. Als Referenzgene für die qPCR dienten *UBI10*, *UBC9* und *TIP41L*. Die Expression der PP2Cs in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* ohne ABA-Exposition wurde auf eins gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier biologischer Replikate ($\bar{x} \pm s$) mit jeweils drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test und führte zu signifikanten Ergebnissen (* $p < 0,05$).

Da für *ABI5*, *RCAR13* und *AHG1* eine positive Regulation der Expression durch JAM2 gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob JAM2 auch direkt an die Promotoren dieser Gene binden kann. Es wurde auch der *ABF3*-Promotor auf eine mögliche Bindung untersucht. Hier konnte zwar keine Regulation der Expression von *ABF3* durch JAM2 gezeigt werden, aber die Versuche der Wiederherstellung der JAM2-Wirkung auf den ABA-Signalweg in *abf2/abf3/abf4*-Protoplasten hatten gezeigt, dass nur in Gegenwart des *pABF3::ABF3*-Konstrukts die ABA-Antwort durch JAM2 stimuliert werden kann. Des Weiteren sollte auch untersucht werden, ob die negative Regulation der Expression von *CYP707A1* durch eine direkte Promotorbindung von JAM2 hervorgerufen wird. Im Promotor (3000 bp *upstream* des ATG) von *CYP707A1* ist ebenfalls eine G-Box (285 bp *upstream* des ATG) enthalten. Im Promotorbindungs-Assay führte JAM2-VP16 ohne ABA zu einer Steigerung der Reporteraktivität für *pRCAR13*, *pABF3*, *pAHG1* und *pCYP707A1* um das 1,9-, 2,7-, 8,2- bzw. 17,1-fache im Vergleich zu LV-VP16 (Abbildung 60, a).

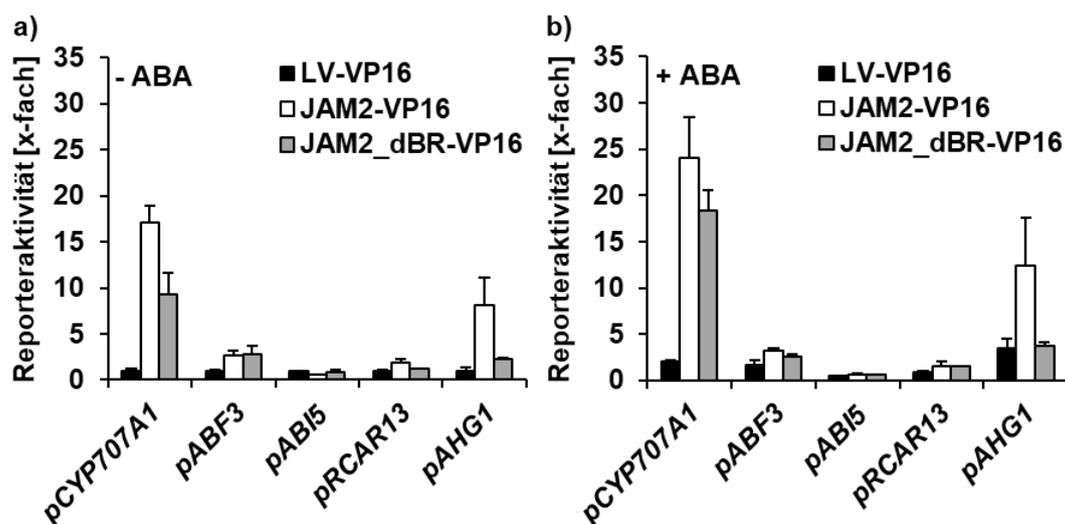


Abbildung 60: Studien zur Bindung von JAM2 an Promotoren von regulatorischen Komponenten des ABA-Signalwegs. Promotorbindungs-Assay in Col-0-Protoplasten. Protoplasten ($10^5/100 \mu\text{l}$) von zwei bis drei Wochen alten Blättern wurden mit $3 \mu\text{g}$ *p35S::GUS*, $4 \mu\text{g}$ Reporter-Konstrukt (*pCYP707A1::LUC*; *pABF3::LUC*; *pABI5::LUC*; *pRCAR13::LUC*; *pAHG1::LUC*) sowie $3 \mu\text{g}$ Effektor-VP16 (*p35S::JAM2-VP16*; *p35S::JAM2_dBR-VP16*; *p35S::MCS-VP16*, LV-VP16) transformiert. Die Inkubation erfolgte ohne (a) oder mit $3 \mu\text{M}$ ABA (b) für 16 ± 1 h bei 25°C . Die Luciferaseaktivität wurde als CPS gemessen und auf die β -Glucuronidaseaktivität, gemessen als RFU, bezogen. Der Messwert mit LV-VP16 und Reporter-Konstrukt ($13,4$ kCPS/RFU mit *pCYP707A1::LUC*; $9,7$ kCPS/RFU mit *pABF3::LUC*; $5,3$ kCPS/RFU mit *pABI5::LUC*; $51,3$ kCPS/RFU mit *pRCAR13::LUC*; $2,9$ kCPS/RFU mit *pAHG1::LUC*) wurde auf eins gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ($\bar{x} \pm s$) und wurden mindestens einmal unabhängig wiederholt. Die Voraussetzungen einer statistischen Auswertung wurden nicht erfüllt.

Mit exogener ABA konnte die Reporteraktivität um das 1,1- bis 1,5-fache für *pABF3*, *pAHG1* und *pCYP707A1* gesteigert werden (Abbildung 60, b). Die Reporteraktivität von *pABI5* mit JAM2-VP16 war ohne und mit exogener ABA 40 % geringer als mit LV-VP16. Die Deletion der DNA-Binderegion von JAM2 (JAM2_dBR-VP16) führte ohne ABA zu einer Verringerung der Reporteraktivität für *pRCAR13*, *pCYP707A1* und *pAHG1* um 36 %, 46 % bzw. 73 % im

Vergleich zu JAM2-VP16. Mit exogener ABA war die Aktivität der Reporter *pRCAR13::LUC*, *pCYP707A1::LUC* und *pAHG1::LUC* um 4 %, 23 % bzw. 70 % geringer. Die Reporteraktivität ohne exogene ABA und mit JAM2_dBR-VP16 blieb für *pABF3* gleich und für *pABI5* stieg sie um das 1,5-fache im Vergleich zu JAM2-VP16 an. Mit exogener ABA und JAM2_dBR-VP16 sank die Reporteraktivität für *pABF3* und *pABI5* um 20 % bzw. 9 %. JAM2 kann den Ergebnissen nach die Expression von *AHG1* über eine direkte Promotorbindung regulieren. Für *pABF3*, *pABI5* und *pRCAR13* wird eine direkte Regulation durch Promotorbindung eher ausgeschlossen, da die gemessenen Effekte nur gering waren. JAM2 bindet auch an *pCYP707A1*, jedoch führte die Deletion der DNA-Binderegion nicht zu einem kompletten Verlust der Reporteraktivität.

3. Diskussion

3.1 Modell des JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplexes

Aus dem Y2H-Screen von Huang (2014) ging hervor, dass AHR11 mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor JAM2 und den Co-Repressoren TPL und TPR2 interagieren kann. Diese Ergebnisse konnten hier im Y2H bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AHR11 im Y2H nicht nur eine Interaktion mit TPL und TPR2 eingeht, sondern auch mit den TPL-verwandten Proteinen TPR1, TPR3 und TPR4 (Abbildung 61). Eine Interaktion zu den JAM2-verwandten Proteinen JAM1, JAM3 konnte im Y2H nicht ermittelt werden. Eine Aussage über eine Interaktion von AHR11 mit MYC2 konnte nicht getroffen werden, da sich MYC2 fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne im Y2H autoaktiv verhielt und ein Wechsel der Fusions-Domäne zur Autoaktivität von AHR11 geführt hätte (Huang 2014).

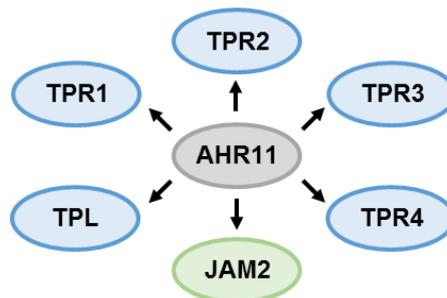


Abbildung 61: Interaktoren von AHR11. Dargestellt sind die hier im Y2H bestimmten Interaktoren von AHR11. Die Proteine wurden je nach Funktion farblich hinterlegt: Transkriptionsfaktoren hellgrün, Inhibitoren hellblau und bei noch unbekannter Funktion grau.

Der Versuch, die Interaktion von AHR11 mit TPL bzw. JAM2 im P2H zu bestätigen, war ohne Erfolg. Zwar konnten die publizierten Homo- und Heterodimerisierungen von JAM2 (Nakata und Ohme-Takagi 2013; Fonseca et al. 2014; Sasaki-Sekimoto et al. 2014; Huang et al. 2018) und die Interaktion von TPL mit NINJA (Pauwels et al. 2010; Ke et al. 2015) gezeigt werden, die Interaktionen mit AHR11 waren in Protoplasten jedoch nicht reproduzierbar. Dies lässt vermuten, dass sich die Lokalisation der Interaktoren in der pflanzlichen Zelle unterscheidet. JAM2 ist ein Transkriptionsfaktor und ist dementsprechend im Kern vorzufinden, wenn auch eine gleichzeitige Lokalisation im Cytoplasma gezeigt werden konnte (Song et al. 2013; Fonseca et al. 2014). Für AHR11 konnte ebenfalls eine Kernlokalisation bestimmt werden (Lisa Groß, Lehrstuhl für Botanik des WZW, unveröffentlicht) und auch TPL, TPR1 und TPR4 sind im Kern vorzufinden (Long et al. 2006; Zhu et al. 2010b; Fukazawa et al. 2014; Graeff et al. 2016). Für TPR2 sowie TPR3 wird eine gleiche Lokalisation aufgrund der Ähnlichkeit zu den anderen TPL/TPRs vermutet (The UniProt Consortium 2018). Das Ausbleiben der Interaktion kann somit nicht auf eine unterschiedliche Lokalisation in der pflanzlichen Zelle

zurückgeführt werden. Weitere voneinander abweichende Ergebnisse ergaben sich mit AHR11 bei der Bestimmung des Einflusses auf den ABA-Signalweg. Während in der *pATHB6::LUC*-Reporterlinie eine hypersensitive Reaktion durch die Überexpression von *AHR11* ausgelöst werden konnte, zeigte AHR11 in Protoplastenversuchen keinen Einfluss auf die ABA-Antwort. Es ist möglich, dass mit AHR11 in Pflanzen und in Protoplasten unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden können. Dies kann zum einen bedingt sein durch die Verwendung von unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Des Weiteren können in Protoplasten nur Vorgänge beobachtet werden, die in einzelnen Zellen eines bestimmten Gewebes ablaufen (Sheen 2001). In den hier gezeigten Versuchen wurden Mesophyll-Protoplasten von zwei bis drei Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen verwendet. Das Luciferase-Imaging hingegen erfolgte mit sechs Tage alten Keimlingen. Zum anderen ist der Vorgang der Protoplastierung vergleichbar mit einer Verwundung. Blätter werden von einer Pflanze abgeschnitten und in einer Enzymlösung verdaut. Dies löst in der pflanzlichen Zelle Mechanismen aus, die vergleichbar mit einer Wundreaktion sind. Ein wichtiges Hormon in der Reaktion auf Verwundung ist JA, das in der Folge einer Verwundung in der Zelle akkumuliert (Koo und Howe 2009). In hier durchgeführten Protoplastenexperimenten mit dem Jasmonat-induzierbaren *pTAT1* konnte festgestellt werden, dass dieser im Vergleich zum ABA-induzierbaren *pRD29B* ohne Hormonzugabe bereits eine 12,3-fach stärkere Induktion aufwies (*pTAT1* mit 12,3 kCPS/RFU im Vergleich zu *pRD29B* mit 1,0 kCPS/RFU; Abbildung 54). Daraus wird deutlich, dass Experimente in Protoplasten auch immer unter dem Einfluss einer aktiven JA-Signaltransduktion erfolgen. AHR11 könnte in Folge dieses hormonellen Stimulus posttranslationalen Modifikationen unterliegen, die möglicherweise zu einer Änderung des Aktivitätszustandes führen oder die Degradation des Proteins zur Folge haben. Ein Hinweis darauf könnte die hypersensitive Reaktion von *ahr11* bzw. d476 in der JA-Reporterlinie *pTAT1::LUC* unter Me-JA-Behandlung sein (Dr. Alexander Christmann, Lehrstuhl für Botanik des WZW, unveröffentlicht). Die JAZ-Proteine, die ebenfalls mit JAM2 interagieren, können zum Beispiel während eines JA-Stimulus sumoyliert (Srivastava et al. 2018) oder ubiquitiniert (Saracco et al. 2009; Pauwels et al. 2015; Durand et al. 2016) vorliegen. Beides dient der schnellen Regulation von JA-Antworten. Bei der Sumoylierung werden Polypeptide, die etwa 100–115 Aminosäuren groß sind und als SMALL-UBIQUITIN-LIKE MODIFIER (SUMO) bezeichnet werden, an Lysinreste der Zielproteine gebunden, wodurch verschiedene zelluläre Prozesse, wie Signaltransduktion oder Zellzyklus, reguliert werden können (Yates et al. 2016; He et al. 2017). Auch bei der Ubiquitinierung sind Lysinreste des Zielproteins entscheidend für die Modifikation, anstelle von SUMO wird dabei aber ein kleines Ubiquitin-Protein angehängt und das Protein dadurch meist für die Degradation markiert (Belknap und Garbarino 1996). Sumoylierung und Ubiquitinierung können sowohl synergistisch als auch antagonistisch zueinander wirken (He et al. 2017). Für

AHR11 sind Interaktionen zu SUMO1 (Miller et al. 2010) und SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS THALIANA (SINAT) 3 (Huang 2014) bekannt (Abbildung 62).

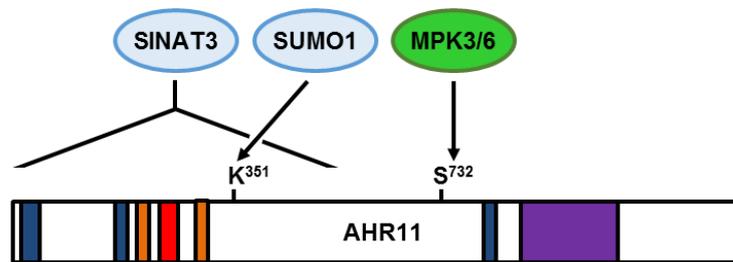


Abbildung 62: Domänen von AHR11, die Ziel einer posttranslationalen Modifikation sind. SINAT3 interagiert mit AHR11 über den N-terminalen Bereich, der die Aminosäuren 1–554 umfasst (Huang 2014). Die Sumoylierung mit SUMO1 erfolgt am K³⁵¹ (Miller et al. 2010) und eine Phosphorylierung durch MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MPK) 3 bzw. 6 wurde für S⁷³² gezeigt (Hoehenwarter et al. 2013). SINAT3, SUMO1 und MPK3/6 wurden je nach Funktion farblich hinterlegt: Inhibitoren hellblau und Aktivatoren grün. Die weiteren Markierungen in AHR11 entsprechen den Angaben von Huang (2014) und umfassen die NLSs (NLS1, Aminosäuren 18–29; PYNLS2, Aminosäuren 194–199; NLS3, Aminosäuren 793–799; blau), die EAR-Motive (EAR1, Aminosäuren 208–212; EAR2, Aminosäuren 314–318; orange), die CR (CR, Aminosäuren 235–249; rot) und die DNA_pol_viral_N (Aminosäuren 840–994; lila).

Die Interaktion von AHR11 mit SUMO1 erfolgt über die Sequenz ³⁵⁰VKSE³⁵³, die der kanonischen Bindestelle ΨKxE – wobei Ψ für eine große hydrophobe Aminosäure steht und x für eine beliebige Aminosäure – entspricht (Rodriguez et al. 2001; Miller et al. 2010). Die Sumoylierung von AHR11 erfolgt unter stressfreien Bedingungen, bei Hitzebehandlung oder unter oxidativem Stress (Miller et al. 2010). Da AHR11 in der Mutante *siz1-2* weniger sumoyliert vorliegt, wird vermutet, dass die Sumoylierung von AHR11 durch die SUMO-Ligase SCAFFOLD ATTACHMENT FACTOR A/B/ACINUS/PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED SIGNALTRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION/L-METHIONINE SULFOXIMINE INTERACTING-ZINC FINGER (SIZ) 1 erfolgt (Rytz et al. 2018). Ein weiteres Zielprotein von SIZ1, dessen Aktivität durch Sumoylierung reguliert wird, ist der bZIP-Transkriptionsfaktor ABI5 (Miura et al. 2009). SINAT3 ist eine von fünf SINAT E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen in Arabidopsis und sorgt für den Abbau von Proteinen durch deren Ubiquitinierung (Wang et al. 2008; Yang et al. 2017). Experimentell wurde die Ubiquitinierung von AHR11 durch SINAT3 bisher aber noch nicht nachgewiesen. Huang (2014) bestimmte als Interaktionsbereich von SINAT3 mit AHR11 den Sequenzabschnitt 1–554 aa. Die Interaktionsbereiche von SUMO1 und SINAT3 befinden sich demzufolge im gleichen Abschnitt. Eine Konkurrenz um den Lysinrest an Position 351 ist möglich. Eine weitere Modifikation, die den Aktivitätszustand eines Proteins moduliert, ist die Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von Proteinen ist reversibel und erfolgt meist an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten (He et al. 2017). Für AHR11 konnte eine Phosphorylierung in dem Sequenzabschnitt ⁷²⁴IINLTQVKS^PPVK⁷³⁵ durch die Kinasen MPK3 und MPK6 detektiert werden (Hoehenwarter et al. 2013). Sowohl MPK3 als auch MPK6 haben eine Funktion in der Abwehr des Pathogens *Botrytis cinerea* (Galletti et al.

2011; Xu et al. 2016). Beide Kinasen phosphorylieren aber auch MYB44, wodurch die ABA-vermittelte Inhibierung der Keimung verstärkt wird (Nguyen et al. 2012). Daraus wird deutlich, dass AHR11 auf verschiedenen Wegen modifiziert werden kann. Zu welchem Zeitpunkt und mit welchem Effekt die Modifikation von AHR11 erfolgt, ist jedoch noch offen. Eine Klärung würde zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise von AHR11 beitragen und möglicherweise die Ursache für abweichende Ergebnisse hervorbringen.

3.1.1 Domänen der Interaktion von JAM2 und AHR11

Als Interaktionsdomäne von AHR11 für JAM2 hatte Huang (2014) den Sequenzabschnitt 552–804 aa bestimmt. In diesem Abschnitt von AHR11 sind die Phosphorylierungsstelle der MPK3/6 (S^{732}) und die NLS3 (Aminosäuren 793–799) lokalisiert (Hoehenwarter et al. 2013; Huang 2014). In Y2H-Analysen sollte versucht werden, den Interaktionsbereich zwischen AHR11 und JAM2 zu spezifizieren. Dabei konnte die Interaktionsdomäne jedoch nicht weiter eingeschränkt werden. In den hier durchgeführten Versuchen ergab sich vielmehr ein Interaktionsbereich von Aminosäuren 555–1168, was dem C-Terminus von AHR11 entspricht (Abbildung 63). Die Ergebnisse stimmen aber in sofern mit denen von Huang (2014) überein, dass das Rumpfpfprotein (Aminosäuren 1–247 von AHR11) in der Mutante *ahr11* nicht in der Lage ist, mit JAM2 zu interagieren.

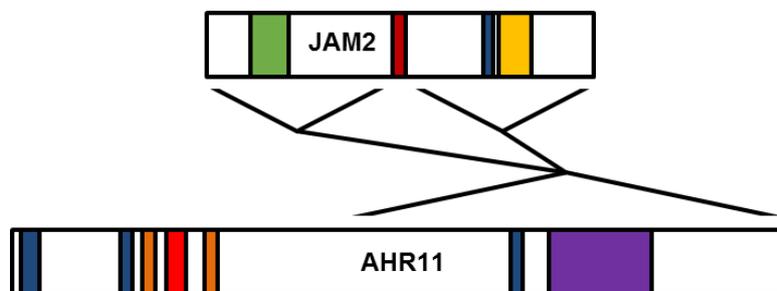


Abbildung 63: Interaktionsdomänen von JAM2 und AHR11. Die Interaktion von JAM2 mit AHR11 erfolgt über den N- und C-Terminus von JAM2 (Aminosäuren 1–274 und Aminosäuren 296–590) sowie den C-Terminus von AHR11 (Aminosäuren 555–1168). Die markierten Bereiche von JAM2 umfassen die JID (Aminosäuren 76–138; grün; Fernández-Calvo et al. 2011; Song et al. 2013), die QRR (Aminosäuren 275–295, dunkelrot; The UniProt Consortium 2018), die NLS (Aminosäuren 406–424, blau; Sasaki-Sekimoto et al. 2014) und die bHLH-Domäne (Aminosäuren 429–478, gelb; The UniProt Consortium 2018). Die Markierungen in AHR11 entsprechen den Angaben von Huang (2014) und umfassen die NLSs (NLS1, Aminosäuren 18–29; PYNLS2, Aminosäuren 194–199; NLS3, Aminosäuren 793–799; blau), die EAR-Motive (EAR1, Aminosäuren 208–212; EAR2, Aminosäuren 314–318; orange), die CR (Aminosäuren 235–249; rot) und die DNA_pol_viral_N (Aminosäuren 840–994; lila).

Umgekehrt sollte auch bestimmt werden, welcher Bereich von JAM2 für die Interaktion mit AHR11 verantwortlich ist. Dabei zeigte sich, dass AHR11 sowohl den N-Terminus als auch den C-Terminus von JAM2 für die Interaktion benötigt. Der N-Terminus von JAM2 enthält die JID für die Interaktion mit JAZ-Proteinen (Song et al. 2013) und der C-Terminus die bHLH-

Domäne, die für die Dimerisierung mit anderen bHLHs notwendig ist (Murre et al. 1989; Ferré-D'Amaré et al. 1993; Ellenberger et al. 1994; Ferré-D'Amaré et al. 1994; Massari und Murre 2000). Durch die Interaktion von AHR11 mit dem N- und C-Terminus von JAM2 könnte eine Konkurrenz zu anderen JAM2-Interaktionspartnern, wie den JAMs oder JAZs, entstehen. AHR11 könnte aber auch – ähnlich wie die JAZs – die DNA-Bindung von JAM2 verhindern, indem es beispielsweise die Homodimerisierung oder die Dimerisierung mit anderen bHLHs verhindert. Nur ein bHLH-Dimer ist in der Lage an die DNA zu binden, da immer nur eine Halbseite der Erkennungssequenz durch ein Monomer gebunden wird (Ellenberger et al. 1994; Shimizu et al. 1997). Nach der Darstellung des JA-Signalwegs von Goossens et al. (2017) liegt die Interaktion zwischen JAM2 und den JAZs ohne DNA-Bindung in Abwesenheit von JA-Ile vor (vgl. Abbildung 10). In Anwesenheit von JA-Ile werden die JAZs abgebaut und JAM2 kann an die DNA binden. Goossens et al. (2017) vermuten dies, weil Song et al. (2013) in einem Aktivierungsassay in Protoplasten zeigen konnte, dass die JAZs die reprimierende Wirkung von JAM2 aufheben. Der Aktivierungsassay von Song et al. (2013) ist vom Aufbau her mit dem hier verwendeten (vgl. Abbildung 52) vergleichbar. In dem Assay von Song et al. 2013 (vgl. Abbildung 8 C) zeigte GAL4BD-JAM2 eine um 56 % geringere Reporteraktivität als die Kontrolle mit der GAL4BD alleine (GUS/LUC-Verhältnis mit GAL4BD ca. 7,2 und GUS/LUC-Verhältnis mit GAL4BD-JAM2 ca. 3,2). Durch die Zugabe von JAZ1 erhöhte sich die Reporteraktivität um das 1,5-fache (GUS/LUC-Verhältnis mit GAL4BD-JAM2 in Kombination mit JAZ1 ca. 4,7). Andererseits könnte die Interaktion von AHR11 auch mit einem JAM2-Dimer, das an die DNA gebunden ist, erfolgen. AHR11 könnte in diesem Fall mit dem N-Terminus des einen JAM2-Monomers interagieren und mit dem C-Terminus des zweiten Monomers. Die Interaktion mit beiden Monomeren würde durch die JAM2-Homodimerisierung und durch die Einlagerung des JAM2-Dimers in die große DNA-Furche zustande kommen. AHR11 könnte dadurch die Interaktion mit anderen Proteinen, die die Funktion von JAM2 als Transkriptionsfaktor fördern, verhindern. Zudem würde diese Annahme zur Interaktion von JAM2 und AHR11 auch dem Modell von Huang (2014) nahe kommen. Sie nahm an, dass ohne hormonellen Stimulus JAM2 in Interaktion mit AHR11 an die DNA gebunden ist. In Folge eines Reizes sollte AHR11 durch Ubiquitinierung dem Abbau zugeführt werden, wodurch JAM2 die Funktion als Transkriptionsfaktor wahrnehmen kann. Aus den Modellen von Huang (2014) und Goossens et al. (2017) zur Interaktion von JAM2 mit AHR11 bzw. JAZ-Proteinen ergibt sich somit die Frage, wie die Interaktionen reguliert werden. Beide Modelle nehmen an, dass JAM2 mit AHR11 bzw. den JAZ-Proteinen in Abwesenheit eines Stimulus interagiert. Die Interaktionen würden demzufolge gleichzeitig stattfinden. Bisher wurde aber nicht geklärt, ob AHR11 mit den JAZ-Proteinen um die Interaktionsdomäne konkurriert oder ob eine gleichzeitige Interaktion mit JAM2 möglich ist. Ebenso ist unklar, ob AHR11 mit den JAZs interagieren kann. Um zu bestimmen, unter welchen Bedingungen JAM2 mit welchem Interaktionspartner interagiert, sind weitere

Studien notwendig. Eine Möglichkeit bietet das *Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging* (FRET-FLIM)-System, in dem Proteininteraktionen auch unter dem Einfluss von verschiedenen hormonellen Stimuli in pflanzlichen Geweben getestet werden können.

3.1.2 Domänen der Interaktion von AHR11 und TPL/TPRs

Über einen Sequenzvergleich mit AHR11-Orthologen bestimmte Huang (2014) zwei N-terminale EAR-Motive. EAR-Motive wurden zuerst in den ERFs vorgefunden und für die transkriptionelle Repressor-Funktion der ERFs verantwortlich gemacht (Ohta et al. 2001). Arabidopsis enthält etwa 219 transkriptionelle Regulatoren, in denen ein EAR-Motiv vorzufinden ist (Kagale et al. 2010). Aus der Literatur ist bekannt, dass TPL/TPRs mit Proteinen, die ein solches Motiv enthalten, interagieren können (Szemenyei et al. 2008; Pauwels et al. 2010; Oh et al. 2014; Wang et al. 2015a; Lee et al. 2016; Lynch et al. 2017). Es stellte sich die Frage, über welches der beiden EAR-Motive die TPL/TPRs mit AHR11 in Interaktion treten oder ob ganz und gar beide EAR-Motive für die Interaktion notwendig sind. Kagale et al. (2010) stellten fest, dass in einem Protein ein bis vier EAR-Motive enthalten sein können. Am häufigsten sind jedoch ein (ca. 75 %) bzw. zwei (20 %) EAR-Motive. Zu Proteinen, die wie AHR11 zwei EAR-Motive enthalten, zählen zum Beispiel JAZ5, ERF4 und IAA7 (Causier et al. 2012a). Für IAA7 konnte gezeigt werden, dass es wie AHR11 mit allen TPL/TPRs eine Interaktion eingehen kann (Causier et al. 2012a; Lee et al. 2016). Sobald jedoch eines der beiden EAR-Motive mutiert war, konnte TPR3 mit IAA7 nicht mehr interagieren. Auch TPL und TPR1 interagieren mit beiden EAR-Motiven von IAA7, wobei jedoch die Mutation des zweiten EARs nicht zu einem Verlust der Interaktion, sondern lediglich zu einer Reduktion der Interaktionsstärke führte. TPR2 sowie TPR4 interagierten nur mit dem N-terminalen EAR-Motiv. An diesem Beispiel wird deutlich, wie unterschiedlich das Interaktionsverhalten der TPL/TPRs zu einem Interaktionspartner sein kann. Im Fall von AHR11 konnte nur für TPR1 und TPR3 ein Interaktionsverlust zu AHR11 verzeichnet werden, wenn eines oder beide EAR-Motive deletiert wurden. Jedoch reagierten TPR1 und TPR3 auch auf jede weitere Veränderung von AHR11 – bis auf die Deletion der RD1 – mit einem Interaktionsverlust (Abbildung 64). Die Interaktion zwischen AHR11 und TPR1 bzw. TPR3 wurde bisher nur über Y2H gezeigt und über keine weitere Methode bestätigt. Es ist daher nicht sicher, ob die Interaktion zwischen diesen beiden TPRs und AHR11 tatsächlich in der Pflanze zustande kommt und ob eines der beiden TPRs dafür mit einem EAR-Motiv oder einer anderen Domäne von AHR11 in Kontakt tritt.

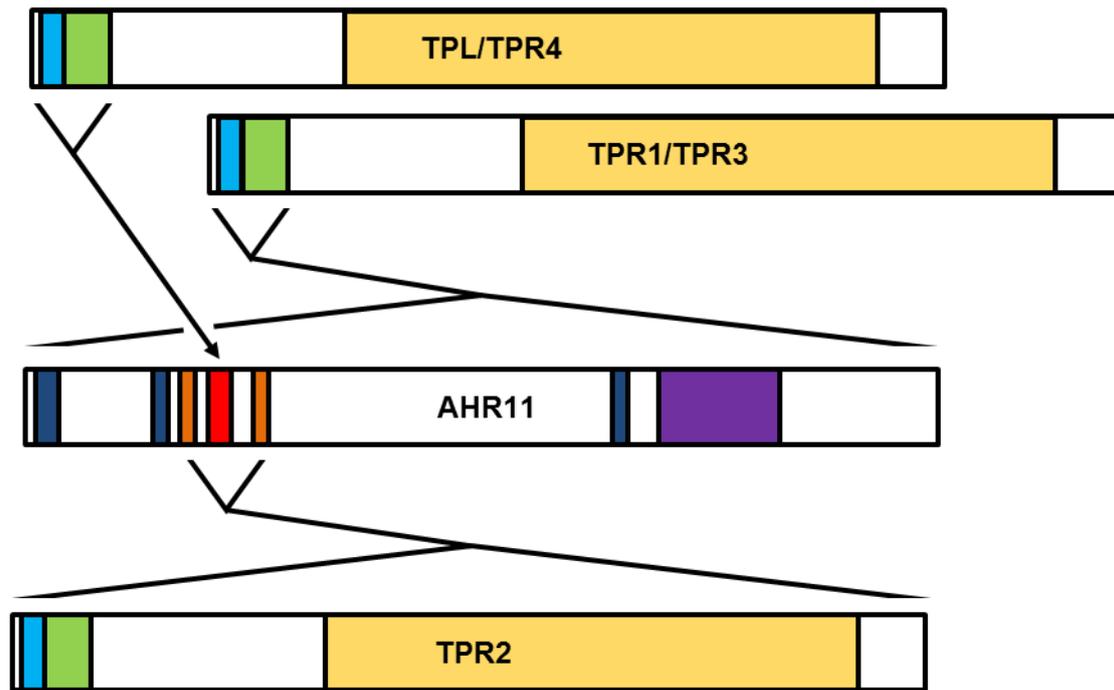


Abbildung 64: Interaktionsdomänen der TPL/TPRs mit AHR11. Die Interaktionsdomäne der TPL/TPRs – bis auf TPR2 – mit AHR11 beschränkt sich auf den N-Terminus, aus LisH (Aminosäuren 4–36, hellblau) und CTLH (Aminosäuren 34–92, grün). TPR2 interagiert neben dem N-Terminus auch über weitere Bereiche, wie zum Beispiel den WD-Wiederholungen (Aminosäuren 353–1091, gelb) mit AHR11, die hier nicht genauer charakterisiert wurden. AHR11 interagiert mit TPL und TPR4 über ²³⁹WDLN²⁴² der CR (Aminosäuren 235–249; rot). Für die Interaktion mit TPR2 ist neben der CR auch eines der EAR-Motive (EAR1, Aminosäuren 208–212; EAR2, Aminosäuren 314–318; orange) notwendig. Die Interaktion von AHR11 mit TPR1 und TPR3 geht zumeist verloren, sobald eine Veränderung an AHR11 vorgenommen wird. Neben den bereits genannten Domänen sind auch die drei NLSs (NLS1, Aminosäuren 18–29; PYNLS2, Aminosäuren 194–199; NLS3, Aminosäuren 793–799; blau) und eine potentielle DNA-Bindedomäne (DNA_pol_viral_N, aa 840–994; lila) von AHR11 gekennzeichnet. Die Angaben zur Lokalisation der Domänen von AHR11 stammen von Huang (2014) und für die TPL/TPRs von UniProt (The UniProt Consortium 2018).

Für die drei weiteren TPL/TPRs kam es zu keinem Interaktionsverlust durch die Deletion der EAR-Motive. Erst die Deletion der CR hatte einen Interaktionsverlust mit TPL und TPR4 zur Folge. Wie auch die EAR-Motive wurde die CR von Huang (2014) über Sequenzvergleiche der AHR11-Orthologen identifiziert. Hier wurde festgestellt, dass die CR die Aminosäuresequenz ²³⁹WDLN²⁴² enthält, die einem partiellen DLNxxP-Motiv entspricht. Sowohl DLNxxP als auch LxLxL werden als Konsensussequenz des EAR-Motivs angesehen. LxLxL lässt sich zu ca. 75 % und DLNxxP zu ca. 24 % in transkriptionellen Regulatoren mit EAR-Motiven vorfinden (Kagale et al. 2010; Kagale und Rozwadowski 2011). Die beiden von Huang (2014) identifizierten EAR-Motive entsprechen der LxLxL-Konsensussequenz. Für die Proteine DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER 1 (DAZ1) und ERF3, die beide ein DLNxxP enthalten, wurde die Bedeutung dieses Motivs für eine Interaktion mit TPL gezeigt (Causier et al. 2012a; Borg et al. 2014). Die Mutation dieser Sequenz zum Beispiel zu AHNxxP oder die Deletion führte zu einem Verlust der Interaktion. Durch einen schrittweisen Austausch der Aminosäuren wurde hier versucht die Sequenz innerhalb der CR, die für die Interaktion zu TPL und TPR4 notwendig ist, zu bestimmen. Der Interaktionsbereich konnte dabei auf ²³⁹WDLN²⁴²

eingeschränkt werden, wobei der Austausch einer einzelnen Aminosäure in diesem Bereich schon den Verlust der Interaktion mit TPL oder TPR4 zur Folge hatte. Für TPR2 konnte erst durch weitere Analysen bestimmt werden, dass es für die Interaktion zu AHR11 sowohl die CR benötigt als auch eines der beiden EAR-Motive. Wie aber bereits angedeutet, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Deletion eines EAR-Motivs und der CR der eigentliche Interaktionsbereich für TPR2 nicht mehr zugänglich ist.

Neben der AHR11-Interaktionsdomäne der TPL/TPRs sollte auch die TPL/TPR-Interaktionsdomäne von AHR11 bestimmt werden. Aus der Literatur geht hervor, dass die Interaktion zu Proteinen mit EAR-Motiven oder einer WUS-Box (TLxLG) meist über den N-Terminus, der die LisH- und die CTLH-Domäne enthält, erfolgt (Kieffer et al. 2006; Szemenyei et al. 2008; Krogan et al. 2012; Wang et al. 2013a; Ke et al. 2015; Martin-Arevalillo et al. 2017). Die TPL/TPRs wurden in Anlehnung an Kieffer et al. (2006) in vier Fragmente zerlegt und im Y2H auf die Interaktion mit AHR11 getestet. AHR11 interagiert mit allen TPL/TPRs bis auf TPR2 nur über das Fragment 1–288 aa, das die LisH und die CTLH-Domäne enthält. Um eine weitere Unterscheidung zu treffen, welche der beiden Domänen für die Interaktion verantwortlich ist, wurde die LisH-Domäne über N-terminale Verkürzungen entfernt (Kieffer et al. 2006) oder die CTLH-Domäne deletiert (Szemenyei et al. 2008; Krogan et al. 2012; Wang et al. 2013a). Hier wurden wie bei Kieffer et al. (2006) die Vollängen der TPL/TPRs bzw. die N-terminalen Fragmente (1–288 aa) um die ersten 37 aa verkürzt, so dass keine LisH-Domäne mehr vorhanden war. Der Verlust der LisH-Domäne führte auch zu einem Verlust der Interaktion zu AHR11, woraus sich schließen lässt, dass die LisH-Domäne im Gegensatz zur CTLH für die Interaktion entscheidend ist. In den Studien, in denen anstelle der LisH die CTLH-Domäne entfernt wurde, wird jedoch stets der gegenteilige Schluss gezogen. In den hier vorliegenden Interaktionsstudien wurde allerdings eine Auswirkung der Deletion der CTLH auf die Interaktion der TPL/TPRs mit AHR11 nicht getestet. Es ist möglich, dass die Herangehensweise von Szemenyei et al. (2008), Krogan et al. (2012) und Wang et al. (2013a) hier zu deren Schluss führen könnte. Deletionen in zwei eng benachbarten Domänen, die sich zum Teil auch überschneiden, können einen Verlust der Interaktion aufgrund von Konformationsänderungen zur Folge haben, auch wenn die deletierten Bereiche keine direkte Beteiligung an der Interaktion haben. Die Studien und die hier vorliegenden Ergebnisse vereint jedoch die Aussage, dass der N-Terminus der TPL/TPRs für die Interaktion mit Proteinen, die EAR-Motive enthalten, notwendig ist.

Wie zuvor schon angedeutet, bildet TPR2 eine Ausnahme in diesem Fall. Die Interaktion von TPR2 mit AHR11 konnte nicht allein auf den N-Terminus eingeschränkt werden. Auch C-terminale Fragmente (Aminosäuren 37–1131 und Aminosäuren 289–1131) von TPR2 waren in

der Lage, eine Interaktion mit AHR11 einzugehen. Ähnliches konnte auch von Collins et al. (2019) und Zhang et al. (2014) für TPL beobachtet werden – bei letzterem jedoch für TPL aus *Medicago truncatula*. Zhang et al. (2014) bestimmten eine Prolin-reiche Region von TPL, die zwischen der CTLH und den WD-Wiederholungen liegt, als essentiell für die Interaktion mit STENOFOLIA (STF). Collins et al. (2019) stellte fest, dass TPL über die WD-Wiederholungen mit RELATED TO ABI3/VIVIPAROUS1 1 (RAV1), TEMPRANILLO 1 (TEM1) und VERNALIZATION 5 (VRN5) interagiert. Ob die Prolin-reiche Region, die WD-Wiederholungen oder beide neben dem N-Terminus für die Interaktion von TPR2 mit AHR11 zuständig sind, kann aus den hier durchgeführten Interaktionsstudien nicht geschlussfolgert werden. Es wird jedoch deutlich, dass neben dem N-Terminus auch der C-Terminus eine Rolle in der Interaktion von TPR2 und AHR11 spielt.

3.1.3 Funktion des JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplexes im ABA-Signalweg

JAM2 ist in der Literatur als generell negativer Transkriptionsfaktor beschrieben. Zu dieser Annahme kam es vor allem aufgrund einer Reihe von Aktivierungsassays (Nakata und Ohme-Takagi 2013; Song et al. 2013; Huang et al. 2018). In diesen Assays wurde JAM2 mit der GAL4BD fusioniert und zusammen mit einem Reporterkonstrukt, das die DNA-Bindesequenz der GAL4BD enthält, in ein pflanzliches Expressionssystem eingebracht. Da GAL4BD-JAM2 eine geringere Reporteraktivität aufwies als die GAL4BD alleine, wurde angenommen, dass JAM2 sich allgemein reprimierend auf die Expression auswirkt. Des Weiteren wurde auch festgestellt, dass die JAMs im Gegensatz zum nahe verwandten MYC2 keine mit sauren Aminosäuren angereicherte Region enthalten, die als transkriptionelle Aktivierungsdomäne dienen kann (Nakata et al. 2013). Dadurch könnten die JAMs nicht die RNA Polymerase II rekrutieren, um die Expression zu aktivieren (Goossens et al. 2017). Niu et al. (2011) und Fonseca et al. (2014) zeigten zudem, dass JAM2 einen reprimierenden Einfluss auf die Expression von JAZ2 nimmt. Dafür wurde die CDS von JAM2 zusammen mit einem Reporterkonstrukt aus dem *pJAZ2* und der CDS für GUS in Protoplasten eingebracht. JAM2 führte dabei zu einer geringeren Reporteraktivität als der Kontrollansatz mit dem Reporter alleine. In den hier gezeigten Experimenten hatte JAM2 in Anwesenheit von ABA jedoch eine aktivierende Wirkung auf die Expression ABA-regulierter Gene. Dies zeigte sich im Luciferase-Imaging mit der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC*, in der Expressionsanalyse von ABA-regulierten Genen – wie *RD29B*, *ABI5*, *RCAR13* und *AHG1* – oder mit dem ABA-Reporter *pRD29B::LUC* in Protoplasten. Für AHG1 konnte sogar eine direkte Regulation durch die Bindung an den Promotor gezeigt werden. JAM1 wurde ebenfalls als generell negativer Regulator beschrieben (Nakata et al. 2013; Nakata und Ohme-Takagi 2013; Song et al. 2013), während für den ABA-Signalweg eine aktivierende Funktion festgestellt wurde (Li et al. 2007). Umgekehrt konnte auch für das

zu den JAMs nahe verwandte MYC2 eine negative regulatorische Funktion für *PLANT DEFENSIN 1.2 (PDF1.2)* bestimmt werden (Anderson et al. 2004), obwohl es als generell positiver Regulator beschrieben wurde (Niu et al. 2011; Nakata et al. 2013; Song et al. 2013; Fonseca et al. 2014). Auch für andere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel ABI5, wurden sowohl negative als auch positive regulatorische Funktionen nachgewiesen. Zu den negativ regulierten Genen zählen beispielsweise *ABSCISIC ACID RESPONSIVE PROTEIN (ABR)* und *M17* (Finkelstein und Lynch 2000; Su et al. 2016). Positiv regulierte sind *SHOOT GRAVITROPISM 1 (SGR1)*, *EARLY METHIONINE-LABELLED (EM) 6* und *NON-YELLOW COLORING (NYC) 1* (Sakuraba et al. 2014). Es stellt sich demnach die Frage des Sinns einer Einteilung von Transkriptionsfaktoren in generell positive oder negative Regulatoren. Transkriptionsfaktoren scheinen doch eher sowohl positive als auch negative regulatorische Funktionen wahrzunehmen, je nach vorliegendem Stimulus oder beteiligtem Interaktionspartner.

Neben der aktivierenden Wirkung auf das ABA-Reportersystem in Protoplasten und der positiven Wirkung auf die Expression ABA-regulierter Gene konnte für JAM2 auch eine physiologische Funktion nachgewiesen werden. JAM2 wirkte sich in Verbindung mit ABA sowohl auf das Wurzelwachstum als auch auf die Keimung aus. Beide Vorgänge werden zu den ABA-regulierten Wachstumsprozessen gezählt (Zeevaart und Creelman 1988; Hilhorst und Karssen 1992; Himmelbach et al. 1998; Cutler et al. 2010). ABA vermittelt eine Aufrechterhaltung der Dormanz, wodurch das vorzeitige Keimen bzw. die Keimung unter ungünstigen Umweltbedingungen verhindert wird. Auf das Wurzelwachstum hat ABA in geringen Konzentrationen einen fördernden Effekt, während es in höheren Konzentrationen das Wachstum inhibiert (Zeevaart und Creelman 1988; Himmelbach et al. 1998; Dietrich et al. 2017; Li et al. 2017). Durch die positive und negative Regulation des Wurzelwachstums kann eine optimale Anpassung an die umgebenden Bodenverhältnisse erfolgen. Die Überexpression von JAM2 hatte eine meist signifikant verminderte Keimung zur Folge. Die JAM2-Knockout-Linie hingegen wies im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Keimungsrate auf. Der Einfluss auf das Wurzelwachstum war nicht so eindeutig wie der auf die Keimung, jedoch schien JAM2 die Empfindlichkeit gegenüber exogener ABA zu erhöhen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den anderen Ergebnissen, nach denen JAM2 einen positiven Einfluss auf die ABA-Antwort nimmt. JAM2 ist demnach als positiver Regulator der ABA-Antwort anzusehen.

Für AHR11 wurde im ABA-Signalweg eine Funktion erwartet, die ähnlich zur Funktion der JAZs im JA-Signalweg oder der Aux/IAAs im Auxin-Signalweg ist. Sowohl JAZs als auch Aux/IAAs wirken als Linker zwischen einem Transkriptionsfaktor und TPL, wodurch die Expression von Zielgenen des JA- und Auxin-Signalwegs unterdrückt wird (Pauwels et al. 2010). Diese Erwartung für AHR11 begründete sich auf der Interaktion zu den TPL/TPRs, auf der Interaktion mit

einem Transkriptionsfaktor in Form von JAM2 und auf dem ABA-hypersensitiven Phänotyp in der *AHR11*-Defektmutante. AHR11 sollte sich somit negativ auf die JAM2-vermittelte ABA-Antwort auswirken. Während AHR11 aber mit dem ABA-Reporter-system in Protoplasten keinen Effekt zeigte, löste es in der ABA-Reporterlinie *pATHB6::LUC* unter ABA-Exposition eine hypersensitive Reaktion aus. Dies steht zunächst im Gegensatz zu der erwarteten Funktion. Wenn aber davon ausgegangen wird, dass die negative Regulation nicht durch AHR11 selbst, sondern vorrangig durch die TPL/TPRs ausgelöst wird und AHR11 lediglich das Bindeglied darstellt, dann könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die Überexpression von AHR11 zu einem Austitrieren der TPL/TPRs führt. Ein Teil des vorkommenden AHR11s würde die TPL/TPRs binden, ein weiterer an JAM2 und wenige AHR11-Moleküle würden auch als Linker fungieren. Nur dieser seltene vollständige Komplex mit den TPL/TPRs hätte auch eine reprimierende Wirkung (Abbildung 65). Die Mutante *ahr11*, die nur das Rumpfprotein von AHR11 enthält, und die T-DNA-Insertionslinie d476 lösten ebenfalls eine hypersensitive Reaktion der ABA-Reporterlinie aus. Das Rumpfprotein *ahr11* ist weder in der Lage mit JAM2 noch mit den TPL/TPRs zu interagieren. Es entsteht somit kein Komplex und JAM2 kann positiv auf die ABA-Antwort einwirken.

Im Gegensatz zu JAM2 hatte AHR11 keinen Einfluss auf die Expression der ABA-regulierten Gene *RD29B* und *CYP707A1*. Auch die Daten aus Versuchen zur Keimung oder zum Wurzelwachstum geben kein Anzeichen eines nennenswerten Einflusses von AHR11 auf ABA-regulierte Prozesse. Eine Tatsache ist jedoch, dass JAM2 und dessen positiver Einfluss auf die ABA-Antwort erst durch die Interaktion mit AHR11 entdeckt wurden. Ein zufälliger Befund ist möglich, aber doch eher als unwahrscheinlich anzusehen. Vielleicht wurden bisher die falschen Gene hinsichtlich einer Regulation durch AHR11 betrachtet. In Keimlingen von *Arabidopsis* konnten etwa 1354 Gene detektiert werden, die durch ABA reguliert werden (Hoth 2002). Es ist möglich, dass ein Teil dieser Gene durch den JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplex reguliert wird, aber auch manche nur durch JAM2 in Kombination mit anderen bisher noch unbekanntem Interaktionspartnern oder durch AHR11-TPL/TPR in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren. Auf die Expression des ABA-induzierbaren Gens *ATHB6* (Söderman et al. 1999) in der ABA-Reporterlinie zeigten sowohl JAM2 als auch AHR11 einen positiven Effekt. Die hypersensitive Reaktion von *ahr11* konnte aber durch den Knockout von *JAM2* nicht beeinflusst werden. Es ist möglich, dass AHR11 auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert, die zur Regulation von *ATHB6* und anderen Genen beitragen (Abbildung 65). Der alleinige Knockout von *JAM2* hätte in diesem Fall keinen Einfluss.

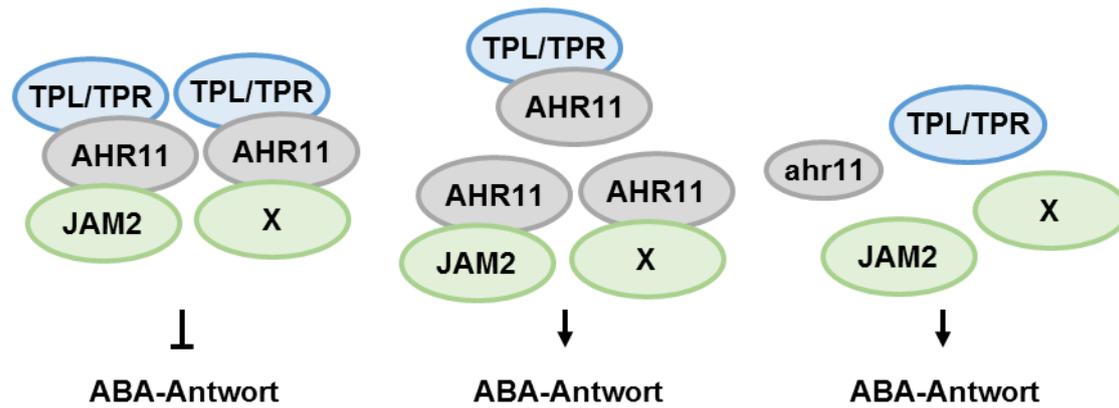


Abbildung 65: Hypothetisches Modell zur hypersensitiven Reaktion durch AHR11. Durch die Überexpression von AHR11 in *pATHB6::LUC* kommt es neben der Ausbildung des Triple-Komplexes (links) mit JAM2 und anderen Transkriptionsfaktoren (X) auch zur getrennten Interaktion von AHR11 mit JAM2, X bzw. den TPL/TPRs (Mitte). Während der Triple-Komplex die ABA-Antwort hemmt, wird durch die getrennte Interaktion die ABA-Antwort nicht unterdrückt. In der Mutante *ahr11* ist nur das Rumpfprotein vorzufinden, das nicht mit JAM2, potentiellen anderen Transkriptionsfaktoren (X) sowie mit den TPL/TPRs interagieren kann (rechts). Auch hier kommt es nicht zu einer Hemmung der ABA-Antwort.

Die TPL/TPRs fanden schon im Zusammenhang mit anderen Transkriptionsfaktoren im ABA-Signalweg Erwähnung. TPR3 bildet zum Beispiel einen Komplex mit MYB44, um die Expression von *ABI1*, *ABI2* und *HAI1* zu reprimieren (Nguyen und Cheong 2018). TPL interagiert mit einem Teil der AFPs, die wiederum mit den ABFs interagieren können und negativ auf deren Funktion einwirken (Lynch et al. 2017). Ein reprimierender Effekt auf den ABA-Signalweg konnte hier für TPL und TPR4 bestätigt werden. Sie reduzierten die Reporteraktivität im Protoplastenexperiment um 10–20 % und in Verbindung mit ABA um 30–40 %. Ein anderes Bild ergab sich für die JAM2-induzierte ABA-Antwort. Sowohl ohne als auch mit ABA-Zugabe führten die TPL/TPRs zu einer Steigerung der Reporteraktivität. Dies widerspricht der erwarteten Funktion der TPL/TPRs im JAM2-AHR11-TPL/TPR-Komplex und der allgemein geläufigen Beschreibung als Repressor (Szemenyei et al. 2008; Zhu et al. 2010b; Causier et al. 2012b). Für den Nachweis des Modells müssten die TPL/TPRs auch hier eine reprimierende Wirkung haben. Die erlangten Ergebnisse deuten jedoch nicht auf die von Huang (2014) vermutete Bildung eines Triple-Komplexes von JAM2, AHR11 und den TPL/TPRs hin, der reprimierend auf JAM2-Zielgene wirkt. Weitere Experimente sind demnach notwendig, um ein besseres Verständnis über die Funktion von JAM2, AHR11 und den TPL/TPR-Komplex zu bekommen. Ein wichtiger Schritt nach vorne wäre der Nachweis der Interaktionen in Pflanze und unter welchen Bedingungen AHR11 posttranslationalen Modifikationen durch SUMO1, SINAT3 und MPK3/6 unterliegt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das Modell hinfällig ist, weil die Interaktionen von AHR11 mit JAM2 bzw. mit den TPL/TPRs getrennt voneinander stattfinden. Goossens et al. (2017) folgerten zum Beispiel aus den Ergebnissen von Song et al. (2013), dass die JAZs im Gegensatz zur Regulation von MYC2 anscheinend nicht die TPL/TPRs rekrutieren und so eine Repression von JAM-Zielgenen vermitteln, sondern durch Interaktion mit den JAMs lediglich deren DNA-Bindung verhindern. Vielleicht reguliert auch AHR11 JAM2 unabhängig von

den TPL/TPRs. Als weiteres Beispiel können die Interaktionen von SUPERCENTIPEDE1 (SCN1) angeführt werden. SCN1 interagiert sowohl mit TPR1 als auch mit bHLH84 (Zhu et al. 2010b; Xu et al. 2014). Sie bilden aber keinen Triple-Komplex, sondern TPR1 und bHLH84 wirken unabhängig voneinander auf die durch SCN1 ausgelöste Abwehrreaktion ein. Es wird angenommen, dass in Verbindung mit TPR1 negative Regulatoren reprimiert werden und dass in Verbindung mit bHLH84 positive Regulatoren gefördert werden (Xu et al. 2014). Ebenso könnte es sich auch im Fall von AHR11, JAM2 und den TPL/TPRs verhalten (Abbildung 66). An dieser Stelle bleibt jedoch zu klären, warum auch das Rumpfpotein *ahr11* eine hypersensitive Reaktion auslöst, obwohl es weder mit JAM2 noch mit den TPL/TPRs interagiert.

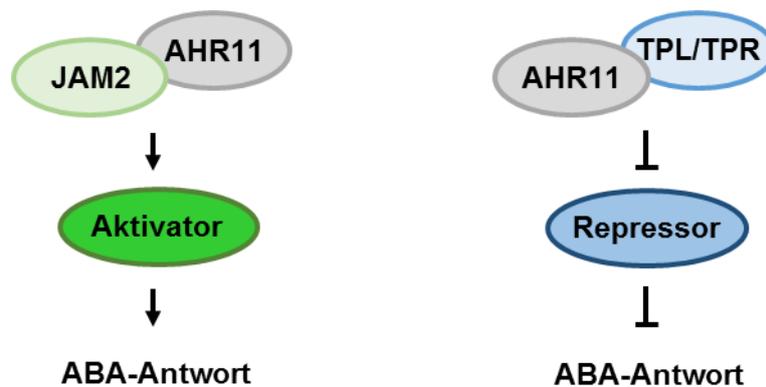


Abbildung 66: Hypothetisches Modell zur Regulation der ABA-Antwort durch JAM2, AHR11 und die TPL/TPRs. AHR11 interagiert mit JAM2 und den TPL/TPRs getrennt voneinander. Durch die Interaktion mit JAM2 werden Aktivatoren des ABA-Signalwegs positiv reguliert, während durch die Interaktion mit den TPL/TPRs Repressoren reprimiert werden und so ebenfalls der ABA-Signalweg aktiviert wird.

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen lässt sich nur schwer ein allgemein gültiges Modell zur Regulation der ABA-Antwort unter Berücksichtigung von JAM2, AHR11 und den TPL/TPRs ableiten. Zu viele unbekannte Variable existieren zu diesem Zeitpunkt noch, um eine eindeutige Prognose hervorzubringen. Die hypothetischen Modelle können aber als Vorlage für weitere Experimente dienen und dadurch zur Klärung der gemeinsamen Funktion der drei Faktoren im ABA-Signalweg beitragen.

3.2 JAM2-Zielgene und deren Regulation

Für die JAMs wurde bereits eine regulatorische Funktion für verschiedene Gene gezeigt (Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Song et al. 2013; Sasaki-Sekimoto et al. 2014; Huang et al. 2018). Eine spezifische Regulation durch JAM2 wurde für *GLUCURONIC ACID SUBSTITUTION OF XYLAN 1 (GUX1)*, *GERMIN-LIKE PROTEIN 10 (GLP10)*, *LIPOXYGENASE 2 (LOX2)*, *MYB21*, *PDF1.2*, *REVOLUTA (REV)* und *VSP1* nachgewiesen (Gaudinier et al. 2011; Yilmaz et al. 2011; Nakata und Ohme-Takagi 2013; Song et al. 2013). *LOX2*, *MYB21*, *PDF1.2* und *VSP1* sind JA-regulierte Gene und erfüllen verschiedene Funktionen in Folge des JA-Stimulus. *LOX2* ist an der JA-Biosynthese beteiligt und spielt wie auch *PDF1.2* eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr (Bell und Mullet 1993; Manners et al. 1998; Turner et al. 2002). *VSP1* ist ein vegetatives Speicherprotein mit Phosphatase-Aktivität (Berger et al. 1995) und *MYB21* wirkt an der Stamenentwicklung mit (Song et al. 2011). *GUX1* gehört zur Familie 8 der Glycosyltransferasen (CAZy-Datenbank, Cantarel et al. 2009), ist im Golgi lokalisiert und substituiert den Zellwandbestandteil Xylan mit Glucuronsäure oder 4-O-Methylglucuronsäure (Oikawa et al. 2010; Mortimer et al. 2010; Lee et al. 2012; Rennie et al. 2012; Bromley et al. 2013). *GUX1* kann unter anderem auch mit PHOSPHATE TRANSPORTER 4.1 (*PHT4.1*) interagieren, ein in der Thylakoid-Membran der Chloroplasten lokalisierter Na⁺-abhängiger Phosphat-Transporter (Roth et al. 2004; Guo et al. 2008; Pavón et al. 2008; Jones et al. 2014). Über *GLP10* ist bisher nur bekannt, dass es eines der zwölf Germin-ähnlichen Proteine in Arabidopsis ist und in der Zellwand vorzufinden ist (Carter et al. 1998; Bayer et al. 2006). Auch mögliche Interaktionspartner von *GLP10* wurden noch nicht beschrieben. *REV* ist wie auch *JAM2* ein Transkriptionsfaktor und zählt zur Familie der *homeodomain-leucine zipper* (*HD-ZIP*; Zhong und Ye 1999). Es ist wichtig für die Entwicklung des apikalen Meristems und für die Limitierung der Zellteilung in Blättern sowie im Spross (Talbert et al. 1995). *REV* interagiert mit *LITTLE ZIPPERs (ZPRs)* – kleine Proteine mit Leucin-Zipper-Domäne. Die *ZPRs* können mit *REV* heterodimerisieren, wodurch wahrscheinlich die DNA-Bindfähigkeit von *REV* verhindert wird und daraus folgend die Transkription der *ZPRs* abnimmt (Wenkel et al. 2007; Kim et al. 2008). *REV* nimmt direkten Einfluss auf den Auxin-Signalweg, indem es zum Beispiel Gene wie *TRYPTOPHAN AMINO-TRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1)* und *YUCCA5 (YUC5)*, die für Enzyme der Auxin-Biosynthese kodieren, reguliert (Zhong und Ye 2001; Brandt et al. 2012). Daraus wird deutlich, dass *JAM2* unterschiedliche Gene reguliert, die wiederum verschiedene Funktionen wahrnehmen. Eine Verbindung zum ABA-Signalweg konnte über die bisher annotierte Gen-Regulation von *JAM2* aber nicht gezogen werden.

Die Liste der *JAM2*-regulierten Gene lässt sich durch die hier vorliegenden Ergebnisse erweitern (Abbildung 67), wodurch sich auch ein erster Einblick in die regulatorische Funktion von

JAM2 im ABA-Signalweg ergibt. JAM2 nahm einen positiven Einfluss auf die Expression von *AHG1*, *ABI5*, *RD29B* und *RCAR13* sowie einen negativen auf die Expression von *CYP707A1*. Eine Regulation dieser Gene durch JAM2 geht aus der Literatur bisher nicht hervor. Zur Regulation dieser neuen JAM2-Zielgene liegen wiederum einige Informationen vor. So ist beispielweise bekannt, dass die Expression von *AHG1* durch bZIP16, *ABI5* sowie *ABI4* gesteuert wird (Reeves et al. 2011; Hsieh et al. 2012) und die Expression von *CYP707A1* durch TGACG SEQUENCE-SPECIFIC BINDING PROTEIN 1 (TGA1) und *ATHB1* (Lv et al. 2014). *AHG1* gehört zur Gruppe A der Protein-Phosphatasen 2C (PP2C) und ist ein negativer Regulator des ABA-Signalwegs (Schweighofer et al. 2004; Nishimura et al. 2007). Es kann mit allen RCARs der Unterfamilie eins – bis auf *RCAR4* – einen ABA-Rezeptorkomplex bilden, wodurch die Phosphatase-Aktivität inhibiert wird und der ABA-Signalweg aktiviert wird (Tischer et al. 2017). Die höchste Transkriptmenge von *AHG1* wird im trockenen Samen vorgefunden und während der Stratifikation wird die mRNA von *AHG1* nahezu vollständig abgebaut (Nishimura et al. 2007). *ABI5* ist ein bZIP-Transkriptionsfaktor und nimmt einen wesentlichen Anteil an der Regulation der Samenkeimung (Skubacz et al. 2016). *ABI5* wird während der frühen Keimungsphase besonders stark exprimiert und ist an der Definierung eines Entwicklungs-Checkpoints beteiligt, an dem der keimende Samen noch auf Umweltreize mit einer Arretierung der Entwicklung reagieren kann (Lopez-Molina et al. 2001; Maia et al. 2014). Die Funktion von *RD29B* ist noch nicht bekannt. Die Expression von *RD29B* wird aber sowohl durch Dehydrierung als auch durch ABA während der Keimung und in der vegetativen Phase induziert (Nakashima et al. 2006). *RCAR13* zählt zur Unterfamilie III der ABA-Rezeptoren und induziert im Vergleich zu den drei weiteren Mitgliedern dieser Unterfamilie – *RCAR11*, *RCAR12* und *RCAR14* – die ABA-Antwort in Protoplasten am stärksten (Tischer et al. 2017). Des Weiteren konnte Tischer et al. (2017) zeigen, dass *RCAR13* mit allen PP2Cs – bis auf *AHG1* – für die Regulation der ABA-Antwort interagieren kann. *RCAR13* nimmt Einfluss auf die ABA-vermittelte Inhibierung der Keimung sowie auf das Wurzelwachstum und induziert die ABA-vermittelte Schließung der Stomata (Li et al. 2018). *CYP707A1* gehört zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme und ist eine ABA-8'-Hydroxylase (Kushiro et al. 2004). ABA-8'-Hydroxylasen sind für den Abbau von ABA zu Phaseinsäure verantwortlich (Cutler und Krochko 1999). Der Knockout von *CYP707A1* führt zu einer Akkumulation von ABA im trockenen Samen und zu einer verminderten Keimfähigkeit (Okamoto et al. 2006). Für die Transkriptmenge von *CYP707A1* konnte gezeigt werden, dass sie mit Beginn der Quellung zunimmt (Kushiro et al. 2004). Aus den Beschreibungen geht hervor, dass die JAM2-regulierten Gene eine wesentliche Rolle während der Keimung einnehmen. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass JAM2 in Verbindung mit ABA einen solch deutlichen Effekt auf die Keimung zeigte. Um diese Hypothese zu bestätigen sind jedoch weitere Analysen notwendig. Die hier aufgeführten Expressionsdaten wurden mit fünf Tage alten Keimlingen erhoben. Wenn JAM2 einen maßgebenden Einfluss auf die Expression

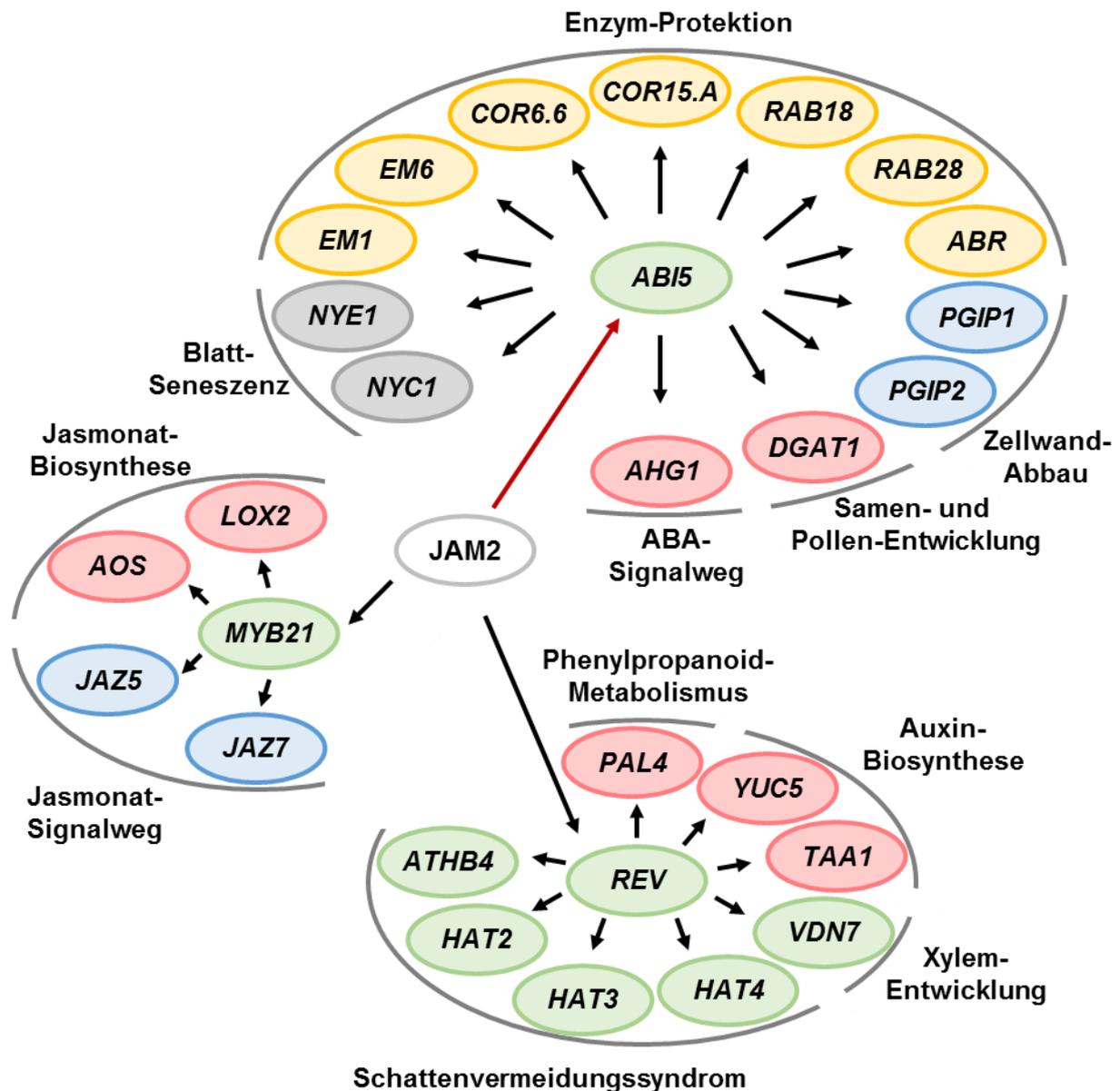


Abbildung 68: Übersicht über ABI5-, MYB21- bzw. REV-regulierte Gene. Die Informationen über REV-regulierte Gene stammen aus der Datenbank AGRIS (Yilmaz et al. 2011) und wurden von Brandt et al. (2012), Taylor-Teeple et al. (2015) und Endo et al. (2015) erhoben. Informationen über ABI5-regulierte Gene stammen von Skubacz et al. (2016) und über MYB21-regulierte Gene von Reeves et al. (2012). In der Darstellung sind aus der Literatur bereits bekannte regulatorische Beziehungen durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet und der hier neu identifizierte Einfluss von JAM2 auf *ABI5* durch einen roten Pfeil markiert. Der äußere Kreis gibt die Zugehörigkeit zu einem Signalweg bzw. zu einem bestimmten Prozess an. Die Gene wurden je nach Funktion des kodierten Proteins farblich hinterlegt: Enzyme rot, Rezeptoren lila, Transkriptionsfaktoren hellgrün, Inhibitoren hellblau, LEA-Proteine gelb und bei noch unbekannter Funktion grau.

Reeves et al. (2012) stellten fest, dass MYB21 *AOS*, *LOX2*, *JAZ5* und *JAZ7* negativ reguliert. Diese MYB21-regulierten Gene haben alle eine Funktion in der JA-Antwort. *LOX2* und die *JAZs* sind schon aus vorherigen Beschreibungen bekannt. *AOS* wird in verwundeten Blättern verstärkt exprimiert und konvertiert für die JA-Biosynthese 13(S)-Hydroperoxylinolensäure zu 12,13-Epoxylinolensäure (Laudert et al. 1996; Laudert und Weiler 1998). Zu den REV-regulierten Genen zählen – wie zuvor erwähnt – *TAA1* sowie *YUC5*, die für Enzyme der Auxin-

Biosynthese kodieren (Woodward et al. 2005; Cheng et al. 2006; Stepanova et al. 2008; Tao et al. 2008). *PHENYLALANINE AMMONIALYASE 4 (PAL4)*, das für ein Enzym des Phenylpropanoid-Metabolismus kodiert, wird ebenfalls durch REV reguliert (Raes et al. 2003; Cochrane et al. 2004). PAL4 katalysiert die Deaminierung von Phenylalanin zu Ammoniak und Zimtsäure. Es liefert dadurch Vorstufen für die Lignin- und Flavonoid-Produktion (Raes et al. 2003; Fraser und Chapple 2011). Des Weiteren reguliert REV auch eine Reihe von Genen, die für HD-ZIP-Transkriptionsfaktoren kodieren, wie *ATHB4*, *HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER PROTEIN (HAT) 2*, *HAT3* und *HAT4* (Ruberti et al. 1991; Carabelli et al. 1993; Schena und Davis 1994), sowie einen NAC-Domänen-Transkriptionsfaktor, *VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN (VDM) 7* (Ooka et al. 2003). VDM7 reguliert die Expression von Genen, die für die Formierung der Tracheen im Xylem benötigt werden (Yamaguchi et al. 2011). Die meisten Proteine (*ATHB4*, *HAT2*, *HAT3*, *HAT4*, *TAA1*, *YUC5*), deren Genexpression durch REV reguliert wird, sind jedoch an der Steuerung der Reaktion auf Beschattung, dem *shade avoidance syndrome* (Schattenvermeidungssyndrom) beteiligt (Steindler et al. 1999; Devlin et al. 2003; Roig-Villanova et al. 2006; Sorin et al. 2009; Brandt et al. 2012; Bou-Torrent et al. 2012; Zhou et al. 2018). Das Schattenvermeidungssyndrom bezieht sich auf Reaktionen der Pflanze, die das Wachstum und die Entwicklung an Umgebungen mit hoher Pflanzendichte anpassen (Martínez-García et al. 2014). Die Qualität und die Quantität des verfügbaren Lichts in solchen Umgebungen werden zum einen durch die Reflexion und die Absorption benachbarter Pflanzen und zum anderen durch die direkte Beschattung beeinflusst (Franklin 2008; Casal 2012; Martínez-García et al. 2014). Direkte oder indirekte Beschattung kann so zur Unterdrückung der Keimung, zur Förderung des Hypokotyl- und Stängel-Wachstums, zu stärker aufgerichteten Blättern oder zur vorzeitigen Blüte führen (Casal 2012). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Expression von *JAM2* vor allem durch UV induziert werden kann (Heim et al. 2003). An der Reaktion der Schattenvermeidung sind die Signalwege der Phytohormone Auxin, Ethylen und Gibberellin beteiligt (Franklin 2008). Für *ATHB4* und *HAT2* wurde neben der Funktion im Schattenvermeidungssyndrom auch publiziert, dass ihre Gene einer Regulation in Folge von Salzstress bzw. Trockenheit unterliegen, die aber in keiner Verbindung zu ABA steht (Ma et al. 2006; Huang et al. 2008). Die ABI5-regulierten Gene kodieren für Enzyme, Inhibitoren, LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA)-Proteine und Mitglieder des ABA-Signalwegs. Zu den durch ABI5 positiv oder negativ regulierten LEA-Genen zählen *ABR*, *EM1*, *EM6*, *COLD REGULATED (COR) 6.6* und *15A* sowie *RESPONSIVE TO ABSCISIC ACID (RAB) 18* und *28* (Finkelstein und Lynch 2000; Nakamura et al. 2001; Carles et al. 2002; Brocard et al. 2002; Hundertmark und Hinch 2008; Bies-Ethève et al. 2008; Su et al. 2016). LEA-Proteine sind im trockenen Samen vorzufinden sowie unter Wassermangel im vegetativen Pflanzengewebe. Sie verhindern Konformationsänderungen von Enzymen unter Wassermangel und erhalten dadurch die Aktivität des Enzyms (Olvera-Carrillo et al. 2011). Zu

den ABI5-regulierten Inhibitoren zählen POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN (PGIP) 1 und 2 (Kanai et al. 2010). Die PGIPs inhibieren die Polygalacturonasen, wodurch Pektin, das während der Quellung aus der Samenschale abgegeben wird und den Samen als eine Art Schleimschicht umgibt, nicht abgebaut werden kann und die Keimung inhibiert wird (Ferrari et al. 2003; Ferrari et al. 2006; Kanai et al. 2010). Eine gemeinsame Regulation von ABI5 mit ABI4 wurde beispielsweise für die Gene *DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 1 (DGAT1)* und *AHG1* – Phosphatase und ABA-Co-Rezeptor – beschrieben (Reeves et al. 2011; Kong et al. 2013). DGAT1 ist ein Enzym in der Biosynthese von Triacylglycerolen, die den Hauptanteil der Reservelipide bilden, und ist wichtig für die Pollen- und Samenentwicklung (Zhang et al. 2009). *NON-YELLOWING 1 (NYE1)* und *NYC1* werden durch ABI5 in Verbindung mit ENHANCED EM LEVEL (EEL) positiv reguliert (Sakuraba et al. 2014). NYC1 und NYE1 bilden wahrscheinlich mit anderen Proteinen einen Komplex für den Chlorophyllkatabolismus und regulieren die Blattseneszenz (Park et al. 2007; Sakuraba et al. 2012; Kusaba et al. 2013; Jia et al. 2015).

Aus den Ausführungen wird deutlich, welche Auswirkungen die Überexpression oder der Knockout von *JAM2* zur Folge haben kann. *JAM2* nimmt Einfluss auf die Expression von Enzymen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren haben wiederum Einfluss auf die Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren sowie von Enzymen, Inhibitoren und Stabilisatoren. Durch eine veränderte Regulation von *JAM2* kann dadurch eine Kaskade an Folgereaktionen ausgelöst werden, die sich auch auf andere Signalwege – neben ABA- und JA-Signalweg – auswirken könnten.

3.2.1 Die G-Box als DNA-Bindestelle

Die meisten bHLH-Proteine binden an eine hexamere E-Box (CANNTG), wobei nur eine Halbseite (CAN) durch ein bHLH-Monomer in der großen Furche der DNA gebunden wird (Ellenberger et al. 1994; Shimizu et al. 1997). Eine Variante der E-Box ist die palindromische G-Box mit der Sequenz CACGTG (Menkens et al. 1995; Toledo-Ortiz et al. 2003). Erste Beschreibungen der G-Box in Pflanzen gehen auf Giuliano et al. (1988) im Promotor der kleinen Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (*pRbcS*) zurück. Die G-Box ist aber nicht nur in Promotoren vorzufinden, die in Folge eines Licht-Stimulus reguliert werden, sondern auch in Promotoren, die durch Hormone wie ABA oder Methyl-Jasmonat reguliert werden (Donald und Cashmore 1990; Block et al. 1990; Guiltinan et al. 1990; Mason et al. 1993; Menkens et al. 1995). Neben bHLH-Transkriptionsfaktoren können auch bZIP- und bHLH/ZIP-Transkriptionsfaktoren, die dem Namen zufolge neben der basischen Region sowohl ein HLH-Motiv als auch ein Leucin-Zipper enthalten, an die G-Box binden (Guiltinan et

al. 1990; Kawaoka et al. 1994; Ferré-D'Amaré et al. 1994). Gemeinsam ist ihnen eine basische Region, über die die DNA-Bindung erfolgt (Fujii et al. 2000).

Toledo-Ortiz et al. (2003) prognostizierten anhand von bioinformatischen Analysen, dass JAM2 aufgrund von fünf basischen Aminosäuren (R³, H⁹, R¹⁴, R¹⁶, R¹⁷) innerhalb der ersten 17 Aminosäuren des bHLH-Motivs – im Durchschnitt sind sechs basische Aminosäuren in der basischen Region der bHLHs von Arabidopsis enthalten – an DNA binden kann (Abbildung 69). Des Weiteren ordneten Toledo-Ortiz et al. (2003) JAM2 zu den E-Box-bindenden bHLHs, da es die dafür hochkonservierten Aminosäuren E¹³ und R¹⁶ in der basischen Region enthält (Atchley et al. 1999). Die Kategorisierung zu den G-Box-bindenden bHLHs erfolgte aufgrund der Aminosäuren H, E und R an Position 9, 13 bzw. 17. E¹³ ist in den bHLHs hochkonserviert und bindet das äußere CA der G-Box (Fisher und Goding 1992; Ferré-D'Amaré et al. 1994; Ellenberger et al. 1994; Shimizu et al. 1997). R¹⁷ ist für die Unterscheidung zwischen CACGTG und CAGCTG verantwortlich, indem es mit dem zentralen G in der G-Box interagiert (Dang et al. 1992). H⁹ interagiert mit dem komplementären G des ersten Cs in der G-Box (Shimizu et al. 1997).

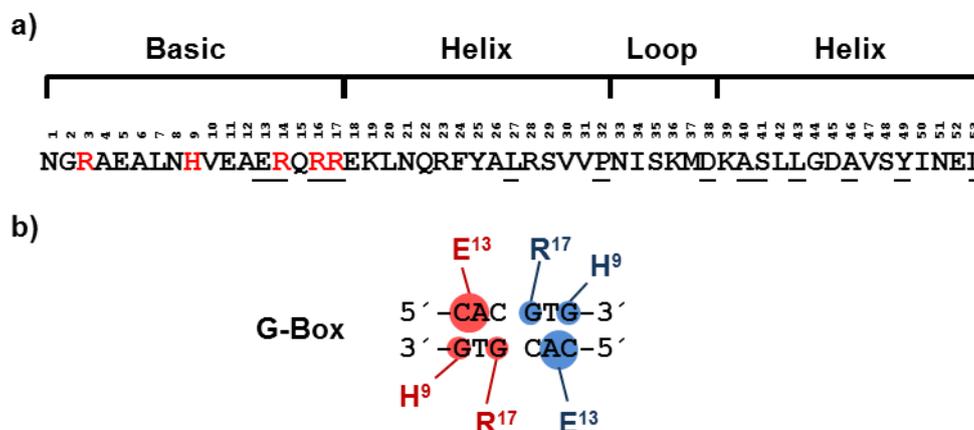


Abbildung 69: Das bHLH-Motiv und die DNA-Bindung von JAM2. a) Aminosäuresequenz des bHLH-Abschnitts von JAM2. Der Ausschnitt zeigt die Aminosäuren 425–478 von JAM2. Die Zahlen oberhalb der Aminosäuresequenz geben die Position innerhalb des bHLH-Motivs an. Die Zuordnung der Sequenzabschnitte und die Angaben zu konservierten Aminosäuren (unterstrichen) innerhalb der bHLHs aus Arabidopsis wurden aus Toledo-Ortiz et al. (2003) entnommen. Basische Aminosäuren in der BR sind rot hervorgehoben. b) Prognostizierte Bindung von einem JAM2-Dimer an die G-Box. Die Halbseite einer G-Box (CAC) wird jeweils von einem Monomer (rot bzw. blau) gebunden. Die Zuordnung der für die DNA-Bindung essentiellen Aminosäuren (H⁹, E¹³, R¹⁷) und die für die DNA-Protein-Interaktion wichtigen Basen sind dargestellt. Auch diese Angaben stammen von Toledo-Ortiz et al. (2003).

Die Prognose über die DNA-Bindenspezifität von Toledo-Ortiz et al. (2003) konnte über einen *protein binding microarray* (PBM) von Fonseca et al. (2014) und in dieser Arbeit über einen Promotorbindungs-Assay mit *pTAT1* bestätigt werden. Die Mutation der G-Box in *pTAT1* zu AGGTCA oder die Deletion der basischen Region von JAM2 führten zu einer Reduktion der Reporterantwort um 76 % bzw. 92 %. Dies verdeutlicht zum einen die hohe Affinität zu einer

G-Box und zum anderen die Notwendigkeit der basischen Region zur DNA-Bindung. Es stellen sich nur die Fragen, warum zum einen die Mutation der G-Box in *pTAT1* zu einer geringeren Reduktion der Reporteraktivität als die Deletion der basischen Region führte, und zum anderen, warum die Reporteraktivität von *pTAT1_mGbox* um 62 % mit JAM2_dBR reduziert werden konnte. Die DNA-Bindestelle von JAM2 lässt laut dem PBM von Fonseca et al. (2014) auch eine Sequenz-Variation (MAYGTG) zu. Die sich daraus ergebenden Varianten der G-Box AACGTG, AATGTG, CATGTG können von JAM2 auch gebunden werden, jedoch mit geringerer Affinität. In *pTAT1* kann neben der G-Box auch zweimal die G-Box-Variante AATGTG vorgefunden werden (Tabelle 2). Es ist möglich, dass JAM2 mit geringerer Präferenz auch an diese G-Box-Variante in *pTAT1* binden kann und dadurch die Reporteraktivität auslöst. Für die abweichende Sequenzspezifität von JAM2 spricht auch die G-Box-Variante CATGTG, die in den Promotoren der JAM2-regulierten Gene *GUX1*, *GLP10*, *LOX2*, *MYB21*, *PDF1.2*, *REV* und *VSP1* enthalten ist. Eine palindromische G-Box kann laut der Datenbank AGRIS (Yilmaz et al. 2011) im Promotor dieser Gene nicht vorgefunden werden. Die CATGTG-Sequenz entspricht der Bindestelle des bHLH-Transkriptionsfaktors MYC2 im Promotor von *RD22* (Abe et al. 1997). Zudem stellten Fonseca et al. (2014) für JAM2 fest, dass es vornehmlich an Sequenzen bindet, die auch von MYC2 gebunden werden. Auch in den weiteren Promotoren *pAHG1* und *pCYP707A1*, für die eine direkte Bindung von JAM2 gezeigt werden konnte, sind G-Box-Varianten enthalten. Die Variante AATGTG ist in *pAHG1* zweimal und in *pCYP707A1* einmal enthalten. CATGTG ist in *pAHG1* und *pCYP707A1* jeweils zweimal enthalten. Die dritte mögliche Variante AACGTG ist nur in *pCYP707A1* und dort zweimal vorzufinden. Es ist möglich, dass JAM2 die Promotoren nicht nur über die G-Box, sondern auch über die von Fonseca et al. (2014) bestimmten Sequenz-Varianten der G-Box binden kann. Eine experimentelle Überprüfung, ob diese Sequenz-Varianten in den genannten Promotoren als Bindestelle dienen, gibt es bisher nicht.

Tabelle 2: G-Box-Varianten in den durch JAM2-gebundenen Promotoren. Die Entfernung der G-Box-Variante in *pTAT1*, *pAHG1* und *pCYP707A1* ist in n bp zum ATG angegeben.

Promotor	G-Box-Variante n bp upstream des ATG		
	CATGTG	AATGTG	AACGTG
<i>pTAT1</i>		121	
		578	
<i>pAHG1</i>	317	1219	
	742	1741	
<i>pCYP707A1</i>	990	517	663
	1255		2049

Die Bindung eines Transkriptionsfaktors an ein Sequenzmotiv wie die G-Box wird jedoch nicht nur durch das Sequenzmotiv alleine bestimmt. Dies wird allein schon an der Zahl der ABA-Signalkomponenten deutlich, die eine G-Box enthalten. Von den hier analysierten Promotor-Bereichen der ABA-Signalkomponenten enthielten 51 % eine oder mehrere G-Boxen. G-Box-

Varianten wurden in dieser Analyse nicht betrachtet. Schon diese Anzahl spricht dafür, dass die Bindung einer G-Box von weiteren Faktoren abhängig sein muss, die in Folge zu einer feinen Regulation der Transkription führen. Heterodimerisierungen zwischen bHLH-Transkriptionsfaktoren können die Bindungsspezifität beeinflussen (Fisher und Goding 1992). Zudem vermuteten Fisher und Goding (1992) sowie Menkens et al. (1995), dass die umgebende DNA-Sequenz die Bindung der G-Box beeinflussen könnte. Zum einen könnte die umgebende DNA-Sequenz einen direkten Einfluss auf die Bindung der G-Box nehmen, indem der Transkriptionsfaktor in bestimmten Abständen Nukleotide vorfinden muss, mit denen er interagieren kann, um eine funktionelle G-Box-Bindung einzugehen. Zum anderen könnten andere Proteine an die benachbarte DNA-Sequenz binden und durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor die Bindung an die G-Box fördern oder aber auch die G-Box für den Transkriptionsfaktor unzugänglich machen.

Für den bHLH-Transkriptionsfaktor PHOSPHATE METABOLISM 4 (PHO4) aus Hefe konnte gezeigt werden, dass das Histidin, welches mit dem komplementären G des ersten Cs in der G-Box interagiert, auch mit einem zum G 3'-flankierenden G interagiert, das außerhalb der G-Box liegt (Shimizu et al. 1997). Auch für zwei weitere bHLH-Transkriptionsfaktoren aus Hefe, CBF1 und TYE7, wurde ein Einfluss auf die DNA-Bindung durch flankierende DNA-Bereiche festgestellt. Dabei spielt nicht unbedingt der spezifische Kontakt zu einer bestimmten Base die Rolle, sondern die dreidimensionale Struktur der DNA-Bindestelle (Gordân et al. 2013). Auch Zhou et al. (2015) stellten fest, dass die dreidimensionale Struktur der DNA einen Einfluss auf die DNA-Bindung eines Transkriptionsfaktors hat. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass nicht nur die Aminosäuren der BR für die DNA-Bindung entscheidend sind, sondern auch Aminosäuren im Loop der bHLH-Transkriptionsfaktoren. So zum Beispiel für den bHLH-Transkriptionsfaktor DEADPAN aus *Drosophila* (Winston und Gottesfeld 2000; Nair und Burley 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vorhandensein einer G-Box somit noch lange kein Anzeichen für eine DNA-Bindung durch einen Transkriptionsfaktor ist, sondern nur ein erstes mögliches Indiz.

Fonseca et al. (2014) stellten für JAM2 fest, dass es bevorzugt an G-Boxen bindet, die am 5'-Ende durch ein Purin und am 3'-Ende durch ein Pyrimidin flankiert sind. Andere Octamere können mit geringerer Affinität aber auch gebunden werden. Die flankierenden Bereiche der G-Boxen von *pAHG1*, *pCYP707A1* und *pTAT1* entsprechen jedenfalls nicht generell der mitgeteilten Präferenz von JAM2 gegenüber Purinen oder Pyrimidinen. Während die flankierenden Bereiche der G-Box in *pCYP707A1* und die flankierenden Bereiche der zum ATG am nächsten gelegenen G-Box in *pAHG1* den angegebenen Präferenzen von JAM2 tatsächlich entsprechen, verhält es sich bei den flankierenden Bereichen der G-Box in *pTAT1* und den

flankierenden Bereichen der weiteren G-Boxen in *pAHG1* genau umgekehrt. Die höchste Reporteraktivität wurde zudem mit dem *pTAT1* (56-fach) gemessen und nicht mit *pAHG1* oder *pCYP707A1* (8- bzw. 17-fach). Die Affinität von JAM2 zu einer G-Box lässt sich demzufolge nicht alleine über die direkten flankierenden Bereiche erklären. Vielleicht hängt die Bindung von JAM2 an eine G-Box auch von weiteren Basen ab, die mit Aminosäuren des bHLH-Motivs interagieren, aber bisher noch nicht charakterisiert wurden. Es ist auch denkbar, dass JAM2 mit anderen Proteinen interagieren kann oder seine Bindung an G-Boxen durch andere Proteine verhindert wird.

Ein Dimerisierungspartner von JAM2 ist beispielweise JAM3 (Nakata und Ohme-Takagi 2013; Fonseca et al. 2014). Wie auch JAM2 bindet JAM3 mit höchster Affinität an eine G-Box (Fonseca et al. 2014). Es ist daher wahrscheinlich, dass das Heterodimer aus JAM2 und JAM3 vorwiegend an G-Boxen bindet und eher selten an G-Box-Varianten. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch G-Box-Varianten gebunden werden, da auch die DNA-Bindesequenz (MAYRTK) von JAM3 variieren kann. Ergebnisse über die Affinität des Heterodimers zu bestimmten DNA-Sequenzen liegen bisher nicht vor. Es ist aber davon auszugehen, dass JAM2 durch die Dimerisierung mit JAM3 in der Bindung von G-Boxen oder G-Box-Varianten beeinflusst wird und möglicherweise bestimmte DNA-Sequenzen bevorzugt vom Heterodimer gegenüber dem JAM2-Dimer gebunden werden. Wie auch JAM2 soll JAM3 eine Vorliebe für Purine an der 5'-flankierenden DNA-Sequenz der G-Box und Pyrimidine an der 3'-flankierenden DNA-Sequenz aufweisen (Fonseca et al. 2014). Dies schränkt zudem die Auswahl an G-Boxen, die durch das Heterodimer gebunden werden können, ein. Im Heterodimer können aber auch kleinere Abweichungen in der DNA-Bindesequenz ignoriert werden. Da jedes Monomer die Halbseite der DNA-Bindestelle mit unterschiedlicher Affinität bindet, kann es dazu kommen, dass ein Monomer eine Halbseite mit hoher Affinität bindet und dadurch für das andere Monomer die Bindung einer Halbseite, zu der es eine geringere Affinität aufweist, tolerierbar wird (Masi et al. 2011).

Die Bindung an *pCYP707A1* von JAM2 könnte auch über ein Heterodimer erfolgen. Dies würde zumindest erklären, warum die Deletion der BR von JAM2 nicht zu einem Ausbleiben der Reporteraktivität führte, sondern nur zu einer Reduktion um 46 % ohne exogene ABA und um 23 % mit exogener ABA. HLH-Proteine, denen die BR fehlt, sind selber nicht in der Lage DNA zu binden (Ledent und Vervoort 2001; Toledo-Ortiz et al. 2003; Jones 2004). Sie können aber mit bHLH-Proteinen dimerisieren, jedoch führt das eher zu einer Verhinderung der Bindung an die DNA (Wang und Baker 2015). JAM2 mit deletierter BR könnte im Gegensatz zu den HLH-Proteinen noch Bereiche enthalten, die stabilisierend auf die DNA-Bindung wirken. Im Heterodimer würde die DNA-Bindung nur über den Interaktionspartner erfolgen und JAM2

würde aufgrund der fehlenden BR keine direkte Interaktion mit der DNA eingehen, sondern nur die DNA-Bindung stabilisieren.

3.2.2 Expressions-Regulation über das *ABA-response element*

JAM2 zeigte in den Experimenten einen deutlichen Einfluss auf die Induktion der Expression von *RD29B*. In Col-0-Protoplasten mit dem ABA-Reportersystem wies JAM2 unter Zugabe von ABA eine bis zu 7,1-fach höhere Induktion der Reporteraktivität als der Leervektor auf. Auch die Überexpression oder der Knockout von JAM2 zeigten einen Einfluss auf die Expression von *RD29B*. Es stellte sich die Frage, ob JAM2 die Expression von *RD29B* über die direkte Bindung des Promotors regulieren kann. Der Promotor von *RD29B* enthält jedoch keine kanonische G-Box, sondern nur G-Box-artige ABREs (YACGTGKC), die in Promotoren ABA-regulierter Gene vorzufinden sind (Guiltinan et al. 1990; Ingram und Bartels 1996; Busk und Pagès 1998; Hattori et al. 2002; Shen et al. 2004; Fujita et al. 2011). Erste Beschreibungen des ABREs gehen auf Sequenzanalysen des Promotors von zum Beispiel *EM* aus Weizen (Marcotte, Jr. et al. 1989; Guiltinan et al. 1990), *RAB16A* aus Reis (Mundy et al. 1990; Skriver et al. 1991), *RAB28* aus Mais (Pla et al. 1993) und *HORDEUM VULGARE 22 (HVA22)* aus Gerste (Shen und Ho 1995) zurück. Um eine ABA-Antwort auszulösen, ist im Promotor neben einem ABRE meistens auch ein CE notwendig. Bioinformatische Promotoranalysen in Arabidopsis zeigten, dass als CE meist ein weiteres ABRE dient (Zhang et al. 2005; Gómez-Porrás et al. 2007). Die Sequenz für ein CE in Arabidopsis entspricht RNSRCGTSDH (Zhang et al. 2005). Der Abstand zwischen ABREs eines ABRE-Paars beträgt im Schnitt 236 bp und das ABRE-Paar ist selbst wiederum etwa 350 bp vom ATG entfernt (Gómez-Porrás et al. 2007). Für die Orientierung eines ABREs wurde keine Präferenz festgestellt (Gómez-Porrás et al. 2007). Der *RD29B*-Promotor aus Arabidopsis enthält nach der Sequenzanalyse von Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki (1994) drei ABRE-Motive (ABRE1: TACGTGTC; ABRE2: GACGTGGC; ABRE3: AACGTGGA), wobei das ABRE3 zum Teil von der ABRE-Sequenz abweicht (Abbildung 70). Analysen mit Fragmenten des *pRD29B*, in denen ein oder mehr ABREs mutiert oder deletiert wurden, zeigten, dass mehr als ein ABRE im *pRD29B* für die Induktion der ABA-Antwort notwendig ist (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1994; Uno et al. 2000). Von Zhang et al. (2005) wurde aufgrund von bioinformatischen Sequenzanalysen prognostiziert, dass es sich bei ABRE1 um das funktionale ABRE und bei ABRE2 um das CE handelt.

```

-347 ACTACATGATGGGCCAATAAACGTGGACCGACTAAAACATAATAATAGAA
-297 GATACATCGATAGGCTTCTCTAAAGATCGGATAAAAGATAATGTGCGCATA
-247 GCCACGTAGAGAGCAACTGGCTGAGACGTGGCAGGACGAAACGGACGCAT
-197 CGTACGTGTCAGAATCCTACAGAAGTAAAGAGACAGAAGCCAGAGAGAGG
-147 TGGTTCGGCCATATGTCATCGTTCTCTCTATAAACTTTATGGAACTTTGT
-97 TCTGATTTTCTCAGAGACACGAAAAGAAAAGAAAACAACACTAGAACAAAG
-47 AGGGTTTGATTGATTCACTTGAAAAAGAGAAAACACAGCTTTGGAAAATG
  
```

Abbildung 70: Promotor-Ausschnitt des *RD29B*. Das Translations-Start-Codon (ATG) ist fettgedruckt, die TATA-Box ist unterstrichen und die ABREs (ABRE1: 188–195 bp *upstream* des ATG; ABRE2: 216–223 bp *upstream* des ATG; ABRE3: 321–328 bp *upstream* des ATG) sind rot hervorgehoben. Die Zahlen geben die Entfernung zum ATG in bp an.

Mit einem Sequenzabschnitt des *pRD29B*, der das ABRE1 und das ABRE2 enthielt, wurden in einem *Yeast one-hybrid* (Y1H)-Screen die beiden ABRE-bindenden Proteine ABF2 und ABF4 entdeckt (Uno et al. 2000). In einem weiteren Y1H-Screen mit einem Sequenzabschnitt des *pEM* (EM1a-Element, GGACACGTGGCG) wurden neben ABF2 und ABF4 dann auch ABF1 und ABF3 gefunden (Choi et al. 2000). ABF1 und ABF3 scheinen also ein G-Box-artiges ABRE zu bevorzugen, während ABF2 und ABF4 auch an nicht G-Box-Varianten des ABRE binden können. Für das fünfte Mitglied der ABF-Familie, ABI5, konnte erst später gezeigt werden, dass es auch ABREs binden kann (Carles et al. 2002). Eine Bindung von JAM2 an ABRE-Motive geht aus der Literatur nicht hervor. Da ABREs aber einer G-Box zum Teil sehr ähnlich sind und JAM2 die ABA-Antwort über den *pRD29B* induzieren kann, lag die Vermutung nahe, dass JAM2 auch an ABREs im *pRD29B* binden kann und dadurch die ABA-Antwort auslöst. Das ABRE3 in *pRD29B* entspricht tatsächlich einer Sequenz-Variante, die nach den Ergebnissen von Fonseca et al. (2014) auch von JAM2 gebunden werden kann. Eine kanonische G-Box oder eine weitere Sequenz-Variante der G-Box, an die JAM2 binden könnte, ist nach Sequenzanalysen im *pRD29B* nicht vorhanden. Den Ergebnissen aus den Promotorbindungsstudien in Protoplasten zu Folge konnte JAM2 keine Reporterantwort auslösen und ist somit weder in der Lage das ABRE3 noch einen anderen Sequenzabschnitt des *pRD29B* zu binden. Die Induktion des *pRD29B* kann somit nicht auf eine direkte Bindung von JAM2 zurückgeführt werden. JAM2 löst demnach durch *upstream*-Effekte die Induktion aus, was heißen soll, dass JAM2 direkt oder indirekt Einfluss auf Regulatoren des ABA-Signalwegs nimmt, die dann die Induktion des *pRD29B* auslösen. Die Ergebnisse legen auch nahe, dass eine Sequenz-Variation an erster Stelle der kanonischen G-Box (C zu T (ABRE1), G (ABRE2) oder A (ABRE3)) bereits zu einem Ausbleiben der Bindung von JAM2 an einen Promotor führt. Dies steht im Widerspruch zu den Daten aus dem PBM von Fonseca et al. (2014), da zumindest der Austausch von C zu A nicht zu einem Bindungsverlust führen sollte. Es ist aber auch möglich, dass die Bindung von JAM2 an ABRE-Motive im *pRD29B* durch die umliegenden Sequenzen beeinflusst wird – ähnlich wie zuvor für G-Box-Elemente beschrieben. Anhand der hier gezeigten Ergebnisse kann aber nicht gefolgert werden, dass JAM2 generell keine ABREs bindet. Zwar bindet JAM2 nicht die ABREs im *pRD29B*, aber Ergebnisse mit anderen Promotoren

liegen bisher noch nicht vor. Dafür spricht auch, dass JAM2 nicht an jeden Promotor bindet, der eine G-Box enthält. Die Promotoren von *AHG1* und *CYP707A1* enthalten neben G-Boxen auch ABREs. Bisher wurde nur die Bindung an diese Promotoren gezeigt und dass dafür die BR von JAM2 notwendig ist. Es sind also weitere Experimente notwendig, um die Bindung von JAM2 auf einen bestimmten Sequenzabschnitt in den Promotoren zurückzuführen. Im Fall von *pRD29B* entsteht keine Konkurrenz um potentielle Bindestellen zwischen den ABFs und JAM2. Wenn JAM2 aber tatsächlich in bestimmten anderen Fällen ABREs binden kann, dann könnte dabei auch mit den ABFs eine Konkurrenz um potentielle Bindestellen entstehen.

3.3 Abgrenzung des Einflusses von JAM2 und JAM1 oder MYC2 auf die ABA-Antwort

Für die mit JAM2 nahe verwandten bHLH-Transkriptionsfaktoren JAM1 und MYC2 wurde ein positiver Effekt auf die ABA-Antwort postuliert (Abe et al. 1997; Abe et al. 2003; Li et al. 2007; Aleman et al. 2016). Für JAM1 wurde in Verbindung mit ABA ein Einfluss auf das Wurzelwachstum, die Ergrünung der Kotyledonen und die Trockentoleranz bestimmt (Li et al. 2007). MYC2 wies in Verbindung mit ABA einen Einfluss auf die Keimung und die Generierung von Biomasse auf (Abe et al. 2003). Auch für JAM2 konnte hier eine positive Wirkung auf die ABA-bedingte Inhibierung der Keimung und des Wurzelwachstums bestimmt werden. Eine Verbindung zwischen MYC2, JAM1 und JAM2 in der Regulation der ABA-Antwort erscheint somit als logisch. Gemeinsamkeiten hatten sich zwischen diesen Elementen in Form einer Konkurrenz um die Bindung an die G-Box und damit in der Regulation der JA-Antwort gezeigt (Sasaki-Sekimoto et al. 2013; Song et al. 2013; Fonseca et al. 2014). Von Aleman et al. (2016) wurde eine Interaktion zwischen MYC2 und dem ABA-Rezeptor RCAR9 postuliert. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von JAM2 zu MYC2 sollte überprüft werden, ob JAM2 ebenfalls eine Interaktion mit einem Mitglied der RCAR-Familie eingeht. Im Gegensatz zu MYC2 konnte für JAM2 weder eine Interaktion mit RCAR9 noch mit einem anderem RCAR gezeigt werden. Auch eine indirekte Interaktion zu RCAR9 über eines der anderen JAMs kann ausgeschlossen werden, da auch diese nicht mit RCAR9 in Hefe interagierten. Weitere Unterschiede zur Wirkung auf die ABA-Antwort von MYC2, JAM1 und JAM2 wurden auch mit dem ABA-Reportersystem und in der Expressionsanalyse von ABA-regulierten Genen festgestellt. Im Gegensatz zu JAM2 induzierten MYC2 und JAM1 mit dem ABA-Reportersystem in Protoplasten keine ABA-Antwort. Als ABA-induzierbarer Promotor für das Reportersystem diente der *pRD29B*. Der *pRD29B* enthält laut der Datenbank AGRIS (Yilmaz et al. 2011) keine CATGTG-Sequenz, für die eine MYC2-Bindung gezeigt wurde (Abe et al. 1997). Auch eine kanonische G-Box, an die JAM1 binden könnte (Fonseca et al. 2014), ist im *pRD29B* nicht vorhanden. Für JAM2 wurde festgestellt, dass die Induktion des *pRD29B* über *upstream*-Effekte und nicht über eine direkte

Promotorbindung zustande kommt. Auch dies scheint für MYC2 und JAM1 aufgrund der Ergebnisse nicht zutreffend zu sein. Während für JAM1 bisher noch keine Daten über eine mögliche Regulation von *RD22* vorliegen, konnte für MYC2 die Induktion des ABA-regulierten Gens *RD22* gezeigt werden (Abe et al. 1997; Abe et al. 2003). In dieser Arbeit konnte für JAM2 kein Einfluss auf die Expression von *RD22* bestimmt werden. Wahrscheinlich haben MYC2, JAM1 und JAM2 unterschiedliche Zielgene und Interaktionspartner im ABA-Signalweg. Unter den hochregulierten Genen in einer *MYC2/MYB2*-Überexpressionslinie (Abe et al. 2003) ließen sich auch weder *ABI5*, *AHG1*, *RD29B* noch *RCAR13* vorfinden, für die hier eine Induktion unter Überexpression von *JAM2* festgestellt wurde. Auch wenn sowohl JAM1, MYC2 als auch JAM2 einen positiven Einfluss auf die ABA-Antwort nehmen, so scheint sich der Weg, über den dieses Ziel erlangt wird, zwischen diesen drei Transkriptionsfaktoren zu unterscheiden.

3.4 Integration von JAM2 in die ABA-Antwort

Für JAM2 sind neben AHR11 (Huang 2014), den JAZs (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium 2011; Song et al. 2013; Sasaki-Sekimoto et al. 2014; Fonseca et al. 2014; Trigg et al. 2017) und den JAMs (Nakata und Ohme-Takagi 2013; Fonseca et al. 2014; Huang et al. 2018) noch weitere Interaktoren bekannt (Abbildung 71), die über Y2H-Screens von Trigg et al. (2017) sowie dem Arabidopsis Interactome Mapping Consortium 2011 bestimmt wurden.

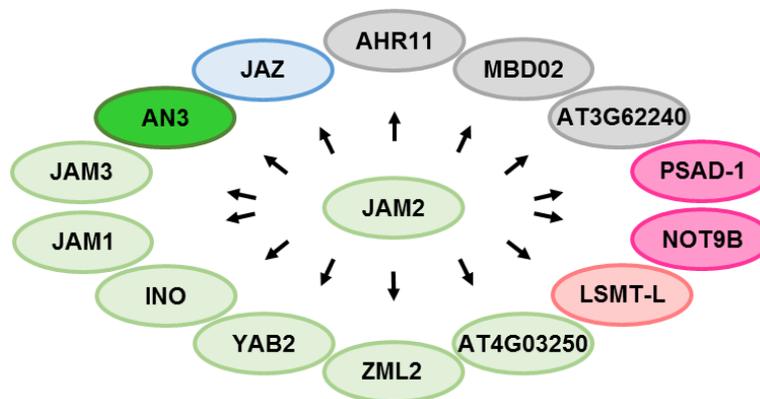


Abbildung 71: Interaktionspartner von JAM2. Die Übersicht wurde mithilfe der Datenbank BioGRID (Stark et al. 2006) erstellt. Die Daten wurden erhoben vom Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011) sowie von Nakata und Ohme-Takagi (2013), Song et al. (2013), Sasaki-Sekimoto et al. (2014), Fonseca et al. (2014), Huang (2014), Trigg et al. (2017) und Huang et al. (2018). Zur Vereinfachung wurden JAZ1–6 und JAZ8–12 nur als JAZ dargestellt. Homodimerisierungen wurden in der Darstellung nicht berücksichtigt. Die Interaktionspartner wurden je nach Funktion farblich hinterlegt: Enzyme rot, Inhibitoren hellblau, Transkriptionsfaktoren hellgrün, Aktivatoren grün, Untereinheiten von Proteinkomplexen pink und bei noch unbekannter Funktion grau.

Über einen Teil der Interaktoren ist bisher nur wenig bekannt. AT3G62240 enthält eine REALLY INTERESTING NEW GENE (RING)-Finger-Domäne und könnte daher Zinkionen binden (Kosarev et al. 2002), die Funktion des Proteins wurde aber noch nicht näher charakterisiert.

METHYL-CPG-BINDING DOMAIN PROTEIN 2 (MBD02) wird – wie der Name schon verrät – aufgrund der Proteinsequenz zur METHYL-CPG-BINDING DOMAIN (MBD)- Proteinfamilie gezählt, eine Bindung an methylierte CpGs konnte bisher aber nicht gezeigt werden (Zechman und Grafi 2003). LYSINE METHYLTRANSFERASE-LIKE (LSMT-L) und PHOTOSYSTEM I SUBUNIT D-1 (PSAD-1) nehmen verschiedene Funktionen im Stoffwechsel wahr. LSMT-L methyliert Lysinreste von Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolasen (Mininno et al. 2012). PSAD-1 ist ein Teil der D-Untereinheit des Photosystems I und spielt eine Rolle in der Photosynthese (Ihnatowicz et al. 2004). Die meisten Interaktoren nehmen aber Einfluss auf die Expression als Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren oder Translationsinhibitoren. AT4G03250 gehört zur Familie der HD-ZIP-Transkriptionsfaktoren und wurde im TOPLESS-Interaktom als Interaktionspartner von TPR1 gefunden (Causier et al. 2012a). ZIM-LIKE 2 (ZML2) ist ein Transkriptionsfaktor mit einem C2C2-GATA-Zinkfinger und löst unter Starklichtbedingungen wahrscheinlich die Transkription von photoprotektiven Proteinen aus (Vanholme et al. 2007; Shaikhali et al. 2012). YABBY2 (YAB2) und INNER NO OUTER (INO) sind Mitglieder der YABBY-Transkriptionsfaktorfamilie und haben eine Funktion in der ab-axialen Zelldifferenzierung (Siegfried et al. 1999; Villanueva et al. 1999). Für den transkriptionellen Co-Aktivator AN-GUSTIFOLIA 3 (AN3) wurde eine Beteiligung an der Regulation des Blattwachstums und der Morphologie postuliert (Kim und Kende 2004). Des Weiteren moduliert AN3 die Wassernutzeffizienz und die Trockentoleranz über die Regulation der Transkription von *YODA*, das Auswirkungen auf die Dichte der Stomata und das Wurzelwachstum hat (Meng und Yao 2015). NEGATIVE ON TATA 9B (NOT9B) ist ein Teil des CARBON CATABOLITE REPRESSOR 4 (CCR4)-NOT-Komplexes, der Einfluss auf die Translation nimmt (Arae et al. 2019). Ob die Interaktionen von JAM2 zu diesen Partnern auch *in planta* vorzufinden sind, gilt es zu überprüfen. Auch unter welchen Bedingungen und mit welcher Funktion die Interaktion mit JAM2 stattfindet, muss überprüft werden.

Einige Interaktoren von JAM2 weisen auch Verbindungen zu Komponenten des ABA-Signalwegs auf (Abbildung 72). Diese Komponenten sind vor allem Transkriptionsfaktoren der Familien AP2/ERF, NAC, WRKY, MYB, HD-ZIP und bZIP bis auf ARMADILLO REPEAT PROTEIN INTERACTING WITH ABF2 (ARIA) sowie die RING E3 Ligase KEEP ON GOING (KEG).

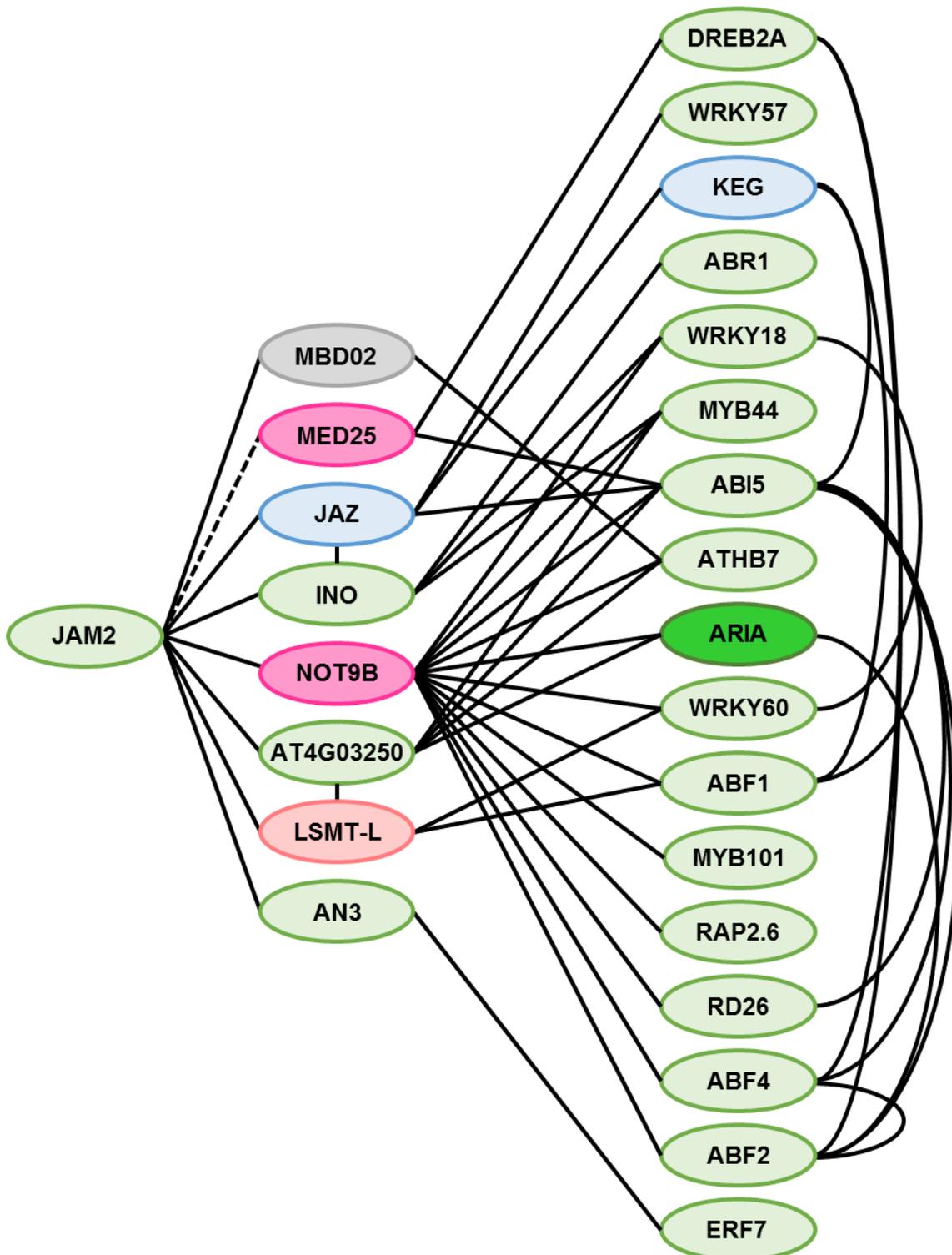


Abbildung 72: Interaktionsnetzwerk von JAM2 zu Komponenten des ABA-Signalwegs. Die Interaktion von JAM2 zu MED25 wurde bisher nur mit Homologen aus *Taxus media* gezeigt (Cui et al. 2019) und deshalb mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Zur Vereinfachung wurden JAZ1–6 und JAZ8–12 nur als JAZ dargestellt. Homodimerisierungen wurden in der Darstellung nicht berücksichtigt. Das Netzwerk wurde mithilfe der Datenbank BioGRID (Stark et al. 2006) erstellt. Die Interaktionsdaten wurden erhoben vom Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011) und von Kim et al. (2004), Stone et al. (2006), Lee et al. (2010), Liu und Stone (2010), Yoshida et al. (2010), Çevik et al. (2012), Chen et al. (2012), Lynch et al. (2012), Chen et al. (2013), Song et al. (2013), Aguilar et al. (2014), Fonseca et al. (2014), Jiang et al. (2014), Lumba et al. (2014), Sasaki-Sekimoto et al. (2014), Trigg et al. (2017) sowie Ju et al. (2019). Die Interaktionspartner wurden je nach Funktion farblich hinterlegt: Enzyme rot, Inhibitoren hellblau, Transkriptionsfaktoren hellgrün, Aktivatoren grün, Untereinheiten von Proteinkomplexen pink und bei noch unbekannter Funktion grau.

WRKY18, WRKY57 und WRKY60 können Einfluss auf die Samenkeimung, das Wachstum nach der Keimung sowie die Blattseneszenz nehmen (Rushton et al. 2012; Su et al. 2016). WRKY18 kann mit WRKY40 Heterodimere bilden und dann WRKY60 aktivieren. In Abwesenheit von ABA verhindern WRKY18/40/60 die Expression von Zielgenen des ABA-Signalwegs, wie *RCAR13*, *ABI5* und *RAB18*. Erst die Perzeption des ABA-Signals hebt die Reprimierung auf und die Expression kann eingeleitet werden (Shang et al. 2010; Rushton et al. 2012). Für WRKY57 wurde die Bindung an den Promotor von *ABI5* gezeigt (Su et al. 2016). Da für WRKY57 schon eine Funktion in der JA-induzierten Blattseneszenz bekannt war, wurde vermutet, dass WRKY57 den JA- und ABA-Signalweg über *ABI5* miteinander verbindet (Jiang et al. 2014; Skubacz et al. 2016; Su et al. 2016). RELATED TO APETALA2 6 (RAP2.6), RD26, MYB44 und MYB101 fördern ABA-regulierte Prozesse, wie den Schluss der Stomata, die Inhibierung der Keimung oder die Reduktion des Wurzelwachstums (Fujita et al. 2004; Reyes und Chua 2007; Jung et al. 2008; Zhu et al. 2010a; Nguyen et al. 2012). Wie zuvor bereits erwähnt, erfolgt die Förderung durch MYB44, indem es mit TPR3 interagiert und die Expression der PP2Cs *ABI1*, *ABI2* und *HAI1* reprimiert (Nguyen und Cheong 2018). Die AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren ABR1 und ERF7 sowie der HD-ZIP-Transkriptionsfaktor ATHB7 wirken sich hingegen negativ auf ABA-regulierte Prozesse aus (Pandey et al. 2005; Song et al. 2005; Valdés et al. 2012). ATHB7 reguliert dafür die Expression von PP2Cs hoch und von RCARs nach unten (Valdés et al. 2012). Die WRKYs und ATHB7 nehmen somit auf ähnliche ABA-Signalkomponenten wie auch JAM2 Einfluss.

DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (DREB) 2A, ARIA und KEG wiederum interagieren direkt mit Mitgliedern der ABF-Familie (Kim et al. 2004; Stone et al. 2006; Lee et al. 2010; Fujita et al. 2011). Während DREB2A und ARIA positiven Einfluss auf die ABA-Antwort nehmen, ubiquitiniert KEG ABF1, ABF3 und ABI5 in Abwesenheit von Stress und hält damit die internen Spiegel dieser bZIP-Transkriptionsfaktoren gering. Kommt es zur Aktivierung des ABA-Signalwegs, ubiquitiniert sich KEG selber und die ABFs akkumulieren (Stone et al. 2006; Liu und Stone 2010; Chen et al. 2013). In den hier durchgeführten Versuchen konnte keine direkte Interaktion zwischen den ABFs und JAM2 gezeigt werden. Über die Interaktoren LSMT-L, NOT9B, JAZ und AT4G03250 kann jedoch eine indirekte Verbindung auf Proteinebene zu ABF1, ABF2, ABF4 und ABI5 gezogen werden. Die JAZs sind vor allem als Inhibitoren im JA-Signalweg bekannt (Pauwels und Goossens 2011; Sasaki-Sekimoto et al. 2013). Für ein JAZ-Homolog in Reis, OsJAZ1, konnte aber gezeigt werden, dass es sowohl den JA- als auch den ABA-Signalweg negativ reguliert (Fu et al. 2017). Des Weiteren stellten Ju et al. (2019) fest, dass einige JAZs auch mit ABI5 interagieren. Die Autoren bestimmten auch, dass in Folge eines ABA-Stimulus die JA-Biosynthesegene, wie *ALLENE OXIDE CYCLASE 2 (AOC2)* und *3-KETO-ACYL-COENZYME A THIOLASE 5 (KAT5)*, induziert wurden.

Daraus entstand die Hypothese, dass in Abwesenheit von ABA die JAZs ABI5 inhibieren. In Anwesenheit von ABA wird jedoch die JA-Biosynthese gesteigert, woraufhin JAZ abgebaut wird und ABI5 seiner Funktion als Transkriptionsfaktor nachgehen kann. Eine weitere Verbindung zwischen dem ABA-Signalweg und dem JA-Signalweg ergibt sich durch MEDIATOR 25 (MED25). MED25 ist ein Teil des Mediator-Komplexes in Arabidopsis, der mit der RNA-Polymerase II interagiert und die Transkription reguliert (Bäckström et al. 2007). MED25 interagiert sowohl mit ABI5 als auch mit MYC2, jedoch hat MED25 auf MYC2-regulierte Gene einen positiven Effekt und auf ABI5-regulierte einen negativen (Chen et al. 2012). Auch für JAM2 und MED25 aus *Taxus media* konnte eine Interaktion gezeigt werden (Cui et al. 2019), der Nachweis der Interaktion in *Arabidopsis thaliana* wurde aber bisher noch nicht erbracht. Ob *in planta* die Interaktion zwischen LSMT-L, NOT9B und AT4G03250 und den ABFs bzw. JAM2 stattfindet und mit welcher Funktion ist noch nicht geklärt. Interessant ist jedoch, dass über Linkerproteine Verbindungen zu Komponenten des ABA-Signalwegs und speziell den ABFs auf Ebene der Genregulation und Proteininteraktion gezogen werden können. Es erscheint somit als wahrscheinlich, dass für JAM2 auf verschiedenen Ebenen Ansatzpunkte existieren, die einen positiven Einfluss auf den ABA-Signalweg erlauben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass JAM2 die Expression von Zielgenen des ABA-Signalwegs nur in Anwesenheit von ABA fördert (Abbildung 73). JAM2 löst somit nicht selbst die Synthese oder die Freisetzung von ABA aus, sondern ist auf die Perzeption von ABA durch die Rezeptoren und die nachfolgende Signaltransduktion angewiesen. Dies umfasst auch die Signaltransduktion durch die SnRK2s. Ohne SnRK2.2 und SnRK2.6 verstummt die JAM2-vermittelte ABA-Antwort. Ob JAM2 durch die Phosphorylierung durch eine oder beide Kinasen aktiviert wird, wurde noch nicht bestimmt. Aus der Literatur ist zumindest bekannt, dass die SnRK2.2, SnRK2.3 sowie SnRK2.6 neben den ABFs (Fujii et al. 2007; Fujii und Zhu 2009) auch weitere Transkriptionsfaktoren, wie RAV1, ABA-RESPONSIVE KINASE SUBSTRATE1 (AKS1) und AREB3 (Wang et al. 2013b; Feng et al. 2014; Takahashi et al. 2017), phosphorylieren und dadurch deren Aktivitätszustand modulieren.

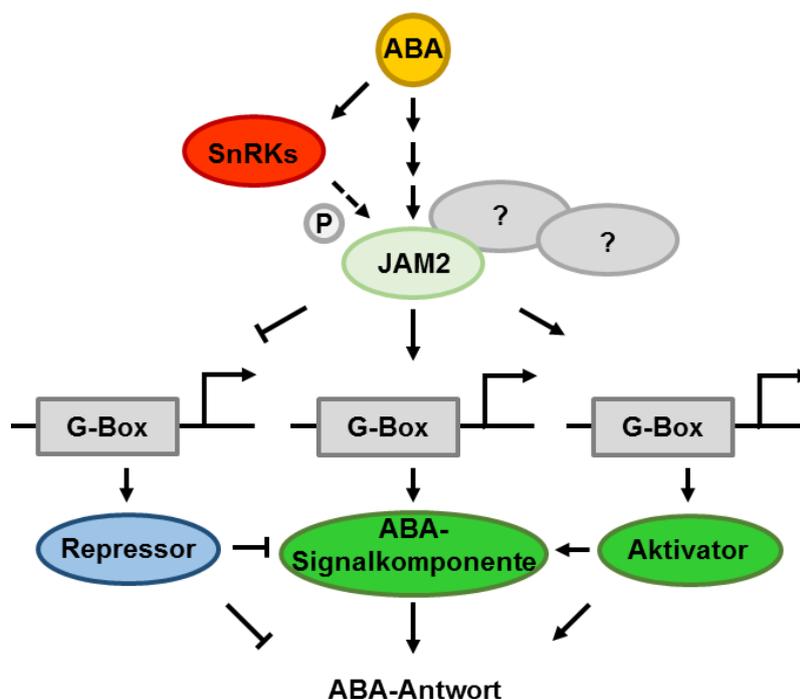


Abbildung 73: Modell zur Funktion von JAM2 im ABA-Signalweg. ABA wird in der Zelle wahrgenommen, wodurch die Signalkaskade ausgelöst und JAM2 aktiviert wird. Die Aktivierung könnte über die Phosphorylierung (gestrichelte Linie) durch SnRK2.2 oder SnRK2.6 erfolgen. JAM2 könnte mit anderen Aktivatoren des ABA-Signalwegs direkt oder indirekt über Linkerproteine interagieren und die Expression von weiteren Aktivatoren sowie ABA-Signalkomponenten auslösen. Auf die Expression von Repressoren könnte sich JAM2 negativ auswirken. Als Folge würde es zu einer Verstärkung der ABA-Antwort kommen.

Auch wenn JAM2 ähnlich wie die ABFs einer Regulation durch die SnRKs unterliegt, nimmt der bHLH-Transkriptionsfaktor keine gleichwertige Position zu den ABFs ein, denn auch ohne ABF3 verstummt die JAM2-vermittelte ABA-Antwort. Eine transkriptionelle Regulation von JAM2 durch die ABFs ist eher unwahrscheinlich – auch wenn es laut AGRIS (Yilmaz et al. 2011) eine ABRE-artige Sequenz im Promotor enthält –, weil JAM2 weder durch abiotischen Stress noch durch ABA laut den Daten des Arabidopsis eFP Browsers induziert wird (Kilian et al. 2007; Winter et al. 2007). Der Versuch, die JAM2-vermittelte Stimulation der ABA-Antwort auf eine Interaktion mit den ABFs zurückzuführen, blieb ohne Erfolg. Es zeigte sich aber, dass vor allem die Funktion als Transkriptionsfaktor und damit verbunden die DNA-Bindefähigkeit unerlässlich ist, um eine ABA-Antwort auszulösen. JAM2 kann demzufolge auf die Expression von Aktivatoren, Repressoren sowie Signalkomponenten des ABA-Signalwegs einwirken und nimmt daher wahrscheinlich eine vergleichbare Funktion zu den oben genannten Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise den WRKYs und MYBs ein. Der bHLH-Transkriptionsfaktor hat damit eine Funktion im Feintuning der ABA-Antwort, die sich den Ergebnissen zu Folge besonders auf die Keimung auswirkt. Es ist möglich, dass JAM2 für seine Funktion mit anderen Proteinen, die einen Einfluss auf den ABA-Signalweg haben, in Kontakt tritt. Um dies aber zu klären und um weitere Zielgene von JAM2 zu bestimmen, sind weitere Studien notwendig.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1 Chemikalien und Kits

Die Chemikalien (analytische Qualität) und Kits wurden – sofern nicht anders erwähnt – von Analytik Jena AG (Jena, Deutschland), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), J. T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Grafing, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) und Genomed (Löhne, Deutschland) bezogen.

4.1.2 Geräte

Die für die Experimente notwendigen Geräte sind in der nachstehenden Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
CCD-Kamera	ORCAII ERG	Hamamatsu Photonics
CCD-Kamera-Objektiv	Xenon 0.95/25	Schneider
DNA-Mikrophotometer	Nano Photometer 7122 V1.4	Implen
Elektrophorese-Spannungsgerät	EPS 200 E844	Pharmacia Biotech Consort
Elektroporationssystem	Eporator	Eppendorf
Geldokumentations-System	UV 312 nm Doc-It P91D	Bachhofer UVP Mitsubishi
Homogenisator	Tissuelyser II	Qiagen
Inkubator	WTB Brutschrank Thermoshaker ES-20	Binder Gerhardt PegLab
Kippschüttler	Rotor Shaker Genie	Scientific Industries
Luminometer	Chameleon Plate	Hidex
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	BioTek
Mikroskop	Stemi SV11 HBO 50 Axioskop	Zeiss Zeiss
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV	Pharmacia Biotech
qPCR-System	LightCycler® 480	Roche
Rundschüttler	Rotamax 120	Heidolph
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Tisch-Inkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vortexer	MS3 basic	IKA

Waage	BP 3100 S BP 110 S	Sartorius Sartorius
Zentrifuge	Avanti J-25 Typ 5424 Typ 5424R Universal	Beckmann Coulter Eppendorf Eppendorf Hettich

4.1.3 Software

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden die in Tabelle 4 aufgeführte Software verwendet.

Tabelle 4: Für die Erstellung der Daten verwendete Software.

Software	Internetadresse/Hersteller	Zweck
ACD/ChemSketch	https://www.acdlabs.com/re-sources/freeware/chemsketch/	Erstellung von chemischen Strukturen
AGRIS	https://agris-knowledgebase.org/	Informationen zu Transkriptionsfaktoren und Promotorelementen
ApE – A plasmid Editor	http://jorgensen.bio-logy.utah.edu/wayned/ape/	Erstellung von Plasmidkarten
Arabidopsis eFP Browser	http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi	Informationen zu Genexpressionsdaten
ARAPORT	https://www.araport.org/	Informationen zu Genen aus <i>A. thaliana</i>
BioGRID	https://thebiogrid.org/	Informationen zu Proteininteraktionen
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/	Homologie-Vergleich von Aminosäure-sequenzen
CHOPCHOP	http://chopchop.cbu.uib.no/	Bestimmung der Zielsequenz für CRISPR/Cas9-Knockouts
Chromas Lite	https://chromas-lite.software.informer.com/	Auswertung von DNA-Sequenzierungen
Excel	Microsoft	Statistik, Auswertung und grafische Darstellung von Versuchen
ImageJ	http://imagej.nih.gov/ij/	Ausmessen des Wurzelwachstums
MEGA-X	http://www.megasoftware.net/	Erstellen von phylogenetischen Bäumen
Primer3Plus	www.bioinformatics.nl/primer3plus	Primerdesign für qPCR
Simple PCI 6.6.0.0	Compix	Auswertung der Luciferaseaktivität in Keimlingen
TAIR	https://www.arabidopsis.org/	Informationen zu Genen

4.1.4 Mikroorganismen und deren Kultivierung

Die verwendeten Organismen sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Die Kultivierung von *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) erfolgte mit LB-Medium bei 37 °C bzw. 30 °C. Antibiotika (Tabelle 6) wurden dem LB-Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben. *S. cerevisiae* (30 °C) wurde mit autoklaviertem YPD- oder SD-Medium angezogen. Die Selektion transformierter Hefen erfolgte über einen Mangel an Aminosäuren im SD-Medium. Flüssigkulturen aller Mikroorganismen wurden zusätzlich bei 200 rpm geschüttelt. Für die

Langzeitlagerung wurden 500 µl Bakterienkultur bzw. 1 ml Hefekultur mit 1 ml bzw. 500 µl 75%igem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 5: Verwendete Organismen. Die Zahlen in der Spalte „#“ geben die Position in der Stammsammlung an.

Organismus	Genotyp	Resistenz	#	Quelle
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _k -m _k +), λ-	-	3334	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> XL1blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17</i> (r _k -m _k +)	Tetracyclin	3340	Stratagene (Heidelberg)
<i>A. tumefaciens</i> C58 GV3101	Ti Plasmid pMP90/ pSOUP	Gentamycin Tetracyclin Rifampicin	625	Csaba Koncz (MPI Köln)
<i>S. cerevisiae</i> AH109	MATa, <i>trp1-109, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2AS-GAL2TATA-ADE2, URA::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i>	-	3332	Clontech Matchmaker-System

LB-Medium	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Natriumchlorid	1 % (w/v)
	Trypton	1 % (w/v)
	(Agar	1,5 % (w/v))
	pH 7,0 mit NaOH	

Tabelle 6: Antibiotika für die Anzucht von *E. coli* oder *A. tumefaciens*.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration im Medium (µg/ml)
Ampicillin	bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	200	100
Chloramphenicol	100%iges Ethanol	25	25
Gentamycin	ddH ₂ O	25	25
Kanamycin	ddH ₂ O	50	50
Rifampicin	100%iges Dimethylsulfoxid (DMSO)	25	25
Spectinomycin	ddH ₂ O	50	50
Tetracyclin	ddH ₂ O	25	25

SD-Medium (1 l)	10 x Hefe-Makrosalze	100 ml
	1000 x Hefe-Mikrosalze	1 ml
	(Agar	2 % (w/v))
	ddH ₂ O	auf 800 ml auffüllen
	pH 5,8 mit KOH	
	autoklaviert, dann folgende Lösungen hinzugefügt:	
	10 x Dropout-Lösung	100 ml
20%ige Glucose	100 ml	

1000 x Hefe-Mikrosalze (mg/l)	Biotin	2
	Pantothensäure-Calciumsalz	400
	Folsäure	20
	Myo-Inositol	2000
	Nicotinsäure	400
	p-Aminobenzoessäure	200
	Pyridoxinhydrochlorid	400
	Riboflavin	200
	Thiamin HCl	400
	Borsäure	500
	Kupfersulfat	40
	Kaliumiodid	100
	Eisen(II)-chlorid	200
	Mangansulfat	400
	Natriummolybdat	200
	Zinksulfat	400
10 x Hefe-Makrosalze (g/l)	Kaliumhydrogenphosphat	10
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	10,24
	Natriumchlorid	1
	Calciumchlorid-Anhydrat	1
	Ammoniumsulfat	50
10 x Dropout-Lösung (mg/l)	L-Adenin-Hemisulfatsalz	200
	L-Arginin HCl	200
	L-Isoleucin	300
	L-Lysin HCl	300
	L-Methionin	200
	L-Phenylalanin	500
	L-Threonin	2000
	L-Tyrosin	300
	L-Uracil	200
	L-Valin	1500
	(L-Histidin HCl Monohydrat	200)
	(L-Leucin	1000)
	(L-Tryptophan	200)

YPD-Medium (pro l)	Trypton	2 % (w/v)
	Hefeextrakt	1 % (w/v)
	(Agar	2 % (w/v))
	ddH ₂ O	auf 900 ml auffüllen
	autoklaviert, danach 10 % sterile 20%ige Glucose zugesetzt	

4.1.5 Pflanzenlinien und deren Kultivierung

In dieser Arbeit wurde *A. thaliana*, Ökotyp Columbia (Col-0), und Mutanten in diesem Hintergrund (Tabelle 7) verwendet. Für die Anzucht wurden Töpfe mit einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ 7) gefüllt und im Gewächshaus oder in Phytokammern (Conviron, Kanada) aufgestellt. Die Phytokammern wurden auf 16 h Licht ($\sim 180 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit) und 8 h Dunkelheit (17 °C, 65 % Luftfeuchtigkeit) eingestellt. Die Generationszeit betrug dadurch ca. sechs bis acht Wochen. In Phytokammern angezogene Pflanzen wurden für Protoplasten oder für die Gewinnung von Saatgut für physiologische Untersuchungen genutzt.

Tabelle 7: Verwendete Pflanzenlinien und deren Bezugsquelle.

Linie	Quelle
Col-0	ABRC in Ohio, USA
<i>aba2-1</i>	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), United Kingdom
<i>pATHB6::LUC</i>	Lehrstuhl für Botanik, TUM
<i>JAM2</i> -Überexpressionslinien in <i>pATHB6::LUC</i>	Lehrstuhl für Botanik, TUM
<i>AHR11</i> -Überexpressionslinien in <i>pATHB6::LUC</i>	Lehrstuhl für Botanik, TUM
<i>pATHB6::LUC x ahr11 (ahr11)</i>	Lehrstuhl für Botanik, TUM
<i>pATHB6::LUC x d476 (d476)</i>	Lehrstuhl für Botanik, TUM
<i>jam2</i> in <i>pATHB6::LUC</i>	diese Arbeit
<i>jam2_d476</i> in <i>pATHB6::LUC</i>	diese Arbeit
<i>jam2_ahr11</i> in <i>pATHB6::LUC</i>	diese Arbeit
<i>snrk2.2/snrk2.3</i>	Pedro Rodriguez in Valencia, Spanien
<i>snrk2.2/snrk2.6</i>	Pedro Rodriguez in Valencia, Spanien
<i>snrk2.3/snrk2.6</i>	Pedro Rodriguez in Valencia, Spanien
<i>snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6</i>	Pedro Rodriguez in Valencia, Spanien
<i>abf2</i>	NASC, United Kingdom
<i>abf3</i>	NASC, United Kingdom
<i>abf4</i>	NASC, United Kingdom
<i>abf2/abf3/abf4</i>	Kazuko Yamaguchi-Shinozaki in Tokio, Japan

4.1.6 Enzyme

Enzyme und deren Puffer für molekularbiologische Arbeiten wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland), Promega GmbH (Mannheim, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific GmbH

(München, Deutschland) bezogen. Enzyme zur Herstellung von Protoplasten wurden von Yakult Honsha Co. Ltd. aus Japan bezogen.

4.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen und in ddH₂O zu einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgelistet.

4.1.8 Plasmide

Die verwendeten Plasmide für Interaktionsstudien in Hefen und für die transiente Expression in Protoplasten sind im Anhang in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführt. Sie wurden in *E. coli* transformiert und als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert.

4.2 Physiologische Methoden

4.2.1 Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Samen

Die Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Samen erfolgte unter kontinuierlichem Schütteln im ersten Schritt mit 80%igem Ethanol versetzt mit 0,1 % (v/v) Triton für 25 min sowie im zweiten Schritt mit 3%iger Natriumhypochlorit-Lösung für 3 min. Die Samen wurden anschließend fünfmal mit ddH₂O gewaschen und auf MS_{0,5xZucker}-Agarplatten nach Murashige und Skoog (1962) ausgebracht. Bei Bedarf wurde dem MS_{0,5xZucker}-Medium Kanamycin (50 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 25 μg/ml, ABA zu einer Endkonzentration von 0,1–30 μM oder Sorbit bzw. Mannit für ein Wasserpotential von -1,2 bis -0,2 MPa zugegeben.

MS _{0,5xZucker} -Medium (pro l)	400 x Mikrosalze	2,5 ml
	10 x Makrosalze	100 ml
	Saccharose	5 g
	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	1 g
	Agar	10 g
	(Sorbit/Mannit, siehe Tabelle 8)	
	pH 5,8 mit KOH, autoklaviert	

Tabelle 8: Mengen an Sorbit bzw. Mannit für MS_{0,5xZucker}-Medium mit verschiedenen Wasserpotentialen.

Wasserpotential (MPa)	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1,0	-1,2
Sorbit bzw. Mannit (g/l)	14,64	28,88	42,97	56,96	70,89	84,76

400 x Mikrosalze (g/l)	Eisen-II-Sulfat-Heptahydrat	11,12
	Na ₂ -Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)-Dihydrat	14,89
	Kaliumjodid	0,3
	Magnesium-II-Sulfat-Monohydrat	4,0
	Borsäure	1,2
	Zinksulfat-Heptahydrat	0,8
	Natrium-Molybdat-Dihydrat	0,1
	Kupfersulfat-Pentahydrat	0,01
	Kobalt-II-Chlorid-Hexahydrat aliquotiert, Lagerung bei -20 °C	0,01
10 x Makrosalze (g/l)	Ammoniumnitrat	16,5
	Kaliumnitrat	19
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7
	Calciumchlorid-Dihydrat	4,4
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat autoklaviert, Lagerung bei RT	3,7
	ABA-Stocklösung	5 mM 2- <i>cis</i> , 4- <i>trans</i> ABA (Chemos, Altdorf, Deutschland) 10 mM MES pH 7, Lagerung bei -20 °C

4.2.2 Keimungs-Assay

Der Keimungs-Assay erfolgte mit synchronisierten, oberflächensterilisierten Arabidopsis-Samen auf quadratischen MS_{0,5xZucker}-Agarplatten. Das MS_{0,5xZucker}-Medium wurde nach Bedarf mit ABA zu einer Endkonzentration von 0,1–30 µM oder Sorbit bzw. Mannit für ein Wasserpotential von -1,2 bis -0,2 MPa versetzt. Die MS_{0,5xZucker}-Agarplatten wurden immer am Tag der Verwendung hergestellt. Für jeden Versuch wurden Triplikate angelegt und von jeder Linie wurden pro Einheit mindestens 50 Samen ausgebracht. Die Versuche wurden zweimal unabhängig wiederholt. Um einen Gasaustausch zu gewährleisten, wurde zum Abkleben der Platten Pflasterband (Soehngen PoreTM, Soehngen, Deutschland) verwendet. Die Samenruhe wurde durch eine Stratifikation bei 4 °C für 48 h unter Dauerlicht gebrochen. Anschließend wurden die Samen für 3 d bei 22 °C und Dauerlicht (60 µE x m⁻² x s⁻¹) zum Keimen gebracht.

Die Keimung wurde als vollendet betrachtet, wenn die Keimwurzel die Samenschale durchdrungen hatte.

4.2.3 Wurzelwachstums-Assay

Für den Wurzelwachstums-Assay wurden synchronisierte, oberflächensterilisierte Arabidopsis-Samen zunächst auf frischen $MS_{0,5xZucker}$ -Agarplatten für 48 h bei 4 °C unter Dauerlicht stratifiziert. Anschließend wurden die Samen für 4 d bei 22 °C und Dauerlicht ($60 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$) zum Keimen gebracht. Danach wurden die Keimlinge auf quadratische $MS_{0,5xZucker}$ -Agarplatten mit ABA (0,1–30 μM) oder Sorbit bzw. Mannit (Wasserpotential von -1,2 bis -0,2 MPa) umgesetzt und die Positionen der Wurzelspitzen markiert. Als Kontrolle dienten $MS_{0,5xZucker}$ -Agarplatten ohne Zusatz. Auf Sorbit- oder Mannit-haltigem Medium wurden die Sprosse auf Parafilm aufgelegt, sodass nur die Wurzel Kontakt zum Medium aufnahm. Zum Abkleben der Platten wurde Pflasterband (Soehngen PoreTM, Soehngen, Deutschland) verwendet. Nach 3 d bei 22 °C und Dauerlicht ($60 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$) wurde das Wurzelwachstum bestimmt. Dazu wurden die Wurzelspitzen erneut markiert, die $MS_{0,5xZucker}$ -Agarplatten mit dem HP Scanjet G4050 eingescannt und das Wurzelwachstum mit der Software ImageJ gemessen. Für jeden Parameter wurde das Wurzelwachstum von 30 Keimlingen untersucht. Die Versuche wurden zwei- bis fünfmal unabhängig wiederholt.

4.2.4 Quantifizierung ABA-abhängiger Luciferase-Aktivität in Keimlingen

Für das *in vivo*-Imaging der Luciferaseaktivität wurden oberflächensterilisierte Arabidopsis-Samen zunächst auf frischen $MS_{0,5xZucker}$ -Agarplatten für 48 h bei 4 °C unter Dauerlicht stratifiziert. Anschließend wurden die Samen für 5 d bei 22 °C unter Dauerlicht ($60 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$) zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden auf $MS_{0,5xZucker}$ -Agarplatten ohne oder mit 10 μM ABA umgesetzt und erneut für 18–24 h bei 22 °C unter Dauerlicht ($60 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$) inkubiert. Zum Abkleben der Platten wurde Pflasterband (Soehngen PoreTM, Soehngen, Deutschland) verwendet. Für die Messung wurden die Keimlinge mit Luciferinlösung besprüht. Die Detektion erfolgte in einem lichtdicht verschlossenen Kasten mit einer CCD-Kamera (ORCAII ERG; Hamamatsu City, Japan) und einem Xenon 0.95/25-Objektiv (Schneider, Kreuznach, Deutschland). Dafür wurden die Keimlinge dreimal mit unterschiedlichen Einstellungen fotografiert (Tabelle 9). Die erste Aufnahme fand für eine spätere Überlagerung mit der Lumineszenzaufnahme bei Raumlicht statt. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Simple PCI 6.6.0.0“ (Compix, Cranberry Township, PA). Die Intensität der Lichtemission wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Mass}_{\text{korrigiert}} (\text{CCD-RLU}) = \text{Mass} - (\text{Area} \times \text{Grey Level})$$

Mass: aufsummiertes Licht eines definierten Bereichs
 Area x Grey Level: Einfluss der Hintergrundsignale in Bezug zur Fläche des definierten Bereichs

Luciferinlösung

Luciferin	1 mM
MES	10 mM
Tween80	0,01 % (v/v)
pH 7,0, 10-ml-Aliquots, Lagerung bei -20 °C	

Tabelle 9: Einstellungen der CCD-Kamera für die Lumineszenzdetektion.

Einstellung	1. Aufnahme	2. Aufnahme	3. Aufnahme
Gain	0	2	2
Exposure Time (s)	0,04	300	600
Binning	1	4 x 4	4 x 4
Speed Index	High Speed	High Precision	High Precision
Raumlicht	ja	nein	nein

4.2.5 Floral-Dip von *Arabidopsis thaliana*

Zur Erzeugung von *JAM2*-Knockouts über CRISPR/Cas9 wurde die Floral-Dip-Methode angewendet (Clough und Bent 1998; Zhang et al. 2006). Als Ausgangsvektor für das CRISPR/Cas9-Konstrukt (*pDGE065_CC4_JAM2*, #8378) diente der *pDGE65* (#7660), der von Dr. Johannes Stuttmann (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) bereitgestellt wurde. Das CRISPR/Cas9-Konstrukt wurde in *A. tumefaciens* über Elektroporation eingebracht und auf einer selektiven LB-Agarplatte (25 µg/ml Rifampicin, 25 µg/ml Gentamycin, 50 µg/ml Spectinomycin) angezogen (2 d, 30 °C). Für den Floral-Dip wurde dann von den transformierten Agrobakterien eine 1-ml-Vorkultur (24 h, 30 °C) in selektivem LB-Medium erzeugt. Die Vorkultur wurde in 150 ml selektives LB-Medium überführt und erneut für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Agrobakterien geerntet (3000 x g, 10 min) und in 300 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Als Pflanzenmaterial wurden drei bis vier Wochen alte Arabidopsis-Pflanzen verwendet, die flächig in einem Topf ausgesät wurden. Die Arabidopsis-Pflanzen wurden für ca. 30 s in die Bakteriensuspension getaucht und danach in Phytokammern bis zur Ernte kultiviert. Das gewonnene Saatgut wurde auf Erde ausgesät und zum Keimen gebracht. Für die Selektion wurden 3 d alte Keimlinge mit BASTA (Glufosinat-Ammonium, Verdünnung 1:1000) behandelt. Die Behandlung wurde zweimal im Abstand von 2 d wiederholt.

Infiltrationsmedium (pro l)	Zucker	70 g
	MES	0,5 g
	pH 5,8 mit KOH	
	Silvet L77	500 µl

4.2.6 Isolierung von Mesophyll-Protoplasten

Die Isolation von Mesophyll-Protoplasten aus Blättern von zwei bis drei Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte in Anlehnung an Abel und Theologis (1994) sowie Yoo et al. (2007). Die Enzymlösung wurde nach den Anweisungen von Sambrook und Russell (2001) hergestellt. Die vorbereiteten Dialyseschläuche (28 mm Ø) wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Die Cellulase (Yakult, Tokyo, Japan), Macerozyme (Yakult, Tokyo, Japan) und 4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid (AEBSF) wurden in 10 mM MES (pH 5,6 mit KOH) gelöst. Die Lösung wurde zweimal für 30 min gegen 10 mM MES (pH 5,6) dialysiert. Danach wurden die restlichen Bestandteile hinzugefügt. Die Enzymlösung wurde filtriert (Filter: 0,22 µm) und bei -20 °C aliquotiert gelagert. Etwa 1 g Blattmaterial wurde mit 15 ml Enzymlösung in einer Petrischale für 3–4 h bei 25 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 50 rpm verdaut. Die Protoplasten wurden durch Filtration durch ein Nylonnetz (100 µm Maschenweite) filtriert. Für eine höhere Ausbeute wurde die Petrischale mit 10 ml WISK gespült und die Suspension ebenfalls über das Nylonnetz filtriert. Nach einer Zentrifugation bei 60 x g für 2 min wurde der Überstand abgenommen und die Protoplasten in 10 ml WISK aufgenommen. Die Zentrifugation wurde wiederholt, jedoch nach Abnahme des Überstands wurden die Protoplasten in 5 ml SoMg aufgenommen. Die Anzahl an vitalen Protoplasten wurde über eine Lebendzellfärbung mit Fluorescein-Diacetat (FDA) bestimmt (Widholm 1972; Huang et al. 1986). Dazu wurden 100 µl Protoplasten mit 1 µl FDA (5 mg/ml in Aceton) versetzt. Das Auszählen erfolgte mithilfe einer Thoma-Kammer am Zeiss Axioskop HBO 50 mit einem FITC-Filtersatz (480 nm Anregungsfilter, 505 nm Sperrfilter, 535 nm Emissionsfilter). Die Protoplastensuspension wurde auf eine Konzentration von 0,5–1 x 10⁶-Protoplasten pro ml eingestellt und auf Eis für mindestens 2 h inkubiert.

Enzymlösung	Cellulase Onozuka R-10	1 % (w/v)
	Macerozym R-10	0,25 % (w/v)
	AEBSF	2,5 nM
	Sorbitol	400 mM
	CaCl ₂	8 mM
	MES	5 mM
	BSA	0,6 % (w/v)
	pH 5,6 mit KOH, 50-ml-Aliquots, Lagerung bei -20 °C	

WISK	Sorbitol	500 mM
	KCl	20 mM
	MES	4 mM
	pH 5,7 mit KOH, autoklaviert	
SoMg	Sorbitol	400 mM
	MgCl ₂	15 mM
	MES	5 mM
	pH 5,7 mit KOH, autoklaviert	

4.2.7 Transfektion von Protoplasten

Die Transfektion von Protoplasten erfolgte in 50-ml-Falcons oder in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Rundboden. Der DNA-Mix wurde vorgelegt. Pro Transfektionsansatz wurden zum DNA-Mix 100 µl Protoplastensuspension und 130 µl PEG-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde invertiert und 10 min inkubiert. Die Transfektion wurde mit 1 ml WISK abgestoppt und bei 400 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Protoplasten durch Invertieren in 220 µl WISK resuspendiert. Die Transfektionsansätze wurden als 100-µl-Aliquots in eine 96-Well-Platte aufgeteilt und mit oder ohne ABA für 16 ± 1 h bei 25 °C unter Dauerlicht inkubiert. Von der ABA-Stammlösung wurden dazu Verdünnungen mit WISK hergestellt.

DNA-Mix pro Ansatz	Reporter-DNA (2 µg/µl)	2 µl
	<i>p35S::GUS</i> (1 µg/µl)	3 µl
	Effektor-DNA (1-2 µg/µl)	0-10 µl
	0,8 M Sorbit	15 µl
	mit ddH ₂ O auf 30 µl auffüllen	
PEG-Lösung	PEG 4000	5 mM
	Sorbit	200 mM
	CaCl ₂	100 mM
	Lagerung bei 4 °C	
ABA-Stammlösung	ABA	5 mM
	MES	10 mM
	pH 7, 10-ml-Aliquots, Lagerung bei -20 °C	

4.2.8 Messung der β -D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten

Die Messung der β -D-Glucuronidase-Aktivität erfolgte in schwarzen 96-Well-Platten im „Synergy 2 Plate Reader“ von BioTek. Die Aktivität des Enzyms wurde anhand des Umsatzes von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG) zu Methylumbelliferon quantifiziert. Methylumbelliferon kann anhand seiner Fluoreszenz (Anregung: 365 nm; Emission: 460 nm) gemessen werden. Für die Messung wurden 50 μ l des Transfektionsansatzes nach der Inkubation mit 100 μ l 1,5 x MUG-Puffer gemischt. Die Messung erfolgte für 10 min bei 37 °C. Die Aktivität wurde als RFU, d. h. Änderung der gemessenen Fluoreszenz pro Sekunde, gemessen.

1,5 x MUG-Puffer	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ , pH 7	50 mM
	Na ₂ EDTA	10 mM
	Triton X-100	0,1 %
	Dithiothreitol (DTT)	1 mM
	MUG	0,5 mM
	50-ml-Aliquots, Lagerung bei -20 °C	

4.2.9 Messung der Luciferase-Aktivität in Protoplasten

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit dem „Chameleon Plate“-Luminometer. Die Aktivität der Luciferase wurde über das Licht, welches beim Umsatz des Substrats Luciferin freigesetzt wird, bestimmt. Dazu wurden 50 μ l eines Transfektionsansatzes nach der Inkubation in eine weiße 96-Well-Platte überführt. Die Substratlösung *Luciferase Assay Reagent* (LAR) wurde vom Luminometer eingespritzt und das emittierte Licht für 20 s gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde als *counts per second* (CPS) ausgegeben.

LAR	Tricin (pH 7,8, mit NaOH)	20 mM
	MgSO ₄	2,7 mM
	EDTA	0,5 mM
	DTT	33,3 mM
	Adenosintriphosphat (ATP)	0,53 mM
	MgCO ₃	1 mM
	Coenzym A	250 μ M
	Luciferin	500 μ M
	50-ml-Aliquots, Lagerung bei -20 °C	

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Herstellung chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurden in 250 ml Medium A *E. coli* bei 18 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Nach 10 min auf Eis wurde die Bakterien-suspension bei 4 °C und 2500 x g für 15 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 80 ml eisgekühltem TB-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 0,7 ml DMSO versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension aliquo-tiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Medium A	Pepton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
TB-Medium	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)	10 mM
	MnCl ₂	55 mM
	CaCl ₂	15 mM
	KCl	250 nM

4.3.2 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation wurden die chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen für 15 min auf Eis aufgetaut. Danach wurden 90 µl der Bakteriensuspension mit einem 10-µl-DNA-Ansatz (ca. 5–80 ng DNA) gemischt und erneut auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 15 s. Die Suspension wurde 5 min auf Eis abgekühlt und dann mit 400 µl LB-Medium versetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C und unter leichtem Schütteln wurde die Suspension zentrifugiert (2 min, 4000 rpm) und auf einer selektiven LB-Agarplatte ausplattiert. Die LB-Agarplatte wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.3.3 Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium von einer *A. tume-faciens*-Vorkultur zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–1 angezogen. Danach wurde die Bakteriensuspension

auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (4 °C, 5000 rpm, 10 min). Die Zellen wurden mit 500 ml eiskaltem ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 5000 rpm, 10 min). Der Vorgang wurde wiederholt und die Zellen wurden anschließend in 20 ml 10%iger Glycerin-Lösung aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (4 °C, 5000 rpm, 10 min) wurden die Zellen in 9 ml 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.3.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die elektrokompetenten *A. tumefaciens*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut (15 min) während gleichzeitig die Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) auf Eis vorgekühlt wurde. Die Bakterien wurden mit 10–50 ng DNA gemischt und in die Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, 25 µF und 700 Ω für mindestens 4 s. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugefügt und die Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden für 2 h bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Suspension zentrifugiert und die Bakterien auf einer selektiven LB-Agarplatte ausplattiert. Die LB-Agarplatten wurden bei 30 °C für 2 d inkubiert.

4.3.5 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit verschiedenen DNA-Präparationskits von Macherey-Nagel oder mit dem „JETSTAR Maxiprep-Kit“ von Genomed (Löhne, Deutschland). Dabei wurden die Anweisungen der Hersteller befolgt. Die Plasmid-DNA wurde in ddH₂O aufgenommen und die Konzentration wurde über Agarose-Gelelektrophorese oder photometrisch mit dem NanoDrop-Photometer bestimmt.

4.3.6 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen erfolgte mit der Polymerase „Phusion High-Fidelity“ bzw. „Pfu native“ von Thermo Fisher Scientific. Für alle weiteren Amplifikationen wurde die „GoTaq“ von Promega verwendet. Die Polymerasen wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Für SDMs wurde nach dem Protokoll des „QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene (La Jolla, Kalifornien) gearbeitet.

4.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Separierung von Nukleinsäure-Fragmenten anhand ihrer Größe und zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarose-Gel mit Ladepuffer versetzt. Als Ladepuffer wurde der „10 x FastDigest Green Buffer“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gelöst. Für die Konzentrationsbestimmung wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel verwendet und für die Separierung von Fragmenten variierte die Agarose-Konzentration zwischen 0,8–2 %. Beim Gießen wurde dem Agarose-Gel für die spätere Visualisierung der Nukleinsäuren Ethidiumbromid zugesetzt (0,5–0,75 µg/ml; Stammlösung 10 mg/ml). Das polymerisierte Agarose-Gel wurde in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Neben den Proben wurde als Größen- und Konzentrationsvergleich ein Längenstandard von Thermo Fisher Scientific auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 200 V (6,7 V/cm) und 400 mM für 30 min. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte mit UV-Licht.

50 x TAE-Puffer	Tris-Base	2 mM
	Eisessig	5,71 % (v/v)
	EDTA (pH 8)	50 mM

4.3.8 Klonierungsmethoden

Für den Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurden Restriktionsenzyme von Thermo Fisher Scientific und New England Biolabs verwendet. Die Enzyme wurden nach den Angaben der Hersteller angewendet. Der Erfolg der Restriktion wurde, wenn größere Fragmente entstanden, über Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die anschließende Reinigung erfolgte mit dem „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit“ von Machery-Nagel. Auch hier wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Um eine Religation des Vektors zu minimieren wurde dieser dephosphoryliert. Dafür kam die Antarctic Phosphatase von New England Biolabs zum Einsatz und wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Vektor wurde anschließend wieder mit dem „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit“ von Machery-Nagel gereinigt. Für die Ligation von Insert und Vektor wurde die T4-DNA-Ligase von Thermo Fisher Scientific nach Gebrauchsanweisung verwendet. Das entstandene Konstrukt wurde in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

4.3.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden Proben an GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) gesendet. Die Proben wurden nach den Anforderungen von GATC Biotech vorbereitet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit der Software Chromas Lite und ApE.

4.3.10 DNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation von DNA aus *A. thaliana* erfolgte mit der CTAB-Extraktion in Anlehnung an Murray und Thompson (1980). Etwa 50 mg Pflanzenmaterial wurden zusammen mit Glasperlen in einem 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Spitzboden durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und mit dem „Tissuelyser II“ von Qiagen zerkleinert. Das Pflanzenmaterial wurde mit 300 µl 2 x CTAB-Puffer versetzt und für mindestens 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Suspension wurde abgekühlt, mit 300 µl Chloroform versetzt und durch Vortexen gemischt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (11000 x g, 1 min) voneinander getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol gemischt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 11000 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde erneut zentrifugiert (11000 x g, 30 s), das Ethanol abgenommen und das Pellet für 10 min bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl ddH₂O mit 0,3 µg/µl RNase bei 65 °C für 10 min gelöst. Von der isolierten DNA wurde 1 µl für einen PCR-Ansatz verwendet.

2 x CTAB-Puffer	CTAB	2 % (w/v)
	NaCl	1,4 M
	Tris-HCl (pH 8)	100 mM
	EDTA	20 mM

4.3.11 RNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation von RNA aus *A. thaliana* erfolgte mit dem „innuPREP Plant RNA Kit“ von Analytik Jena AG. Das Pflanzenmaterial wurde zusammen mit Glasperlen in einem 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Spitzboden durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und mit dem „Tissuelyser II“ von Qiagen zerkleinert. Für die Isolation der RNA wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Anstelle des ersten Waschschriffs mit Puffer HS wurde eine DNase-Behandlung mit dem „innuPREP DNase I Kit“ von Analytik Jena AG durchgeführt. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop-Photometer und die Qualität über Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

4.3.12 Synthese der komplementären DNA

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte mit dem „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Thermo Fisher Scientific. Pro Reaktion wurden 500 ng RNA eingesetzt. Das Kit wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die erzeugte cDNA wurde 1:20 verdünnt und aliquotiert. Bei direkter Verwendung wurde die cDNA im Kühlschrank gelagert. Für die Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum wurde die cDNA in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.13 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Für die qPCR wurde der „GoTaq® qPCR Master Mix“ von Promega verwendet. Die qPCR-Ansätze wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Pro Reaktion wurde anstelle des 40-µl-Ansatzes ein 10-µl-Ansatz (Tabelle 10) verwendet.

Tabelle 10: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.

Bestandteil	10-µl-Ansatz	Endkonzentration
2 x GoTaq® qPCR Master Mix	5 µl	1 x
10 µM <i>forward</i> -Primer	0,5 µl	0,5 µM
10 µM <i>reverse</i> -Primer	0,5 µl	0,5 µM
cDNA, 1:20 verdünnt	2 µl	1:200
nukleasefreies Wasser	2,5 µl	-

Für die Durchführung wurde der „LightCycler® 480“ von Roche mit den vorgegebenen Einstellungen von Promega verwendet. Als Referenzgene dienten *TIP41L*, *UBC9* und *UBI10*. Die verwendeten Primer sind im Anhang in der Tabelle 13 aufgeführt. Die Primer wurden mithilfe des Online-Programms „Primer3Plus“ erstellt. Für jeden Parameter wurden drei technische Replikate erzeugt, aus denen das arithmetrische Mittel gebildet wurde. Die Versuche wurden zweimal unabhängig wiederholt. Für die Auswertung wurden folgende Gleichungen angewendet:

1. Aus den *cycle threshold* (CT)-Werten der drei biologischen Replikate von *UBI10* (b), *UBC9* (c) und *TIP41L* (d) wurden die arithmetrischen Mittelwerte gebildet. Mit den arithmetrischen Mittelwerten von *UBI10* (b), *UBC9* (c) und *TIP41L* (d) wurde der geometrische Mittelwert der Referenzgene (a) berechnet.

$$a = \sqrt[3]{b \cdot c \cdot d}$$

2. Berechnung des Unterschieds zwischen der Transkriptmenge des Zielgens und der der Referenzgene (f)

$$f = 2^{-(e-a)}$$

e = CT-Wert eines biologischen Replikats für ein Zielgen

3. Berechnung des Unterschieds der Transkriptmenge zwischen einer Linie im Verhältnis zur Kontrolllinie (h)

$$h = \frac{f}{g}$$

g = arithmetisches Mittel von f_1 , f_2 und f_3 der Kontrolllinie

Aus h_1 , h_2 und h_3 , die sich für jede Linie ergaben, wurden das arithmetrische Mittel und die Standardabweichung berechnet.

4.3.14 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte in Anlehnung an Gietz und Woods (2002). 5 ml YPD wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde eine 50-ml-Hauptkultur mit YPD auf eine OD_{600} von 0,3 angeimpft und erneut bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,6–0,8 wurden die Hefezellen geerntet (1500 x g, 5 min). Das Pellet wurde mit 25 ml ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert (1500 x g, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und die Hefezellen wurden in 1 ml einer 100-mM Lithiumacetat-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde in ein 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Rundboden überführt und zentrifugiert (11000 x g, 15 s). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 500 µl der 100-mM Lithiumacetat-Lösung aufgenommen. Pro Transformation wurden 50 µl der Hefesuspension in ein 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Rundboden überführt und zentrifugiert (11000 x g, 15 s). Der Überstand wurde abgenommen und zum Pellet wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Komponenten nacheinander zugegeben. Die *Carrier*-DNA wurde zuvor bei 95 °C für 5 min erhitzt und bis zur Transformation auf Eis gelagert. Der Transformationsansatz wurde gemischt und 40 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz zentrifugiert (11000 x g, 15 s). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 100 µl ddH₂O resuspendiert. Die Hefen wurden auf einer selektiven SD-Agarplatte ausplattiert und bei 30 °C für 2 d inkubiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung eines Hefe-Transformationsansatzes

Komponente	Konzentration	Volumen (μl)
PEG 4000	50 % (w/v)	240
Lithiumacetat	1 M	36
Carrier-DNA	2 mg/ml	50
Plasmid-DNA	80 ng/ μ l	2
ddH ₂ O	-	auf 360 μ l auffüllen

4.3.15 *Yeast two-hybrid*

Für das Y2H-Spotting wurde das Protokoll von Scholz (2018) verwendet. Eine Hefe-Einzelkolonie wurde in 100 μ l ddH₂O resuspendiert und dann 1:10 und 1:100 verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde unter Zuhilfenahme einer 96-Well-Platte erzeugt. Für das Spotting wurde eine 12-Kanal-Pipette verwendet. Jeweils 10 μ l der Hefesuspension wurden auf selektives SD-Medium (-L/-W, -L/-W/-H), das zum Teil mit ABA (10 μ M Endkonzentration) oder mit 3-AT (1–15 mM Endkonzentration) versetzt war, aufgetropft. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden sie mit Parafilm verschlossen und für 3 d bei 30 °C inkubiert. Für die Dokumentation des Wachstums wurden die Platten mit dem HP Scanjet G4050 eingescannt.

5. Anhang

5.1 Weiterführende Ergebnisse

5.1.1 Y2H-Wachstumskontrollen von Interaktionsstudien mit AHR11, JAM2 und TPL/TPRs

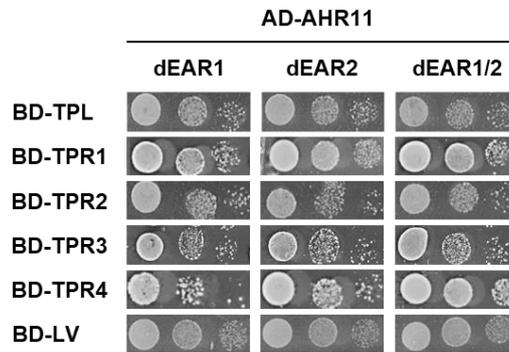


Abbildung 74: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Varianten mit deletierten EAR-Motiven. Y2H von BD-TPL/TPRs mit AD-Varianten von AHR11, in denen ein oder beide EAR-Motive deletiert wurden, auf selektivem Medium (-L/-W, Wachstumskontrolle). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben.

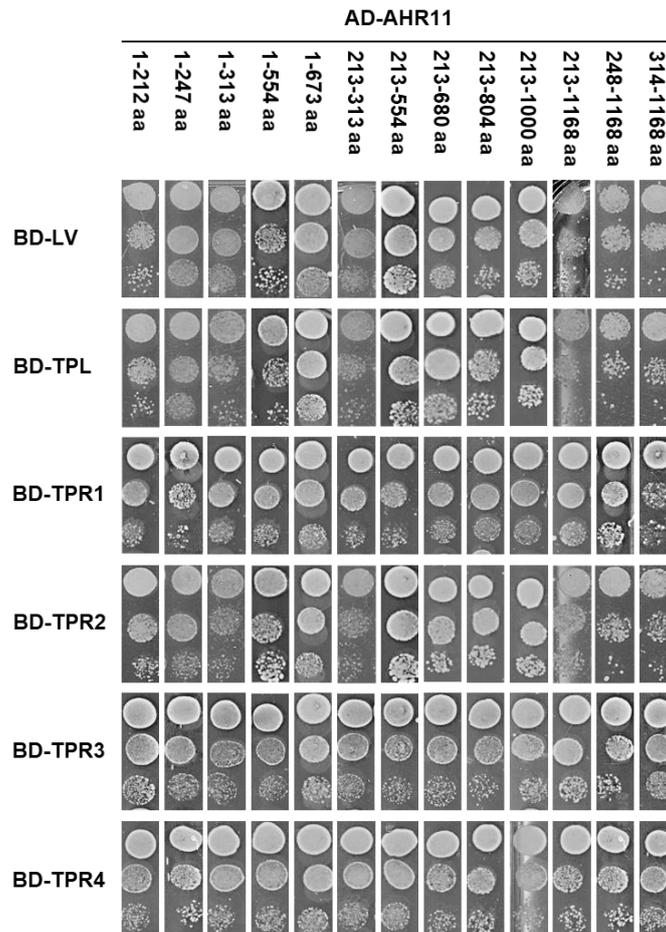


Abbildung 75: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen TPL/TPRs und AHR11-Fragmenten. Y2H von BD-TPL/TPRs mit AD-AHR11-Fragmenten auf selektivem Medium (-L/-W, Wachstumskontrolle). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben.

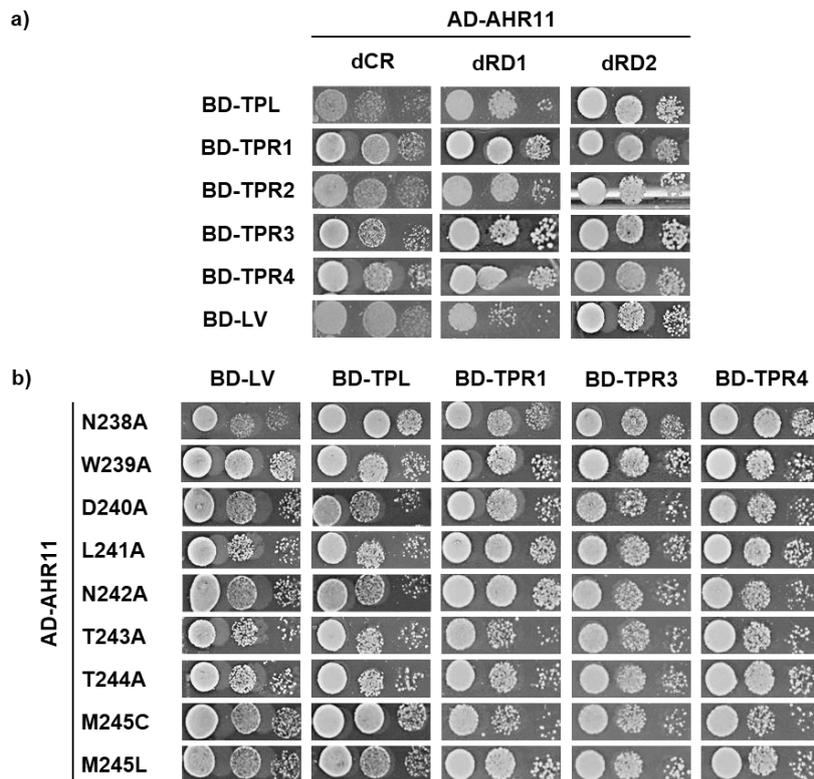


Abbildung 76: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen AHR11-RD-Varianten und TPL/TPRs. a) Y2H von BD-TPL/TPRs mit AD-AHR11-RD-Varianten auf selektivem Medium (-L/-W, Wachstumskontrolle). b) Y2H von BD-TPL/TPRs mit AD-AHR11-Varianten, in denen einzelne Aminosäuren der partiellen RD (²⁴⁰DLN²⁴²) und umliegende Aminosäuren ausgetauscht wurden, auf selektivem Medium (-L/-W, Wachstumskontrolle). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben.

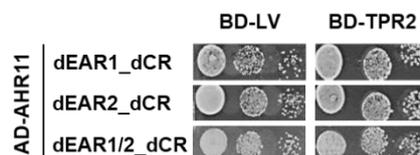


Abbildung 77: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen TPR2 und AHR11-Varianten mit deletierter konservierter Region sowie ein oder beider EAR-Motive. Y2H von BD-TPR2 und AD-AHR11-Varianten – deletierte CR sowie ein oder beide EAR-Motive deletiert – auf selektivem Medium (-L/-W, Wachstumskontrolle). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben.

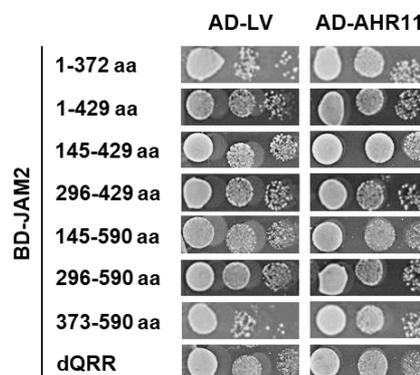


Abbildung 78: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen AHR11 und JAM2-Fragmenten. Y2H von AD-AHR11 und BD-JAM2-Fragmenten und einer BD-JAM2-Variante mit deletierter QRR auf selektivem Medium (-L/-W, Wachstumskontrolle). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben.

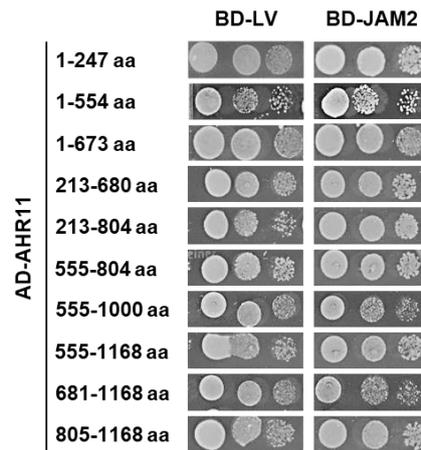


Abbildung 79: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse von JAM2 mit AHR11-Fragmenten. Y2H zwischen BD-JAM2 und AD-AHR11-Fragmenten auf selektivem Medium (-L/-W, Wachstumskontrolle). Die Anzucht und das Spotting erfolgten wie zuvor beschrieben.

5.1.2 Y2H-Wachstumskontrollen von Interaktionsstudien mit MYC2, JAMs und RCARs

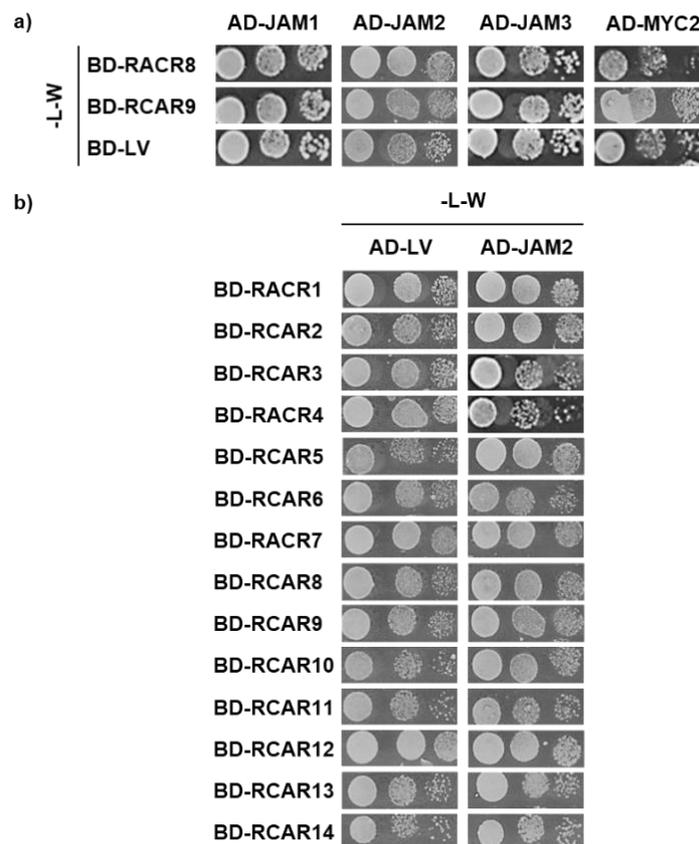


Abbildung 80: Wachstumskontrolle der Interaktionsanalyse zwischen MYC2/JAMs und RCARs. a) Y2H-Interaktionsanalyse zwischen MYC2/JAMs und RCAR8 bzw. RCAR9. MYC2 bzw. die JAMs wurden für die Interaktionsanalyse mit der AD und die RCARs mit der BD fusioniert. Eine Hefeinzelnkolonie wurde in 100 µl ddH₂O resuspendiert und 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan (-L/-W, Wachstumskontrolle) aufgetropft und für 3 d bei 30 °C inkubiert. b) Y2H-Interaktionsanalyse zwischen JAM2 und RCARs. Der Versuch erfolgte wie unter a) beschrieben. Der Y2H (a, b) wurde zweimal unabhängig wiederholt.

5.2 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 12: Oligonukleotide für Klonierungen oder Sequenzierungen.

#	Gen	Bezeichnung	Sequenz
2426	JAM2	Seq_Jam2_r2	GCAGATTCTCGTCGCTTCC
2476	AHR11	del_EAR1_for	GAAGAGCCTACAGAAAGCAAGGGCGTCTGT CCCCG
2477	AHR11	del_EAR1_rev	GCGGGACAGACGCCCTTGCTTTCTGTAGGC TCTTC
2478	AHR11	del_EAR2_for	GTTAATCCCACCTGCTCAAGTTCATATCCTC C
2479	AHR11	del_EAR2_rev	GGAGGATATGAACTTGAGCAGGTGGGATTA AC
2719	AD	pACT2-FP	GATGATGAAGATACCCAC
2720	AD	pACT2-RP	CAGTTGAAGTGAAGTTGC
2721	BD	pGBT9-FP	AGTGCGACATCATCATCG
2722	BD	pGBT9-RP	CGTTTTAAAACCTAAGAGTCAC
2724	AHR11	AHR11_A238_f	CAACAGTGGCCTGAACAGAGAAGCTTGGGA TTTGAATACTACC
2725	AHR11	AHR11_A238_r	GGTAGTATTCAAATCCCAAGCTTCTCTGTTC AGGCCACTGTTG
2726	AHR11	AHR11_681aa_f	ATTAGAATTCTCTACAGTGTGAGGCCGCGCATT G
2730	AHR11	AHR11_213aa_f	ATTAGAATTCAGCAAGGGAGTTTGTCCCGC
2731	AHR11	AHR11_313aa_r	ATTAGTCGACTGAGCATGTGGGATTAACATG ATTATC
2732	AHR11	AHR11_1168aa_r	ATTAGTCGACTTAAAAACCATCACCACCGAG CTC
2733	AHR11	AHR11_dCR_f	CCAATCTGGCAACAGTGGCCTGGATGCTC TAGATCGCACAAAGTGG
2734	AHR11	AHR11_dCR_r	CCACTTGTGCGATCTAGAGCATCCAGGCCA CTGTTGCCAGATTTGG
2735	TPL	TPL_1aa_f	ATTACCCGGGCATGTCTTCTTTAGTAGAGA GCTCG
2736	TPL	TPL_288aa_r	ATTAGTCGACTGGAGGAGTTCTCGGGTGC
2737	TPL	TPL_37aa_f	ATTACCCGGGCAATATGAAGTATTTTGAGGA TGAGGTTAC
2738	TPL	TPL_289aa_f	ATTACCCGGGCACTAATGCTTCTTTAGACTA CCCGTC
2739	TPR2	TPR2_288aa_r	ATTAGTCGACAGGGTGTTCAGCTCATTAAAC TTG
2740	TPR2	TPR2_37_aa_f	ATTAGAATTCAACATTAAGTACTTTGAAGAG AAAGCTCTTG
2741	TPR2	TPR2_289aa_f	ATTAGAATTCCGGGCACCGTCTAACTCTC
2742	JAM2	JAM2_1aa_f	ATTAGAATTCATGAATATTGGTGCCTAGTGTGG
2743	JAM2	JAM2_372aa_r	ATTAGTCGACCCTCTGCGATGATTGCTGC
2744	JAM2	JAM2_373aa_f	ATTAGAATTCCTGCTTCTCCTGCTCAAATGC
2745	AHR11	AHR11_AH_f	GTGGCCTGAACAGAGAAAATTGGGCCATA ATACTACCATGGATG
2746	AHR11	AHR11_AH_r	CATCCATGGTAGTATTATGGGCCCAATTTTC TCTGTTCCAGGCCAC
2747	AHR11	AHR11_314aa_f	ATTAGAATTCCTTAGTCTAGGCCTCAGTTCA TATCC
2748	AHR11	AHR11_212aa_r	ATTAGTCGACTAATGACAAATTCAGTTCTGT AGGCTC

2749	AHR11	AHR11_dPRD2_f	GGATTTAGTTCTCCTAAGGTGGATAATCATG TTAATCCCAC
2750	AHR11	AHR11_dPRD2_r	GTGGGATTAACATGATTATCCACCTTAGGAG AACTAAATCC
2751	AHR11	AHR11_248aa_f	ATTAGAATTCTGGGAAGATGCTCTAGATCGC A
2752	JAM2	CC4_JAM2_f	ATTG TGGTCGCCTAGTGTGGAACG
2753	JAM2	CC4_JAM2_r	AAAC CGTTCACACTAGGCGACCA
2756	AHR11	AHR11_S218_f	CCCAAAAAAGAGATCGAATTCCCCGCTCAT AACACAG
2757	AHR11	AHR11_S218_r	CTGTGTTATGAGCGGGGAATTGATCTCTTT TTTTGGG
2758	AHR11	AHR11_S223_f	CCCAAAAAAGAGATCGAATTGATTCTACT TCTACC
2759	AHR11	AHR11_S223_r	GGTAGAAGTAGAATCGAATTGATCTCTTTT TTTTGGG
2760	AHR11	AHR11_S228_f	CCCAAAAAAGAGATCGAATTCAAATCTGGC AACAGTGG
2761	AHR11	AHR11_S228_r	CCACTGTTGCCAGATTTGAATTCGATCTCTTT TTTTGGG
2762	AHR11	AHR11_S233_f	CCAAAAAAGAGATCGAATTCGGCCTGAAC AGAGAAAATTGG
2763	AHR11	AHR11_S233_r	CCAATTTTCTCTGTTTCAGGCCGAATTCGATC TCTTTTTTGG
2764	AHR11	AHR11_S238_f	CCCAAAAAAGAGATCGAATTCAATTGGGAT TTGAATACTACC
2765	AHR11	AHR11_S238_r	GGTAGTATTCAAATCCCAATTGAATTCGATC TCTTTTTTGGG
2766	AHR11	AHR11_S243_f	CCCAAAAAAGAGATCGAATTCACTACCATG GATGTTTGG
2767	AHR11	AHR11_S243_r	CCAACATCCATGGTAGTGAATTCGATCTCT TTTTTTGGG
2768	AHR11	AHR11_A240_f	GGCCTGAACAGAGAAAATTGGGCCTTGAAT ACTACCATGG
2769	AHR11	AHR11_A240_r	CCATGGTAGTATTCAAGGCCAATTTTCTCT GTTTCAGGCC
2770	AHR11	AHR11_H241_f	GGCCTGAACAGAGAAAATTGGGATCATAATA CTACCATGGATG
2771	AHR11	AHR11_H241_r	CATCCATGGTAGTATTATGATCCCAATTTTCT CTGTTTCAGGCC
2772	AHR11	AHR11_A242_f	GAACAGAGAAAATTGGGATTTGGCTACTACC ATGGATGTTTGG
2773	AHR11	AHR11_A242_r	CCAACATCCATGGTAGTAGCCAAATCCCAA TTTTCTCTGTTT
2774	AHR11	AHR11_C245_f	GGGATTTGAATACTACCTGCGATGTTTGGGA AGATGCTCTAG
2775	AHR11	AHR11_C245_r	CTAGAGCATCTTCCCAAACATCGCAGGTAGT ATTCAAATCCC
2776	AHR11	AHR11_G241_f	GCCTGAACAGAGAAAATTGGGATGGGAATAC TACCATGGATG
2777	AHR11	AHR11_G241_r	CATCCATGGTAGTATTCCCATCCCAATTTTCT CTGTTTCAGGCC
2778	AHR11	AHR11_L245_f	GGGATTTGAATACTACCTTGGATGTTTGGGA AGATGCTC
2779	AHR11	AHR11_L245_r	GAGCATCTTCCCAAACATCCAAGGTAGTATT CAAATCCC
2780	AHR11	AHR11_554aa_r	ATTAGTCGACAGTTCCACGAGAATTACAAG GG
2783	TPL	S_TPL_F	TCCGCTAGCGAATTCGATGTCTTCTCTTAG TAGAGAG

2784	<i>TPL</i>	S_TPL_R	AGAATGAGCTCACCGGTCATCTCTGAGGCT GAT
2788	<i>AHR11</i>	S_AHR11_F	TCCGCTAGCGAATTCGATGTCTGGAAGCCA AG
2789	<i>AHR11</i>	S_AHR11_R	AGAATGAGCTCACCGGTTAAAAACCATCACC ACC
2790	<i>TPR2</i>	S_TPR2_F	TCCGCTAGCGAATTCGATGTCGTCTTTGAG CAG
2791	<i>TPR2</i>	S_TPR2_R	AGAATGAGCTCACCGGTTACCTTTGAATCTG ATCCG
2794	<i>JAM2</i>	S_JAM2_F	TCCGCTAGCGAATTCGATGAATATTGGTCGC CT
2795	<i>JAM2</i>	S_JAM2_R	AGAATGAGCTCACCGGCTATCTACCTGATGA TGTTT
2796	<i>AHR11</i>	AHR11_ESVGF_f	GTTTCTGAAAGACAGAAGAGTTCTCCTAAGG TGACG
2797	<i>AHR11</i>	AHR11_ESVGF_r	CGTCACCTTAGGAGAACTCTTCTGTCTTTCA GAAAC
2798	<i>AHR11</i>	AHR11_DNHVNP_f	CGTTGATGCAGTTTACATGCTCACTTAGTCT AGG
2799	<i>AHR11</i>	AHR11_DNHVNP_r	CCTAGACTAAGTGAGCATGTAAACTGCATCA ACG
2800	<i>AHR11</i>	AHR11_W239A_f	GGCCTGAACAGAGAAAATGCGGATTTGAAT ACTACCATGG
2801	<i>AHR11</i>	AHR11_W239A_r	CCATGGTAGTATTCAAATCCGCATTTTCTCT GTTCAGGCC
2802	<i>AHR11</i>	AHR11_L241A_f	GAACAGAGAAAATTGGGATGCGAATACTAC CATGGATGTTTGG
2803	<i>AHR11</i>	AHR11_L241A_r	CCAAACATCCATGGTAGTATTCGCATCCCAA TTTTCTCTGTTT
2804	<i>AHR11</i>	AHR11_T243A_f	GAACAGAGAAAATTGGGATTTGAATGCTACC ATGGATGTTTGG
2805	<i>AHR11</i>	AHR11_T243A_r	CCAAACATCCATGGTAGCATTCAAATCCCAA TTTTCTCTGTTT
2806	<i>AHR11</i>	AHR11_T244A_f	CAGAGAAAATTGGGATTTGAATACTGCCATG GATGTTTGGG
2807	<i>AHR11</i>	AHR11_T244A_r	CCCAAACATCCATGGCAGTATTCAAATCCCA ATTTTCTCTG
2814	<i>TPR1</i>	TPR1_Seq1_r	GTTGACAGGGGATGGTGCTC
2815	<i>TPR1</i>	TPR1_Seq1_f	GCAACACCAGCTTTGTAAGAACC
2816	<i>TPR1</i>	TPR1_Seq2_f	CACGGTGGTGAAGACATGAGG
2817	<i>TPR1</i>	TPR1_Seq3_f	GGTGGATGTGAAGCCAGTG
2818	<i>TPR1</i>	TPR1_Seq4_f	CTGTGCGTGAATCAGCAGC
2819	<i>TPR3</i>	TPR3_Seq1_f	GCTAGTTGGATGGCTGCTG
2820	<i>TPR3</i>	TPR3_Seq1_r	GTGGTGTTCCTTGGTCGCTTCAAG
2821	<i>TPR3</i>	TPR3_Seq2_f	CCACGACGCTCCAGTTTATTCC
2822	<i>TPR3</i>	TPR3_Seq3_f	TGCTGGAATCTTGGCACTAGG
2823	<i>TPR4</i>	TPR4_Seq1_r	CAGTAGGGTGTGTACCGATGG
2824	<i>TPR4</i>	TPR4_Seq1_f	GGAGGCTTCCCACCATTAGG
2825	<i>TPR4</i>	TPR4_Seq2_f	CAAGGTCTGGGATGCTGTTAC
2826	<i>TPR4</i>	TPR4_Seq3_f	GCTTCGTA CTCTGCGGCTTC
2827	<i>TPR1</i>	TPR1_Seq2_r	CATAGTTGCTTGTTCGGAGTGG
2828	<i>TPR1</i>	TPR1_Seq3_r	GGAGTCTCAATGAACGGCAC
2837	<i>AHR11</i>	AHR11_1000aa_r	ATTAGTCGACATTCGATGGTCTATGCGAGA AAGG

2838	<i>AHR11</i>	AHR11_804aa_r	ATTAGTCGACGCTTTCTGTGTTATCAGGTAA TCTCC
2839	<i>AHR11</i>	AHR11_680aa_r	ATTAGTCGACGACACCTGACGTTCCCTCACC
2840	<i>AHR11</i>	AHR11_805aa_f	ATTAGAATTCAATCTGCATGACCAGGACACA
2841	<i>AHR11</i>	AHR11_555aa_f	ATTAGAATTCGATGAACTTTCCAGAAATGAT GAAGAG
2842	<i>TPR4</i>	SDM_TPR4dA_f	GCTTTGCACTCTCAAAAAATGATTCTTATGT CATGTCAGCCTC
2843	<i>TPR4</i>	SDM_TPR4dA_r	GAGGCTGACATGACATAAGAATCATTTTTTG AGAGTGCAAAGC
2844	<i>TPR4</i>	SDM_TPR4_mT_f	CGACATTCAACGAAGAGCTTTTTAAGGAGAT TACCATGC
2845	<i>TPR4</i>	SDM_TPR4_mT_r	GCATGGTAATCTCCTTAAAAAGCTCTTCGTT GAATGTCG
2846	<i>TPR1</i>	SDM_TPR1_mG_f	GGGATCTTAATGACAAACGATGTGGCTGAAA CTAATCC
2847	<i>TPR1</i>	SDM_TPR1_mG_r	GGATTAGTTTCAGCCACATCGTTTGTCATTA AGATCCC
2848	<i>JAM2</i>	JAM2_CRIS_r	CTTTAGGCTCTCTGCAATATCCATCG
2849	<i>JAM2</i>	JAM2_CRIS_f	GAGAAAATCTCGGTGGAAGAGACTTG
2850	<i>AHR11</i>	AHR11_BgIII_r	ATTAAGATCTAAAACCATCACCACCGAGCTC
2861	<i>ahr11</i>	ahr11_BgIII_r	ATTAAGATCTAACATCCATGGTAGTATTCAA ATCCC
2862	<i>AHR11SV</i>	AHR11SV_BgIII_r	ATTAAGATCTGGTAGAGCATGCTTTAATATG TTTATTACC
2863	<i>pTAT1</i>	TAT1_mGB_f	GTCTTCTATGTTGATGTTAATATCCAGGTCA AGATATCAAATGTTTAGAAC
2864	<i>pTAT1</i>	TAT1_mGB_r	GTTCTAAACATTTGATATCTTGACCTGGATAT TAACATCAACATAGAAGAC
2865	<i>PAT</i>	Sq_PAT_f	CAGATTTTCGGTGACGGGCAG
2866	<i>PAT</i>	Sq_PAT_r	GTCTGCACCATCGTCAACC
2886	<i>JAM2</i>	JAM2_dQRR_f	GCACAATTCAGGGTTTCTTTTTAGAGAGAAAC TCACGG
2887	<i>JAM2</i>	JAM2_dQRR_r	CCGTGAGTTTCTCTCTAAAAAGAAACCCTGA ATTGTGC
2928	<i>ABI5</i>	ABI5_A1313C_f	CATTGATGAGGAACCCGAGTTGTCCACTCT AG
2929	<i>ABI5</i>	ABI5_A1313C_r	CTAGAGTGGACAACCTCGGGTTCCATCAA TG
2961	<i>AHR11</i>	AHR11_Seq_r	CAGCTCCATGTAGATGGTCTGATC
3195	<i>ABI5</i>	ABI5_GtoA_r	GGATTAGTGGGATGTTCTCTAACCCACACCA GCCTTCACC
3196	<i>ABI5</i>	ABI5_GtoA_f	GGTGAAGGCTGGTGTGGTTAGAGAACATCC CACTAATCC
3464	<i>JAM2</i>	JAM2_dBR_f	CCTGCCAACGGAAGAGCGGAGAAGCTTAAC CAGAGG
3465	<i>JAM2</i>	JAM2_dBR_r	CCTCTGGTTAAGCTTCTCCGCTCTTCCGTTG GCAGG

Tabelle 13: Oligonukleotide für die qPCR.

#	Gen	Bezeichnung	Sequenz
3448	<i>ABF3</i>	ABF3_qP4_f	ATTGGTGGGTTAGCTGTTGG
3449	<i>ABF3</i>	ABF3_qP45_r	CCTTCATCAGCTCCTCCAG
3426	<i>ABI5</i>	ABI5_qP1_f	AGACAGAGGAGGATGATCAAGAAC
3427	<i>ABI5</i>	ABI5_qP1_r	CAGCTTCCAATTCCACTGTATATG

3428	<i>AHG1</i>	AHG1_qP1_f	AATAGAATGGCTCAAGAAGACGAC
3429	<i>AHG1</i>	AHG1_qP1_r	GAGCTATTCTTGAGATCAATGACG
3430	<i>AHG3</i>	AHG3_qP2_f	GAACGGTTGCATGATATAGTGAAG
3431	<i>AHG3</i>	AHG3_qP2_r	TCTCGTTGGCTAACTTCTTTATCC
3432	<i>AHR11</i>	AHR11_qP_6f	CTCCACTCAGATTCCACAACC
3433	<i>AHR11</i>	AHR11_qP_6r	TCCCAATGCTCTTCCCTTTAC
3450	<i>CYP707A1</i>	CYP707A1_qP2_f	CTGCTAAGTTCGTGCTGGTG
3451	<i>CYP707A1</i>	CYP707A1_qP2_r	TGTTTCCCAACATCCTCTC
3438	<i>HAB1</i>	HAB1_qP2_f	GATACCAATACTTCGGAGGTTGTC
3439	<i>HAB1</i>	HAB1_qP2_r	CATCCTCCATCTCAGATCTATTCC
3436	<i>HAI1</i>	HAI1_qP1_f	TCCTGAAGCTTATCCTAAATACGG
3437	<i>HAI1</i>	HAI1_qP1_r	GGATGAATATTCCGTCTGATGAC
3444	<i>HAI2</i>	HAI2_qP2_f	GTAGCTTCACACGTATGGACAAAG
3445	<i>HAI2</i>	HAI2_qP2_r	TTGAAGCTCACACCTACAATTAGC
3440	<i>JAM2</i>	JAM2_qP1_f	TACCTTTGCAGCAATCATCG
3441	<i>JAM2</i>	JAM2_qP1_r	CTCTGAAGCCCTTGAACCTCG
3454	<i>LUC</i>	Luc_qP23_f	AACACCCCAACATCTTCGAC
3455	<i>LUC</i>	Luc_qP2_r	TTTTCCGTCATCGTCTTTCC
1866	<i>RCAR1</i>	RT RCAR1 fw	TGAGACTTGCTACTTTGTTGAAGC
1867	<i>RCAR1</i>	RT RCAR1 rev	GTAATGTCCTGAGAAGCCAATCTT
1868	<i>RCAR2</i>	RT RCAR2 fw	CTATGGTGATGGAGTCTTTTGTG
1869	<i>RCAR2</i>	RT RCAR2 rev	CACTTTATGAGTGATTCCACGAAG
1870	<i>RCAR3</i>	RT RCAR3 fw	CCAGAAGGAAACACAAAGGATG
1871	<i>RCAR3</i>	RT RCAR3 rev	GTCGTGTCTTGAACCGCAAG
1876	<i>RCAR6</i>	RT RCAR6 fw	GAAGACAGTGGTTGTGGAGAGTTA
1877	<i>RCAR6</i>	RT RCAR6 rev	CCAACGATAGTATCAGCAAACAAC
1880	<i>RCAR8</i>	RT RCAR8 fw	GACCACAGGCTCAAGAACTACC
1881	<i>RCAR8</i>	RT RCAR8 rev	CACATCAACGATGTAAGACTCCAC
1884	<i>RCAR10</i>	RT RCAR10 fw	TACGATGCAATCTTCAATCTCTTG
1885	<i>RCAR10</i>	RT RCAR10 rev	TCACAGAGACATCTTCTTCTTGCT
1890	<i>RCAR13</i>	RT RCAR13 fw	CAACGAGTTCGTCGTCTTGG
1891	<i>RCAR13</i>	RT RCAR13 rev	CGACCGTATCCACAAACATCC
1892	<i>RCAR14</i>	RT RCAR14 fw	TTACACGGTGGTTCTTGAATCTTA
1893	<i>RCAR14</i>	RT RCAR14 rev	TCCACAAACATTTTAGTGTCTTCC
3414	<i>RD22</i>	RD22_qP1_f	ACGGGTAAACCCGGTAAAAG
3415	<i>RD22</i>	RD22_qP1_r	AAGGGTTTGCTCCTGGTTTC
3416	<i>RD29B</i>	RD29B_qP2_f	ACTGATCCCACGCATAAAGG
3417	<i>RD29B</i>	RD29B_qP2_r	GTCTTCTTCGCGTCCTTGTC
3418	<i>SnRK2.3</i>	Snrk23_qp1_f	CCAAAGTCAACTGTTGGTACTCC
3419	<i>SnRK2.3</i>	Snrk23_qp1_r	GTCACACCACATGACCATACATC
3410	<i>TIP41L</i>	TIP41L_01_fw	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA
3411	<i>TIP41L</i>	TIP41L_01_rev	TCAACTGGATACCCTTTTCGCA
2582	<i>UBC9</i>	UBC9_01_fw	TCACAATTTCCAAGGTGCTGC
2583	<i>UBC9</i>	UBC9_01_rev	TCATCTGGGTTTGGATCCGT
3412	<i>UBI10</i>	UBI10_01_fw	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG
3413	<i>UBI10</i>	UBI10_01_rev	AAAGAGATAACAGGAACGGAACATAGT

5.3 Verwendete Plasmide

Tabelle 14: *E. coli*-Glycerinkulturen mit den Plasmiden für die Interaktionsanalyse im Y2H. Die Zahl (#) gibt jeweils die Position in der Stammsammlung an.

#	Stamm	Plasmid	Resistenz
1864	DH5α	<i>pGAD_empty</i>	Amp
3594	XL1blue	<i>pGAD_ABF1</i>	Amp
5228	DH5α	<i>pGAD_ABF2</i>	Amp
5235	DH5α	<i>pGAD_ABF3</i>	Amp
5234	DH5α	<i>pGAD_ABF4</i>	Amp
3590	XL1blue	<i>pGAD_ABI5</i>	Amp
4583	DH5α	<i>pGAD_AHR11</i>	Amp
7424	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dEAR1</i>	Amp
7426	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dEAR2</i>	Amp
7436	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dEAR1_dEAR2</i>	Amp
7734	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dRD1</i>	Amp
8097	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dRD2</i>	Amp
7568	DH5α	<i>pGAD_AHR11_dCR</i>	Amp
7794	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dEAR1_dCR</i>	Amp
7795	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dEAR2_dCR</i>	Amp
7733	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_dEAR1/EAR2_dCR</i>	Amp
7730	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_1_212aa</i>	Amp
4555	DH5α	<i>pGAD_AHR11_1_247aa</i>	Amp
7605	DH5α	<i>pGAD_AHR11_1_313aa</i>	Amp
7809	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_1_554aa</i>	Amp
8349	DH5α	<i>pGAD_AHR11_1_673aa</i>	Amp
7606	DH5α	<i>pGAD_AHR11_213_313aa</i>	Amp
7811	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_213_554aa</i>	Amp
8244	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_213_680aa</i>	Amp
8243	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_213_804aa</i>	Amp
8242	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_213_1000aa</i>	Amp
7607	DH5α	<i>pGAD_AHR11_213_1168aa</i>	Amp
7732	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_248_1168aa</i>	Amp
7731	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_314_1168aa</i>	Amp
8245	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_555_804aa</i>	Amp
8371	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_555_1000aa</i>	Amp
8246	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_555_1168aa</i>	Amp
8370	DH5α	<i>pGAD_AHR11_681_1168aa</i>	Amp
8247	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_805_1168aa</i>	Amp
8422	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_N238A</i>	Amp
8098	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_W239A</i>	Amp
7797	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_D240A</i>	Amp
8101	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_L241A</i>	Amp
7798	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_N242A</i>	Amp
8099	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_T243A</i>	Amp
8100	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_T244A</i>	Amp

7796	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_M245C</i>	Amp
7799	XL1blue	<i>pGAD_AHR11_M245L</i>	Amp
7553	XL1blue	<i>pGAD_JAM1</i>	Amp
7399	XL1blue	<i>pGAD_JAM2</i>	Amp
7551	XL1blue	<i>pGAD_JAM3</i>	Amp
7555	XL1blue	<i>pGAD_MYC2</i>	Amp
3218	DH5 α	<i>pBRIDGE_empty</i>	Amp
7554	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM1</i>	Amp
7400	DH5 α	<i>pBRIDGE_JAM2</i>	Amp
7552	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM3</i>	Amp
7556	XL1blue	<i>pBRIDGE_MYC2</i>	Amp
7722	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM2_1_372aa</i>	Amp
7812	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM2_1_429aa</i>	Amp
8368	DH5 α	<i>pBRIDGE_JAM2_145_429aa</i>	Amp
8369	DH5 α	<i>pBRIDGE_JAM2_145_590aa</i>	Amp
7814	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM2_296_429aa</i>	Amp
7813	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM2_296_590aa</i>	Amp
7723	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM2_373_590aa</i>	Amp
8423	XL1blue	<i>pBRIDGE_JAM2_dQRR</i>	Amp
2166	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR1</i>	Amp
3968	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR2</i>	Amp
2163	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR3</i>	Amp
3844	XL1blue	<i>pBRIDGE_RCAR4</i>	Amp
3976	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR5</i>	Amp
3076	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR6</i>	Amp
3962	XL1blue	<i>pBRIDGE_RCAR7</i>	Amp
3972	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR8</i>	Amp
3888	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR9</i>	Amp
3892	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR10</i>	Amp
3896	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR11</i>	Amp
3883	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR12</i>	Amp
3078	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR13</i>	Amp
3081	DH5 α	<i>pBRIDGE_RCAR14</i>	Amp
8320	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR1</i>	Amp
8353	DH5 α	<i>pBRIDGE_TPR1_1_288aa</i>	Amp
8354	DH5 α	<i>pBRIDGE_TPR1_37_288aa</i>	Amp
8355	DH5 α	<i>pBRIDGE_TPR1_37_1119aa</i>	Amp
8356	DH5 α	<i>pBRIDGE_TPR1_289_1119aa</i>	Amp
7564	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR2</i>	Amp
7727	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR2_1_288aa</i>	Amp
7728	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR2_37_288aa</i>	Amp
7818	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR2_37_1131aa</i>	Amp
7729	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR2_289_1131aa</i>	Amp
8176	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR3</i>	Amp
8358	DH5 α	<i>pBRIDGE_TPR3_1_288aa</i>	Amp
8359	DH5 α	<i>pBRIDGE_TPR3_37_288aa</i>	Amp

8360	DH5α	<i>pBRIDGE_TPR3_37_1108aa</i>	Amp
8361	DH5α	<i>pBRIDGE_TPR3_289_1108aa</i>	Amp
8319	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPR4</i>	Amp
8363	DH5α	<i>pBRIDGE_TPR4_1_288aa</i>	Amp
8364	DH5α	<i>pBRIDGE_TPR4_37_288aa</i>	Amp
8365	DH5α	<i>pBRIDGE_TPR4_37_1137aa</i>	Amp
8366	DH5α	<i>pBRIDGE_TPR4_289_1137aa</i>	Amp
7468	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPL</i>	Amp
7724	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPL_1_288aa</i>	Amp
7725	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPL_37_288aa</i>	Amp
7859	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPL_37_1131aa</i>	Amp
7726	XL1blue	<i>pBRIDGE_TPL_289_1131aa</i>	Amp

Tabelle 15: *E. coli*-Glycerinkulturen mit den Plasmiden für die transiente Transformation in Protoplasten. Die Zahl (#) gibt jeweils die Position in der Stammsammlung an.

#	Stamm	Plasmid	Resistenz
9033	XL1blue	<i>pABF3::ABF3</i>	Amp
9034	XL1blue	<i>pABF3::LUC</i>	Amp
8923	XL1blue	<i>pABI5::LUC</i>	Amp
8921	XL1blue	<i>pAHG1::LUC</i>	Amp
4893	XL1blue	<i>p8xABRE::LUC</i>	Amp
9025	XL1blue	<i>pCYP707A1::LUC</i>	Amp
7847	XL1blue	<i>pGAL4_UAS::LUC</i>	Amp
8920	XL1blue	<i>pRCAR13::LUC</i>	Amp
3041	DH5α	<i>pRD29B::LUC</i>	Amp
883	DH5α	<i>p35S::GUS</i>	Amp
6570	DH5α	<i>pTAT1::LUC</i>	Amp
8331	XL1blue	<i>pTAT1mGbox::LUC</i>	Amp
7641	XL1blue	<i>p35S::MCS</i>	Amp
8459	XL1blue	<i>p35S::ABF2</i>	Amp
8460	XL1blue	<i>p35S::ABF4</i>	Amp
8528	XL1blue	<i>p35S::ABF3</i>	Amp
7820	XL1blue	<i>p35S::AHR11</i>	Amp
8535	XL1blue	<i>p35S::JAM1</i>	Amp
7821	XL1blue	<i>p35S::JAM2</i>	Amp
8930	XL1blue	<i>p35S::JAM2-dBR</i>	Amp
8821	XL1blue	<i>p35S::GFP-JAM2</i>	Amp
8822	XL1blue	<i>p35S::JAM2-GFP</i>	Amp
8536	XL1blue	<i>p35S::JAM3</i>	Amp
8534	XL1blue	<i>p35S::MYC2</i>	Amp
8342	DH5α	<i>p35S::TPR1</i>	Amp
7822	XL1blue	<i>p35S::TPR2</i>	Amp
8343	DH5α	<i>p35S::TPR3</i>	Amp
8344	DH5α	<i>p35S::TPR4</i>	Amp
7819	XL1blue	<i>p35S::TPL</i>	Amp
8254	XL1blue	<i>p35S::MCS-VP16</i>	Amp

Anhang

8339	DH5α	<i>p35S::AHR11-VP16</i>	Amp
8309	XL1blue	<i>p35S::JAM1-VP16</i>	Amp
8308	XL1blue	<i>p35S::JAM2-VP16</i>	Amp
8931	XL1blue	<i>p35S::JAM2-dBR-VP16</i>	Amp
8539	XL1blue	<i>p35S::JAM3-VP16</i>	Amp
7266	DH5α	<i>p35S::NINJA-VP16</i>	Amp
7267	DH5α	<i>p35S::TPL-VP16</i>	Amp
8446	XL1blue	<i>p35S::N-TPL-VP16</i>	Amp
8255	XL1blue	<i>p35S::GAL4BD-MCS</i>	Amp
8447	XL1blue	<i>p35S::GAL4BD-ABF1</i>	Amp
8394	DH5α	<i>p35S::GAL4BD-ABF2</i>	Amp
8395	DH5α	<i>p35S::GAL4BD-ABF3</i>	Amp
8396	DH5α	<i>p35S::GAL4BD-ABF4</i>	Amp
8858	XL1blue	<i>p35S::GAL4BD-ABI5</i>	Amp
7263	DH5α	<i>p35S::GAL4BD-AHR11</i>	Amp
8537	XL1blue	<i>p35S::GAL4BD-JAM1</i>	Amp
7860	XL1blue	<i>p35S::GAL4BD-JAM2</i>	Amp
8538	XL1blue	<i>p35S::GAL4BD-JAM3</i>	Amp
7265	DH5α	<i>p35S::GAL4BD-NINJA</i>	Amp
8338	DH5α	<i>p35S::GAL4BD-TPL</i>	Amp

6 Literaturverzeichnis

- Abe, H.; Urao, T.; Ito, T.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003):** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. In: *The Plant Cell* 15 (1), S. 63–78.
- 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. In: *The Plant Cell* 9 (10), S. 1859–1868.
- Abel, S.; Theologis, A. (1994):** Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. In: *The Plant Journal* 5 (3), S. 421–427.
- Ache, P.; Becker, D.; Ivashikina, N.; Dietrich, P.; Roelfsema, M. R. G.; Hedrich, R. (2000):** GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. In: *FEBS Letters* 486 (2), S. 93–98.
- Adie, B. A. T.; Pérez-Pérez, J.; Pérez-Pérez, M. M.; Godoy, M.; Sánchez-Serrano, J.-J.; Schmelz, E. A.; Solano, R. (2007):** ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 19 (5), S. 1665–1681.
- Aguilar, X.; Blomberg, J.; Brännström, K.; Olofsson, A.; Schleucher, J.; Björklund, S. (2014):** Interaction studies of the human and *Arabidopsis thaliana* Med25-ACID proteins with the herpes simplex virus VP16- and plant-specific Dreb2a transcription factors. In: *PLOS ONE* 9 (5), e98575.
- Aleman, F.; Yazaki, J.; Lee, M.; Takahashi, Y.; Kim, A. Y.; Li, Z.; Kinoshita, T.; Ecker, J. R.; Schroeder, J. I. (2016):** An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 transcription factor: a putative link of ABA and JA signaling. In: *Scientific Reports* 6, Nr. 28941.
- Anderson, J. P.; Badruzsaufari, E.; Schenk, P. M.; Manners, J. M.; Desmond, O. J.; Ehlert, C.; Maclean, D. J.; Ebert, P. R.; Kazan, K. (2004):** Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 16 (12), S. 3460–3479.
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011):** Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. In: *Science* 333 (6042), S. 601–607.
- Arae, T.; Morita, K.; Imahori, R.; Suzuki, Y.; Yasuda, S.; Sato, T.; Yamaguchi, J.; Chiba, Y. (2019):** Identification of Arabidopsis CCR4-NOT complexes with Pumilio RNA binding proteins, APUM5 and APUM2. In: *Plant & Cell Physiology*.
- Atchley, W.; Terhalle, W.; Dress, A. (1999):** Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. In: *Journal of Molecular Evolution* 48 (5), S. 501–516.
- Atchley, W. R.; Fitch, W. M. (1997):** A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (10), S. 5172–5176.
- Bäckström, S.; Elfving, N.; Nilsson, R.; Wingsle, G.; Björklund, S. (2007):** Purification of a plant mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit. In: *Molecular Cell* 26 (5), S. 717–729.
- Bailey, P. C.; Martin, C.; Toledo-Ortiz, G.; Quail, P. H.; Huq, E.; Heim, M. A.; Jakoby, M.; Werber, M.; Weisshaar, B. (2003):** Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Cell* 15 (11), S. 2497–2502.
- Barrero, J. M.; Piqueras, P.; González-Guzmán, M.; Serrano, R.; Rodríguez, P. L.; Ponce, M. R.; Micol, J. L. (2005):** A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the

involvement of ABA in vegetative development. In: *Journal of Experimental Botany* 56 (418), S. 2071–2083.

Barrero, J. M.; Rodríguez, P. L.; Quesada, V.; Piqueras, P.; Ponce, M. R.; Micol, J. L. (2006): Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABA1* in response to salt stress. In: *Plant, Cell & Environment* 29 (10), S. 2000–2008.

Bartel, P. L.; Chien, C.-T.; Sternglanz, R.; Fields, S. (1993): Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: D. A. Hartley (Hg.): *Cellular interaction in development: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, S. 153–179.

Bassel, G. W.; Fung, P.; Chow, T.-f. Freeman; Foong, J. A.; Provar, N. J.; Cutler, S. R. (2008): Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. In: *Plant Physiology* 147 (1), S. 143–155.

Bayer, E. M.; Bottrill, A. R.; Walshaw, J.; Vigouroux, M.; Naldrett, M. J.; Thomas, C. L.; Maule, A. J. (2006): Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. In: *Proteomics* 6 (1), S. 301–311.

Becker, D.; Hoth, S.; Ache, P.; Wenkel, S.; Roelfsema, M.R.G.; Meyerhoff, O.; Hartung, W.; Hedrich, R. (2003): Regulation of the ABA-sensitive *Arabidopsis* potassium channel gene *GORK* in response to water stress. In: *FEBS Letters* 554 (1-2), S. 119–126.

Belhaj, K.; Chaparro-Garcia, A.; Kamoun, S.; Patron, N. J.; Nekrasov, V. (2015): Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. In: *Current Opinion in Biotechnology* 32, S. 76–84.

Belin, C.; Franco, P.-O. de; Bourbousse, C.; Chaignepain, S.; Schmitter, J.-M.; Vavasseur, A.; Giraudat, J.; Barbier-Brygoo, H.; Thomine, S. (2006): Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. In: *Plant Physiology* 141 (4), S. 1316–1327.

Belknap, W. R.; Garbarino, J. E. (1996): The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. In: *Trends in Plant Science* 1 (10), S. 331–335.

Bell, E.; Mullet, J. E. (1993): Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. In: *Plant Physiology* 103, S. 1133–1137.

Benfey, P. N.; Chua, N.-H. (1990): The Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. In: *Science* 250 (4983), S. 959–966.

Bennet-Clark; T. A.; Kefford, N. P. (1953): Chromatography of the growth substances in plant extracts. In: *Nature* 171 (4354), S. 645–647.

Berger, S.; Bell, E.; Saka, A.; Mullet, J. E. (1995): *Arabidopsis thaliana Atvsp* is homologous to soybean *VspA* and *VspB*, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. In: *Plant Molecular Biology* 27 (5), S. 933–942.

Bewley, J. D. (1997): Seed Germination and Dormancy. In: *The Plant Cell* 9 (7), S. 1055–1066.

Bies-Ethève, N.; Gaubier-Comella, P.; Debures, A.; Lasserre, E.; Jobet, E.; Raynal, M.; Cooke, R.; Delseny, M. (2008): Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Molecular Biology* 67 (1-2), S. 107–124.

Block, A.; Dangl, J. L.; Hahlbrock, K.; Schulze-Lefert, P. (1990): Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of cis elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (14), S. 5387–5391.

Bodenhausen, N.; Reymond, P. (2007): Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in *Arabidopsis*. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (11), S. 1406–1420.

- Borg, M.; Rutley, N.; Kagale, S.; Hamamura, Y.; Gherghinoiu, M.; Kumar, S.; Sari, U.; Esparza-Franco, M. A.; Sakamoto, W.; Rozwadowski, K.; Higashiyama, T.; Twell, D. (2014):** An EAR-dependent regulatory module promotes male germ cell division and sperm fertility in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 26 (5), S. 2098–2113.
- Boudsocq, M.; Droillard, M.-J.; Barbier-Brygoo, H.; Laurière, C. (2007):** Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. In: *Plant Molecular Biology* 63 (4), S. 491–503.
- Boursiac, Y.; Léran, S.; Corratgé-Faillie, C.; Gojon, A.; Krouk, G.; Lacombe, B. (2013):** ABA transport and transporters. In: *Trends in Plant Science* 18 (6), S. 325–333.
- Bou-Torrent, J.; Salla-Martret, M.; Brandt, R.; Musielak, T.; Palauqui, J.-C.; Martínez-García, J. F.; Wenkel, S. (2012):** ATHB4 and HAT3, two class II HD-ZIP transcription factors, control leaf development in *Arabidopsis*. In: *Plant Signaling & Behavior* 7 (11), S. 1382–1387.
- Bram, R. J.; Lue, N. F.; Kornberg, R. D. (1986):** A *GAL* family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription. In: *The EMBO Journal* 5 (3), S. 603–608.
- Brandt, R.; Salla-Martret, M.; Bou-Torrent, J.; Musielak, T.; Stahl, M.; Lanz, C.; Ott, F.; Schmid, M.; Greb, T.; Schwarz, M.; Choi, S.-B.; Barton, M. K.; Reinhart, B. J.; Liu, T.; Quint, M.; Palauqui, J.-C.; Martínez-García, J. F.; Wenkel, S. (2012):** Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf patterning and light-mediated growth responses. In: *The Plant Journal* 72 (1), S. 31–42.
- Brocard, I. M.; Lynch, T. J.; Finkelstein, R. R. (2002):** Regulation and role of the *Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response. In: *Plant Physiology* 129 (4), S. 1533–1543.
- Bromley, J. R.; Busse-Wicher, M.; Tryfona, T.; Mortimer, J. C.; Zhang, Z.; Brown, D. M.; Dupree, P. (2013):** GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. In: *The Plant Journal* 74 (3), S. 423–434.
- Busk, P. K.; Pagès, M. (1998):** Regulation of abscisic acid-induced transcription. In: *Plant Molecular Biology* 37 (3), S. 425–435.
- Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. (2009):** The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. In: *Nucleic Acids Research* 37 (Database Issue), S. 233–238.
- Carabelli, M.; Sessa, G.; Baima, S.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1993):** The *Arabidopsis Athb-2* and *-4* genes are strongly induced by far-red-rich light. In: *The Plant Journal* 4 (3), S. 469–479.
- Carles, C.; Bies-Etheve, N.; Aspart, L.; Léon-Kloosterziel, K. M.; Koornneef, M.; Echeverria, M.; Delseny, M. (2002):** Regulation of *Arabidopsis thaliana Em* genes: role of ABI5. In: *The Plant Journal* 30 (3), S. 373–383.
- Carretero-Paulet, L.; Galstyan, A.; Roig-Villanova, I.; Martínez-García, J. F.; Bilbao-Castro, J. R.; Robertson, D. L. (2010):** Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. In: *Plant Physiology* 153 (3), S. 1398–1412.
- Carter, C.; Graham, R. A.; Thornburg, R. A. (1998):** *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. In: *Plant Molecular Biology* 38 (6), S. 929–943.
- Casal, J. J. (2012):** Shade avoidance. In: *The Arabidopsis Book* 10, e0157.
- Causier, B.; Ashworth, M.; Guo, W.; Davies, B. (2012a):** The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 158 (1), S. 423–438.

Causier, B.; Lloyd, J.; Stevens, L.; Davies, B. (2012b): TOPLESS co-repressor interactions and their evolutionary conservation in plants. In: *Plant Signaling & Behavior* 7 (3), S. 325–328.

Çevik, V.; Kidd, B. N.; Zhang, P.; Hill, C.; Kiddle, S.; Denby, K. J.; Holub, E. B.; Cahill, D. M.; Manners, J. M.; Schenk, P. M.; Beynon, J.; Kazan, K. (2012): MEDIATOR25 acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 160 (1), S. 541–555.

Chang, C.-Y.; Norris, J. D.; Grøn, H.; Paige, L. A.; Hamilton, P. T.; Kenan, D. J.; Fowlkes, D.; McDonnell, D. P. (1999): Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors α and β . In: *Molecular and Cellular Biology* 19 (12), S. 8226–8239.

Chen, R.; Jiang, H.; Li, L.; Zhai, Q.; Qi, L.; Zhou, W.; Liu, X.; Li, H.; Zheng, W.; Sun, J.; Li, C. (2012): The Arabidopsis mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. In: *The Plant Cell* 24 (7), S. 2898–2916.

Chen, Y.-T.; Liu, H.; Stone, S.; Callis, J. (2013): ABA and the ubiquitin E3 ligase KEEP ON GOING affect proteolysis of the Arabidopsis thaliana transcription factors ABF1 and ABF3. In: *The Plant Journal* 75 (6), S. 965–976.

Chen, Z.; Zheng, Z.; Huang, J.; Lai, Z.; Fan, B. (2009): Biosynthesis of salicylic acid in plants. In: *Plant Signaling & Behavior* 4 (6), S. 493–496.

Cheng, C.-Y.; Krishnakumar, V.; Chan, A.; Schobel, S.; Town, C. D. (2017): Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. In: *The Plant Journal* 89 (4), S. 789–804.

Cheng, Y.; Dai, X.; Zhao, Y. (2006): Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. In: *Genes & Development* 20 (13), S. 1790–1799.

Chini, A.; Fonseca, S.; Chico, J. M.; Fernández-Calvo, P.; Solano, R. (2009): The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. In: *The Plant Journal* 59 (1), S. 77–87.

Chini, A.; Fonseca, S.; Fernández, G.; Adie, B.; Chico, J. M.; Lorenzo, O.; García-Casado, G.; López-Vidriero, I.; Lozano, F. M.; Ponce, M. R.; Micol, J. L.; Solano, R. (2007): The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. In: *Nature* 448 (7154), S. 666–671.

Chini, A.; Gimenez-Ibanez, S.; Goossens, A.; Solano, R. (2016): Redundancy and specificity in jasmonate signalling. In: *Current Opinion in Plant Biology* 33, S. 147–156.

Choi, H.-i.; Hong, J.-h.; Ha, J.-o.; Kang, J.-y.; Kim, S. Young (2000): ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (3), S. 1723–1730.

Christmann, A.; Hoffmann, T.; Teplova, I.; Grill, E.; Müller, A. (2005): Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 137 (1), S. 209–219.

Christmann, A.; Moes, D.; Himmelbach, A.; Yang, Y.; Tang, Y.; Grill, E. (2006): Integration of abscisic acid signalling into plant responses. In: *Plant Biology* 8 (3), S. 314–325.

Christmann, A.; Weiler, E. W.; Steudle, E.; Grill, E. (2007): A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. In: *The Plant Journal* 52 (1), S. 167–174.

Ciarapica, R.; Rosati, J.; Cesareni, G.; Nasi, S. (2003): Molecular recognition in helix-loop-helix and helix-loop-helix-leucine zipper domains. Design of repertoires and selection of high affinity ligands for natural proteins. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (14), S. 12182–12190.

- Claeys, H.; van Landeghem, S.; Dubois, M.; Maleux, K.; Inzé, D. (2014):** What is stress? Dose-response effects in commonly used in vitro stress assays. In: *Plant Physiology* 165 (2), S. 519–527.
- Clough, S. J.; Bent, A. F. (1998):** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 16 (6), S. 735–743.
- Cochrane, F. C.; Davin, L. B.; Lewis, N. G. (2004):** The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. In: *Phytochemistry* 65 (11), S. 1557–1564.
- Collins, J.; O'Grady, K.; Chen, S.; Gurley, W. (2019):** The C-terminal WD40 repeats on the TOPLESS co-repressor function as a protein-protein interaction surface. In: *Plant Molecular Biology* 100 (1-2), S. 47–58.
- Cornforth, J. W.; Milborrow, B. V.; Ryback, G. (1965a):** Synthesis of (\pm)-Abscisin II. In: *Nature* 206 (4985), S. 715.
- Cornforth, J. W.; Milborrow, B. V.; Ryback, G.; Wareing, P. F. (1965b):** Chemistry and physiology of "dormins" in sycamore. Identity of sycamore "dormin" with abscisic acid. In: *Nature* 205, S. 1269–1270.
- Cracker, L. E.; Abeles, F. B. (1969):** Abscission: role of abscisic acid. In: *Plant Physiology* 44 (8), S. 1144–1149.
- Cui, Y.; Mao, R.; Chen, J.; Guo, Z. (2019):** Regulation mechanism of MYC family transcription factors in jasmonic acid signalling pathway on taxol biosynthesis. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8), Nr. 1843.
- Cutler, A. J.; Krochko, J. E. (1999):** Formation and breakdown of ABA. In: *Trends in Plant Science* 4 (12), S. 472–478.
- Cutler, S. R.; Rodriguez, P. L.; Finkelstein, R. R.; Abrams, S. R. (2010):** Abscisic acid: emergence of a core signaling network. In: *Annual Review of Plant Biology* 61, S. 651–679.
- Czap, G. U. M. (2015):** Die Proteinkinase CPK23, Ökotyp-spezifische Unterschiede und Funktion in der Abscisinsäure-Signaltransduktion. Dissertation. Technische Universität München, Freising. Botanik.
- Dang, C. V.; Dolde, C.; Gillison, M. L.; Kato, G. J. (1992):** Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (2), S. 599–602.
- Davuluri, R. V.; Sun, H.; Palaniswamy, S. K.; Matthews, Nicole; Molina, Carlos; Kurtz, M.; Grote-wold, E. (2003):** AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. In: *BMC Bioinformatics* 4, Nr. 25.
- Delessert, C.; Wilson, I. W.; Straeten, D. Van Der; Dennis, E. S.; Dolferus, R. (2004):** Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. In: *Plant Molecular Biology* 55 (2), S. 165–181.
- Devlin, P. F.; Yanovsky, M. J.; Kay, S. A. (2003):** A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 133 (4), S. 1617–1629.
- Dietrich, D.; Pang, L.; Kobayashi, A.; Fozard, J. A.; Boudolf, V.; Bhosale, R.; Antoni, R.; Nguyen, T.; Hiratsuka, S.; Fujii, N.; Miyazawa, Y.; Bae, T.-W.; Wells, D. M.; Owen, M. R.; Band, L. R.; Dyson, R. J.; Jensen, O. E.; King, J. R.; Tracy, S. R.; Sturrock, C. J.; Mooney, S. J.; Roberts, J. A.; Bhalerao, R. P.; Dinneny, J. R.; Rodriguez, P. L.; Nagatani, A.; Hosokawa, Y.; Baskin, T. I.; Pridmore, T. P.; Veylder, L. de; Takahashi, H.; Bennett, M. J. (2017):** Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. In: *Nature Plants* 3, Nr. 17057.
- Donald, R. G. K.; Cashmore, A. R. (1990):** Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. In: *The EMBO Journal* 9 (6), S. 1717–1726.

- Duek, P. D.; Fankhauser, C. (2005):** bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. In: *Trends in Plant Science* 10 (2), S. 51–54.
- Durand, A. N.; Pauwels, L.; Goossens, A. (2016):** The ubiquitin system and jasmonate signaling. In: *Plants* 5 (1), Nr. 6.
- Eagles, C. F.; Wareing, P. F. (1963):** Dormancy regulators in woody plants. Experimental induction of dormancy in *Betula pubescens*. In: *Nature* 199 (4595), S. 874–875.
- Eagles, C. F.; Wareing, P. F. (1964):** The role of growth substances in the regulation of bud dormancy. In: *Physiologia Plantarum* 17, S. 697–709.
- Ei-Antably, H. M. M.; Wareing, P. F.; Hillman, J. (1967):** Some physiological responses to d, l abscisic (dormin). In: *Planta* 73 (1), S. 74–90.
- Ellenberger, T.; Fass, D.; Arnaud, M.; Harrison, S. C. (1994):** Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. In: *Genes & Development* 8 (8), S. 970–980.
- Endo, H.; Yamaguchi, M.; Tamura, T.; Nakano, Y.; Nishikubo, N.; Yoneda, A.; Kato, K.; Kubo, M.; Kajita, S.; Katayama, Y.; Ohtani, M.; Demura, T. (2015):** Multiple classes of transcription factors regulate the expression of *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7*, a master switch of xylem vessel differentiation. In: *Plant & Cell Physiology* 56 (2), S. 242–254.
- Evans, L. T. (1966):** Abscisic II: inhibitory effect on flower induction in a long-day plant. In: *Science* 151 (3706), S. 107–108.
- Felsenstein, J. (1985):** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. In: *Evolution* 39 (4), S. 783–791.
- Feng, C.-Z.; Chen, Y.; Wang, C.; Kong, Y.-H.; Wu, W.-H.; Chen, Y.-F. (2014):** Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of *ABI3*, *ABI4*, and *ABI5* during seed germination and early seedling development. In: *The Plant Journal* 80 (4), S. 654–668.
- Fernández-Calvo, P.; Chini, A.; Fernández-Barbero, G.; Chico, J.-M.; Gimenez-Ibanez, S.; Geerinck, J.; Eeckhout, D.; Schweizer, F.; Godoy, M.; Franco-Zorrilla, J. M.; Pauwels, L.; Witters, E.; Puga, M. I.; Paz-Ares, J.; Goossens, A.; Reymond, P.; Jaeger, G. de; Solano, R. (2011):** The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. In: *The Plant Cell* 23 (2), S. 701–715.
- Ferrari, S.; Galletti, R.; Vairo, D.; Cervone, F.; Lorenzo, G. de (2006):** Antisense expression of the *Arabidopsis thaliana* *AtPGIP1* gene reduces polygalacturonase-inhibiting protein accumulation and enhances susceptibility to *Botrytis cinerea*. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (8), S. 931–936.
- Ferrari, S.; Vairo, D.; Ausubel, F. M.; Cervone, F.; Lorenzo, G. de (2003):** Tandemly duplicated Arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. In: *The Plant Cell* 15 (1), S. 93–106.
- Ferré-D´Amaré, A.; Pognonec, P.; Roeder, R. G.; Burley, S. K. (1994):** Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. In: *The EMBO Journal* 13 (1), S. 180–189.
- Ferré-D´Amaré, A.; Prendergast, G. C.; Ziff, E. B.; Burley, S. K. (1993):** Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. In: *Nature* 363 (6424), S. 38–45.
- Finch-Savage, W. E.; Leubner-Metzger, G. (2006):** Seed dormancy and the control of germination. In: *New Phytologist* 171 (3), S. 501–523.
- Finkelstein, R. (2013):** Abscisic acid synthesis and response. In: *The Arabidopsis Book* 11, e0166.

- Finkelstein, R.; Gampala, S. S. L.; Lynch, T. J.; Thomas, T. L.; Rock, C. D. (2005):** Redundant and distinct functions of the ABA response loci *ABA-INSENSITIVE(ABI)5* and *ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3*. In: *Plant Molecular Biology* 59 (2), S. 253–267.
- Finkelstein, R. R.; Lynch, T. J. (2000):** The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. In: *The Plant Cell* 12 (4), S. 599–609.
- Finkelstein, R. R.; Rock, C. D. (2002):** Abscisic acid biosynthesis and response. In: *The Arabidopsis Book* 1, e0058.
- Fisher, A.; Caudy, M. (1998):** The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. In: *BioEssays* 20 (4), S. 298–306.
- Fisher, F.; Goding, C. R. (1992):** Single amino acid substitutions alter helix-loop-helix protein specificity for bases flanking the core CANNTG motif. In: *The EMBO Journal* 11 (11), S. 4103–4109.
- Fonseca, S.; Chini, A.; Hamberg, M.; Adie, B.; Porzel, A.; Kramell, R.; Miersch, O.; Wasternack, C.; Solano, R. (2009):** (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-iso-leucine is the endogenous bioactive jasmonate. In: *Nature Chemical Biology* 5 (5), S. 344–350.
- Fonseca, S.; Fernández-Calvo, P.; Fernández, G. M.; Díez-Díaz, M.; Gimenez-Ibanez, S.; López-Vidriero, I.; Godoy, M.; Fernández-Barbero, G.; van Leene, J.; Jaeger, G. de; Franco-Zorrilla, J. M.; Solano, R. (2014):** bHLH003, bHLH013 and bHLH017 are new targets of JAZ repressors negatively regulating JA responses. In: *PLOS ONE* 9 (1), e86182.
- Franklin, K. A. (2008):** Shade avoidance. In: *New Phytologist* 179 (4), S. 930–944.
- Fraser, C. M.; Chapple, C. (2011):** The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. In: *The Arabidopsis Book* 9, e0152.
- Fu, J.; Wu, H.; Ma, S.; Xiang, D.; Liu, R.; Xiong, L. (2017):** OsJAZ1 attenuates drought resistance by regulating JA and ABA signaling in rice. In: *Frontiers in Plant Science* 8, Nr. 2108.
- Fuchs, S.; Grill, E.; Meskiene, I.; Schweighofer, A. (2013):** Type 2C protein phosphatases in plants. In: *The FEBS Journal* 280 (2), S. 681–693.
- Fuchs, S.; Tischer, S. V.; Wunschel, C.; Christmann, A.; Grill, E. (2014):** Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (15), S. 5741–5746.
- Fujii, H.; Chinnusamy, V.; Rodrigues, A.; Rubio, S.; Antoni, R.; Park, S.-Y.; Cutler, S. R.; Sheen, J.; Rodriguez, P. L.; Zhu, J.-K. (2009):** *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. In: *Nature* 462 (7273), S. 660–664.
- Fujii, H.; Verslues, P. E.; Zhu, J.-K. (2007):** Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 19 (2), S. 485–494.
- Fujii, H.; Zhu, J.-K. (2009):** Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20), S. 8380–8385.
- Fujii, Y.; Shimizu, T.; Toda, T.; Mitsuhiro, Y.; Hakoshima, T. (2000):** Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZip transcription factors. In: *Nature Structural Biology* 7 (10), S. 889–893.
- Fujita, M.; Fujita, Y.; Maruyama, K.; Seki, M.; Hiratsu, K.; Ohme-Takagi, M.; Tran, L.-S. P.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (2004):** A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. In: *The Plant Journal* 39 (6), S. 863–876.
- Fujita, Y.; Fujita, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011):** ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. In: *Journal of Plant Research* 124 (4), S. 509–525.

- 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*. In: *Plant & Cell Physiology* 50 (12), S. 2123–2132.
- Fukazawa, J.; Teramura, H.; Murakoshi, S.; Nasuno, K.; Nishida, N.; Ito, T.; Yoshida, M.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S.; Takahashi, Y. (2014):** DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 26 (7), S. 2920–2938.
- Galletti, R.; Ferrari, S.; Lorenzo, G. de (2011):** *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. In: *Plant Physiology* 157 (2), S. 804–814.
- Garcia, M. E.; Lynch, T.; Peeters, J.; Snowden, C.; Finkelstein, R. (2008):** A small plant-specific protein family of ABL five binding proteins (AFPs) regulates stress response in germinating *Arabidopsis* seeds and seedlings. In: *Plant Molecular Biology* 67 (6), S. 643–658.
- Gaudinier, A.; Zhang, L.; Reece-Hoyes, J. S.; Taylor-Teeples, M.; Pu, L.; Liu, Z.; Breton, G.; Pruneda-Paz, J. L.; Kim, D.; Kay, S. A.; Walhout, A. J. M.; Ware, D.; Brady, S. M. (2011):** Enhanced Y1H assays for *Arabidopsis*. In: *Nature Methods* 8 (12), S. 1053–1055.
- Geiger, D.; Scherzer, S.; Mumm, P.; Marten, I.; Ache, P.; Matschi, S.; Liese, A.; Wellmann, C.; Al-Rasheid, K. A. S.; Grill, E.; Romeis, T.; Hedrich, R. (2010):** Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17), S. 8023–8028.
- Geiger, D.; Scherzer, S.; Mumm, P.; Stange, A.; Marten, I.; Bauer, H.; Ache, P.; Matschi, S.; Liese, A.; Al-Rasheid, K. A. S.; Romeis, T.; Hedrich, R. (2009):** Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (50), S. 21425–21430.
- Gietz, D. R.; Woods, R. A. (2002):** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In: C. Guthrie (Hg.): *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*, Bd. 350. Amsterdam: Academic Press (Methods in Enzymology, 350), S. 87–96.
- Gietz, R. Daniel; Robbins, A.; Graham, K. C.; Triggs-Raine, B.; Woods, R. A. (1997):** Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system. In: G. N. Pierce und W. C. Claycomb (Hg.): *Novel methods in molecular and cellular biochemistry of muscle*. Boston, MA: Springer (Developments in Molecular and Cellular Biochemistry, 20), S. 67–79.
- Giniger, E.; Varnum, S. M.; Ptashne, M. (1985):** Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. In: *Cell* 40 (4), S. 767–774.
- Giuliano, G.; Pichersky, E.; Malik, V. S.; Timko, M. P.; Scolnik, P. A.; Cashmore, A. R. (1988):** An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (19), S. 7089–7093.
- Gómez-Porrás, J. L.; Riaño-Pachón, D. M.; Dreyer, I.; Mayer, J. E.; Mueller-Roeber, B. (2007):** Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in *Arabidopsis* and rice. In: *BMC Genomics* 8, Nr. 260.
- González-Guzmán, M.; Apostolova, N.; Bellés, J. M.; Barrero, J. M.; Piqueras, P.; Ponce, M. R.; Micol, J. L.; Serrano, R.; Rodríguez, P. L. (2002):** The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. In: *The Plant Cell* 14 (8), S. 1833–1846.
- Goossens, J.; Fernández-Calvo, P.; Schweizer, F.; Goossens, A. (2016):** Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses. In: *Plant Molecular Biology* 91 (6), S. 673–689.

- Goossens, J.; Mertens, J.; Goossens, A. (2017):** Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. In: *Journal of Experimental Botany* 68 (6), S. 1333–1347.
- Gordân, R.; Shen, N.; Dror, I.; Zhou, T.; Horton, J.; Rohs, R.; Bulyk, M. L. (2013):** Genomic regions flanking E-box binding sites influence DNA binding specificity of bHLH transcription factors through DNA shape. In: *Cell Reports* 3 (4), S. 1093–1104.
- Graeff, M.; Straub, D.; Eguen, T.; Dolde, U.; Rodrigues, V.; Brandt, R.; Wenkel, S. (2016):** Micro-Protein-mediated recruitment of CONSTANS into a TOPLESS trimeric complex represses flowering in *Arabidopsis*. In: *PLOS Genetics* 12 (3), e1005959.
- Guilfoyle, T.; Hagen, G.; Ulmasov, T.; Murfett, J. (1998):** How does auxin turn on genes? In: *Plant Physiology* 118 (2), S. 341–347.
- Guiltinan, M. J.; Marcotte, W. R.; Quatrano, R. S. (1990):** A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. In: *Science* 250 (4978), S. 267–270.
- Guo, A.; He, K.; Liu, D.; Bai, S.; Gu, X.; Wei, L.; Luo, J. (2005):** DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. In: *Bioinformatics* 21 (10), S. 2568–2569.
- Guo, B.; Irigoyen, S.; Fowler, T. B.; Verwaw, W. K. (2008):** Differential expression and phylogenetic analysis suggest specialization of plastid-localized members of the PHT4 phosphate transporter family for photosynthetic and heterotrophic tissues. In: *Plant Signaling & Behavior* 3 (10), S. 784–790.
- Gusta, L. V.; Trischuk, R.; Weiser, C. J. (2005):** Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. In: *Journal of Plant Growth Regulation* 24 (4), S. 308–318.
- Hardie, D. G. (1999):** Plant protein serine/threonin kinases: classification and functions. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, S. 97–131.
- Hartung, W. (2010):** The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. In: *Functional Plant Biology* 37 (9), S. 806–812.
- Hattori, T.; Totsuka, M.; Hobo, T.; Kagaya, Y.; Yamamoto-Toyoda, A. (2002):** Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. In: *Plant Cell Physiology* 43 (1), S. 136–140.
- He, Z.; Huang, T.; Ao, K.; Yan, X.; Huang, Y. (2017):** Sumoylation, phosphorylation, and acetylation fine-tune the turnover of plant immunity components mediated by ubiquitination. In: *Frontiers in Plant Science* 8, Nr. 1682.
- Hedrich, R.; Geiger, D. (2017):** Biology of SLAC1-type anion channels - from nutrient uptake to stomatal closure. In: *New Phytologist* 216 (1), S. 46–61.
- Heim, M. A.; Jakoby, M.; Werber, M.; Martin, C.; Weisshaar, B.; Bailey, P. C. (2003):** The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. In: *Molecular Biology and Evolution* 20 (5), S. 735–747.
- Hilhorst, H. W. M.; Karssen, C. M. (1992):** Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. In: *Plant Growth Regulation* 11 (3), S. 225–238.
- Himmelbach, A.; Hoffmann, T.; Leube, M.; Höhener, B.; Grill, E. (2002):** Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. In: *The EMBO Journal* 21 (12), S. 3029–3038.
- Himmelbach, A.; Iten, M.; Grill, E. (1998):** Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353 (1374), S. 1439–1444.

- Hoehenwarter, W.; Thomas, M.; Nukarinen, E.; Egelhofer, V.; Röhrig, H.; Weckwerth, W.; Conrath, U.; Beckers, G. J. M. (2013):** Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (2), S. 369–380.
- Holdsworth, M.; Kurup, S.; MKibbin, R. (1999):** Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. In: *Trends in Plant Science* 4 (7), S. 275–280.
- Hosy, E.; Vavasseur, A.; Mouline, K.; Dreyer, I.; Gaymard, F.; Porée, F.; Boucherez, J.; Lebaudy, A.; Bouchez, D.; Véry, A.-A.; Simonneau, T.; Thibaud, J.-B.; Sentenac, H. (2003):** The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9), S. 5549–5554.
- Hoth, S. (2002):** Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. In: *Journal of Cell Science* 115 (24), S. 4891–4900.
- Hsieh, W.-P.; Hsieh, H.-L.; Wu, S.-H. (2012):** *Arabidopsis* bZIP16 transcription factor integrates light and hormone signaling pathways to regulate early seedling development. In: *The Plant Cell* 24 (10), S. 3997–4011.
- Huang, C.-N.; Cornejo, M. J.; Bush, D. S.; Jones, R. L. (1986):** Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. In: *Protoplasma* 135 (2-3), S. 80–87.
- Huang, D.; Wu, W.; Abrams, S. R.; Cutler, A. J. (2008):** The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. In: *Journal of Experimental Botany* 59 (11), S. 2991–3007.
- Huang, H.; Gao, H.; Liu, B.; Fan, M.; Wang, J.; Wang, C.; Tian, H.; Wang, L.; Xie, C.; Wu, D.; Liu, L.; Yan, J.; Qi, T.; Song, S. (2018):** *bHLH13* regulates jasmonate-mediated defense responses and growth. In: *Evolutionary Bioinformatics* 14, 1-8.
- Huang, J. (2014):** Identification and characterization of a novel component involved in water deficit stress and abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Technische Universität München, Freising. Lehrstuhl für Botanik.
- Hundertmark, M.; Hinch, D. K. (2008):** LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *BMC Genomics* 9, Nr. 118.
- Ihnatowicz, A.; Pesaresi, P.; Varotto, C.; Richly, E.; Schneider, A.; Jahns, P.; Salamini, F.; Leister, D. (2004):** Mutants for photosystem I subunit D of *Arabidopsis thaliana*: effects on photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions. In: *The Plant Journal* 37 (6), S. 839–852.
- Iida, K.; Seki, M.; Sakurai, T.; Satou, M.; Akiyama, K.; Toyoda, T.; Konagaya, A.; Shinozaki, K. (2005):** RARTF: database and tools for complete sets of Arabidopsis transcription factors. In: *DNA Research* 12 (4), S. 247–256.
- Ikeda, M.; Mitsuda, N.; Ohme-Takagi, M. (2009):** *Arabidopsis* WUSCHEL is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning. In: *The Plant Cell* 21 (11), S. 3493–3505.
- Ikeda, M.; Ohme-Takagi, M. (2009):** A novel group of transcriptional repressors in Arabidopsis. In: *Plant & Cell Physiology* 50 (5), S. 970–975.
- Ingram, J.; Bartels, D. (1996):** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, S. 377–403.
- Iten, M.; Hoffmann, T.; Grill, E. (1999):** Receptors and signalling components of plant hormones. In: *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 19 (1-4), S. 41–58.

- Jaillais, Y.; Chory, J. (2010):** Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (6), S. 642–645.
- James, P.; Halladay, J.; Craig, E. A. (1996):** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. In: *Genetics* 144 (4), S. 1425–1436.
- Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A.; Bevan, M. W. (1987):** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. In: *The EMBO Journal* 6 (13), S. 3901–3907.
- Jia, T.; Ito, H.; Hu, X.; Tanaka, A. (2015):** Accumulation of the NON-YELLOW COLORING 1 protein of the chlorophyll cycle requires chlorophyll b in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 81 (4), S. 586–596.
- Jiang, Y.; Liang, G.; Yang, S.; Yu, D. (2014):** *Arabidopsis* WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence. In: *The Plant Cell* 26 (1), S. 230–245.
- Jones, A.; Xuan, Y.; Xu, M.; Wang, R.-S.; Ho, C.-H.; Lalonde, S.; You, C. H.; Sardi, M. I.; Parsa, S. A.; Smith-Valle, E.; Su, T.; Frazer, K. A.; Pilot, G.; Pratelli, R.; Grossmann, G.; Acharya, B. R.; Hu, H.-C.; Engineer, C.; Villiers, F.; Ju, C.; Takeda, K.; Su, Z.; Dong, Q.; Assmann, S. M.; Chen, J.; Kwak, J. M.; Schroeder, J. I.; Albert, R.; Rhee, S. Y.; Frommer, W. B. (2014):** Border control – a membrane-linked interactome of *Arabidopsis*. In: *Science* 344 (6185), S. 711–716.
- Jones, R. J.; Mansfield, T. A. (1970):** Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. In: *Journal of Experimental Botany* 21 (3), S. 714–719.
- Jones, S. (2004):** An overview of the basic helix-loop-helix proteins. In: *Genome Biology* 5 (6), Nr. 226.
- Ju, L.; Jing, Y.; Shi, P.; Liu, J.; Chen, J.; Yan, J.; Chu, J.; Chen, K.-M.; Sun, J. (2019):** JAZ proteins modulate seed germination through interaction with ABI5 in bread wheat and *Arabidopsis*. In: *New Phytologist* 223 (1), S. 246–260.
- Jung, C.; Seo, J. S.; Han, S. W.; Koo, Y. J.; Kim, C. H.; Song, S. I.; Nahm, B. H.; Choi, Y. D.; Cheong, J.-J. (2008):** Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 146 (2), S. 623–635.
- Kagale, S.; Links, M. G.; Rozwadowski, K. (2010):** Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 152 (3), S. 1109–1134.
- Kagale, S.; Rozwadowski, K. (2011):** EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. In: *Epigenetics* 6 (2), S. 141–146.
- Kanai, M.; Nishimura, M.; Hayashi, M. (2010):** A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of *ABI5*. In: *The Plant Journal* 62 (6), S. 936–947.
- Kang, J.; Hwang, J.-U.; Lee, M.; Kim, Y.-Y.; Assmann, S. M.; Martinoia, E.; Lee, Y. (2010):** PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5), S. 2355–2360.
- Kang, J.; Yim, S.; Choi, H.; Kim, A.; Lee, K. P.; Lopez-Molina, L.; Martinoia, E.; Lee, Y. (2015):** Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. In: *Nature Communications* 6, Nr. 8113.
- Kanno, Y.; Hanada, A.; Chiba, Y.; Ichikawa, T.; Nakazawa, M.; Matsui, M.; Koshiba, T.; Kamiya, Y.; Seo, M. (2012):** Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (24), S. 9653–9658.

- Karszen, C. M.; Brinkhorst-van der Swan, D. L.; Breekland, A. E.; Koornneef, M. (1983):** Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. In: *Planta* 157 (2), S. 158–165.
- Kawaoka, A.; Kawamoto, T.; Sekine, M.; Yoshida, K.; Takano, M.; Shinmyo, A. (1994):** A *cis*-acting element and a *trans*-acting factor involved in the wound-induced expression of a horseradish peroxidase gene. In: *The Plant Journal* 6 (1), S. 87–97.
- Kazan, K.; Manners, J. M. (2008):** Jasmonate signaling: toward an integrated view. In: *Plant Physiology* 146 (4), S. 1459–1468.
- Ke, J.; Ma, H.; Gu, X.; Thelen, A.; Brunzelle, J. S.; Li, J.; Xu, H. Eric; Melcher, K. (2015):** Structural basis for recognition of diverse transcriptional repressors by the TOPLESS family of corepressors. In: *Science Advances* 1 (6), e1500107.
- Khan, A. A. (1968):** Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. In: *Plant Physiology* 43 (9), S. 1463–1465.
- Kieffer, M.; Stern, Y.; Cook, H.; Clerici, E.; Maulbetsch, C.; Laux, T.; Davies, B. (2006):** Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. In: *The Plant Cell* 18 (3), S. 560–573.
- Kilian, J.; Whitehead, D.; Horak, J.; Wanke, D.; Weinl, S.; Batistic, O.; D'Angelo, C.; Bornberg-Bauer, E.; Kudla, J.; Harter, K. (2007):** The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. In: *The Plant Journal* 50 (2), S. 347–363.
- Kim, J. H.; Kende, H. (2004):** A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36), S. 13374–13379.
- Kim, S.; Choi, H.-i.; Ryu, H.-J.; Park, J. H.; Kim, M. D.; Kim, S. Y. (2004):** ARIA, an *Arabidopsis* arm repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component. In: *Plant Physiology* 136 (3), S. 3639–3648.
- Kim, T.-H.; Böhmer, M.; Hu, H.; Nishimura, N.; Schroeder, J. I. (2010):** Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. In: *Annual Review of Plant Biology* 61, S. 561–591.
- Kim, Y.-S.; Kim, S.-G.; Lee, M.; Lee, I.; Park, H.-Y.; Seo, P. J.; Jung, J.-H.; Kwon, E.-J.; Suh, S. W.; Paek, K.-H.; Park, C.-M. (2008):** HD-ZIP III activity is modulated by competitive inhibitors via a feedback loop in *Arabidopsis* shoot apical meristem development. In: *The Plant Cell* 20 (4), S. 920–933.
- Kong, Y.; Chen, S.; Yang, Y.; An, C. (2013):** ABA-insensitive (ABI) 4 and ABI5 synergistically regulate *DGAT1* expression in *Arabidopsis* seedlings under stress. In: *FEBS Letters* 587 (18), S. 3076–3082.
- Koo, A. J. K.; Howe, G. A. (2009):** The wound hormone jasmonate. In: *Phytochemistry* 70 (13-14), S. 1571–1580.
- Kosarev, P.; Mayer, K. F. X.; Hardtke, C. S. (2002):** Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. In: *Genome Biology* 3 (4), Nr. 16.1.
- Kranz, H. D.; Denekamp, M.; Greco, R.; Jin, H.; Leyva, A.; Meissner, R. C.; Petroni, K.; Urzainqui, A.; Bevan, M.; Martin, C.; Smeekens, S.; Tonelli, C.; Paz-Ares, J.; Weisshaar, B. (1998):** Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 16 (2), S. 263–276.
- Krogan, N. T.; Hogan, K.; Long, J. A. (2012):** APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. In: *Development* 139 (22), S. 4180–4190.

- Kulik, A.; Wawer, I.; Krzywińska, E.; Bucholc, M.; Dobrowolska, G. (2011):** SnRK2 protein kinases-key regulators of plant response to abiotic stresses. In: *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 15 (12), S. 859–872.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. (2018):** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. In: *Molecular Biology and Evolution* 35 (6), S. 1547–1549.
- 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. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5), S. 2361–2366.
- Kuromori, T.; Sugimoto, E.; Shinozaki, K. (2011):** Arabidopsis mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. In: *The Plant Journal* 67 (5), S. 885–894.
- Kusaba, M.; Tanaka, A.; Tanaka, R. (2013):** Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. In: *Photosynthesis Research* 117 (1-3), S. 221–234.
- Kushiro, T.; Okamoto, M.; Nakabayashi, K.; Kazutoshi, Y.; Kitamura, S.; Tadao, A.; Hirai, N.; Koshiba, T.; Kamiya, Y.; Nambara, E. (2004):** The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. In: *The EMBO Journal* 23 (7), S. 1647–1656.
- Lane, F. E.; Bailey, L. F. (1964):** Isolation and characterization studies on the β -inhibitor in dormant buds of the silver maple, *Acer saccharinum* L. In: *Physiologia Plantarum* 17 (1), S. 91–99.
- Laudert, D.; Pfannschmidt, U.; Lottspeich, F.; Holländer-Czytko, H.; Weiler, E. W. (1996):** Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. In: *Plant Molecular Biology* 31 (2), S. 323–335.
- Laudert, D.; Weiler, E. W. (1998):** Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. In: *The Plant Journal* 15 (5), S. 675–684.
- Ledent, V.; Vervoort, M. (2001):** The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. In: *Genome Research* 11 (5), S. 754–770.
- Lee, C.; Teng, Q.; Zhong, R.; Ye, Z.-H. (2012):** Arabidopsis GUX proteins are glucuronyltransferases responsible for the addition of glucuronic acid side chains onto xylan. In: *Plant & Cell Physiology* 53 (7), S. 1204–1216.
- Lee, K. H.; Piao, H. L.; Kim, H.-Y.; Choi, S. M.; Jiang, F.; Hartung, W.; Hwang, I.; Kwak, J. M.; Lee, I.-J.; Hwang, I. (2006):** Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. In: *Cell* 126 (6), S. 1109–1120.
- Lee, M.-S.; An, J.-H.; Cho, H.-T. (2016):** Biological and molecular functions of two EAR motifs of Arabidopsis IAA7. In: *Journal of Plant Biology* 59 (1), S. 24–32.
- Lee, S. C.; Lan, W.; Buchanan, B. B.; Luan, S. (2009):** A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (50), S. 21419–21424.
- Lee, S.-J.; Kang, J.-y.; Park, H.-J.; Kim, M. D.; Bae, M. S.; Choi, H.-i.; Kim, S. Y. (2010):** DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its over-expression affects abscisic acid sensitivity. In: *Plant Physiology* 153 (2), S. 716–727.
- Li, H.; Sun, J.; Xu, Y.; Jiang, H.; Wu, X.; Li, C. (2007):** The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in *Arabidopsis*. In: *Plant Molecular Biology* 65 (5), S. 655–665.

- Li, X.; Chen, L.; Forde, B. G.; Davies, W. J. (2017):** The biphasic root growth response to abscisic acid in *Arabidopsis* involves interaction with ethylene and auxin signalling pathways. In: *Frontiers in Plant Science* 8, Nr. 1493.
- Li, X.; Li, G.; Li, Y.; Kong, X.; Zhang, L.; Wang, J.; Li, X.; Yang, Y. (2018):** ABA receptor subfamily III enhances abscisic acid sensitivity and improves the drought tolerance of *Arabidopsis*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7), e1938.
- Liang, C.-H.; Yang, C.-C. (2015):** Identification of ICE1 as a negative regulator of ABA-dependent pathways in seeds and seedlings of *Arabidopsis*. In: *Plant Molecular Biology* 88 (4-5), S. 459–470.
- Liang, G.; Zhang, H.; Li, X.; Ai, Q.; Yu, D. (2017):** bHLH transcription factor bHLH115 regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. In: *Journal of Experimental Botany* 68 (7), S. 1743–1755.
- Lim, E.-K.; Doucet, C. J.; Hou, B.; Jackson, R. G.; Abrams, S. R.; Bowles, D. J. (2005):** Resolution of (+)-abscisic acid using an *Arabidopsis* glycosyltransferase. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 16 (1), S. 143–147.
- Liu, H.; Stone, S. L. (2010):** Abscisic acid increases *Arabidopsis* ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. In: *The Plant Cell* 22 (8), S. 2630–2641.
- Liu, X.; Hou, X. (2018):** Antagonistic regulation of ABA and GA in metabolism and signaling pathways. In: *Frontiers in Plant Science* 9, Nr. 251.
- Liu, Z.; Karmarkar, V. (2008):** Groucho/Tup1 family co-repressors in plant development. In: *Trends in Plant Science* 13 (3), S. 137–144.
- Long, J. A.; Ohno, C.; Smith, Z. R.; Meyerowitz, E. M. (2006):** TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. In: *Science* 312 (5779), S. 1517–1520.
- Lopez-Molina, L.; Chua, N.-H. (2000):** A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Cell Physiology* 41 (5), S. 541–547.
- Lopez-Molina, L.; Mongrand, S.; Chua, N.-H. (2001):** A postgermination developmental arrest check-point is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8), S. 4782–4787.
- Luehrsen, K. R.; Wet, J. R. de; Walbot, V. (1992):** Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. In: *Methods in Enzymology* 216, S. 397–414.
- Lumba, S.; Toh, S.; Handfield, L.-F.; Swan, M.; Liu, R.; Youn, J.-Y.; Cutler, S. R.; Subramaniam, R.; Provart, N.; Moses, A.; Desveaux, D.; McCourt, P. (2014):** A mesoscale abscisic acid hormone interactome reveals a dynamic signaling landscape in *Arabidopsis*. In: *Developmental Cell* 29 (3), S. 360–372.
- Luo, X.; Chen, Z.; Gao, J.; Gong, Z. (2014):** Abscisic acid inhibits root growth in *Arabidopsis* through ethylene biosynthesis. In: *The Plant Journal* 79 (1), S. 44–55.
- Lv, Q.; Cheng, R.; Shi, T. (2014):** Regulatory network rewiring for secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana* under various conditions. In: *BMC Plant Biology* 14, Nr. 180.
- Lynch, T.; Erickson, B. J.; Finkelstein, R. R. (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. In: *Plant Molecular Biology* 80 (6), S. 647–658.
- Lynch, T. J.; Erickson, B. J.; Miller, D. R.; Finkelstein, R. R. (2017):** ABI5-binding proteins (AFPs) alter transcription of ABA-induced genes via a variety of interactions with chromatin modifiers. In: *Plant Molecular Biology* 93 (4-5), S. 403–418.

- Ma, S.; Gong, Q.; Bohnert, H. J. (2006):** Dissecting salt stress pathways. In: *Journal of Experimental Botany* 57 (5), S. 1097–1107.
- Ma, Y.; Cao, J.; He, J.; Chen, Q.; Li, X.; Yang, Y. (2018):** Molecular mechanism for the regulation of ABA homeostasis during plant development and stress responses. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11), Nr. 3643.
- 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. In: *Science* 324 (5930), S. 1064–1068.
- Maia, J.; Dekkers, B. J. W.; Dolle, M. J.; Ligterink, W.; Hilhorst, H. W. M. (2014):** Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. In: *New Phytologist* 203 (1), S. 81–93.
- Manners, J. M.; Penninckx, I. A. M.; Vermaere, K.; Kazan, K.; Brown, R. L.; Morgan, A.; Maclean, D. J.; Curtis, M. D.; Cammue, B. P. A.; Broekart, W. F. (1998):** The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. In: *Plant Molecular Biology* 38 (6), S. 1071–1080.
- Marcotte, W. R., Jr.; Russell, S. H.; Quatrano, R. S. (1989):** Abscisic acid-responsive sequences from the *Em* gene of wheat. In: *The Plant Cell* 1 (10), S. 969–976.
- Martin-Arevalillo, R.; Nanao, M. H.; Larrieu, A.; Vinos-Poyo, T.; Mast, D.; Galvan-Ampudia, C.; Brunoud, G.; Vernoux, T.; Dumas, R.; Parcy, F. (2017):** Structure of the *Arabidopsis* TOPLESS corepressor provides insight into the evolution of transcriptional repression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (30), S. 8107–8112.
- Martínez-García, J. F.; Gallemí, M.; Molina-Contreras, M. J.; Llorente, B.; Bevilacqua, M. R. R.; Quail, P. H. (2014):** The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: the antagonistic role of phytochrome A and B differentiates vegetation proximity and canopy shade. In: *PLOS ONE* 9 (10), e109275.
- Masi, F. de; Grove, C. A.; Vedenko, A.; Alibés, A.; Gisselbrecht, S. S.; Serrano, L.; Bulyk, M. L.; Walhout, A. J. M. (2011):** Using a structural and logics systems approach to infer bHLH-DNA binding specificity determinants. In: *Nucleic Acids Research* 39 (11), S. 4553–4563.
- Mason, H. S.; DeWald, D. B.; Mullet, J. E. (1993):** Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. In: *The Plant Cell* 5 (3), S. 241–251.
- Massari, M. E.; Murre, C. (2000):** Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (2), S. 429–440.
- Matsui, K.; Umemura, Y.; Ohme-Takagi, M. (2008):** AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. In: *The Plant Journal* 55 (6), S. 954–967.
- Melcher, K.; Ng, L.-M.; Zhou, X. E.; Soon, F.-F.; Xu, Y.; Suino-Powell, K. M.; Park, S.-Y.; Weiner, J. J.; Fujii, H.; Chinnusamy, V.; Kovach, A.; Li, J.; Wang, Y.; Li, J.; Peterson, F. C.; Jensen, D. R.; Yong, E.-L.; Volkman, B. F.; Cutler, S. R.; Zhu, J.-K.; Xu, H. E. (2009):** A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. In: *Nature* 462 (7273), S. 602–608.
- Melotto, M.; Mecey, C.; Niu, Y.; Chung, H. S.; Katsir, L.; Yao, J.; Zeng, W.; Thines, B.; Staswick, P.; Browse, J.; Howe, G. A.; He, S. Y. (2008):** A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the CO11 F-box protein. In: *The Plant Journal* 55 (6), S. 979–988.
- Meng, L.-S.; Yao, S.-Q. (2015):** Transcription co-activator *Arabidopsis* ANGUSTIFOLIA3 (AN3) regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density and improving root architecture by the transrepression of *YODA* (YDA). In: *Plant Biotechnology Journal* 13 (7), S. 893–902.

- Menkens, A. E.; Schindler, U.; Cashmore, A. R. (1995):** The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. In: *Trends in Biochemical Sciences* 20 (12), S. 506–510.
- Milborrow, B. V. (1967):** The identification of (+)-Abscisin II [(+)-Dormin] in plants and measurement of its concentrations. In: *Planta* 76 (2), S. 93–113.
- Miller, M. J.; Barrett-Wilt, G. A.; Hua, Z.; Vierstra, R. D. (2010):** Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (38), S. 16512–16517.
- Mininno, M.; Brugière, S.; Pautre, V.; Gilgen, A.; Ma, S.; Ferro, M.; Tardif, M.; Alban, C.; Ravanel, S. (2012):** Characterization of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphate aldolases as lysine-methylated proteins in plants. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (25), S. 21034–21044.
- Mitsuda, N.; Ohme-Takagi, M. (2009):** Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. In: *Plant & Cell Physiology* 50 (7), S. 1232–1248.
- Miura, K.; Lee, J.; Jin, J. B.; Yoo, C. Y.; Miura, T.; Hasegawa, P. M. (2009):** Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13), S. 5418–5423.
- Miyazono, K.-I.; Miyakawa, T.; Sawano, Y.; Kubota, K.; Kang, H.-J.; Asano, A.; Miyauchi, Y.; Takahashi, M.; Zhi, Y.; Fujita, Y.; Yoshida, T.; Kodaira, K.-S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Tanokura, M. (2009):** Structural basis of abscisic acid signalling. In: *Nature* 462 (7273), S. 609–614.
- Mortimer, J. C.; Miles, G. P.; Brown, D. M.; Zhang, Z.; Segura, M. P.; Weimar, T.; Yu, X.; Seffen, K. A.; Stephens, E.; Turner, S. R.; Dupree, P. (2010):** Absence of branches from xylan in *Arabidopsis gux* mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (40), S. 17409–17414.
- Mundy, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Chua, N.-H. (1990):** Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (4), S. 1406–1410.
- Munemasa, S.; Oda, K.; Watanabe-Sugimoto, M.; Nakamura, Y.; Shimoishi, Y.; Murata, Y. (2007):** The *coronatine-insensitive 1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. In: *Plant Physiology* 143 (3), S. 1398–1407.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum* 15 (3), S. 473–497.
- Murray, M. G.; Thompson, W. F. (1980):** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic Acids Research* 8 (19), 4321–4325.
- Murre, C.; McCaw Schonleber, P.; Baltimore, D. (1989):** A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* Proteins. In: *Cell* 56 (5), S. 777–783.
- Mustilli, A.-C.; Merlot, S.; Vavasseur, A.; Fenzi, F.; Giraudat, J. (2002):** *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. In: *The Plant Cell* 14 (12), S. 3089–3099.
- Nair, S. K.; Burley, S. K. (2000):** Recognizing DNA in the library. In: *Nature* 404 (6779), S. 717–718.
- Nakabayashi, K.; Okamoto, M.; Koshiba, T.; Kamiya, Y.; Nambara, E. (2005):** Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. In: *The Plant Journal* 41 (5), S. 697–709.

- Nakamura, S.; Lynch, T. J.; Finkelstein, R. R. (2001):** Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. In: *The Plant Journal* 26 (6), S. 627–635.
- 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*. In: *Plant Molecular Biology* 60 (1), S. 51–68.
- Nakashima, K.; Ito, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009):** Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. In: *Plant Physiology* 149 (1), S. 88–95.
- Nakata, M.; Mitsuda, N.; Herde, M.; Koo, A. J. K.; Moreno, J. E.; Suzuki, K.; Howe, G. A.; Ohme-Takagi, M. (2013):** A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 25 (5), S. 1641–1656.
- Nakata, M.; Ohme-Takagi, M. (2013):** Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility. In: *Plant Signaling & Behavior* 8 (12), e26473.
- Negi, J.; Matsuda, O.; Nagasawa, T.; Oba, Y.; Takahashi, H.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiya, H.; Hashimoto, M.; Iba, K. (2008):** CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. In: *Nature* 452 (7186), S. 483–486.
- Nemhauser, J. L.; Mockler, T. C.; Chory, J. (2004):** Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. In: *PLOS Biology* 2 (9), e258.
- Nguyen, N. H.; Cheong, J.-J. (2018):** AtMYB44 interacts with TOPLESS-RELATED corepressors to suppress *protein phosphatase 2C* gene transcription. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 507 (1-4), S. 437–442.
- Nguyen, X. C.; Hoang, M. H. T.; Kim, H. S.; Lee, K.; Liu, X.-M.; Kim, S. H.; Bahk, S.; Park, H. C.; Chung, W. S. (2012):** Phosphorylation of the transcriptional regulator MYB44 by mitogen activated protein kinase regulates *Arabidopsis* seed germination. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423 (4), S. 703–708.
- 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. In: *The Plant Journal* 50 (6), S. 935–949.
- Niu, Y.; Figueroa, P.; Browse, J. (2011):** Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. In: *Journal of Experimental Botany* 62 (6), S. 2143–2154.
- Odell, J. T.; Nagy, F.; Chua, N.-H. (1985):** Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. In: *Nature* 313 (6005), S. 810–812.
- Oh, E.; Zhu, J.-Y.; Ryu, H.; Hwang, I.; Wang, Z.-Y. (2014):** TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1. In: *Nature Communications* 5, Nr. 4140.
- Ohkuma, K.; Addicott, F. T.; Smith, O. E.; Thiessen, W. E. (1965):** The structure of abscisin II. In: *Tetrahedron Letters* 29, S. 2529–2535.
- Ohkuma, K.; Lyon, J. L.; Addicott, F. T.; Smith, O. E. (1963):** Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. In: *Science* 142 (3599), S. 1592–1593.
- Ohta, M.; Matsui, K.; Hiratsu, K.; Shinshi, H.; Ohme-Takagi, M. (2001):** Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. In: *The Plant Cell* 13 (8), S. 1959–1968.

Oikawa, A.; Joshi, H. J.; Rennie, E. A.; Ebert, B.; Manisseri, C.; Heazlewood, J. L.; Scheller, H. V. (2010): An integrative approach to the identification of Arabidopsis and rice genes involved in xylan and secondary wall development. In: *PLOS ONE* 5 (11), e15481.

Okamoto, M.; Kushiro, T.; Jikumaru, Y.; Abrams, S. R.; Kamiya, Y.; Seki, M.; Nambara, E. (2011): ABA 9'-hydroxylation is catalyzed by CYP707A in Arabidopsis. In: *Phytochemistry* 72 (8), S. 717–722.

Okamoto, M.; Kuwahara, A.; Seo, M.; Kushiro, T.; Asami, T.; Hirai, N.; Kamiya, Y.; Koshiba, T.; Nambara, E. (2006): CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 141 (1), S. 97–107.

Olvera-Carrillo, Y.; Luis Reyes, J.; Covarrubias, A. A. (2011): Late embryogenesis abundant proteins: versatile players in the plant adaptation to water limiting environments. In: *Plant Signaling & Behavior* 6 (4), S. 586–589.

Ooka, H.; Satoh, K.; Doi, K.; Nagata, T.; Otomo, Y.; Murakami, K.; Matsubara, K.; Osato, N.; Kawai, J.; Carninci, P.; Hayashizaki, Y.; Suzuki, K.; Kojima, K.; Takahara, Y.; Yamamoto, K.; Kikuchi, S. (2003): Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. In: *DNA Research* 10 (6), S. 239–247.

Palaniswamy, S. K.; James, S.; Sun, H.; Lamb, R. S.; Davuluri, R. V.; Grotewold, E. (2006): AGRIS and AtRegNet. A platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. In: *Plant Physiology* 140 (3), S. 818–829.

Pandey, G. K.; Grant, J. J.; Cheong, Y. H.; Kim, B. G.; Li, L.; Luan, S. (2005): ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 139 (3), S. 1185–1193.

Park, S.-Y.; Fung, P.; Nishimura, N.; Jensen, D. R.; Fujii, H.; Zhao, Y.; Lumba, S.; Santiago, J.; Rodrigues, A.; Chow, T.-f. F.; Alfred, S. E.; Bonetta, D.; Finkelstein, R.; Provart, N. J.; Desveaux, D.; Rodriguez, P. L.; McCourt, P.; Zhu, J.-K.; Schroeder, J. I.; Volkman, B. F.; Cutler, S. R. (2009): Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. In: *Science* 324 (5930), S. 1068–1071.

Park, S.-Y.; Yu, J.-W.; Park, J.-S.; Li, J.; Yoo, S.-C.; Lee, N.-Y.; Lee, S.-K.; Jeong, S.-W.; Seo, H. S.; Koh, H.-J.; Jeon, J.-S.; Park, Y.-I.; Paek, N.-C. (2007): The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. In: *The Plant Cell* 19 (5), S. 1649–1664.

Pauwels, L.; Barbero, G. F.; Geerinck, J.; Tilleman, S.; Grunewald, W.; Pérez, A. C.; Chico, J. M.; Bossche, R. V.; Sewell, J.; Gil, E.; García-Casado, G.; Witters, E.; Inzé, D.; Long, J. A.; Jaeger, G. de; Solano, R.; Goossens, A. (2010): NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. In: *Nature* 464 (7289), S. 788–791.

Pauwels, L.; Goossens, A. (2011): The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. In: *The Plant Cell* 23 (9), S. 3089–3100.

Pauwels, L.; Ritter, A.; Goossens, J.; Durand, A. N.; Liu, H.; Gu, Y.; Geerinck, J.; Boter, M.; Vanden Bossche, R.; Clercq, R. de; van Leene, J.; Gevaert, K.; Jaeger, G. de; Solano, R.; Stone, S.; Innes, R. W.; Callis, J.; Goossens, A. (2015): The RING E3 ligase KEEP ON GOING modulates JASMONATE ZIM-DOMAIN12 stability. In: *Plant Physiology* 169 (2), S. 1405–1417.

Pavón, L. R.; Lundh, F.; Lundin, B.; Mishra, A.; Persson, B. L.; Spetea, C. (2008): Arabidopsis ANTR1 is a thylakoid Na⁺-dependent phosphate transporter. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (20), S. 13520–13527.

Payne, T. C.; Zhang, F.; Lloyd, A. M. (2000): GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. In: *Genetics* 156 (3), S. 1349–1362.

- Pires, N.; Dolan, L. (2010):** Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. In: *Molecular Biology and Evolution* 27 (4), S. 862–874.
- Pla, M.; Vilardell, J.; Gultinan, M. J.; Marcotte, W. R.; Niogret, M. F.; Quatrano, R. S.; Pagès, M. (1993):** The *cis*-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*. In: *Plant Molecular Biology* 21 (2), S. 259–266.
- Pulido, P.; Perello, C.; Rodriguez-Concepcion, M. (2012):** New insights into plant isoprenoid metabolism. In: *Molecular Plant* 5 (5), S. 964–967.
- Raes, J.; Rohde, A.; Christensen, J. H.; van de Peer, Y.; Boerjan, W. (2003):** Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 133 (3), S. 1051–1071.
- Raghavendra, A. S.; Gonugunta, V. K.; Christmann, A.; Grill, E. (2010):** ABA perception and signaling. In: *Trends in Plant Science* 15 (7), S. 395–401.
- Reeves, P. H.; Ellis, C. M.; Ploense, S. E.; Wu, M.-F.; Yadav, V.; Tholl, D.; Chételat, A.; Haupt, I.; Kennerley, B. J.; Hodgens, C.; Farmer, E. E.; Nagpal, P.; Reed, J. W. (2012):** A regulatory network for coordinated flower maturation. In: *PLOS Genetics* 8 (2), e1002506.
- Reeves, W. M.; Lynch, T. J.; Mobin, R.; Finkelstein, R. R. (2011):** Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. In: *Plant Molecular Biology* 75 (4-5), S. 347–363.
- Rennie, E. A.; Hansen, S. F.; Baidoo, E. E. K.; Hadi, M. Z.; Keasling, J. D.; Scheller, H. V. (2012):** Three members of the Arabidopsis glycosyltransferase family 8 are xylan glucuronosyltransferases. In: *Plant Physiology* 159 (4), S. 1408–1417.
- Reyes, J. L.; Chua, N.-H. (2007):** ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. In: *The Plant Journal* 49 (4), S. 592–606.
- Riaño-Pachón, D. M.; Ruzicic, S.; Dreyer, I.; Mueller-Roeber, B. (2007):** PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. In: *BMC Bioinformatics* 8, Nr. 42.
- Riechmann, J. L. (2002):** Transcriptional regulation: a genomic overview. In: *The Arabidopsis Book* 1, e0085.
- Riechmann, J. L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Jiang, C.-Z.; Keddie, J.; Adam, L.; Pineda, O.; Ratcliffe, O. J.; Samaha, R. R.; Creelman, R.; Pilgrim, M.; Broun, P.; Zhang, J. Z.; Ghandehari, D.; Sherman, B. K.; Yu, G.-L. (2000):** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. In: *Science* 290 (5499), S. 2105–2110.
- Robinson, P. M.; Wareing, P. F.; Thomas, T. H. (1963):** Dormancy regulators in woody plants. Isolation of the inhibitor varying with photoperiod in *Acer pseudoplatanus*. In: *Nature* 199 (4596), S. 875–876.
- Rock, C. D.; Zeevaert, J. A. D. (1991):** The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (17), S. 7496–7499.
- Rodriguez, M. S.; Dargemont, C.; Hay, R. T. (2001):** SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (16), S. 12654–12659.
- Roelfsema, M. R. G.; Hedrich, R.; Geiger, D. (2012):** Anion channels: master switches of stress responses. In: *Trends in Plant Science* 17 (4), S. 221–229.
- Roig-Villanova, I.; Bou, J.; Sorin, C.; Devlin, P. F.; Martínez-García, J. F. (2006):** Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 141 (1), S. 85–96.

- Roth, C.; Menzel, G.; Petétot, J. M.-C.; Rochat-Hacker, S.; Poirier, Y. (2004):** Characterization of a protein of the plastid inner envelope having homology to animal inorganic phosphate, chloride and organic-anion transporters. In: *Planta* 218 (3), S. 406–416.
- Ruberti, I.; Sessa, G.; Luccetti, S.; Morelli, G. (1991):** A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. In: *The EMBO Journal* 10 (7), S. 1787–1791.
- Ruiz-Sola, M. Á.; Rodríguez-Concepción, M. (2012):** Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. In: *The Arabidopsis Book* 10, e0158.
- Rushton, D. L.; Tripathi, P.; Rabara, R. C.; Lin, J.; Ringler, P.; Boken, A. K.; Langum, T. J.; Smidt, L.; Boomsma, D. D.; Emme, N. J.; Chen, X.; Finer, J. J.; Shen, Q. J.; Rushton, P. J. (2012):** WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. In: *Plant Biotechnology Journal* 10 (1), S. 2–11.
- Rytz, T. C.; Miller, M. J.; McLoughlin, F.; Augustine, R. C.; Marshall, R. S.; Juan, Y.-T.; Charng, Y.-Y.; Scalf, M.; Smith, L. M.; Vierstra, R. D. (2018):** SUMOylome profiling reveals a diverse array of nuclear targets modified by the SUMO ligase SIZ1 during heat stress. In: *The Plant Cell* 30 (5), S. 1077–1099.
- Sadowski, I.; Ma, J.; Triezenberg, S.; Ptashne, M. (1988):** GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. In: *Nature* 335 (6190), S. 563–564.
- Saint Germain, A. de; Ligerot, Y.; Dun, E. A.; Pillot, J.-P.; Ross, J. J.; Beveridge, C. A.; Rameau, C. (2013):** Strigolactones stimulate internode elongation independently of gibberellins. In: *Plant Physiology* 163 (2), S. 1012–1025.
- 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. In: *Plant Physiology* 134 (4), S. 1439–1449.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987):** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. In: *Molecular Biology and Evolution* 4 (4), S. 406–425.
- Sakuraba, Y.; Jeong, J.; Kang, M.-Y.; Kim, J.; Paek, N.-C.; Choi, G. (2014):** Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. In: *Nature Communications* 5, Nr. 4636.
- Sakuraba, Y.; Schelbert, S.; Park, S.-Y.; Han, S.-H.; Lee, B.-D.; Andrès, C. B.; Kessler, F.; Hörtensteiner, S.; Paek, N.-C. (2012):** STAY-GREEN and chlorophyll catabolic enzymes interact at light-harvesting complex II for chlorophyll detoxification during leaf senescence in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 24 (2), S. 507–518.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001):** Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santiago, J.; Rodrigues, A.; Saez, A.; Rubio, S.; Antoni, R.; Dupeux, F.; Park, S.-Y.; Márquez, J. A.; Cutler, S. R.; Rodriguez, P. L. (2009):** Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. In: *The Plant Journal* 60 (4), S. 575–588.
- Saracco, S. A.; Hansson, M.; Scalf, M.; Walker, J. M.; Smith, L. M.; Vierstra, R. D. (2009):** Tandem affinity purification and mass spectrometric analysis of ubiquitylated proteins in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* 59 (2), S. 344–358.
- Sasaki-Sekimoto, Y.; Jikumaru, Y.; Obayashi, T.; Saito, H.; Masuda, S.; Kamiya, Y.; Ohta, H.; Shirasu, K. (2013):** Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 163 (1), S. 291–304.

- Sasaki-Sekimoto, Y.; Saito, H.; Masuda, S.; Shirasu, K.; Ohta, H. (2014):** Comprehensive analysis of protein interactions between JAZ proteins and bHLH transcription factors that negatively regulate jasmonate signaling. In: *Plant Signaling & Behavior* 9 (1), e27639.
- Sato, A.; Sato, Y.; Fukao, Y.; Fujiwara, M.; Umezawa, T.; Shinozaki, K.; Hibi, T.; Taniguchi, M.; Miyake, H.; Goto, D. B.; 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. In: *The Biochemical Journal* 424 (3), S. 439–448.
- Savatin, D. V.; Gramegna, G.; Modesti, V.; Cervone, F. (2014):** Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. In: *Frontiers in Plant Science* 5, Nr. 470.
- Schaller, A.; Stintzi, A. (2009):** Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. In: *Phytochemistry* 70 (13-14), S. 1532–1538.
- Schena, M.; Davis, R. W. (1994):** Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (18), S. 8393–8397.
- Schiefelbein, J. (2003):** Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. In: *Current Opinion in Plant Biology* 6 (1), S. 74–78.
- Scholz, S. (2018):** Regulatory feedback between AGC kinases coordinating Arabidopsis ovule integument growth. Dissertation. Technische Universität München, Freising.
- Schweighofer, A.; Hirt, H.; Meskiene, I. (2004):** Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. In: *Trends in Plant Science* 9 (5), S. 236–243.
- Shaikhali, J.; Dios Barajas-Lopéz, J. de; Ötvös, K.; Kremnev, D.; Garcia, A. S.; Srivastava, V.; Wingsle, G.; Bako, L.; Strand, Å. (2012):** The CRYPTOCHROME1-dependent response to excess light is mediated through the transcriptional activators ZINC FINGER PROTEIN EXPRESSED IN INFLORESCENCE MERISTEM LIKE1 and ZML2 in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 24 (7), S. 3009–3025.
- Shang, Y.; Yan, L.; Liu, Z.-Q.; Cao, Z.; Mei, C.; Xin, Q.; Wu, F.-Q.; Wang, X.-F.; Du, S.-Y.; Jiang, T.; Zhang, X.-F.; Zhao, R.; Sun, H.-L.; Liu, R.; Yu, Y.-T.; Zhang, D.-P. (2010):** The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. In: *The Plant Cell* 22 (6), S. 1909–1935.
- Sheard, L. B.; Tan, X.; Mao, H.; Withers, J.; Ben-Nissan, G.; Hinds, T. R.; Kobayashi, Y.; Hsu, F.-F.; Sharon, M.; Browse, J.; He, S. Y.; Rizo, J.; Howe, G. A.; Zheng, N. (2010):** Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. In: *Nature* 468 (7322), S. 400–407.
- Sheen, J. (2001):** Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. In: *Plant Physiology* 127 (4), S. 1466–1475.
- Shen, Q.; Ho, Z.-H. David (1995):** Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-Box and a novel *cis*-acting element. In: *The Plant Cell* 7 (3), S. 295–307.
- Shen, Q. J.; Casaretto, J. A.; Zhang, P.; Ho, T.-H. D. (2004):** Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Plant Molecular Biology* 54 (1), S. 111–124.
- Shi, Y. (2009):** Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. In: *Cell* 139 (3), S. 468–484.
- Shimizu, T.; Toumoto, A.; Ihara, K.; Shimizu, M.; Kyogoku, Y.; Ogawa, N.; Oshima, Y.; Hakoshima, T. (1997):** Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. In: *The EMBO Journal* 16 (15), S. 4689–4697.

- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000):** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. In: *Current Opinion in Plant Biology* 3 (3), S. 217–223.
- Shu, K.; Luo, X.; Meng, Y.; Yang, W. (2018):** Toward a molecular understanding of abscisic acid actions in floral transition. In: *Plant & Cell Physiology* 59 (2), S. 215–221.
- Siegel, R. S.; Xue, S.; Murata, Y.; Yang, Y.; Nishimura, N.; Wang, A.; Schroeder, J. I. (2009):** Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K⁺ channels in *Arabidopsis* guard cells. In: *The Plant Journal* 59 (2), S. 207–220.
- Siegfried, K. R.; Eshed, Y.; Baum, S. F.; Otsuga, D.; Drews, G. N.; Bowman, J. L. (1999):** Members of the *YABBY* genes specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. In: *Development* 126 (18), S. 4117–4128.
- Skriver, K.; Olsen, F. L.; Rogers, J. C.; Mundy, J. (1991):** Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16), S. 7266–7270.
- Skubacz, A.; Daszkowska-Golec, A.; Szarejko, I. (2016):** The role and regulation of ABI5 (ABA-insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. In: *Frontiers in Plant Science* 7, S. 1884.
- Söderman, E.; Hjellström, M.; Fahlson, J.; Engström, P. (1999):** The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. In: *Plant Molecular Biology* 40 (6), S. 1073–1083.
- Song, C.-P.; Agarwal, M.; Ohta, M.; Guo, Y.; Halfter, U.; Wang, P.; Zhu, J.-K. (2005):** Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. In: *The Plant Cell* 17 (8), S. 2384–2396.
- Song, S.; Qi, T.; Fan, M.; Zhang, X.; Gao, H.; Huang, H.; Wu, D.; Guo, H.; Xie, D. (2013):** The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. In: *PLOS Genetics* 9 (7), e1003653.
- Song, S.; Qi, T.; Huang, H.; Ren, Q.; Wu, D.; Chang, C.; Peng, W.; Liu, Y.; Peng, J.; Xie, D. (2011):** The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 23 (3), S. 1000–1013.
- Sorin, C.; Salla-Martret, M.; Bou-Torrent, J.; Roig-Villanova, I.; Martínez-García, J. F. (2009):** *ATHB4*, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in *Arabidopsis* seedlings. In: *The Plant Journal* 59 (2), S. 266–277.
- Srivastava, A. K.; Orosa, B.; Singh, P.; Cummins, I.; Walsh, C.; Zhang, C.; Grant, M.; Roberts, M. R.; Anand, G. S.; Fitches, E.; Sadanandom, A. (2018):** SUMO suppresses the activity of the jasmonic acid receptor CORONATINE INSENSITIVE1. In: *The Plant Cell* 30 (9), S. 2099–2115.
- Stark, C.; Breitkreutz, B.-J.; Reguly, T.; Boucher, L.; Breitkreutz, A.; Tyers, M. (2006):** BioGRID: a general repository for interaction datasets. In: *Nucleic Acids Research* 34 (Database Issue), S. 535–539.
- Steindler, C.; Matteucci, A.; Sessa, G.; Weimar, T.; Ohgishi, M.; Aoyama, T.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1999):** Shade avoidance responses are mediated by the *ATHB-2* HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. In: *Development* 126 (19), S. 4235–4245.
- Stepanova, A. N.; Robertson-Hoyt, J.; Yun, J.; Benavente, L. M.; Xie, D.-Y.; Dolezal, K.; Schlereth, A.; Jürgens, G.; Alonso, J. M. (2008):** *TAA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. In: *Cell* 133 (1), S. 177–191.

- Stone, S. L.; Williams, L. A.; Farmer, L. M.; Vierstra, R. D.; Callis, J. (2006):** KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for *Arabidopsis* growth and development, is involved in abscisic acid signaling. In: *The Plant Cell* 18 (12), S. 3415–3428.
- Su, M.; Huang, G.; Zhang, Q.; Wang, X.; Li, C.; Tao, Y.; Zhang, S.; Lai, J.; Yang, C.; Wang, Y. (2016):** The LEA protein, ABR, is regulated by ABI5 and involved in dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Science* 247, S. 93–103.
- Sun, H.; Tao, J.; Gu, P.; Xu, G.; Zhang, Y. (2016):** The role of strigolactones in root development: lessons from shoot branching. In: *Plant Signaling & Behavior* 11 (1), e1110662.
- Sun, T.-P.; Gubler, F. (2004):** Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. In: *Annual Review of Plant Biology* 55, S. 197–223.
- Szemenyei, H.; Hannon, M.; Long, J. A. (2008):** TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. In: *Science* 319 (5868), S. 1380–1384.
- Szostkiewicz, I.; Richter, K.; Kepka, M.; Demmel, S.; Ma, Y.; Korte, A.; Assaad, F. F.; Christmann, A.; Grill, E. (2010):** Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. In: *The Plant Journal* 61 (1), S. 25–35.
- Takahashi, Y.; Ebisu, Y.; Shimazaki, K.-I. (2017):** Reconstitution of abscisic acid signaling from the receptor to DNA via bHLH transcription factors. In: *Plant Physiology* 174 (2), S. 815–822.
- Talbert, P. B.; Adler, H. T.; Parks, D. W.; Comai, L. (1995):** The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. In: *Development* 121 (9), S. 2723–2735.
- Tao, Y.; Ferrer, J.-L.; Ljung, K.; Pojer, F.; Hong, F.; Long, J. A.; Li, L.; Moreno, J. E.; Bowman, M. E.; Ivans, L. J.; Cheng, Y.; Lim, J.; Zhao, Y.; Ballaré, C. L.; Sandberg, G.; Noel, J. P.; Chory, J. (2008):** Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. In: *Cell* 133 (1), S. 164–176.
- Taylor-Teeple, M.; Lin, L.; Lucas, M. de; Turco, G.; Toal, T. W.; Gaudinier, A.; Young, N. F.; Trabucco, G. M.; Veling, M. T.; Lamothe, R.; Handakumbura, P. P.; Xiong, G.; Wang, C.; Corwin, J.; Tsoukalas, A.; Zhang, L.; Ware, D.; Pauly, M.; Kliebenstein, D. J.; Dehesh, K.; Tagkopoulos, I.; Breton, G.; Pruneda-Paz, J. L.; Ahnert, S. E.; Kay, S. A.; Hazen, S. P.; Brady, S. M. (2015):** An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. In: *Nature* 517 (7536), S. 571–575.
- The UniProt Consortium (2018):** UniProt: the universal protein knowledgebase. In: *Nucleic Acids Research* 46 (5), S. 2699.
- Theologis, A.; Ecker, J. R.; Palm, C. J.; Federspiel, N. A.; Kaul, S.; White, O.; Alonso, J.; Altafi, H.; Araujo, R.; Bowman, C. L.; Brooks, S. Y.; Buehler, E.; Chan, A.; Chao, Q.; Chen, H.; Cheuk, R. F.; Chin, C. W.; Chung, M. K.; Conn, L.; Conway, A. B.; Conway, A. R.; Creasy, T. H.; Dewar, K.; Dunn, P.; Etgu, P.; Feldblyum, T. V.; Feng, J.; Fong, B.; Fuji, C. Y.; Gill, J. E.; Goldsmith, A. D.; Haas, B.; Hansen, N. F.; Hughes, B.; Huizar, L.; Hunter, J.; Jenkins, J.; Johnson-Hopson, C.; Khan, S.; Khaykin, E.; Kim, C. J.; Koo, H. L.; Kremenetskaia, I.; Kurtz, D. B.; Kwan, A.; Lam, B.; Langin-Hooper, S.; Lee, A.; Lee, J. M.; Lenz, C. A.; Li, J. H.; Li, Y.; Lin, X.; Liu, S. X.; Liu, Z. A.; Loros, J. S.; Maiti, R.; Marziali, A.; Militscher, J.; Miranda, M.; Nguyen, M.; Nierman, W. C.; Osborne, B. I.; Pai, G.; Peterson, J.; Pham, P. K.; Rizzo, M.; Rooney, T.; Rowley, D.; Sakano, H.; Salzberg, S. L.; Schwartz, J. R.; Shinn, P.; Southwick, A. M.; Sun, H.; Tallon, L. J.; Tambunga, G.; Toriumi, M.; Town, C. D.; Utterback, T.; Aken, S. van; Vaysberg, M.; Vysotskaia, V. S.; Walker, M.; Wu, D.; Yu, G.; Fraser, C. M.; Venter, J. C.; Davis, R. W. (2000):** Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. In: *Nature* 408 (6814), S. 816–820.
- Thines, B.; Katsir, L.; Melotto, M.; Niu, Y.; Mandaokar, A.; Liu, G.; Nomura, K.; He, S. Yang; Howe, G. A.; Browse, J. (2007):** JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. In: *Nature* 448 (7154), S. 661–665.

- Tian, H.; Guo, H.; Dai, X.; Cheng, Y.; Zheng, K.; Wang, X.; Wang, S. (2015):** An ABA down-regulated bHLH transcription repressor gene, *bHLH129* regulates root elongation and ABA response when over-expressed in *Arabidopsis*. In: *Scientific Reports* 5, Nr. 17587.
- Tirode, F.; Malaguti, C.; Romero, F.; Attar, R.; Camonis, J.; Egly, J. M. (1997):** A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (37), S. 22995–22999.
- Tischer, S. V.; Wunschel, C.; Papacek, M.; Kleigrew, K.; Hofmann, T.; Christmann, A.; Grill, E. (2017):** Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (38), S. 10280–10285.
- Toledo-Ortiz, G.; Huq, E.; Quail, P. H. (2003):** The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. In: *The Plant Cell* 15 (8), S. 1749–1770.
- Tominaga-Wada, R.; Iwata, M.; Nukumizu, Y.; Wada, T. (2011):** Analysis of IIIId, IIIe and IVa group basic-helix-loop-helix proteins expressed in *Arabidopsis* root epidermis. In: *Plant Science* 181 (4), S. 471–478.
- Travis, A.; Hagman, J.; Hwang, L.; Grosschedl, R. (1993):** Purification of early-B-cell factor and characterization of its DNA-binding specificity. In: *Molecular and Cellular Biology* 13 (6), S. 3392–3400.
- Treiber, T.; Mandel, E. M.; Pott, S.; Györy, I.; Firner, S.; Liu, E. T.; Grosschedl, R. (2010):** Early B cell factor 1 regulates B cell gene networks by activation, repression, and transcription-independent poising of chromatin. In: *Immunity* 32 (5), S. 714–725.
- Triezenberg, S. J.; Kingsbury, R. C.; McKnight, S. L. (1988):** Function dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. In: *Genes & Development* 2 (6), S. 718–729.
- Trigg, S. A.; Garza, R. M.; MacWilliams, A.; Nery, J. R.; Bartlett, A.; Castanon, R.; Goubil, A.; Feeney, J.; O'Malley, R.; Huang, S.-S. C.; Zhang, Z. Z.; Galli, M.; Ecker, J. R. (2017):** CrY2H-seq: a massively multiplexed assay for deep-coverage interactome mapping. In: *Nature Methods* 14 (8), S. 819–825.
- Trontin, C.; Kiani, S.; Corwin, J. A.; Hématy, K.; Yansouni, J.; Kliebenstein, D. J.; Loudet, O. (2014):** A pair of receptor-like kinases is responsible for natural variation in shoot growth response to mannitol treatment in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 78 (1), S. 121–133.
- Turner, J. G.; Ellis, C.; Devoto, A. (2002):** The jasmonate signal pathway. In: *The Plant Cell* 14 (Supplement), S. 153–164.
- 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*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (41), S. 17588–17593.
- Uno, Y.; Furihata, T.; Abe, H.; Yoshida, R.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000):** *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (21), S. 11632–11637.
- Vahisalu, T.; Kollist, H.; Wang, Y.-F.; Nishimura, N.; Chan, W.-Y.; Valerio, G.; Lamminmäki, A.; Brosché, M.; Moldau, H.; Desikan, R.; Schroeder, J. I.; Kangasjärvi, J. (2008):** SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. In: *Nature* 452 (7186), S. 487–491.
- Valdés, A. E.; Overnäs, E.; Johansson, H.; Rada-Iglesias, A.; Engström, P. (2012):** The homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class I transcription factors ATHB7 and ATHB12 modulate abscisic acid

signalling by regulating protein phosphatase 2C and abscisic acid receptor gene activities. In: *Plant Molecular Biology* 80 (4-5), S. 405–418.

Vanholme, B.; Grunewald, W.; Bateman, A.; Kohchi, T.; Gheysen, G. (2007): The tify family previously known as ZIM. In: *Trends in Plant Science* 12 (6), S. 239–244.

Verslues, P. E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J.; Zhu, J.-K. (2006): Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. In: *The Plant Journal* 45 (4), S. 523–539.

Villanueva, J. M.; Broadhvest, J.; Hauser, B.; Meister, R. J.; Schneitz, K.; Gasser, C. S. (1999): INNER NO OUTER regulates abaxial– adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. In: *Genes & Development* 13 (23), S. 3160–3169.

Vlad, F.; Droillard, M.-J.; Valot, B.; Khafif, M.; Rodrigues, A.; Brault, M.; Zivy, M.; Rodriguez, P. L.; Merlot, S.; Laurière, C. (2010): Phospho-site mapping, genetic and in planta activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. In: *The Plant Journal* 63 (5), S. 778–790.

Waldie, T.; McCulloch, H.; Leyser, O. (2014): Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. In: *The Plant Journal* 79 (4), S. 607–622.

Wang, K. L.-C; Li, H.; Ecker, J. R. (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. In: *The Plant Cell* 14 (Supplement), S. 131–151.

Wang, L.; Kim, J.; Somers, D. E. (2013a): Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (2), S. 761–766.

Wang, L.; Wang, B.; Jiang, L.; Liu, X.; Li, X.; Lu, Z.; Meng, X.; Wang, Y.; Smith, S. M.; Li, J. (2015a): Strigolactone signaling in *Arabidopsis* regulates shoot development by targeting D53-like SMXL repressor proteins for ubiquitination and degradation. In: *The Plant Cell* 27 (11), S. 3128–3142.

Wang, L.-H.; Baker, N. E. (2015): E proteins and ID proteins: helix-loop-helix partners in development and disease. In: *Developmental Cell* 35 (3), S. 269–280.

Wang, M.; Jin, Y.; Fu, J.; Zhu, Y.; Zheng, J.; Hu, J.; Wang, G. (2008): Genome-wide analysis of SINA family in plants and their phylogenetic relationships. In: *DNA Sequence* 19 (3), S. 206–216.

Wang, P.; Xue, L.; Batelli, G.; Lee, S.; Hou, Y.-J.; van Oosten, M. J.; Zhang, H.; Tao, W. Andy; Zhu, J.-K. (2013b): Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (27), S. 11205–11210.

Wang, X.; Wang, X.; Hu, Q.; Dai, X.; Tian, H.; Zheng, K.; Wang, X.; Mao, T.; Chen, J.-G.; Wang, S. (2015b): Characterization of an activation-tagged mutant uncovers a role of GLABRA2 in anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. In: *The Plant Journal* 83 (2), S. 300–311.

Wang, Y. H.; Irving, H. R. (2011): Developing a model of plant hormone interactions. In: *Plant Signaling & Behavior* 6 (4), S. 494–500.

Wasilewska, A.; Vlad, F.; Sirichandra, C.; Redko, Y.; Jammes, F.; Valon, C.; Frei dit Frey, N.; Leung, J. (2008): An update on abscisic acid signaling in plants and more... In: *Molecular Plant* 1 (2), S. 198–217.

Wasternack, C.; Hause, B. (2013): Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. In: *Annals of Botany* 111 (6), S. 1021–1058.

Wenkel, S.; Emery, J.; Hou, B.-H.; Evans, M. M. S.; Barton, M. K. (2007): A feedback regulatory module formed by LITTLE ZIPPER and HD-ZIPIII genes. In: *The Plant Cell* 19 (11), S. 3379–3390.

Widholm, J. M. (1972): The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. In: *Stain Technology* 47 (4), S. 189–194.

Winston, R. L.; Gottesfeld, J. M. (2000): Rapid identification of key amino-acid–DNA contacts through combinatorial peptide synthesis. In: *Chemistry & Biology* 7 (4), S. 245–251.

Winter, D.; Vinegar, B.; Nahal, H.; Ammar, R.; Wilson, G. V.; Provart, N. J. (2007): An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. In: *PLOS ONE* 2 (8), e718.

Woodward, C.; Bemis, S. M.; Hill, E. J.; Sawa, S.; Koshiba, T.; Torii, K. U. (2005): Interaction of auxin and ERECTA in elaborating Arabidopsis inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. In: *Plant Physiology* 139 (1), S. 192–203.

Xie, T.; Ren, R.; Zhang, Y.-Y.; Pang, Y.; Yan, C.; Gong, X.; He, Y.; Li, W.; Miao, D.; Hao, Q.; Deng, H.; Wang, Z.; Wu, J.-W.; 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. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (1), S. 794–802.

Xiong, L.; Ishitani, M.; Lee, H.; Zhu, J.-K. (2001): The Arabidopsis *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress– and osmotic stress–responsive gene expression. In: *The Plant Cell* 13 (9), S. 2063–2083.

Xu, F.; Kapos, P.; Cheng, Y. T.; Li, M.; Zhang, Y.; Li, X. (2014): NLR-associating transcription factor bHLH84 and its paralogs function redundantly in plant immunity. In: *PLOS Pathogens* 10 (8), e1004312.

Xu, J.; Meng, J.; Meng, X.; Zhao, Y.; Liu, J.; Sun, T.; Liu, Y.; Wang, Q.; Zhang, S. (2016): Pathogen-responsive MPK3 and MPK6 reprogram the biosynthesis of indole glucosinolates and their derivatives in Arabidopsis immunity. In: *The Plant Cell* 28 (5), S. 1144–1162.

Xu, Z.-Y.; Lee, K. H.; Dong, T.; Jeong, J. C.; Jin, J. B.; Kanno, Y.; Kim, D. H.; Kim, S. Y.; Seo, M.; Bressan, R. A.; Yun, D.-J.; Hwang, I. (2012): A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 24 (5), S. 2184–2199.

Xue, T.; Wang, D.; Zhang, S.; Ehltling, J.; Ni, F.; Jakab, S.; Zheng, C.; Zhong, Y. (2008): Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. In: *BMC Genomics* 9, Nr. 550.

Yamada, K.; Lim, J.; Dale, J. M.; Chen, H.; Shinn, P.; Palm, C. J.; Southwick, A. M.; Wu, H. C.; Kim, C.; Nguyen, M.; Pham, P.; Cheuk, R.; Karlin-Newmann, G.; Liu, S. X.; Lam, B.; Sakano, H.; Wu, T.; Yu, G.; Miranda, M.; Quach, H. L.; Tripp, M.; Chang, C. H.; Lee, J. M.; Toriumi, M.; Chan, M. M. H.; Tang, C.; Onodera, C. S.; Deng, J. M.; Akiyama, K.; Ansari, Y.; Arakawa, T.; Banh, J.; Banno, F.; Bowser, L.; Brooks, S.; Carninci, P.; Chao, Q.; Choy, N.; Enju, A.; Goldsmith, A. D.; Gurjal, M.; Hansen, N. F.; Hayashizaki, Y.; Johnson-Hopson, C.; Hsuan, V. W.; Iida, K.; Karnes, M.; Khan, S.; Koesema, E.; Ishida, J.; Jiang, P. X.; Jones, T.; Kawai, J.; Kamiya, A.; Meyers, C.; Nakajima, M.; Narusaka, M.; Seki, M.; Sakurai, T.; Satou, M.; Tamse, R.; Vaysberg, M.; Wallender, E. K.; Wong, C.; Yamamura, Y.; Yuan, S.; Shinozaki, K.; Davis, R. W.; Theologis, A.; Ecker, J. R. (2003): Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. In: *Science* 302, S. 842–846.

Yamaguchi, M.; Mitsuda, N.; Ohtani, M.; Ohme-Takagi, M.; Kato, K.; Demura, T. (2011): VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. In: *The Plant Journal* 66 (4), S. 579–590.

Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (1993a): *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. In: *Plant Physiology* 101 (3), S. 1119–1120.

- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (1993b):** Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. In: *Molecular Genetic and Genomics* 236 (2-3), S. 331–340.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (1993c):** The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. In: *Molecular Genetic and Genomics* 238 (1-2), S. 17–25.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (1994):** A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. In: *The Plant Cell* 6 (2), S. 251–264.
- Yan, J.; Zhang, C.; Gu, M.; Bai, Z.; Zhang, W.; Qi, T.; Cheng, Z.; Peng, W.; Luo, H.; Nan, F.; Wang, Z.; Xie, D. (2009):** The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. In: *The Plant Cell* 21 (8), S. 2220–2236.
- Yang, M.; Li, C.; Cai, Z.; Hu, Y.; Nolan, T.; Yu, F.; Yin, Y.; Xie, Q.; Tang, G.; Wang, X. (2017):** SINAT E3 ligases control the light-mediated stability of the brassinosteroid-activated transcription factor BES1 in *Arabidopsis*. In: *Developmental Cell* 41 (1), S. 47–58.
- Yang, Y.; Costa, A.; Leonhardt, N.; Siegel, R. S.; Schroeder, J. I. (2008):** Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. In: *Plant Methods* 4, Nr. 6.
- Yates, G.; Srivastava, A. K.; Sadanandom, A. (2016):** SUMO proteases: uncovering the roles of deSUMOylation in plants. In: *Journal of Experimental Botany* 67 (9), S. 2541–2548.
- Yilmaz, A.; Mejia-Guerra, M. K.; Kurz, K.; Liang, X.; Welch, L.; Grotewold, E. (2011):** AGRIS: the *Arabidopsis* gene regulatory information server, an update. In: *Nucleic Acids Research* 39 (Database Issue), S. 1118–1122.
- 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. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (12), S. 1230–1236.
- Yoo, S.-D.; Cho, Y.-H.; Sheen, J. (2007):** *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. In: *Nature Protocols* 2 (7), S. 1565–1572.
- Yoshida, R.; Hobo, T.; Ichimura, K.; Mizoguchi, T.; Takahashi, F.; Aronso, J.; Ecker, J. R.; Shinozaki, K. (2002):** ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell Physiology* 43 (12), S. 1473–1483.
- Yoshida, T.; Christmann, A.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Grill, E.; Fernie, A. R. (2019):** Revisiting the basal role of ABA - roles outside of stress. In: *Trends in Plant Science* 24 (7), S. 625–635.
- Yoshida, T.; Fujita, Y.; Maruyama, K.; Mogami, J.; Todaka, D.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015):** Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. In: *Plant, Cell & Environment* 38 (1), S. 35–49.
- 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. In: *The Plant Journal* 61 (4), S. 672–685.
- Zechman, A.; Grafi, G. (2003):** Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. In: *The Plant Journal* 34 (5), S. 565–572.
- Zeevaert, J.; Creelman, R. (1988):** Metabolism and physiology of abscisic acid. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39 (1), S. 439–473.

- Zhang, F.; Wang, Y.; Li, G.; Tang, Y.; Kramer, E. M.; Tadege, M. (2014):** STENOFOLIA recruits TOPLESS to repress *ASYMMETRIC LEAVES2* at the leaf margin and promote leaf blade outgrowth in *Medicago truncatula*. In: *The Plant Cell* 26 (2), S. 650–664.
- Zhang, M.; Fan, J.; Taylor, D. C.; Ohlrogge, J. B. (2009):** *DGAT1* and *PDAT1* acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. In: *The Plant Cell* 21 (12), S. 3885–3901.
- Zhang, W.; Ruan, J.; Ho, T.-H. D.; You, Y.; Yu, T.; Quatrano, R. S. (2005):** Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *Bioinformatics* 21 (14), S. 3074–3081.
- Zhang, X.; Henriques, R.; Lin, S.-S.; Niu, Q.-W.; Chua, N.-H. (2006):** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. In: *Nature Protocols* 1 (2), S. 641–646.
- Zhao, Y. (2010):** Auxin biosynthesis and its role in plant development. In: *Annual Review of Plant Biology* 61, S. 49–64.
- Zheng, C.; Acheampong, A. K.; Shi, Z.; Mugzech, A.; Halaly-Basha, T.; Shaya, F.; Sun, Y.; Colova, V.; Mosquna, A.; Ophir, R.; Galbraith, D. W.; Or, E. (2018):** Abscisic acid catabolism enhances dormancy release of grapevine buds. In: *Plant, Cell & Environment* 41 (10), S. 2490–2503.
- Zhong, R.; Ye, Z.-H. (1999):** *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain–leucine zipper protein. In: *The Plant Cell* 11, S. 2139–2152.
- Zhong, R.; Ye, Z.-H. (2001):** Alteration of Auxin polar transport in the *Arabidopsis ifl1* mutants. In: *Plant Physiology* 126 (2), S. 549–563.
- Zhou, T.; Shen, N.; Yang, L.; Abe, N.; Horton, J.; Mann, R. S.; Bussemaker, H. J.; Gordân, R.; Rohs, R. (2015):** Quantitative modeling of transcription factor binding specificities using DNA shape. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (15), S. 4654–4659.
- Zhou, Y.; Zhang, D.; An, J.; Yin, H.; Fang, S.; Chu, J.; Zhao, Y.; Li, J. (2018):** TCP transcription factors regulate shade avoidance via directly mediating the expression of both *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* and auxin biosynthetic genes. In: *Plant Physiology* 176 (2), S. 1850–1861.
- Zhu, J.-K. (2002):** Salt and drought stress signal transduction in plants. In: *Annual Review of Plant Biology* 53, S. 247–273.
- Zhu, Q.; Zhang, J.; Gao, X.; Tong, J.; Xiao, L.; Li, W.; Zhang, H. (2010a):** The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor *RAP2.6* participates in ABA, salt and osmotic stress responses. In: *Gene* 457 (1-2), S. 1–12.
- Zhu, Z.; Xu, F.; Zhang, Y.; Cheng, Y. Ti; Wiermer, M.; Li, X.; Zhang, Y. (2010b):** *Arabidopsis* resistance protein *SNC1* activates immune responses through association with a transcriptional corepressor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (31), S. 13960–13965.
- Zuckerkindl, E.; Pauling, L. (1965):** Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. In: V. Bryson und H. J. Vogel (Hg.): *Evolving Genes and Proteins*. A Symposium Held at the Institute of Microbiology of Rutgers the State University with Support from the National Science Foundation. Burlington: Elsevier Science, S. 97–166.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susan Ibe
Geburtstag: 18.09.1990
Geburtsort: Eisenach
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung/akademischer Werdegang

seit 04/15 Promotion am Lehrstuhl für Botanik
Technische Universität München

10/12 – 01/15 Technische Universität Dresden, Biologie
Abschluss: Master of Science
Thema der Abschlussarbeit: „Funktionelle Analyse des selbst-spaltenden MIIA-Proteinlinkers“

10/09 – 09/12 Technische Universität Dresden, Biologie
Abschluss: Bachelor of Science
Thema der Abschlussarbeit: „Heterologe Expression des *Bradyrhizobium japonicum*-Proteins Pgl in *Escherichia coli*“

08/03 – 06/09 Philipp-Melanchthon-Gymnasium, Gerstungen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Leistungskurse: Mathematik und Biologie

08/01 – 07/03 Eltetschule – Staatliche Regelschule Oberellen

Publikationen

Ibe, S.; Huang, J.; Groß, L.; Mucha, S.; Christmann, A.; Grill, E. (2019): JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE 2 (JAM2) – a bHLH transcription factor with a inhibitory role in JA signaling is an activator of ABA signaling. In Erstellung.

Ibe, S.; Schirrmeister, J.; Zehner, S. (2015): Single step purification of recombinant proteins using the metal ion-inducible autocleavage (MIIA) domain as linker for tag removal. *Journal of Biotechnology*, 208, S. 22-27.

Danksagung

Dies sind wohl die Seiten, die – auch wenn es das Wissenschaftler Herz schmerzt – von den meisten Lesern studiert werden. Doch wer diese zwei Seiten aufsucht, weiß, dass die Erarbeitung dieser letzten Seiten am aufwendigsten war. Diese Seiten tragen unzählige Stunden auf sich, in denen jeder Samen einzeln und ganz für sich alleine ausgebracht wurde, Keimlinge behutsam das Medium wechselten, Protoplasten mit Hingabe transfiziert wurden, der Duft von Bakterien- und Hefekulturen allgegenwärtig war, Messgeräte keine Ruhe fanden, Publikationen beim Lesen ihre Buchstaben verloren, die Haarfarbe eine neue Erfahrungsstufe annahm und Nächte in Gedanken gefangen vorübergingen. Diese Seiten durften erst entstehen, als weitere Stunden des Sortierens, des Strukturierens, des Überdenkens, des Neuarrangierens, des Streichens und des schließlich Formulierens diese Seiten freigaben. Weil ich beim Durchleben dieser Stunden bis zu diesen beiden Seiten nie alleine gelassen wurde, möchte ich meinen Begleitern Danke sagen:

Ein großer Dank gilt Dr. Alexander Christmann und Prof. Dr. Erwin Grill für die Möglichkeit, diese vielen Stunden für das Thema aufbringen zu dürfen, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung sowie für die Freiräume in der Projektplanung, durch die ich mich weiterentwickeln konnte.

Dr. Ina-Gabriele Richter von der fzmb GmbH in Bad Langensalza möchte ich für Ihre Zeit und Unterstützung als Mentorin danken. Du hattest stets einen Ratschlag für mich parat und hast mich dadurch vorangebracht.

Liebe Claudia und liebe Lisa Held, die Hilfsbereitschaft, die Ihr mir entgegengebracht habt, ist nicht mit Gold aufzuwiegen. Ohne Eure Unterstützung würde ich noch immer mit der Pflege der Pflanzen, der Saatguternte oder mit der einen oder anderen Klonierung beschäftigt sein. Auch auf Euch, Chrisi, Sepp und Korn, konnte ich immer zählen. Ihr habt meinen Arbeitsplatz so angenehm wie möglich gestaltet und immer dafür gesorgt, dass alles, was ich für meine Experimente benötigte, zur Verfügung stand. Mareen, uns verbindet im Labor vor allem die Vorliebe für leuchtende Keimlinge. Der Austausch mit Dir war eine Bereicherung und auf Deine sorgfältige Arbeitsweise ist immer Verlass. Beate, Lisa Berngeherer und Ulrike, Ihr habt immer eine unkomplizierte Lösung in bürokratischen Fragen parat gehabt.

Düschi und Michl, die unangefochtenen Meister der Protoplastentransfektion, Ihr habt mich in Eurem Handwerk gelehrt. Ohne Euer Zutun hätten viele meiner Ergebnisse nicht entstehen

können. Mit Annelie, Franzi, Lisa Groß und Martin würde ich jederzeit wieder Büro und Labor teilen. In Eurem Umfeld haben sich Knoten in meinen Gedanken gelöst und Ideen sind entstanden. Die Freude, die Ihr verbreitet, hat den ein oder anderen misslungenen Versuch auf humorvolle Art erträglich gemacht.

Den „Bontany Allstars and Friends“ möchte ich für die entspannenden Stunden im Kino, am See, auf Ausflügen, an Spieleabenden, in der Boulderhalle, beim Kochen, Grillen, Eierfärben oder einfach nur beim Kaffeetrinken danken. Wenn nichts mehr ging, ging danach alles besser!

Ganz besonders möchte ich aber meinem Partner Johannes, meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Patenkindern sowie meinen weiteren Familienmitgliedern danken. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen. Ihr seid mein Wasser, mein Licht, meine Luft und meine Erde. Ihr gebt mir Mut und Kraft!