

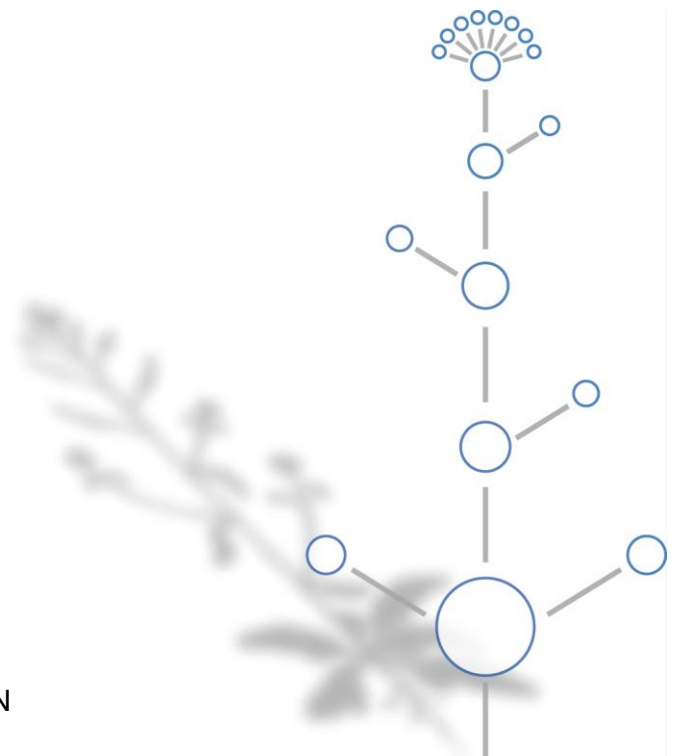


DISSERTATION

Rekonstruktion und Charakterisierung
der Signalkaskade des
Phytohormones Abscisinsäure in Hefe

2017

MORITZ RUSCHHAUPT
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Technische Universität München

Lehrstuhl für Botanik

Rekonstruktion und Charakterisierung der Signalkaskade des
Phytohormones Abscisinsäure in Hefe

Moritz Ruschhaupt

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. Ralph Hückelhoven

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Erwin Grill
2. Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer
3. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 02.08.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.12.2017 angenommen.

I. INHALTSVERZEICHNIS

<u>I. INHALTSVERZEICHNIS.....</u>	<u>1</u>
<u>II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>6</u>
<u>III. ABKÜRZUNGEN.....</u>	<u>8</u>
<u>IV. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>10</u>
<u>V. SUMMARY.....</u>	<u>12</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>14</u>
1.1 ABIOTISCHER STRESS IN PFLANZEN	14
1.2 ABA-BIOSYNTHESE, -KATABOLISMUS UND -TRANSPORT.....	16
1.3 DIE ABA-SIGNALKASKADE.....	18
1.4 ABA-ABHÄNGIGE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.....	20
1.5 EUKARYOTISCHE PROTEINKINASEN.....	23
1.6 PROTEINKINASEN DER ABA-ABHÄNGIGEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.....	24
1.6.1 <i>SUCROSE-NON-FERMENTING (SNF1)-RELATED PROTEIN KINASES 2 (SNRK2)</i>	25
1.6.2 DIE Ca^{2+} - UND ABA-ANTWORT SIND ENG MITEINANDER VERKNÜPFT	29
1.6.3 <i>CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASES (CPKS)</i>	30
1.6.4 <i>CBL-INTERACTING PROTEIN KINASES (CIPK)</i>	33
1.7 DER ABSCISINSÄURE-REZEPTORKOMPLEXES.....	34
1.8 REKONSTRUKTION DER ABA-SIGNALTRANSDUKTION IN HEFE.....	37
1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	40

2	ERGEBNISSE	41
2.1	ETABLIERUNG DES ABA-TRANSAKTIVIERUNGSASSAYS IN HEFE	41
2.1.1	KONSTRUKTION DES SYNTHETISCHEN ABA-RESPONSEPROMOTORS (pSAR)	42
2.1.2	BINDUNGSSTUDIE DER ABA-ABHÄNGIGEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	42
2.2	TRANSAKTIVIERUNG MIT SNRK2-PROTEINKINASEN	44
2.2.1	TRANSAKTIVIERUNG VON ABF2 DURCH SNRK2.6	45
2.2.2	GALAKTOSE INDUKTION DER PROTEINKINASE	46
2.2.3	QUALITATIVE ANALYSE DER <i>IN VIVO</i> LUCIFERASE QUANTIFIZIERUNG	47
2.2.4	EXPRESSIONSZEITREIHE DER pSAR-INDUKTION	48
2.2.5	TRANSAKTIVIERUNG DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DURCH DIE PROTEINKINASE	50
2.2.6	TRANSAKTIVIERUNG VON ABF4 DURCH SNRK2 PROTEINKINASEN	51
2.2.7	SPEZIFITÄT DER ABF-TRANSAKTIVIERUNG DURCH SNRK2s	53
2.2.8	AKTIVIERUNG DER SNRK2.2 UND 2.3 DURCH DIE PROTEINKINASE BIN2	55
2.3	TRANSAKTIVIERUNG MIT CA²⁺-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASEN (CPKs)	56
2.3.1	ABF2-TRANSAKTIVIERUNG MIT CPK23	56
2.3.2	CA ²⁺ -AKTIVIERUNG DER CPK23 IN HEFE	58
2.3.3	INTERMOLEKULARE REGULATION DER CPK23 DURCH IHREN N-TERMINUS	59
2.3.4	ABF-TRANSAKTIVIERUNG DURCH ANDERE CPKS IN HEFE	66
2.4	ABF-PHOSPHORYLIERUNG IN HEFE	67
2.4.1	ABF2 PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN	67
2.4.2	TRANSAKTIVIERUNG VON ABF2-PHOSPHOSITE-MUTANTEN	69
2.4.3	ADDITIVE TRANSAKTIVIERUNG VON ABF2 DURCH CPK23 UND SNRK2.6	72
2.5	REGULATION DER ABA-ANTWORT DURCH CBL-INTERAGIERENDE PROTEINKINASEN (CIPKS)	74
2.5.1	EINFLUSS DER CIPKS AUF DIE ABA-ABHÄNGIGE KEIMUNG	75
2.5.2	REGULATION DER ABA-SIGNALKASKADE DURCH CIPKS	76

INHALTSVERZEICHNIS

2.5.3	EINFLUSS DER CIPKS AUF DIE PP2C VERMITTELTE ABA-ANTWORT.....	81
2.6	REKONSTRUKTION DER ABA-SIGNALKASKADE IN HEFE	85
2.6.1	REGULATION DER PROTEINKINASEN DURCH PROTEIN-PHOSPHATASEN (PP2Cs).....	85
2.6.2	REKONSTRUKTION DES FUNKTIONELLEN ABA-HOLOREZEPTORS IN HEFE	87
2.6.3	STÖCHIOMETRISCHE OPTIMIERUNG DER ABA-REZEPTORKOMPONENTEN.....	89
2.6.4	EINFLUSS DER REGULATORISCHEN DOMÄNEN DER PROTEIN-PHOSPHATASE	91
2.6.5	CHARAKTERISIERUNG DER ABA-HOLOREZEPTOREN IN HEFE.....	94
3	<u>DISKUSSION.....</u>	99
3.1	MEHR ALS NUR BINDUNG - REGULATION EUKARYOTISCHER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	99
3.2	PROTEINKINASEN - HOCH REGULIERTE SCHALTZENTRALEN.....	104
3.3	REKONSTRUKTION DER ABA-SIGNALKASKADE IN HEFE	117
3.4	POTENTIAL DES HETEROLOGEN HEFESYSTEMS	122
4	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	126
4.1	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	126
4.2	GERÄTE.....	126
4.3	SOFTWARE UND DATENBANKEN.....	127
4.4	VERWENDETE MIKROORGANISMEN UND PFLANZEN LINIEN.....	128
4.5	ANALYSIERTE GENE.....	129
4.6	KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN	130
4.6.1	KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i>	130
4.6.2	KULTIVIERUNG VON <i>S. CEREVISIAE</i>	131
4.7	ARBEITEN MIT DNA.....	132
4.7.1	PLASMID PRÄPARATION AUS <i>E. COLI</i>	132
4.7.2	PLASMID PRÄPARATION AUS <i>S. CEREVISIAE</i>	132

INHALTSVERZEICHNIS

4.7.3	RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA	132
4.7.4	DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA	132
4.7.5	LIGATION MIT T4-DNA-LIGASE.....	132
4.7.6	GOLDEN-GATE KLONIERUNG	133
4.7.7	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	134
4.7.8	AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN	134
4.7.9	POLYMERASE KETTENREAKTION	134
4.7.10	KOLONIE-PCR.....	134
4.7.11	ZIEL GERICHTETE MUTAGENESE (SDM).....	135
4.7.12	GOLDEN-GATE BASIERENDE ZIELGERICHTETE MUTAGENESE	135
4.7.13	<i>DRAG&DROP</i> KLONIERUNG IN HEFE	136
4.8	ARBEITEN MIT PROTEINEN	136
4.8.1	PROTEINEXPRESSION UND PROTEINAUFREINIGUNG AUS <i>E. COLI</i>	136
4.8.2	PROTEINEXPRESSION IN HEFE.....	137
4.8.3	SDS-PAGE	138
4.8.4	ANTIKÖRPER BASIERENDER PROTEIN-NACHWEIS.....	138
4.8.5	KINASEASSAY	139
4.9	ARBEITEN MIT HEFE	139
4.9.1	HEFE-TRANSFORMATION	139
4.9.2	KONSTRUKTION DES SYNTHETISCHEN-ABA-RESPONSEPROMOTORS (PSAR)	139
4.9.3	INTEGRATION DES PSAR IN HEFE	140
4.9.4	PSAR-TRANSAKTIVIERUNGS-LUCIFERASE-ASSAY (PSAR-TLA).....	140
4.9.5	PSAR-BINDESTUDIEN (YEAST ONE HYBRID Y1H)	142
4.10	ARBEITEN MIT PROTOPLASTEN.....	142
4.10.1	HERSTELLUNG DER ENZYMLÖSUNG FÜR DIE PROTOPLASTENPRÄPARATION	143
4.10.2	PROTOPLASTENPRÄPARATION UND TRANSFEKTION.....	143

4.11	ARBEITEN MIT PFLANZEN	144
4.11.1	ANZUCHTBEDINGUNGEN	144
4.11.2	SAMENSTERILISATION.....	145
4.11.3	KEIMUNGSVERSUCHE	145
5	<u>ANHANG</u>	146
5.1	AD-ABF4 AKTIVIERUNG	146
5.2	PHBBE-REPORTERSYSTEM IN HEFE	147
5.2.1	GALACTOSE INDUKTIONSREIHE DES PGAL1:ATHB6	147
5.2.2	TRANSAKTIVIERUNG VON ATHB6 DURCH CIPK14 IN HEFE	147
5.3	ABA-ABHÄNGIGE REGULATION DER AKTIVEN SNRK2s IM PSAR-TLA	148
5.4	SNRK2 PROTEIN ALIGNMENT	149
5.5	CPK/CDPK PROTEIN ALIGNMENT	151
5.6	ABA UND PYRABACTIN TITRATION IM PSAR-TLA	153
5.7	SEQUENZ DES PSAR	154
5.8	VERWENDETE PLASMIDE	155
5.9	VERWENDETE PRIMER	160
6	<u>LITERATUR</u>	167
7	<u>DANKSAGUNG</u>	186
8	<u>LEBENS LAUF</u>	187

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1 Ernteverluste durch abiotischen und biotischen Stress	14
Abb. 1-2 ABA Biosynthese und Katabolismus.....	17
Abb. 1-3 Vereinfachte ABA-Signalkaskade	19
Abb. 1-4 Schematisches Model der Transkriptionsfaktor-Regulation bei Trockenstress	22
Abb. 1-5 Struktureller Aufbau der SnRK2.6	26
Abb. 1-6 SnRK2.6 Protein-Protein Interaktionen.....	28
Abb. 1-7 Ca ²⁺ -Sensorproteine in Pflanzen	30
Abb. 1-8 Phylogenetischer Stammbaum der CPKs aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
Abb. 1-9 Strukturelle Darstellung des PP2C-RCAR/SnRK2 Komplexes	36
Abb. 2-1 Aufbau des synthetischen ABA-Responsepromotors (pSAR).....	42
Abb. 2-2 ABF-Transaktivierung des pSAR	43
Abb. 2-3 Schematischer Aufbau der Proteinkinase SnRK2.6.....	44
Abb. 2-4 Cotransformation von ABF2 mit verschiedenen SnRK2.6 Varianten in Hefe	45
Abb. 2-5 pGAL1:SnRK2.6 Galactose Titrationsreihe in pSAR-Reporterhefen	46
Abb. 2-6 Verdünnungsreihe der induzierten pSAR-Reporterhefen.....	48
Abb. 2-7 Zeitreihe der ABF2-Induktion durch SnRK2.6 und SnRK2.6Δ320	49
Abb. 2-8 Transaktivierung der pSAR-bindenden Transkriptionsfaktoren durch SnRK2.6.....	50
Abb. 2-9 Alignment der SnRK2-Box.....	52
Abb. 2-10 ABF4-Transaktivierung durch die SnRK2 Familie	53
Abb. 2-11 ABF-Transaktivierung mit SnRK2.2, 2.3, 2.1, 2.4 und 2.5	54
Abb. 2-12 Regulation der SnRK2.6, 2.2 und 2.3 durch BIN2.....	55
Abb. 2-13 Schematischer Aufbau der Proteinkinase CPK23.....	56
Abb. 2-14 Transaktivierung von ABF2 durch CPK23.....	57
Abb. 2-15 Ca ²⁺ -Induktion der CPK23.....	58
Abb. 2-16 ABF2-Transaktivierung durch verschiedene Vektorvarianten der CPK23-vk.....	59
Abb. 2-17 Regulation der CPK23-vk Aktivität durch N-terminale Fusion in Hefe	60
Abb. 2-18 Struktureller Aufbau des N-Terminus der CPK23	62
Abb. 2-19 Einfluss des N-Terminus auf die Aktivität der CPK23 in Hefe.....	63
Abb. 2-20 Einfluss N-terminaler Veränderungen auf die CPK23-vk Aktivität in Arabidopsis Protoplasten	65
Abb. 2-21 CPK-Abundanz und Transaktivierung in pSAR-Reporterhefen.....	66
Abb. 2-22 Potentielle Phosphorylierungsstellen in ABF2.....	67
Abb. 2-23 pSAR-Transaktivierung durch ABF2-Phosphosite-Mutanten	69
Abb. 2-24 Transaktivierung der ABF2-Phospho-(mimic)-Mutanten durch SnRK2.6 und CPK23	71
Abb. 2-25 Transaktivierung von ABF2 S86 + S94 Doppelmutanten	72
Abb. 2-26 ABF2-Transaktivierung mit CPK23 und SnRK2.6	73

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2-27 Struktureller Aufbau der CIPK14 und seines Interaktionspartners CBL2.....	74
Abb. 2-28 Einfluss der CIPK2, 11 und 14 auf die ABA-abhängige Keimung.....	75
Abb. 2-29 Transaktivierung der ABA-Signalkaskade durch CIPK 2, 11 und 14 in At Protoplasten	76
Abb. 2-30 Regulation der ABFs durch CIPK11 und 14 in Arabidopsis Protoplasten	77
Abb. 2-31 <i>In vitro</i> Kinaseassay mit CIPK14 WT, CIPK14-ka und CIPK14-na.....	78
Abb. 2-32 Einfluss der Kinaseaktivität auf den CIPK14 Effekt in Arabidopsis Protoplasten.....	79
Abb. 2-33 Transaktivierung der ABFs in pSAR-Reporterhefen durch CIPK11 und CIPK14.....	81
Abb. 2-34 Y2H-Interaktionsstudie zwischen CIPK14 und Protein Phosphatasen (PP2Cs)	82
Abb. 2-35 Einfluss der PP2Cs auf die CIPK14 <i>in vitro</i> Kinase-Aktivität	83
Abb. 2-36 Regulation der PP2C-Inhibierung durch CIPK14	84
Abb. 2-37 Inhibierung der SnRK2.6-Transaktivierung durch ABI1.....	86
Abb. 2-38 PP2C Inhibierung des durch SnRK2.6 oder CPK23 aktivierten ABF2.....	87
Abb. 2-39 ABA-abhängige Regulation der SnRK2.6Δ331 durch den ABA-Rezeptorkomplex	88
Abb. 2-40 Optimierung der ABI1-Promotorstärke.....	90
Abb. 2-41 Optimierung der RCAR11-Promotorstärke.....	91
Abb. 2-42 Einfluss der regulatorischen ABI1-Domänen auf die SnRK2.6-Inhibierung	93
Abb. 2-43 ABA-abhängige Induktion des pSAR mit optimierten Effektoren	94
Abb. 2-44 ABA-Titration in pSAR-Reporterhefen.....	96
Abb. 2-45 ABI1-RCAR Corezeptoren im pSAR-TLA	98
Abb. 3-1 Schematische Darstellung einer möglichen ABF2-Aktivierung	102
Abb. 3-2 Modell der SnRK2 Aktivierung	107
Abb. 3-3 Unterschied der SnRK2-Aktivierung.....	109
Abb. 3-4 Model der CPK23-Aktivierung.....	113
Abb. 3-5 Protein Alignment der PP2Cs	118
Abb. 3-6 Vergleich der RCAR abhängigen Regulation der ABA-Signalkaskade im pSAR-TLA und Arabidopsis Protoplasten.....	121
Abb. 3-7 schematische Darstellung der heterologen Rekonstruktion der ABA-Signalkaskade in Hefe.....	123
Abb. 4-1 Abhängigkeit des Luciferasesignals und der Abs ₆₀₀ von der Dichte der Hefekultur.....	142
Abb. 5-1 Einfluss der ABF4-pSAR Bindung durch SnRK2.6	146
Abb. 5-2 pGAL1:HB6 Galactose Induktionsreihe in pHBBE-Reporterhefen	147
Abb. 5-3 Regulation von AtHB6 durch CIPK14 in Hefe	147
Abb. 5-4 ABA-abhängige Regulation der aktiven SnRK2s im pSAR-TLA	148
Abb. 5-5 Aminosäure Sequenz Alignment der SnRK2-Familie	150
Abb. 5-6 Proteinalignment des CPK/CDPK N-Terminus	152
Abb. 5-7 Liganden-Titration im pSAR-TLA	153

III. ABKÜRZUNGEN

3AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
95% Konf. Int.	95%ige Konfidenzintervall
Abs	(Licht)-Absorption
AC ₅₀	halb aktivierende Konzentration, <i>activating Concentration for 50%</i>
AG	Arbeitsgruppe
AGC	PKC-Kinase Familie (PKA, PKG, cAPK)
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ /CaM abhängige Kinase
CBL	<i>Calmodulin B-like</i>
CCaMK	<i>Calcium- and Calmodulin-Dependent Protein Kinase</i>
CDK1	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CDPK	<i>Calcium-Dependent Protein Kinase</i>
CIPK	<i>CBL-Interacting Protein Kinase</i>
cis	lat. für diesseits, im Molekül selbst
CMGC	<i>Cyclin-Dependent and Mitogen-Activated Protein Kinase-Family</i>
CML	<i>Calmodulin-like</i>
DI	SnRK2 regulatorische Domäne I, SnRK2-Box
DII	SnRK2 regulatorische Domäne II, ABA-Box
DTT	Dithiothreitol
Fw	<i>Forward</i> / Primer am 5' Ende
Gal	Galaktose
Glu	Glucose
i. d. R.	in der Regel
KO	Genverlust (<i>Knock out</i> /null-Allel)
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LUC	Luciferase
LV	Leervektor
MAP2K	MAPK-Kinase
MAP3K	MAP2K-Kinase
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBP	<i>Mylic Basic Protein</i>
OD	optische Dichte
PAGE	<i>Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis</i>
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
Pol	Polymerase
PP	Protoplasten

ABKÜRZUNGEN

PP2C	<i>Protein Phosphatase 2C</i>
PPI	Proteinphosphatase Interaktionsdomäne
PS	Pseudo-Substrat
pSAR	synthetischer ABA-Response-Promotor
pSAR-Reporterhefe	<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A mit integriertem pSAR
pSAR-TLA	pSAR-Transaktivierungs-Luciferase-Assay
P-site	Phosphorylierungsstelle eines Proteins
Raff	Raffinose
RCAR	<i>Regulatory Component of ABA-Receptor</i>
Rev	Reverse / Primer am 3' Ende
rLUC	relatives Luciferasesignal
RT	Raum Temperatur (ca. 22 °C)
S/T-Proteinkinasen	Serin/Threonin Proteinkinasen
SD	Standardabweichung
SD-Medium	<i>Synthetic Defined</i> Kulturmedium für Hefe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNF1	<i>Sucrose Non Fermenting 1</i>
SnRK2	<i>SNF1-Related Protein Kinase 2</i>
STE	<i>S. cerevisiae steril kinases</i>
Ste7	<i>S. cerevisiae steril kinase 7</i>
TA	normierte Transaktivierungsleistung
trans	lat. für jenseits, in einem anderen Molekül
ü/N	über Nacht
vgl	vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Y2H	Yeast two hybrid
Zm	<i>Zea mays</i>

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) ist ein zentrales Signal der abiotischen Stressperzeption. Durch die schnelle Wahrnehmung des Stress-Signals gelingt es der Pflanze sich an die wechselnden Umweltbedingungen anzupassen. Seit der Entdeckung der Abscisinsäure-Rezeptoren sind alle Komponenten, die für die Perzeption und Weiterleitung des Signals nötig sind, bekannt. In der pflanzlichen Zelle wird dieser Signalweg aus vier Vertretern ABA-abhängiger Transkriptionsfaktoren (ABFs), zehn aktivierenden Proteinkinasen (SnRK2s), neun inhibitorischen Proteinphosphatasen (PP2Cs) und vierzehn ABA-bindenden Rezeptormolekülen (RCARs) gebildet. Aus diesen vier Klassen an Signalkomponenten wird die zentrale ABA-Signalkaskade gebildet, an deren Anfang die Bindung des Phytohormons und an deren Ende die Regulation der Gentranskription steht. Durch die lokale und temporäre Variation der einzelnen Faktoren ist es der Pflanze möglich, die Signalstärke der ABA-Antwort spezifisch zu modulieren und an die gegebenen Bedingungen anzupassen. Die große Anzahl und die hohe Redundanz der Signalkomponenten führen aber dazu, dass die Analyse der einzelnen Gene in der pflanzlichen Zelle komplex ist und es häufig schwierig ist klare Aussagen zu generieren.

Ziel dieser Studie war es, die ABA-Signalkaskade in einen heterologen Organismus zu überführen, um die Funktion und Regulation einzelner Signalkomponenten außerhalb der pflanzlichen Zelle analysieren zu können. Durch die Übertragung des pflanzlichen Signalweges in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen, welche einen synthetischen ABA-Responsepromotor (pSAR) enthielten, war es zum ersten Mal möglich die molekularen Funktionen und regulativen Mechanismen der Signalkomponenten ohne Einfluss des pflanzlichen Proteoms *in vivo* zu analysieren und neue Erkenntnisse zu gewinnen.

So konnte gezeigt werden, dass die ABFs auch über bisher nicht beschriebene SnRK2-Proteinkinasen und darüber hinaus auch über Calcium-abhängigen Proteinkinasen direkt aktiviert werden. Diese molekulare Verknüpfung des Ca²⁺-Signalweges mit dem ABA-Signalweg beweist zum ersten Mal, dass Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen direkt an der Regulation der ABA-abhängigen Gentranskription beteiligt sind. Phosphorylierungs- und Transaktivierungsstudien der ABFs mit SnRK2.6 und CPK23 belegten die Spezifität der ABF2-Phosphorylierung und deren additive Wirkung auf die ABF-Aktivierung.

Durch die Analyse der beiden Proteinkinasen im heterologen System gelang es für beide Proteinkinasen bisher unbekannte intramolekulare regulative Mechanismen zu finden. Vergleichende Studien in Hefe und in Arabidopsis-Protoplasten zeigten, dass CPK23 durch ihren eigenen N-Terminus

ZUSAMMENFASSUNG

inaktiviert wird, und dessen Modifikation zur Aktivierung der Proteinkinase notwendig ist. SnRK2.6 hingegen wird durch die C-terminal liegenden ABA-Box, welche als Interaktionsdomäne zwischen SnRK2.6 und den PP2Cs beschrieben war, in ihrer Aktivität gehemmt. Durch die Deletion der ABA-Box kam es zu einer beachtlichen Steigerung der Proteinkinase-Aktivität.

Durch die Rekonstruktion der ABA-Signaltransduktion in Hefe konnte erstmals eine komplette Phytohormon-Signalkaskade in einem nicht pflanzlichen Organismus nachgestellt werden. Dieses System ermöglichte es die ABA-abhängige Regulation der Signalkaskade *in vivo* zu messen. Durch ABA-Titrations in Hefe, die unterschiedliche Rezeptorkomponenten exprimierten, konnte erstmals die ABA-Affinität verschiedener Co-Rezeptoren *in vivo* erfasst werden. RCARs der Unterfamilie III zeigten eine strikte ABA-Abhängigkeit ihrer Aktivität, während RCARs der Unterfamilie I auch ohne ABA zu einer Induktion der ABA-Antwort führten. Die gute Übertragbarkeit der in Hefe gefundenen Erkenntnisse auf die Analysen in Arabidopsis-Protoplasten demonstrierte die hohe Aussagekraft der Ergebnisse. Zusammen mit dem breiten Spektrum an genetischen und molekularbiologischen Methoden und der einfachen Kultivierung hat das in dieser Arbeit etablierte Hefe-System ein hohes Potenzial die Forschung im Bereich der ABA-Signaltransduktion zu bereichern.

V. SUMMARY

The phytohormone abscisic acid (ABA) is a central signal of the abiotic stress response. The fast perception of this stress signal is the basis of the plants adaption to changing environmental conditions. Since the discovery of the ABA-receptors, all components responsible for the perception and transmission of this signal are known. In plants, this signalling cascade is composed of four ABA-dependent transcription factors (ABFs), ten activating protein kinases (SnRK2s), nine inhibitory protein phosphatases (PP2Cs) and fourteen ABA-binding receptors (RCARs). These four classes of signalling components form the core ABA signalling cascade that starts with the perception of ABA and ends with the control of gene transcription. By controlling the temporal and spatial expression of the signalling components, the plant is able to adjust the signalling cascade based on the surrounding conditions. The high amount and redundancy of the signalling components in the plant cell lead to complex analysis and make it challenging to draw clear conclusions from *in planta* experiments.

The goal of this study was to transfer the ABA signalling cascade to a heterologous organism in order to study the function and regulation of single factors outside of the plant cell. The reconstruction of the ABA signalling cascade in *Saccharomyces cerevisiae* encoding a synthetical ABA response promoter (pSAR) gave the possibility to analyze the molecular function and regulation of single signalling factors *in vivo* without being influenced by the plants proteome.

In this system, the direct activation of the ABF transcription factors could be demonstrated with SnRK2 protein kinases and Calcium Dependent Protein Kinases (CPKs). The connection between the Ca²⁺-signalling pathway and the ABA pathway demonstrates for the first time the direct regulation of ABA-dependent gene transcription by Ca²⁺-dependent protein kinases. ABF phosphorylation and transactivation studies demonstrated the specificity and additive ABF activation by both kinases.

Experiments with both protein kinases in yeast revealed so far unknown intermolecular regulations. Parallel studies in Arabidopsis protoplasts and yeast showed a regulation of the CPK23 kinase activity by its own N-terminus that needs to be modified to activate the kinase. In case of SnRK2.6 it could be demonstrated that the C-terminal ABA-box, that is important for the interaction between SnRK2.6 and PP2Cs, inhibits the kinase activity and that the deletion of the ABA-box leads to a hyperactive kinase.

The transfer of the ABA signalling pathway into yeast allowed the reconstruction of a complete phytohormone transduction cascade in a non-plant organism and gave the possibility to measure its ABA-dependent regulation *in vivo* for the first time. ABA titrations with yeast cells expressing different ABA coreceptors could demonstrate the variances in ABA affinity between different co-receptor-

complexes *in vivo*. Subclass III RCARs only activated the signalling cascade in combination with ABA while subclass I RCARs also showed activity without ABA. The good correspondence to similar experiments in Arabidopsis protoplast demonstrated the high significance of the yeast system. The wide range of molecular and genetic tools in yeast in combination with its easy cultivation makes the new developed yeast system a powerful tool in the field of ABA signal transduction research.

1 EINLEITUNG

1.1 Abiotischer Stress in Pflanzen

Abiotischer Stress, wie Trockenheit, Hitze, Kälte und Salzbelastungen des Bodens, beeinflusst das Wachstum der Kulturpflanzen und führt zu hohen Ernteverlusten weltweit (Sah et al., 2016; Vishwakarma et al., 2017). Zeitgleich verlangt die steigende Weltbevölkerung nach mehr und höherwertigen Nahrungsmitteln. Daraus ergibt sich eine Steigerung des Bedarfs an Nutzpflanzen zwischen 100 - 110 % im Zeitraum von 2005 bis 2050 (Godfray et al., 2010). Folgt die Welt dem aktuellen Trend der stärkeren Landnutzung in wohlhabenden Ländern (Agrar-Intensivierung) und Vergrößerung der Agrar-Fläche in ärmeren Ländern (Agrar-Expansion) wird die erhöhte Nachfrage nach Nahrungsmitteln zeitgleich zu einer katastrophalen Umweltbilanz führen (Tilman et al., 2011; Godfray et al., 2010; Burney et al., 2010). Nur durch den Import moderner Anbaumethoden in Ländern mit geringem Flächenertrag, der zeitgleichen Steigerung der Erträge auf den existierenden Flächen und

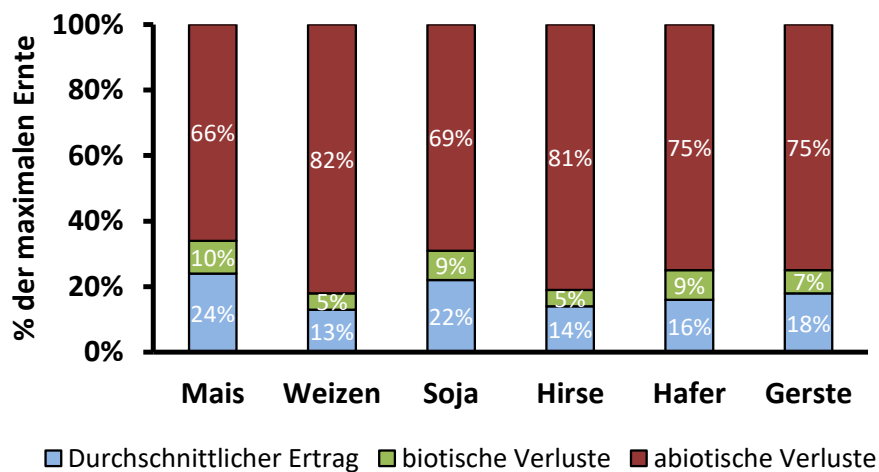


Abb. 1-1 Ernteverluste durch abiotischen und biotischen Stress

Durch abiotischen und biotischen Stress kommt es zu erheblichen Ernteverlusten in verschiedenen Kulturpflanzen. Bezogen auf den maximalen Flächenerträge, der mit den jeweiligen Agrarpflanzen erreicht wurden, kommt es durch abiotischen Stress zu 66 - 82 % Ernteverlust und durch biotischen Stress zu 5 - 10 %. Die Weltweit durchschnittliche Ernte liegt bei 13 - 24 % des maximal erreichten Flächenertrages und zeigt das große Potenzial, das durch Verbesserung der Anbaumethoden und durch stressresistente Agrarpflanzen erreichte werden kann.

Modifiziert nach Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000). Biochemistry & molecular biology of plants (Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists).

EINLEITUNG

der Nutzung von bisher unwirtschaftlichen Agrarflächen kann eine Versorgung der Weltbevölkerung mit hochwertigen Nahrungsmitteln auch in den nächsten 50 Jahren garantiert werden (Tilman et al., 2011). Während es Aufgabe der Politik ist, eine weltweit ökonomisch und ökologisch vertretbare Agrarlandschaft zu etablieren, kommt der Wissenschaft die schwierige Aufgabe zu, die bestehenden Nutzpflanzen weiter zu verbessern und an neue Habitats anzupassen. Betrachtet man die Ernteverluste durch externe Faktoren, führen abiotische Stressoren zu den dramatischsten Einbußen (Abb. 1-1). Verglichen mit Rekordernten, die man als ideale Wachstumsbedingungen ansehen kann, kommt es durch abiotische Stressoren zu massiven Ernteverlusten von 65 - 87 %, abhängig von der jeweiligen Nutzpflanze (Buchanan et al., 2015). Verglichen mit den 5 - 10 % Ernteverlust durch biotische Stressoren zeigt sich das immense Potenzial zur Verbesserung in diesem Bereich.

Bei der Anpassung der pflanzlichen Physiologie an abiotischen Stress spielt das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) eine entscheidende Rolle. ABA wurde zum ersten Mal 1963 durch Frederick Addicott und seinen Kollegen als *Abscisin II* beschrieben (Ohkuma et al., 1963). Zunächst wurde angenommen, dass ABA eine entscheidende Rolle bei der Abszission (Abwurf alter Organe oder reifer Früchte) junger Baumwollfrüchte spielt (Smith, 1969; Cracker and Abeles, 1969). Spätere Studien zeigten aber, dass ABA nicht direkt für die Abszission verantwortlich ist, sondern die Seneszenz fördert, die der Abszission vorausgeht (reviewed in Finkelstein, 2013). Besonders bei abiotischem Stress wie Trockenheit, Salzstress, osmotischen Stress und Kälte kommt es zur Akkumulation von ABA (Endo et al., 2008; Qin and Zeevaart, 1999) und der Anpassung der Pflanze an die veränderten physiologischen Bedingungen.

ABA ist das wichtigste Phytohormon der pflanzlichen abiotischen Stresstoleranz (Sah et al., 2016; Finkelstein, 2013; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Verma et al., 2016; Lee and Luan, 2012). Dabei führt ABA zu einer Vielzahl an physiologischen und molekularen Anpassungen, die es der Pflanze ermöglichen, besser unter Stressbedingungen zu überleben (Ng et al., 2014; Vishwakarma et al., 2017). Eine der ersten Reaktion der Pflanze auf ABA ist das Schließen der Stomata (Schroeder et al., 2001). Durch die Regulation des Ionen-Kanäle *Slow Anion Channel Associated 1* (SLAC1) und *Potassium Channels in Arabidopsis Thaliana 1* (KAT1) kommt es zur Depolarisation der Plasmamembran der Schließzellen (Schroeder et al., 2001; Schachtman et al., 1992; Vahisalu et al., 2008). Durch den darauf folgenden Wasserausstrom verliert die Schließzelle ihren Turgor und schließt sich (Schroeder et al., 2001).

Neben dieser schnellen Anpassung an die abiotischen Bedingungen kontrolliert ABA eine Reihe weiterer physiologischer Prozesse. Hohe Mengen an ABA sind maßgeblich für die Dormanz des Samens

verantwortlich. Hierbei tritt ABA als Gegenspieler des keimungsfördernden Phytohormones Gibberellin (GA) auf. Durch die ABA-abhängige Regulation der DELLA-Proteine, die zentralen Regulatoren der GA Antwort, und der konträren Regulation der keimungshemmenden Faktoren *ABA-insensitive 3* (ABI3) und ABI5, stellen beide Phytohormone die feine Balance zwischen Dormanz und Keimung ein (Reviewed in Verma et al., 2016). Auch beim späteren Wachstum der Pflanze ist ABA nicht unbeteiligt. Eine der primären Funktionen von ABA ist die Modulation des Wurzelwachstums und des Wurzelbaus. Kommt es in Mais bei geringem Wasserpotential zur Akkumulation von ABA, ändert sich das Verhältnis zwischen Wurzel- und Spross-Wachstum zugunsten der Wurzel (Saab et al., 1990). Spätere Studien zeigten, dass die Wachstumsfördernde Wirkung von ABA durch die Inhibition der Ethylen-Biosynthese erreicht wird (Spollen et al., 2000), welche stark inhibierend auf das Wurzelwachstum wirkt. Durch die Förderung der Primärwurzel und der Inhibition des lateralen Wurzelwachstums kommt es zur Erweiterung des Wurzelsystems weg von den Wasser limitierenden Bereichen (Duan et al., 2013). Im Gegensatz zu diesem wachstumsfördernden Effekt bei nanomolaren ABA Konzentrationen, wird das Wurzelwachstum bei millimolaren ABA-Konzentrationen hauptsächlich durch die Inhibition der Zellteilung und Zellexpansion gehemmt (Liu et al., 1994; Levi et al., 1993). Neben diesen primären Wachstumsprozessen wurden auch Effekte bei der Pathogenabwehr, der Blühinduktion und der Seneszenz für ABA beschrieben (Finkelstein, 2013; Nguyen et al., 2016). All diesen physiologischen Anpassungen gehen die ABA-Biosynthese, der ABA-Transport sowie die ABA-Perzeption voraus, um letztendlich die Expression der entsprechenden Gene einzuleiten. Die vielfältigen physiologischen Prozesse, die durch ein und dasselbe Phytohormon koordiniert werden, lassen schon an dieser Stelle auf eine spezifische und genaue Regulation ABA-abhängige Gene schließen.

1.2 ABA-Biosynthese, -Katabolismus und -Transport

ABA ist ein monocyclisches Sesquiterpen das aus dem Xanthophyllzyklus gewonnen wird. Diese langen Carotinoide (C₄₀) dienen der Pflanze als Schutzpigmente bei hoher Lichteinstrahlung. Durch die Umwandlung des Zeaxanthins zum Violaxanthin mittels der Zeaxanthin epoxidase (ZEP), und anschließender Spaltung des Violaxanthins, entsteht das kleinere Xanthoxin (C₁₅) (Abb. 1-2). Die Spaltung des 9'-cis-Neoxanthins oder seines Isomers 9'-cis-Violaxanthins wird durch die 9'-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase (NCED) katalysiert, welches das regulierende Enzym der ABA-Biosynthese ist (Endo et al., 2008; Qin and Zeevaart, 1999). Die *NCED* Expression und Aktivität wird strikt reguliert, da es die Menge an gebildetem ABA maßgeblich steuert. Besonders unter abiotischem Stress werden *NCEDs*, die in Arabidopsis durch eine multi-Genfamilie codiert werden,

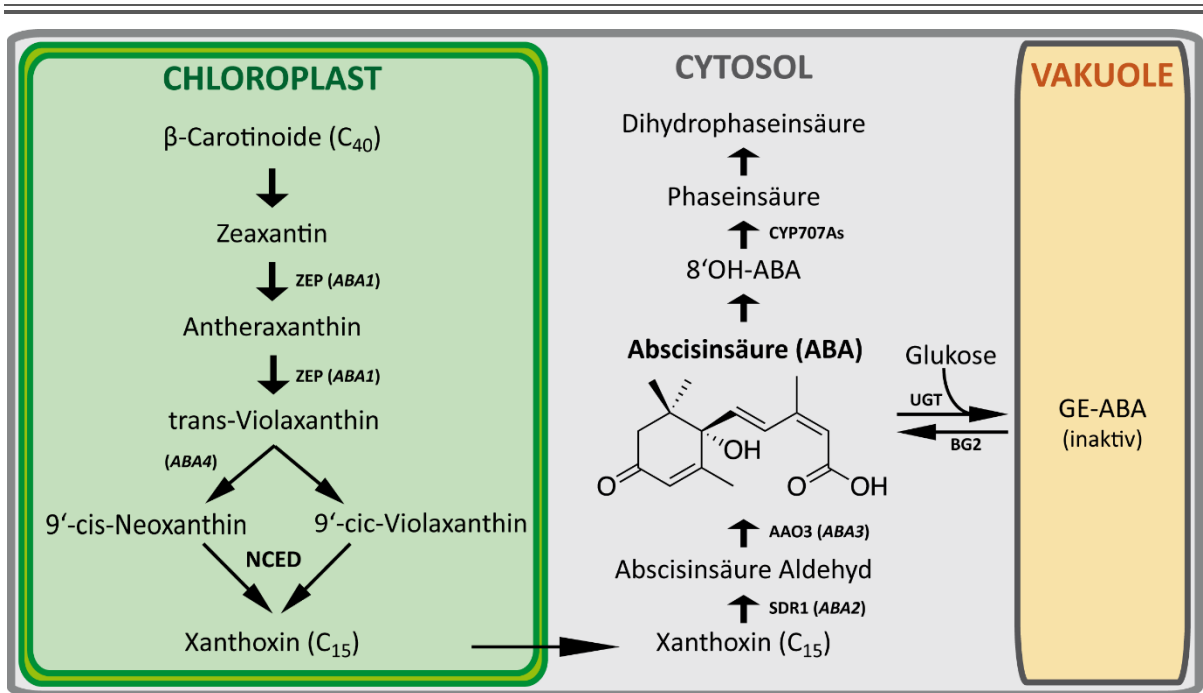


Abb. 1-2 ABA Biosynthese und Katabolismus

ABA wird in der Pflanze aus β -Carotinoiden synthetisiert. Hierbei wird der C_{40} -Körper des Carotinoides nach Umwandlung zum Violaxanthin in zwei Xanthoxine gespalten, welche in das Cytosol exportiert und über das ABA-Aldehyd zum ABA umgewandelt werden. Durch Veresterung mit Glucose kann ABA als Glycosylester (ABA-GE) in der Vakuole als Inaktive Zwischenstufe gespeichert werden, oder durch Hydroxylierung mittels P450-Monooxygenasen (CYP707As) final zur Dihydrophaseinsäure abgebaut werden.

Basierend auf Sah et al. (2016) und Finkelstein (2013).

stark exprimiert (reviewed in Nambara and Marion-Poll, 2005). Das Xanthoxin wird ins Cytosol transportiert und mittels der *Short-Chain Alcohol Dehydrogenase/Reductase* ABA2 zum ABA-Aldehyd oxidiert. Der Genverlust von *ABA2* führt zu stark verringerten ABA-Konzentrationen und schlechterer Stresstoleranz in der Pflanze (Gonzalez-Guzman, 2002). Mittels der *Abcisic Aldehyde Oxidase* (AAO3/*ABA3*) wird das Aldehyd letztendlich zum aktiven ABA oxidiert. Auch wenn in allen Geweben *ZEP* und *AAO3* schwach exprimiert werden, ist die Expression von *ABA2* und *AAO* doch stark auf das vaskuläre Parenchym begrenzt. Dies ist auch der Hauptort der Stress induzierten *NCED* Expression. Neben diesem Haupt-Biosyntheseort kommt es auch in den Schließzellen zur ABA Biosynthese (Finkelstein, 2013).

ABA wird über das vaskuläre System in der Pflanze verteilt. Dabei wird sowohl das Xylem wie auch das Phloem genutzt, was einen bidirektionalen Transport des Phytohormons in der Pflanze erlaubt. Als schwache Säure kann ABA im protonierten Zustand passiv über Zellmembranen diffundieren und frühe Studien haben postuliert, dass es durch die Ansäuerung des Apoplasten unter Stress-Bedingungen zur

Deprotonierung und Erhöhung der ABA-Konzentration im Apoplasten kommt, was wiederum als Signal genutzt wird, um die Transpiration in Blättern zu reduzieren (reviewed in Davies and Zhang, 1991). In der Zwischenzeit konnte durch zahlreiche Studien auch der aktive Transport von ABA über *ATP Binding Cassette (ABC)*-Transportproteine, sowie Transporter anderer Familien, gezeigt werden, die sowohl den Export aus dem vaskulären Gewebe, wie auch den Import in spezifische Gewebetypen fördern (Sah et al., 2016). Darüber hinaus wird osmotischer Stress in den Wurzeln auch unabhängig vom ABA-Transport über hydraulische Signale an die Blätter weitergeleitet. So konnte gezeigt werden, dass es nach osmotischen Stress in der Wurzel zur ABA Biosynthese in Blättern kommt, bevor ABA über das Leitgewebe in die Blätter transportiert werden konnte. Dies lässt auf einen weiteren hydraulischen Mechanismus schließen, der den osmotischen Stress in den Wurzeln wahrnimmt und das Signal an die Blätter weiterleitet (Christmann et al., 2013).

Neben der Kontrolle der ABA-Biosynthese werden die lokalen ABA-Konzentrationen auch über den Katabolismus reguliert. Hierbei ist zwischen der ABA-Konjugation mit Glucose und der Hydroxylierung über P450-Monooxygenasen zu unterscheiden (Abb. 1-2). Während die Hydroxylierung von ABA und die weitere Oxidation zur Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure irreversibel ist, kann ABA reversibel an Glucose verestert werden. Der so entstandenen ABA-Glycosylester (GE-ABA) kann in die Vakuole transportiert und dort gespeichert werden. Unter abiotischen Stressbedingungen kann GE-ABA über die *Beta-Glycosidase Homolog 2 (BG2)* wieder zum aktiven ABA hydrolysiert werden. Diese schnelle Freisetzung von aktivem ABA könnte als erstes schnelles Stresssignal unabhängig von der ABA-Biosynthese genutzt werden (Finkelstein, 2013).

1.3 Die ABA-Signalkaskade

Um das chemische Signal der steigenden ABA Konzentrationen in eine physiologische Antwort zu übersetzen, muss es der Pflanze möglich sein, dieses Signal effizient wahrzunehmen und zu interpretieren. ABA wird über einen Haupt-Signalweg (Abb. 1-3) aus vier Komponenten wahrgenommen (Cutler et al., 2010). Dieser besteht aus einem ABA-bindenden Co-Rezeptor-Komplex, bestehend aus dem *Regulatory Component of ABA-Receptor (RCAR)* (Ma et al., 2009), auch *Pyrabactin Resistant (PYR)* oder *Pyrabactin Resistant-Like (PYL)* genannt (Park et al., 2009), und einer interagierenden Proteinphosphatase der Familie 2C (PP2C) (Umezawa et al., 2009; Fuchs et al., 2013). Beide Moleküle sind an der ABA-Bindung beteiligt und formen zusammen mit ABA einen stabilen Rezeptor-Liganden-Komplex (Holorezeptor) (Melcher et al., 2010). Bei geringen ABA-Konzentrationen wird die PP2C nicht durch das RCAR gebunden und kann durch Dephosphorylierung die dritte Komponente des Haupt-Signalweges inaktivieren. Hierbei handelt es sich um eine Serin/Threonin-

Proteinkinasen aus der Familie der *Sucrose non-fermenting 1* (SNF1)-Related Proteinkinasen 2 (SnRK2) (Fujita et al., 2009). Ohne ABA werden diese durch die PP2Cs in einem inaktiven Status gehalten (Soon et al., 2012). Wird die Phosphatase mittels ABA in den Holorezeptor gebunden, kann die SnRK2 aktiv werden und ihre Substrate phosphorylieren. Hierbei muss zwischen der cytosolischen Funktion, in der die SnRK2 direkt Ionenkanäle, die für den Stomataschluss verantwortlich sind, phosphoryliert, und der nukleären Funktion unterschieden werden (Raghavendra et al., 2010). Im Nucleus phosphoryliert die Proteinkinase verschiedene Transkriptionsfaktoren, wodurch es zur Anpassung der Gentranskription an die veränderten physiologischen Bedingungen kommt. Vier bZIP Transkriptionsfaktoren (ABF1 - 4) stellen dabei die wichtigsten SnRK2-abhängigen Regulatoren der ABA-abhängigen Stressantwort dar (Yoshida et al., 2015). Im Gegensatz zu dieser stark vereinfachten Form der Signalkaskade kommt es *in planta* zu einer komplexen *cross*-Regulation

verschiedener physiologischer Signale und Hormon-Signalwege. (Verma et al., 2016; Nguyen et al., 2016). Besonders der sekundären Botenstoff Calcium bzw. sein Ion (Ca^{2+}) ist eng mit der ABA-Antwort verknüpft (Nguyen et al., 2016; Batistič and Kudla, 2012; Edel and Kudla, 2016) und Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen interagieren und regulieren Komponenten der ABA-Signaltransduktion auf multiplen Ebenen.

In den folgenden Abschnitten soll genauer auf die Funktion und Regulation der einzelnen Elemente der ABA-Signaltransduktion eingegangen werden. Der Focus liegt dabei auf der nukleären Signaltransduktion und der Regulation der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren.

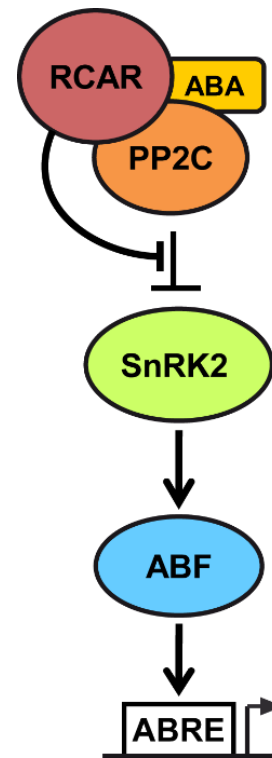


Abb. 1-3 Vereinfachte ABA-Signalkaskade

ABA wird an den aus RCAR und PP2C bestehenden Rezeptorkomplex gebunden, wodurch die Inhibition der SnRK2 durch die PP2C aufgehoben wird. SnRK2 wird darauf hin aktiv und kann ABA-abhängige Transkriptionsfaktoren wie die ABFs durch Phosphorylierung aktivieren. Diese wiederum binden an *ABA responsive cis-elements* (ABRE) und induzieren dadurch die Genexpression Stress-induzierter Gene.

1.4 ABA-abhängige Transkriptionsfaktoren

Etwa 6 % der Gene in *Arabidopsis* kodieren für Transkriptionsfaktoren (Riechmann et al., 2000). Nach aktuellem Stand sind das 2296 Transkriptionsfaktoren (TFs) in 58 Familien (Jin et al., 2017). Dabei umfassen die vier größten Familien, die *basic helix loop helix* (bHLH), die *MYB domain proteins* (MYB), die AP2/ERF domain superfamily (AP2/ERF) und die *basic region/leucine zipper* Familie (bZIP), fast 50 % aller Transkriptionsfaktoren. Viele dieser Transkriptionsfaktoren werden durch Trockenstress oder osmotischen Stress aktiviert und sind maßgeblich für die Anpassung an abiotischen Umweltbedingung mit verantwortlich (Joshi et al., 2016). Besonders die *ABA-Responsive Element Binding Factors* (*ABRE-Binding Proteins*, ABF/AREB), die zur Familie der bZIPs gehören, sind hauptsächlich an der ABA-Antwort beteiligt (Yoshida et al., 2015). Die ABFs binden spezifisch an das *ABA-responsive element* (ABRE), welches sich in der Promotorregion vieler ABA-induzierten Gene befindet (Uno et al., 2000). Mittels eines modifizierten *Yeast-One-Hybrid* (Y1H) konnten vier ABFs identifiziert werden, die spezifische an die Konsensussequenz PyACGTGGC des ABRE-Motivs binden (Choi et al., 2000; Fujita et al., 2011; Fujita et al., 2005). Besonders das Hauptmotiv ACGT ist dabei für die Bindung entscheidend. Die Gene ABF1, ABF2/AREB1, ABF3/DPBF5 und ABF4/AREB2 (ABF1 - 4) wurden später als die wichtigsten Transkriptionsfaktoren der ABA induzierten Genexpression bekannt (Yoshida et al., 2015). Neben ABF1 - 4 gehört auch *ABA Insensitive 5* (ABI5) zu den bZIP Transkriptionsfaktoren und ist eng mit ABF1 - 4 verwandt. ABI5 bindet, wie ABF1 - 4 an das ABRE *cis*-Element (Nakamura et al., 2001), ist aber im Gegensatz zu ABF1 - 4 hauptsächlich an der Regulation der Keimung in *Arabidopsis* Samen beteiligt (Skubacz et al., 2016; Finkelstein and Lynch, 2000). Es wurde dabei gezeigt, dass ABI5 synergistisch mit den AP2-Transkriptionsfaktor ABI4 und dem B3-Transkriptionsfaktor ABI3 agiert. Während ABI4 alleine nur schwach an die Promotorregion ABF4-induzierter Gene bindet, kommt es zu einer starken DNA-Bindung in Kombination mit ABI5, ABF1 oder ABF3 (Reeves et al., 2011). Dabei bindet ABI4 an ein *cis*-Element, das der Bindestelle der *Dehydration Response Elemente Binding Factors* (DREB) stark ähnelt und als *Coupling Element 1-like* (CE1-like) beschrieben wurde (Bossi et al., 2009).

Strukturell gehören die ABFs der Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren an und tragen in ihrem C-terminalen Bereich die für die DNA Bindung wichtige basische Region gefolgt von dem für die Dimerisierung wichtigen Leucin-Zipper. Für die DNA Bindung binden zwei bZIP-Transkriptionsfaktoren über Interaktion der hydrophoben α -Helix des Leucin-Zippers aneinander während die basische Region mit der DNA interagiert (Jakoby et al., 2002; Sornaraj et al., 2016). Hierbei können bZIPs Homo- und Heterodimere bilden, wodurch die Spezifität bezüglich ihrer Zielsequenz geändert werden kann

(Reeves et al., 2011). Im N-terminalen Bereich tragen ABF1 - 4 drei hochkonservierte Regionen, die als Phosphorylierungsstellen ABA-abhängiger Proteinkinasen identifiziert wurden. *In-Gel Kinase-Assays* zeigten, dass eine 42-kDa große Proteinkinase, welche der Größe der SnRK2 entspricht, nach ABA Behandlung ABF2 im N-terminalen Bereich phosphoryliert. Dabei konnten die Aminosäurereste S26, S86 + S94 sowie S135 als potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Furihata et al., 2006). Phosphomimic Mutanten von ABF2, bei denen diese Stellen durch Aspartat ersetzt wurden, induzieren auch ohne Stress-Bedingungen Gene der abiotische Stressantwort (Furihata et al., 2006). Dieser Befund wird dadurch unterstützt, dass die Gruppen reprimierter Gene in *abf2/abf3/abf4 Knockout*-Linien (KO) mit denen der *snrk2.6/2.2/2.3* KO-Linien überlappen (Fujita et al., 2009), was auf eine direkte Abhängigkeit der ABFs und SnRK2s hindeutet. Die starke ABA-Insensitivität der *abf2/3/4*- und *snrk2.6/2.2/2.3* KO-Linien zeigt, dass die ABA-Antwort maßgeblich über diese Faktoren vermittelt wird (Fujita et al., 2009; Fujii and Zhu, 2009). Dennoch sind die SnRK2s nicht die einzigen Proteinkinasen, die ABFs phosphorylieren können. Auch Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen aus der Familie der *Calcium Dependent Proteinkinasen* (CPKs) können ABF2 phosphorylieren. So wurde für CPK4, CPK11, CPK23 und CPK32 die Phosphorylierung von ABF1, ABF2 und ABF4 nachgewiesen (Zhu et al., 2007; Choi et al., 2005; Pleißner, 2015). Überexpression- und KO-Linien der *CPK4* und *CPK11* zeigten, dass es sich dabei um positive Regulatoren der ABA-Antwort handelt. Allerdings hatte der Genverlust von *CPK4* und *CPK11* nur geringen Einfluss auf die Transkription ABA-regulierter Gene (Zhu et al., 2007). CPK32 interagiert und phosphoryliert ABF4 und die Überexpression der CPK32 zeigte einen ABA-hypersensitiven Phänotyp (Choi et al., 2005). CPK23 phosphoryliert ABFs *in vitro* (Pleißner, 2015) und führt zur starken Transaktivierung dieser in Arabidopsis Protoplasten. Dabei überstieg die ABF-Transaktivierung mit CPK23 sogar die Aktivität der SnRK2.6 (Czap, 2015).

Der Vergleich zwischen ABF-Überexpressionen *in planta* mit wildtypischen und hyperaktiven ABFs demonstriert die Notwendigkeit der ABF-Aktivierung über Proteinkinasen (Fujita et al., 2005; Furihata et al., 2006). Allerdings wurde neben der positiven Regulation über Phosphorylierung auch die Dephosphorylierung der ABFs über Proteinphosphatasen gezeigt, was zu einer negativen Regulation der ABF-Antwort führen würde und diese in ihrer Aktivität hemmen würde (Lynch et al., 2012).

Im Gegensatz zu der stark vereinfachten ABA-Signalkaskade, wie sie in Abb. 1-3 dargestellt ist, zeigt sich eine viel komplexere Regulation der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Mehrere ABA-abhängige und ABA-unabhängige Proteinkinasen nehmen Einfluss auf die ABFs, und es kommt zu einer Signalintegration auf Ebene der Transkriptionsfaktoren (Abb. 1-4). Die hohe Redundanz der Signalfaktoren und die damit einhergehende Komplexität des Systems macht die Analyse einzelner Signalkomponenten oft schwierig, da Effekte der ABF-Transaktivierung nicht losgelöst von der

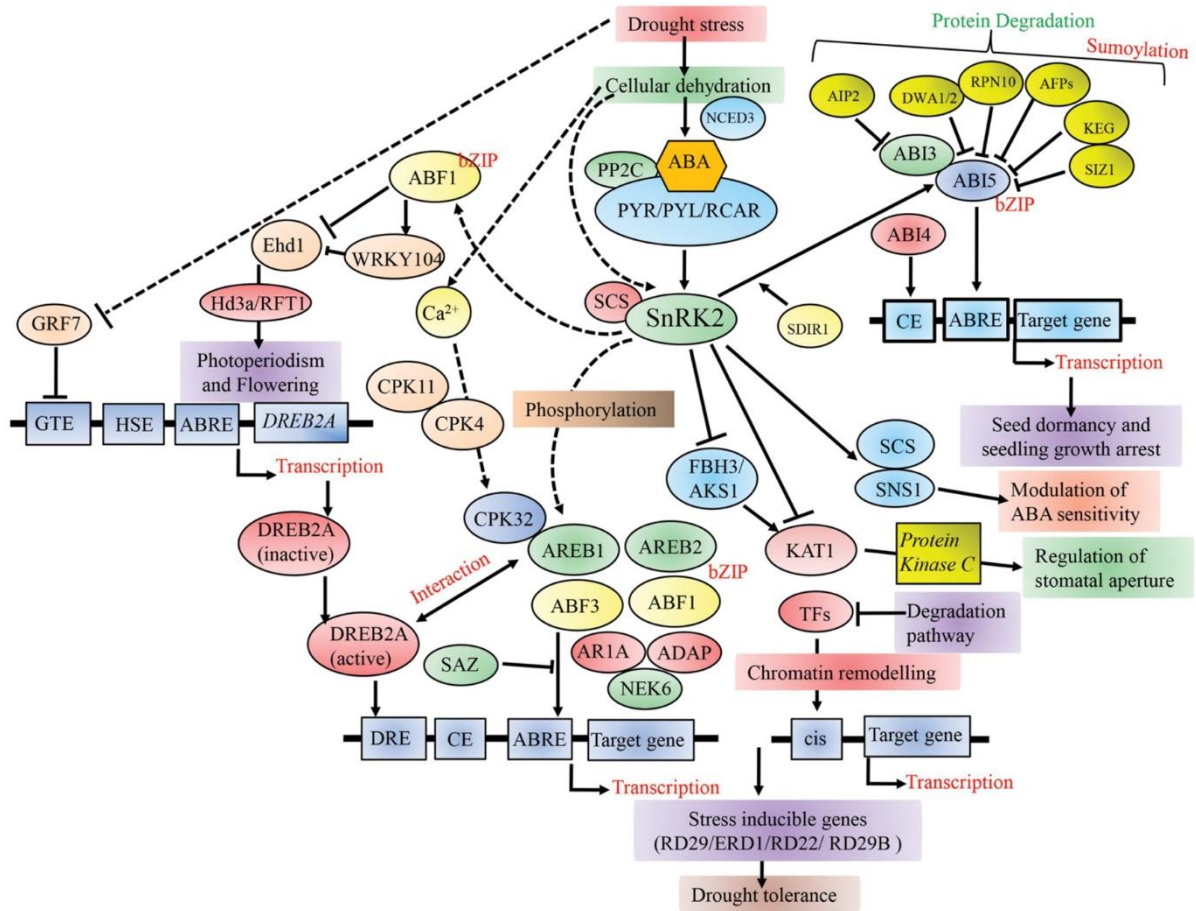


Abb. 1-4 Schematisches Model der Transkriptionsfaktor-Regulation bei Trockenstress

Trocken- und osmotischer Stress führen zur Akkumulation von ABA und der damit verbundenen Aktivierung der SnRK2s durch den ABA-bindenden Holorezeptor. Als zentrale positive Regulatoren der Stressantwort aktivieren die SnRK2s eine Reihe von Transkriptionsfaktoren. Besonders die ABRE-bindenden Transkriptionsfaktoren ABF1, ABF2/AREB1, ABF3 und ABF4/AREB2 werden durch Phosphorylierung aktiviert und induzieren die Transkription stressinduzierter Gene. ABI5, in Kombination mit ABI3 und ABI4, ist besonders bei der Regulation der Keimung beteiligt. Neben den ABFs interagieren und regulieren SnRK2s auch Ionenkanäle wie KAT1, die für den Schluss der Stomata verantwortlich sind, und sind an der Kontrolle der Photoperiode und der Blühinduktion beteiligt. Die ABFs werden nicht nur durch die SnRK2 reguliert, sondern auch durch Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen wie CPK4, 11, 23 und 32 (CPK23 ist nicht abgebildet). Eine Reihe weitere Transkriptionsfaktoren können durch Bindung an modulierenden *coupling elements* (CE) oder andere *cis*-Elemente die Transkription weiter beeinflussen.

entnommen Aus Joshi, R., Wani, S.H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z.A., Lone, A.A., Pareek, A., and Singla-Pareek, S.L. (2016). Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Front. Plant Sci.* 7: 1029

Beeinflussung andere Faktoren beobachtet werden können. Besonders die spezifische Aktivierung der ABFs durch unterschiedliche Proteinkinasen bleibt weitestgehend unverstanden.

1.5 Eukaryotische Proteinkinasen

Fast jeder Aspekt des pflanzlichen Lebenszyklus wird über Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen reguliert. Während die Phosphorylierung durch Proteinkinasen (PK) katalysiert wird, katalysieren Proteinphosphatasen (PP) die Dephosphorylierung. Durch diese reversible posttranskriptionelle Modifikation ist es der Pflanze möglich, schnell und flexibel auf wechselnde Umwelteinflüsse zu reagieren. Die Proteinphosphorylierung wird strikt reguliert, ist hoch spezifisch und erlaubt es, molekulare Signale zu verstärken, zu regulieren oder andere Signale zu integrieren. In vielen Fällen ändert die Phosphorylierung eines Proteins seine Wirkung und Aktivität. Handelt es sich bei dem aktivierten Effektor um eine Proteinkinase, kann es durch ein einfaches anfängliches Phosphorylierungssignal zur Aktivierung einer Reihe nachgeschalteter Effektoren kommen, wodurch ganze Signalkaskaden ausgelöst werden können (Pawson and Scott, 2005). Dabei funktioniert die Proteinphosphorylierung oft als eine Art „Schalter“. Die hohe Spezifität der Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung stellt dabei die Grundlage für diesen Prozess dar (Dissmeyer and Schnittger, 2011). Besonders für Pflanzen ist die schnelle Anpassung an sich ändernde Bedingungen unerlässlich, was sich auch in der Anzahl der in Arabidopsis vorkommenden Proteinkinasen widerspiegelt. In Arabidopsis gibt es über 1000 verschiedene Proteinkinasen die insgesamt etwa 4% aller kodierten Gene ausmachen. Hierbei spricht man auch vom gesamten Kinom des Organismus. Im Gegensatz zu Arabidopsis nimmt das Kinom des Menschen oder der Hefe (*S. cerevisiae*) nur rund 2% des gesamten Genoms ein (Champion et al., 2004; Dissmeyer and Schnittger, 2011). Die Proteinkinasen in Arabidopsis werden in sieben Familien eingeteilt, von denen die Tyrosin-Kinase-ähnliche Gruppe (TKL) rund 60 % aller Proteinkinasen umfasst. TKLs kodieren unter anderem für die große Gruppe der *Leucin Rich Repeat* (LRR) Proteinkinasen und kommen in dieser Häufigkeit nur in Pflanzen vor (Dardick et al., 2007). Darüber hinaus unterscheidet man weiterhin die AGC-Kinasen, die sich von der *cyclic nucleotide-dependent* Familie (PKA und PKG) und der Phospholipid-abhängigen PKC-Familie ableiten, die Ca²⁺/CaM-abhängigen Kinasen (CaMK), die CMGC-Kinasen, die nach ihren Mitgliedern *Cyclin-Dependent Kinase* (CDK1) und *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) benannt wurden und die STE-Kinasen, die Homologe der *S. cerevisiae sterile kinase 7* (Ste7) sind. Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe atypischer Proteinkinasen, deren Kinasedomänen nicht dem sonst typischen Aufbau entsprechen (Champion et al., 2004).

Während die regulativen Elemente der eukaryotischen PKs sich stark unterscheiden, sind die katalytischen Untereinheiten aller PKs hoch konserviert. Alle typischen PKs enthalten eine etwa 200 - 300 Aminosäuren (AS) lange Kinasedomäne, die in eine N-terminale *N-lobe* und eine C-terminale

C-lobe unterteilt wird (Johnson et al., 1996). Während der *N-lobe* hauptsächlich für die ATP-Bindung verantwortlich ist, bindet der *C-lobe* das Proteinsubstrat. Der N-terminale Bereich besteht neben fünf β -Faltblättern aus einer α -Helix (die C-Helix oder α C-Helix) die häufig durch Interaktion mit anderen Bereichen entscheidend für die Aktivität der PK ist. Innerhalb des *N-lobe* ist die P-Schleife der ATP-Bindetasche für die Bindung und Koordination der nicht transferierbaren ATP-Phosphogruppen zuständig, während das zu transferierende γ -Phosphat durch das Aspartat des hochkonservierten DFG-Motives und des daran gebundenen Magnesium-Ions (Mg^{2+}) koordiniert wird (Endicott et al., 2012). Das DFG-Motiv markiert auch den Anfang der Aktivierungsschleife (*activation loop*). Dieser, in allen PKs vorkommende flexible Bereich von 20-40 AS Länge, zwischen dem DFG und dem weniger stark konserviertem APE-Motiv, enthält einige für die Proteinkinase entscheidende Elemente. Neben dem DFG-Motiv ist in vielen PKs hier eine Phosphorylierungsstelle lokalisiert, die für die Aktivität der PK entscheidend ist. Während die Aktivierungsschleife im nicht phosphorylierten Zustand häufig das aktive Zentrum sterisch blockiert und so die Bindung der Substrate verhindert, schwingt dieser nach Phosphorylierung zur Seite und öffnet das aktive Zentrum (Nolen et al., 2004). In dieser „offenen“ Konformation ist es der PK möglich, ATP und das Proteinsubstrat zu binden und passend zueinander zu koordinieren. Dabei wird die OH-Gruppe des Proteinsubstrates (P-site) durch das katalytische Aspartat (D166 in *Protein Kinase A*, PKA) gebunden. Erst nach Phosphorylierung der Aktivierungsschleife, richtiger Positionierung beider Substrate, bei der neben der OH-Gruppe der P-site auch die umgebenden Aminosäurereste entscheidend sind, und korrekter Koordination des *N-* und *C-lobes* zueinander, kann die Kinase in den katalytisch aktiven „geschlossenen“ Zustand übergehen, wobei es zur Übertragung des γ -Phosphats auf das Protein kommt (Endicott et al., 2012; Nolen et al., 2004). Während die „offene“ inaktive Form der Proteinkinase recht variabel ist, da sie keine katalytische Funktion hat, ist die „geschlossen“ Form strukturell hoch konserviert (Taylor and Kornev, 2011).

In Arabidopsis werden rund 30% aller Proteine phosphoryliert (Champion et al., 2004), was im Schnitt bedeuten würde, dass jede Arabidopsis PK mindestens sieben Proteine phosphorylieren müsste. Allerdings wird dabei außer Acht gelassen, dass die meisten Proteine an multiplen Stellen und durch mehrere Kinasen phosphoryliert werden, was die Anzahl der Substrate pro Proteinkinase um ein Vielfaches steigen lässt (Dissmeyer and Schnittger, 2011).

1.6 Proteinkinasen der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren

Die ABFs werden von mehreren Proteinkinasen an multiplen Stellen phosphoryliert (siehe Abschnitt 1.4). Diese Phosphorylierung im N-terminalen Bereich der Transkriptionsfaktoren ist entscheidend für

die Aktivität und reguliert die Genexpression ABA-abhängiger Gene. Einer Reihe von Proteinkinasen wurde eine regulierende Funktion im Bereich der ABA-Signalkaskade und der Aktivierung ABA-abhängiger Genexpression zugesprochen. Die wohl wichtigste Klasse der ABA-aktivierenden Proteinkinasen sind die SnRK2s, die als zentrale Mediatoren der ABA-Antwort bekannt geworden sind (Fujita et al., 2009; Fujii and Zhu, 2009). Aber auch Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen aus der Familie der *Calcium Dependent Protein Kinases* (CPKs) oder *CBL-Interacting Protein Kinases* (CIPKs) wurden im Zusammenhang mit ABA beschrieben (Zhu et al., 2007; Zhou et al., 2015). Im Folgenden soll genauer auf diese Proteinkinasen eingegangen werden.

1.6.1 *Sucrose-non-fermenting (SNF1)-related Protein Kinases 2 (SnRK2)*

Neben den vielen Proteinkinasen, die in der pflanzlichen Stressantwort beteiligt sind, gehören die zehn Mitglieder der für Pflanzen spezifischen SnRK2-Familie zu den wichtigsten Regulatoren der abiotischen Stressantwort (Boudsocq et al., 2004; Fujita et al., 2009; Fujii and Zhu, 2009; Kulik et al., 2011; Fujii et al., 2011). Dabei unterteilen sich diese 10 Mitglieder in 2 Subfamilien. Basierend auf ihrer Homologie lassen sich die SnRK2.2/2D/SPK2.2, SnRK2.3/2I, SnRK2.6/2E/OST1/P44, SnRK2.7/2F und SnRK2.8/2C der Gruppe I zuordnen während SnRK2.1/2G/ASK2, SnRK2.4/2A/ASK1, SnRK2.5/2H und SnRK2.10/2B der Gruppe II angehören (vgl. Abb. 2-9). Sequenz basierend gehört auch SnRK2.9 der Gruppe II an, wurde aber aufgrund ihrer molekularbiologischen Eigenschaften keiner der beiden Gruppen zugeordnet (Boudsocq et al., 2004). Alternativ hierzu erfolgte durch Kobayashi et al. (2004), basierend auf der Homologie der *A. thaliana* und *Oryza sativa* (Reis) SnRK2s, die Unterteilung der Genfamilie in drei Gruppen. Die Autoren unterteilten die durch Boudsocq beschriebene Gruppe I in die Untergruppen II (SnRK2.8 und 2.7) und Untergruppe III (SnRK2.2, 2.3 und 2.6), während sie die durch Boudsocq beschriebene Gruppe II als Untergruppe I betitelten. In der vorliegenden Arbeit wird die Einteilung nach Boudsocq verwendet.

Während die SnRK2s der Gruppe I in Arabidopsis Protoplasten durch Behandlung mit ABA oder osmotischen Stress aktiviert werden, kommt es mit den SnRK2s der Gruppe II mit ABA zu keiner Aktivierung der PK. SnRK2.9 wurde durch keine der beiden Behandlungen aktiviert und nimmt eine Sonderrolle in der SnRK2-Familie ein (Boudsocq et al., 2004). Besonders die Aktivität der SnRK2.2, 2.3 und 2.6 wird durch exogenes ABA stark gesteigert, wodurch sie später als die wichtigsten positiven Regulatoren der ABA-Antwort bekannt wurden (Fujita et al., 2009). Der Genverlust dieser drei Proteinkinasen führt zu einem extrem ABA-insensitivem Phänotyp und reduzierten Trockentoleranz der Pflanze (Fujii and Zhu, 2009). Der Vergleich der *snrk2.2/2.3/2.6* KO-Linien mit KO-Linien aller zehn SnRK2s (*snrk2-decuple*, *snrk2-dec*) zeigt, dass SnRK2.2/2.3 und 2.6 nicht nur an der ABA-vermittelte

Anpassung an osmotischen Stress beteiligt sind, sondern auch eine ABA-unabhängige Rolle einnehmen (Fujii et al., 2011). Die *snrk2-dec* Linie zeigt einen stark welkenden Phänotyp und kann nur schwer auf Erde kultiviert werden. Wird diese Linien allerdings auf Agarplatten mit sehr hoher Luftfeuchte angezogen, wächst sie vergleichbar zum WT. Allerdings zeigt sie schon bei geringem osmotischen Stress ein stark reduziertes Wachstum. Interessanterweise wird dieser Effekt schon durch einen einzigen Vertreter der SnRK2-Familie (SnRK2.2) komplett aufgehoben, was durch das normale Wachstum einer *snrk2-nonupel*-Linie (KO für *SnRK2.1/3/4/5/6/7/8/9/10*) unter den gleichen Bedingungen eindrucksvoll demonstriert wurde (Fujii et al., 2011). Diese Experimente verdeutlichen die starke Redundanz der Genfamilie, was die Analyse spezifischer Funktionen einzelner Proteinkinasen *in planta* schwierig macht. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass es in der *snrk2-dec*

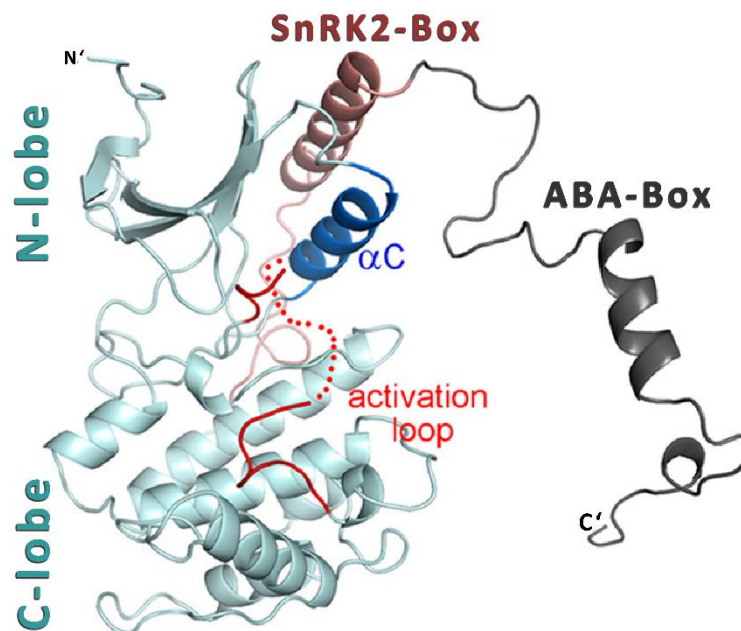


Abb. 1-5 Struktureller Aufbau der SnRK2.6

Wie bei allen S/T-Proteinkinasen besteht die Kinasedomäne der SnRK2.6 aus einer N- und einer C-terminalen Subdomäne (*N- und C-lobe*). Zwischen diesen liegt die für die Aktivität wichtige Aktivierungsschleife (*activation loop*) in der sich auch die kritische Phosphorylierungsstelle S175 befindet. C-terminal des C-lobe liegt die regulatorische Domäne DI (SnRK2-Box) und DII (ABA-Box). Während die SnRK2-Box für die Aktivität der PK obligat ist, da sie für die richtige Positionierung der α C-Helix verantwortlich ist, ist die ABA-Box strukturell flexibel und dient als Interaktionsanker mit den PP2Cs.

Die Abbildung basiert auf einem *in silico* optimierten Kristallmodell der SnRK2.6 bei dem die Form und Positionierung der DII auf strukturellen Vorhersagen beruht.

basierend auf Xie, T. et al., (2012). The Journal of biological chemistry 287 (1): 794–802, © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

nicht zu einem kompletten Verlust der ABA-induzierten Genexpression oder Akkumulation von ABA bei geringem Wasserpotential kommt und neben den SnRK2s wahrscheinlich auch andere PKs an der ABA-Antwort beteiligt sind.

SnRK2s gehören zu den Serin/Threonin Proteinkinasen (S/T-Proteinkinasen) und gehören der Familie der CMGC Kinasen an. Strukturell bestehen sie, neben der Kinasedomäne und einem kurzen N-terminalen Überhang, aus zwei regulatorischen Domänen (Abb. 1-5), die sich C-terminal der Kinasedomäne anschließen. Die regulatorische Domäne I (DI), schließt sich direkt an die Kinasedomäne an. DI ist für die Aktivität der PK unerlässlich, da sie eine α -Helix enthält (SnRK2-Box oder auch SnRK2 *activation motif*), welche mit der α C-Helix des *N-lobe* der Kinasedomäne interagiert (vgl. 1.5) und für dessen richtige Positionierung wichtig ist (Xie et al., 2012). Die SnRK2-Box ist in allen SnRK2s konserviert (Yoshida et al., 2006). An die DI-Domäne schließt sich die DII-Domäne oder auch ABA-Box an. Die ABA-Box verdankt ihren Namen dem Umstand, dass die SnRK2.6 ohne diese, nicht mehr durch exogenes ABA aktiviert werden kann, während es immer noch zur Aktivierung durch osmotischen-Stress kommt (Yoshida et al., 2006). Die ABA-Box wurde später als eine von vier Interaktionsflächen zwischen SnRK2 und PP2C beschrieben (Xie et al., 2012; Ng et al., 2011). Durch eine Häufung negativ geladener Aminosäure in der ABA-Box kommt es zur ionischen Wechselwirkung mit der positiv geladenen Oberfläche der PP2C (Xie et al., 2012). Während diese Ladungen in den SnRK2s der Gruppe I (2.2, 2.3, 2.6, 2.7, 2.8) hauptsächlich durch Aspartate erzielt werden, enthält die ABA-Box der Gruppe II SnRK2s (2.1, 2.4, 2.5, 2.10) hauptsächlich Glutamate (Yoshida et al., 2006). Durch Deletion der ABA-Box kommt es zu einer leichten Steigerung der SnRK2.6 Kinaseaktivität *in vitro*, während die Deletion der DI-Domäne in einer inaktiven SnRK2.6 resultiert (Belin et al., 2009). Wie viele andere S/T-Proteinkinasen besitzen auch die SnRK2s eine Aktivierungsschleife in der Kinasedomäne. Bei SnRK2.6 erstreckt sich diese von Position 160 - 187. In der Aktivierungsschleife ist das Serin 175 für die Aktivität der SnRK2.6 von entscheidender Bedeutung. Nur nach Phosphorylierung der Aktivierungsschleife an S175 kann die SnRK2.6 ihre Substrate binden und in die katalytisch aktive „geschlossene“ Form übergehen (Vlad et al., 2010; Xie et al., 2012; Soon et al., 2012).

SnRK2.6 ist sowohl fähig ihre Aktivierungsschleife in *cis* (*cis* - lat. für diesseits, im Molekül selbst) wie auch die Aktivierungsschleife anderer SnRK2 in *trans* (lat. für jenseits, in einem anderen Molekül) zu phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife steigt die Kinaseaktivität der SnRK2.6 um ein Vielfaches und auch die *trans*-Phosphorylierung ihrer Substrate nimmt zu (Ng et al., 2011). Im Gegensatz zu SnRK2.6 sind ihrer nächsten Homologe SnRK2.2 und SnRK2.3 nicht in der Lage ihre Aktivierungsschleife effizient zu (auto)-phosphorylieren, und zeigen *in vitro* geringere *cis*- und *trans*-Phosphorylierungen. Kommt es allerdings zur Phosphorylierung der Aktivierungsschleife durch

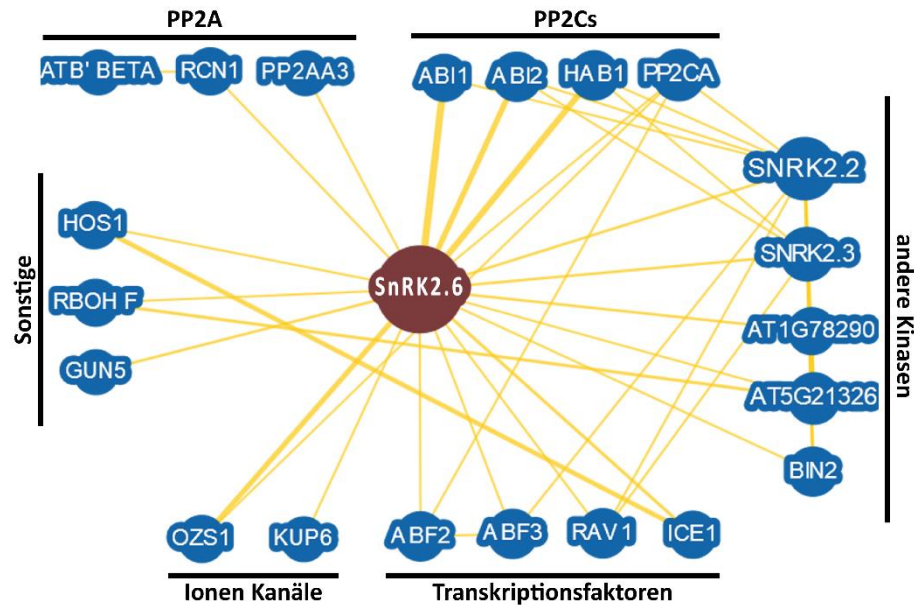


Abb. 1-6 SnRK2.6 Protein-Protein Interaktionen

SnRK2.6 interagiert mit diversen anderen Proteinen. Seine Proteinsubstrate, wie der Ionenkanal OZS1/SLAC1, der K⁺-Transporter KUP6 und den Transkriptionsfaktoren der ABF-Familie, der *Inducer of CBP-Expression* (ICE1) oder der AP2-Transkriptionsfaktor RAV1 sind unterhalb von SnRK2.6 dargestellt. SnRK2.6 wird in seiner Aktivität durch Proteinphosphatasen der Familie 2C inhibiert (ABI1, ABI2, HAB1, PP2CA). Aber auch Komponenten des heterotrimeren Proteinphosphatasen 2A-Komplexes (RCN1 (*PP2A Regulatory Subunit A*), ATB-β (*PP2A Regulator Subunit B prime β-Isoform*), PP2AA3 (*PP2A subunit A3*)) interagieren mit SnRK2.6 (oberhalb). Darüber hinaus wurde die Heterodimerisierung mit andern SnRK2s (SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.8/At1g78290) und die Interaktion und Regulation durch andere Proteinkinasen (BIN2, CIPK26/At5g21326) gezeigt (rechte Seite). Außerdem interagiert SnRK2.6 mit der *Respiratory Burst Oxidase Homolog F* (RBOHF), der *E3 ubiquitin-protein ligase* HOS1 und dem *ABA-binding protein* GUN5 (linke Seite).

Dargestellt sind die physikalischen Protein-Protein Interaktionen mit SnRK2.6 (At4g33950) der BioGRID Interaktionsdatenbank (Chatr-Aryamontri et al., 2017). Interaktionspartner mit weniger als 2 Nachweisen wurden ausgeschlossen. Die Liniendicke korreliert mit der Nachweishäufigkeit.

andere Proteinkinasen, kann die *trans*-Phosphorylierung der SnRK2.2 und 2.3 um ein Vielfaches gesteigert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase *Brassionostereoid Insensitive 2* (BIN2) SnRK2.2 und SnRK2.3 phosphorylierte, aktivierte und auch die *trans*-Phosphorylierung von ABF2 durch SnRK2.3 steigerte (Cai et al., 2014). Neben BIN2 wurden für SnRK2.6 eine Reihe weiterer Interaktionspartner beschrieben. Abgesehen von den Proteinsubstraten, wie dem Ionenkanal SLAC1 und den ABF-Transkriptionsfaktoren, interagiert SnRK2.6/OST1 besonders mit PP2Cs, durch welche sie reguliert wird (Abb. 1-6). Darüber hinaus wurde aber auch die Interaktion mit Proteinphosphatasen der Gruppe 2A beschrieben (Waadt et al., 2015), die ähnlich wie die PP2Cs als negative Regulatoren der SnRK2-Aktivität fungieren könnten. Auch die Heterodimerisierung von SnRK2.6 mit andern Proteinkinasen der SnRK2-Familie, mit CIPK26 oder der oben beschriebenen Proteinkinase BIN2 wurde

mehrfach nachgewiesen (Waadt et al., 2015; Chatr-Aryamontri et al., 2017). Gerade für SnRK2s, welche nicht in der Lage sind sich selbst zu phosphorylieren, könnten solche Interaktionen für die Aktivierung von entscheidender Bedeutung sein.

1.6.2 Die Ca^{2+} - und ABA-Antwort sind eng miteinander verknüpft

Calciumionen (Ca^{2+}) sind zweiwertige Kationen, die in allen Eukaryonten als sekundärer Botenstoff genutzt werden. Ca^{2+} werden durch den aktiven Transport aus der Zelle ausgeschleust oder in Zell-internen Ca^{2+} -Speichern gelagert (z.B. in dem Endoplasmatisches Retikulum (ER) oder der Vakuole). Durch die geringe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (meist unter 100 nM) und dem starken Konzentrationsgefälle zum extrazellulären Raum oder den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern kann die Zelle durch das Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen temporär und lokal begrenzt die Ca^{2+} -Konzentration stark erhöhen (spatiotemporal). Diese lokal hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (Ca^{2+} -Spikes) nutzt die Zelle als Signal (Berg et al., 2003). So sind Ca^{2+} -Signale an der Kontraktion der Skelettmuskulatur oder dem neuronalen Lernprozess beteiligt. Bei letzterem kommt es durch den Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER und der nachgeschalteten Interpretation des Signals durch diverse Proteinkinasen zur Änderung der Gentranskription (Berridge et al., 2000). Die Amplitude und Frequenz der Ca^{2+} -Spikes bestimmen die Ca^{2+} -Signatur und bieten der Zelle die Möglichkeit in dieser Signatur Informationen zu kodieren (Dodd et al., 2010). Während das Erzeugen der Ca^{2+} -Signatur noch recht einfachen Prozessen unterliegt, steht die Zelle vor der großen Herausforderung, diese zu interpretieren und in eine molekulare Signaltransduktion zu übersetzen. Hierzu stehen der pflanzlichen Zelle eine ganze Reihe an Ca^{2+} -bindenden Signalmolekülen zur Verfügung, die es ermöglichen die feinen Unterschiede der Ca^{2+} -Signaturen zu übersetzen (Abb. 1-7). Hierbei muss zwischen reinen Ca^{2+} -Sensorproteinen, wie dem Ca^{2+} -bindenden Calmodulin (CaM), oder sogenannten Sensor-Antwort-Proteinen, wie den Ca^{2+} -bindenden Proteinkinasen, unterschieden werden. Letztere vereinigen die Funktion der Ca^{2+} -Bindung und der Übersetzung des Ca^{2+} -Signals in spezifische Proteinphosphorylierung auf einem Molekül (Batistič and Kudla, 2012). Zwei der wichtigsten Familien der Ca^{2+} -bindenden Proteinkinasen im Bereich der abiotischen Stressantwort sind die Familie der *Calcium Dependent Protein Kinases* (CPK/CDPK) und die Familie der *Calcineurin B-like (CBL)-Interacting Protein Kinases* (CIPK), auf die in dieser Arbeit genauer eingegangen werden soll.

Eine der am besten untersuchten ABA-Funktionen ist das Schließen der Stomata durch erhöhte ABA-Level. An diesem Prozess ist nicht nur ABA sondern auch Ca^{2+} beteiligt. Als eine der ersten Antworten auf extern appliziertes ABA kommt es zu Erhöhung der lokalen Ca^{2+} -Konzentrationen und extensivem Ca^{2+} -„Spiking“ in den Schließzellen (McAinsh et al., 1990; Allen et al., 2001). Spätere Studien konnten

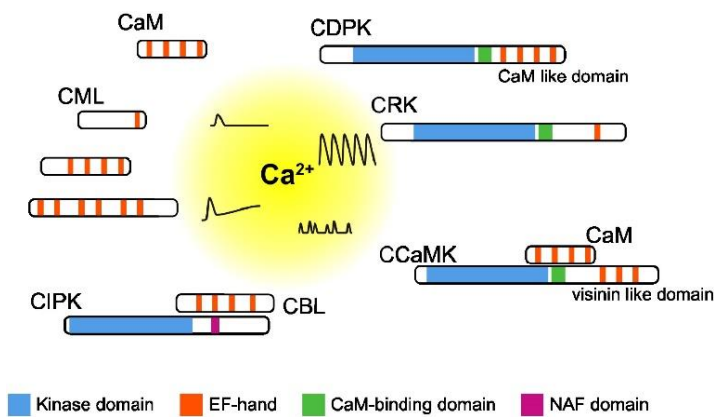


Abb. 1-7 Ca²⁺-Sensorproteine in Pflanzen

Spezifische Ca²⁺-Signaturen werden in Pflanzen über eine Reihe von Ca²⁺-Sensorproteinen wie dem Calmodulin (CaM) oder Calmodulin-like (CML) oder Sensor-Responderproteinen wie Ca²⁺-bindende Proteinkinasen interpretiert. Im Gegensatz zu den CDPKs oder CDPK-related (CRK), welche die Ca²⁺-bindenden EF-Hand Strukturen auf dem Protein tragen, interagieren die CIPKs oder CCaMK mit Ca²⁺-Sensorproteinen und werden von diesen reguliert.

Entnommen aus Batistič, O., and Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820 (8): 1283–1293.

zeigen, dass ABA die beteiligten Signalmechanismen sensitiver gegenüber Ca²⁺ macht (Young et al., 2006). Während die Beteiligung von Ca²⁺ und Ca²⁺-abhängigen PKs bei der Regulation der Ionenkanäle gut beschrieben ist, gibt es nur wenig Evidenzen für die direkte Beeinflussung der ABA-abhängigen Genexpression durch Ca²⁺. Der ABA-abhängige Transkriptionsfaktor ABF2 wird in Arabidopsis Protoplasten nach Ca²⁺-Behandlung durch eine Ca²⁺-induzierte Proteinkinase phosphoryliert (Furihata et al., 2006) und auch CPK4 sowie CPK11 sind an der ABA-abhängigen Genregulation beteiligt (Zhu et al., 2007). Arabidopsis Keimlinge, in denen durch elektrische Stimulation unterschiedliche Ca²⁺-Signaturen erzeugt wurden, zeigten eine erhöhte Gentranskription ABRE-regulierter Gene (Whalley et al., 2011) und die differenziell exprimierten Gene in Überexpressions-Linien der CIPK14 überlappen zu 70% mit denen der *snrk2.2/2.3/2.6* KO-linie (Lumba et al., 2014). Ob Ca²⁺ die ABA-abhängige Genexpression direkt über die Regulation der ABFs oder über Elemente der ABA-Signalkaskade steuert ist allerdings noch weitestgehend unverstanden.

1.6.3 Calcium Dependent Protein Kinases (CPKs)

CPKs sind für Pflanzen und einige Protisten einzigartige Proteinkinasen, die aus der genetischen Fusion einer Serin/Threonin Proteinkinase mit einer C-terminal liegenden Ca²⁺-bindenden CaM-ähnlichen Domäne (CML) bestehen (Zhang and Choi, 2001). Diese beiden Domänen sind über eine *Junction*-Domäne verbunden, die mit der Kinasedomäne interagiert und als Pseudosubstrat (PS) das aktive Zentrum der PK blockiert. Bindet Ca²⁺ an die vier EF-Hände der CML, kommt es zur Umfaltung der CML,

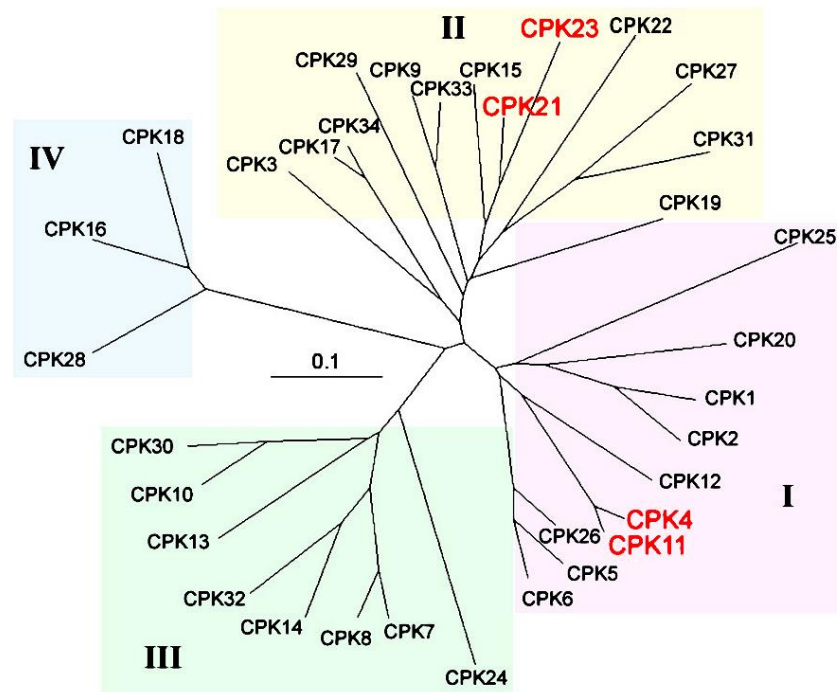


Abb. 1-8 Phylogenetischer Stammbaum der CPKs aus *Arabidopsis thaliana*

Dargestellt sind die verwandtschaftlichen Beziehungen der 34 CPKs aus *Arabidopsis*. Der Vergleich der Proteinsequenz zeigt, dass sich die CPKs in vier Untergruppen einteilen lassen. CPKs für welche die direkte Regulation der ABFs gezeigt wurde sind in Rot dargestellt. Die vergleichsweise große verwandtschaftliche Distanz dieser zeigt, dass weit entfernte CPKs ähnlich Funktion aufweisen können.

Die Astlänge ist proportional zur verwandtschaftlichen Distanz wobei die markierte Distanz von 0.1 auf einen Unterschied der Proteinsequenz von 10% hindeutet. Die Abbildung basiert auf Cheng et al., 2002.

wodurch das Pseudosubstrat aus dem aktiven Zentrum gelöst wird und die CPK aktiv wird (vgl. Abb. 2-13, Wernimont et al., 2010).

In *Arabidopsis* wurden durch Sequenzvergleich 34 CPKs identifiziert (Abb. 1-8), die sich in vier Untergruppen unterteilen (Zhang and Choi, 2001). Viele der *Arabidopsis* CPKs besitzen N-terminal der Kinasedomäne einen unstrukturierten Bereich, der häufig Acylierungsmotive für die kovalente Verknüpfung von Myristinsäure oder Palmitinsäure enthält. In Kombination mit einem darauffolgenden polybasischen Bereich dienen solche Modifikationen mit hydrophoben Fettsäuregruppen häufig der Membranverankerung (Resh, 1999). Für einige dieser CPKs konnte die Lokalisation an der Plasmamembran experimentell bestätigt werden (Dammann et al., 2003; Lu and Hrabak, 2013). Darüber hinaus wurde der N-Terminus der CPKs als wichtiges Element der Substraterkennung und Protein-Protein-Interaktion beschrieben. Durch Deletion des N-terminus von NtCPK1 kann diese ihr Substrat nicht mehr binden und phosphorylieren und durch Austausch des AtCPK9 N-Terminus mit dem der NtCDPK1 konnte eine Chimäre erzeugt werden, die eine artifizielle

NtCPK1 typische Substraterkennung zeigte (Ito et al., 2010). Darüber hinaus kann der myristoylierte N-Terminus auch direkt an der Proteinfaltung beteiligt sein. Bei der *cAMP-Dependent Protein Kinase A* (PKA) bindet der Myristinrest in einer hydrophoben Tasche innerhalb der Kinasedomäne und trägt zur Stabilisierung dieser bei. Durch die Substratbindung der PKA kommt es zur Destabilisierung des N-Terminus und Änderung der Kinaseaktivität (Bastidas et al., 2012). Allerdings ist der N-Terminus vieler Proteinkinasen in Röntgenkristallstrukturen nicht mit aufgelöst, und auch durch die Struktur der CPK1 aus *Toxoplasma gondii* konnte nicht gezeigt werden, welche strukturelle Form dieser in der Familie der CPKs einnimmt (Wernimont et al., 2010).

Funktionell sind CPKs an einer ganzen Reihe physiologischer Prozesse beteiligt, die von Entwicklungsprozessen bis hin zur biotischen und abiotischen Stressantwort reichen (reviewed in Schulz et al., 2013). Im Bereich der abiotischen Stressantwort nehmen CPKs sowohl im Bereich der schnellen Stressantwort über die Regulation der Ionenkanäle wie auch bei der Regulation der stressinduzierten Gentranskription eine entscheidende Rolle ein. CPK21, CPK23 und CPK6 phosphorylieren und aktivieren den Ionenkanal SLAC1 (Brandt et al., 2012; Geiger et al., 2010) und es konnte gezeigt werden, dass durch den Verlust der CPK5, 6, 11 und 23 das ABA-abhängige Schließen der Stomata unterbunden wird (Brandt et al., 2015). Aber auch auf Seiten der Transkriptionsfaktoren konnte für die CPKs diverse Interaktionen und Regulationen der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden.

Durch den Verlust der, aus Gruppe I stammenden, eng verwandten CPK4 und CPK11 kommt es in Arabidopsis zu einem ABA-insensitiven Phänotyp, der sich auf die positive Regulation der ABFs zurückführen lässt. CPK4 und CPK11 phosphorylieren und aktivieren ABF1 und ABF4. Durch die Überexpression der beiden Proteinkinasen kommt es auch ohne ABA-Behandlung zur Induktion ABA-abhängiger Gene (Zhu et al., 2007). Obwohl die untereinander eng verwandten CPK15, CPK21 und CPK23 aus einem ganz anderen Zweig der CPKs stammen, kommt es auch mit diesen zur Induktion der ABFs in Arabidopsis Protoplasten. Vergleicht man die Stärke der ABF-Induktion der CPKs mit den SnRK2s zeigt sich, dass CPK23 die ABA-Antwort stärker als SnRK2.6 hinaus induziert (Czap, 2015). Vergleiche zwischen CPK23 und CPK21 haben gezeigt, dass obwohl es sich bei beiden um eng verwandte Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen handelt, die Dynamik der Ca²⁺-Induzierbarkeit bei CPK21 um ein vielfaches höher liegt als bei CPK23 (Pleißner, 2015). CPK23 hingegen interagiert, im Gegensatz zu CPK21, in Hefe mit Proteinphosphatasen des ABA-Holorezeptors und scheint diese aus der SnRK2-PP2C Interaktion zu verdrängen (Fuchs, 2013). *In vitro* Analysen konnten zeigen, dass CPK23 und SnRK2.6 sich wechselseitig phosphorylieren (Wellmann, 2012; Pleißner, 2015). Auch wenn der funktionelle Mechanismus dieser Interaktionen noch nicht aufgeklärt ist, scheint CPK23 eine wichtige Position in

der ABA-Antwort einzunehmen und möglicherweise neben den ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren auch Komponenten der Haupt-ABA-Signalkaskade zu regulieren.

1.6.4 *CBL-interacting Protein Kinases (CIPK)*

Calcineurin B-like Proteins (CBL) sind kleine Ca^{2+} -bindende Proteine. CBLs interagieren spezifisch mit der Proteinfamilie der *CBL-interacting Protein Kinases* (CIPK/SnRK3), welche sie in ihrer Aktivität kontrollieren (Shi, 1999). Im Gegensatz zu den CPKs sind die CIPKs keine echten Sensor-Antwort-Proteine, werden aber durch ihre strikte Interaktion mit den CBLs oft als solche bezeichnet. Das Arabidopsis Genom codiert für 10 CBLs und 26 CIPKs, wodurch sich ein diverses System an Sensor- und Antwortproteinen ergibt (Weinl and Kudla, 2009, 2009). Strukturell ist das CIPK-CBL-System ähnlich zu den CPKs aufgebaut. C-Terminal der Kinasedomäne liegt die inhibitorische *junction*-Domäne, welche auch die für die CBL-Interaktion wichtige NAF-Domäne (siehe auch Abb. 2-27) enthält. Im Gegensatz zu den CPKs enthalten CIPKs an ihrem C-Terminus eine zusätzlich Proteinphosphatase-Interaktions-Domäne (PPI), über die sie unter anderem auch mit Proteinphosphatasen des ABA-Holorezeptors interagieren können (Fuchs, 2013; Chérel et al., 2002; Guo et al., 2002, 2002; Lan et al., 2011). Auch wenn die Funktion dieser Interaktion noch wenig verstanden ist, wird die Theorie vertreten, dass Proteinkinase und Proteinphosphatase eine funktionelle Einheit bilden, um den Phosphorylierungsstatus ihre Substratproteine schneller und genauer kontrollieren zu können (Batistič and Kudla, 2012; Lan et al., 2011). Durch die Beobachtung, dass CBLs neben den CIPKs auch mit PP2Cs interagieren können, wurde die Theorie aufgestellt, dass CIPK und PP2C durch die interagierenden CBLs Ca^{2+} -abhängig in ihrer Aktivität reguliert werden und so der Phosphorylierungsstatus der Zielproteine nicht nur über die Aktivität der PK, sondern gleichzeitig über die Aktivität der interagierenden PP bestimmt wird (Lan et al., 2011). Neben der Aktivität wird auch die Lokalisation der CIPKs maßgeblich durch die interagierenden CBLs bestimmt. Die CBLs 1, 4, 5 und 9 tragen N-terminale Myristoylierungsstellen und lokalisieren an der Plasmamembran (Batistic et al., 2010; Batistič and Kudla, 2012). Durch die Interaktion zwischen CIPK und CBL wird die Lokalisation der CIPK durch ihren Interaktionspartner bestimmt. Abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration kann es zur Änderung des Interaktionspartners und damit auch der subzellulären Lokalisation kommen (D'Angelo et al., 2006; Waadt et al., 2008).

Ähnlich wie die CPKs sind auch CBL-CIPKs an einer ganzen Reihe physiologischer Prozesse und im besonderen Maße an der ABA-Antwort beteiligt (Yu et al., 2013; Batistič et al., 2012; Kim et al., 2003). Bei den Substratproteinen der CIPKs findet man breite Überlappungen mit den CPKs und SnRK2s. S-type-Anionenkanäle werden sowohl von der ABA-regulierten SnRK2.6, wie auch von den Ca^{2+} -

abhängigen CPK3, 6, 21 und 23 sowie von CIPK23 phosphoryliert (Maierhofer et al., 2014; Brandt et al., 2012; Geiger et al., 2010; Nieves-Cordones et al., 2012). Auch die ABF-Transkriptionsfaktoren wurden als Substrat der CIPK11 und 26, CPK4, 11 und 23 sowie der SnRK2.2, 2.3 und 2.6 beschrieben (Fujii and Zhu, 2009; Zhu et al., 2007; Zhou et al., 2015). In vorherigen Studien wurden CIPK11 und 14 als negative Regulatoren der ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten und Interaktionspartner der ABA-abhängigen PP2Cs beschrieben (Fuchs, 2013). Neben diesen interagieren die CIPK11/SnRK3.22 und CIPK14/SnRK3.15 auch mit ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren der HB-ZIP Klasse und phosphorylieren dieses *in vitro* (Lumba et al., 2014). Ob es *in vivo* allerdings zu einer direkten Regulation der Transkriptionsfaktoren kommt, oder ob der für CIPK14 beschriebene ABA-abhängige Phänotyp (Qin et al., 2008) über die Interaktion mit den PP2Cs zustande kommt, ist bislang nicht erforscht.

1.7 Der Abscisinsäure-Rezeptorkomplexes

ABA wird durch einen Rezeptorkomplex aus der katalytisch aktiven Proteinphosphatase und der regulatorischen Komponente des Rezeptors, dem RCAR erkannt (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). In Arabidopsis gibt es 14 RCAR/PYL/PYRs und 9 PP2Cs, die an der ABA-Antwort beteiligt sind (Fuchs et al., 2014; Fujii et al., 2009). Dabei gliedern sich die RCARs in drei Unterfamilien. RCAR1/PYL9, RCAR2/PYL7, RCAR3/PYL8 und RCAR4/PYL10 bilden die Unterfamilie I, RCAR5/PYL11, RCAR6/PYL12, RCAR7/PYL13, RCAR8/PYL5, RCAR9/PYL6 und RCAR10/PYL4 die Unterfamilie II während RCAR11/PYR1, RCAR12/PYL1, RCAR13/PYL3 und RCAR14/PYL2 die Unterfamilie III bilden (Raghavendra et al., 2010). Während die RCARs der Unterfamilie I und II auch bei geringen ABA-Konzentrationen die ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten stimulieren und auch ABA-unabhängig PP2Cs inhibieren können, benötigen die RCARs der Unterfamilie III höhere ABA-Konzentrationen um eine effiziente Inhibierung der PP2Cs zu erreichen (Hao et al., 2011; Tischer, 2016). Eine Besonderheit stellt RCAR7 dar, welches sehr selektiv mit PP2Cs interagiert und präferenziell mit PP2CA einen funktionellen Co-Rezeptor bildet (Fuchs et al., 2014). Für neun PP2Cs (PP2Cs *clade A*) konnte eine negative Regulation der ABA-Antwort beschrieben werden (Fuchs et al., 2013; Umezawa et al., 2009). Namentlich handelt es sich dabei um ABI1, ABI2, HAB1 und HAB2, welche die Unterfamilie I bilden, sowie AHG1, PP2CA, HAI1, HAI2, und HAI3 aus der Unterfamilie II. Auch wenn alle neun PP2Cs als negative Regulatoren agieren, unterscheiden sie sich doch in ihrer Effizienz die ABA-Antwort zu inhibieren und ihrer Affinität zu den RCARs. Durch die Kombinatorik aus 9 PP2Cs und 14 RCARs können theoretisch 126 verschiedene ABA-Co-Rezeptorkomplexe gebildet werden, die sich in ihrer ABA-Affinität, SnRK2-Spezifität und der *in planta* Lokalisation unterscheiden können. Durch *in vivo* und *in vitro* Charakterisierung der

unterschiedlichen Holo-Rezeptorkomplexe wurden die Funktionalität dieser in den letzten Jahren intensiv untersucht (Tischer et al., 2017; Tischer, 2016; Wunschel, 2017).

Während die PP2C für die katalytische Inhibierung der SnRK2 verantwortlich ist wird ABA hauptsächlich durch die hydrophobe Bindetasche im RCAR-Protein gebunden (Melcher et al., 2009). Die ABA-Bindetasche wird aus der C-terminalen Helix des RCARs und einem siebensträngigen β -Faltblatt gebildet, wodurch eine in allen RCARs hochkonservierte hydrophobe Tasche entsteht. Durch den sogenannte *gate-latch-loop* Mechanismus faltet der *gate-loop* nach ABA-Bindung über die Bindetasche (*closed gate-loop*) und verschließt diese (Melcher et al., 2009; Santiago et al., 2009). Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung des RCARs wodurch die Interaktion zwischen PP2C und RCAR stabilisiert und die katalytische Aktivität der PP2C durch das RCAR-Protein geblockt wird. Hierbei spielt ein in allen PP2Cs (außer AHG1, vgl. Abb. 3-5) hochkonserviertes Tryptophan (W385 in HAB1), welches als einziger Aminosäure der PP2C direkt an der ABA-Bindung beteiligt ist, eine entscheidende Rolle (Abb. 1-9A, Region 3). Dieser Tryptophanrest ragt aus der Oberfläche der PP2C heraus und inseriert bei Bindung der PP2C an das RCAR zwischen dem *gate-* und *latch-loop* des RCARs. Durch eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung bindet dieser direkt an ABA (Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009). Zusätzlich kommt es zur Interaktion zwischen einem konservierten Prolin im *gate-loop* des RCAR (RCAR13-P112) mit einem konservierten Arginin in der PP2C (HAB1-R389) wodurch es zur Ausrichtung des *gate-loops* in das aktive Zentrum der PP2C kommt (Abb. 1-9A, Region 2). Hier interagiert ein konserviertes Serins im *gate-loop* des RCARs mit dem Mn^{2+} koordinierenden Glutamat der PP2Cs (HAB1-E203) und einem Glycin (HAB1-G246), das sich nahe dem katalytischen Zentrum befinden (Abb. 1-9A, Region 1). Durch diese Interaktion wird die katalytische Aktivität der PP2C blockiert (Yin et al., 2009; Zhang et al., 2015; Soon et al., 2012). Grundsätzlich ist eine Interaktion zwischen RCAR und PP2C auch ohne ABA möglich. Durch die ABA-induzierte Konformationsänderung im RCAR und die direkte PP2C-ABA Interaktion kommt es aber zur Stabilisierung des trimeren-Holo-Rezeptorkomplexes (Zhang et al., 2015; Melcher et al., 2010).

RCAR und SnRK2 konkurrieren um die gleichen Bindestellen der PP2C. Durch die Kristallisierung des HAB1/SnRK2.6 Komplexes (Soon et al., 2012) konnte gezeigt werden, dass bei der Interaktion zwischen SnRK2 und PP2C ähnliche Interaktionsflächen wichtig sind wie für die Interaktion zwischen RCAR und PP2C (Abb. 1-9B). PP2C und SnRK2 interagieren über vier verschiedene Interaktionsflächen miteinander, von denen drei sich im Bereich der Kinasedomäne befinden und für die Inhibierung der SnRK2-Aktivität durch die PP2C wichtig sind. Bei einer dieser Interaktionen ist auch das für die RCAR-PP2C Interaktion wichtige Tryptophan beteiligt (HAB1-W385). Dieses wird nahe dem aktiven Zentrum der PK durch drei Aminosäuren gebunden (SnRK2.6-R139, -E144, I183). Zusätzlich kommt es zur

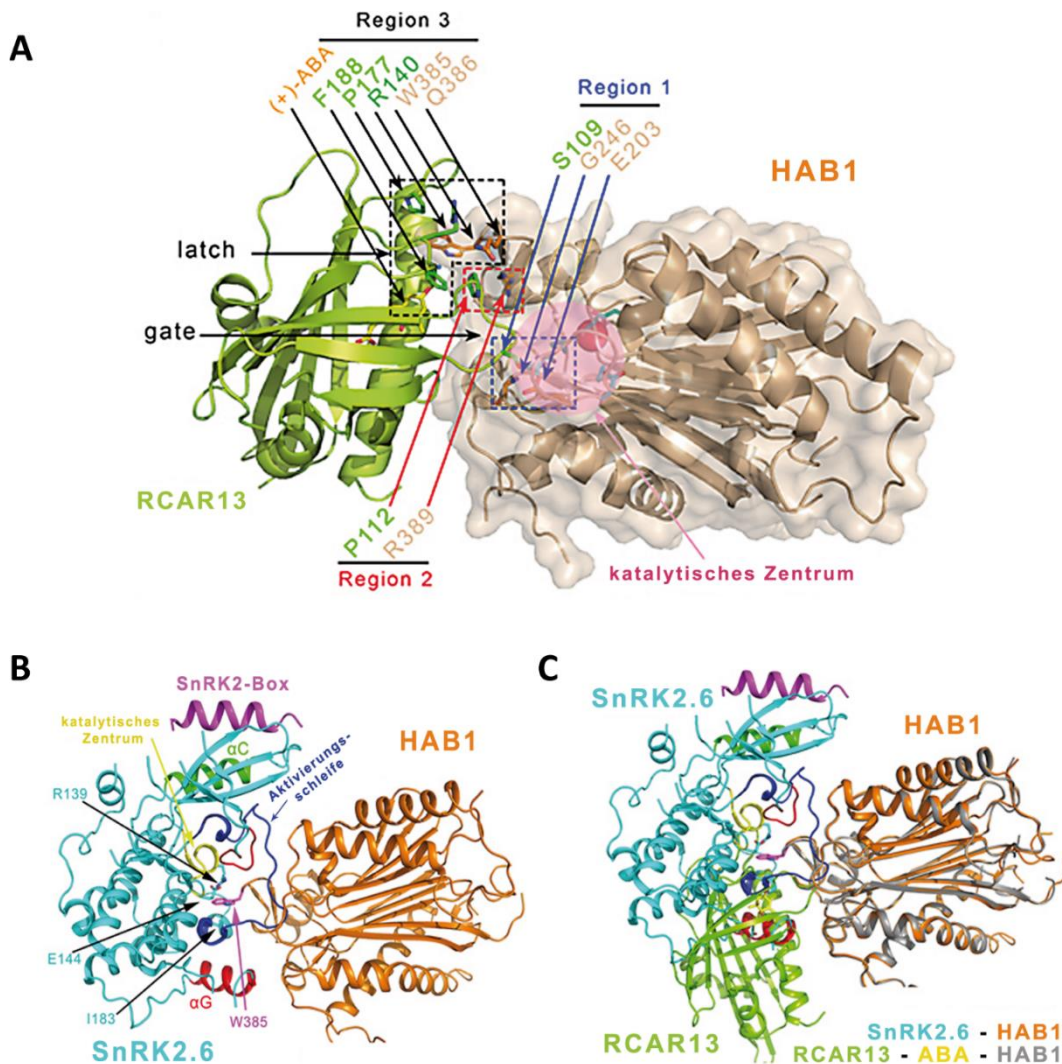


Abb. 1-9 Strukturelle Darstellung des PP2C-RCAR/SnRK2 Komplexes

Darstellung der RCAR13-HAB1 Interaktion (A; PDB ID: 4DS8). RCAR und PP2C interagieren über drei Interaktionsflächen miteinander. Der geschlossene *gate-loop* von RCAR13 (Grün) ragt in das katalytische Zentrum (Pink unterlegt) von HAB1 (Ocker). Dabei interagiert RCAR13-S109 mit HAB1-G246 und -E203 wodurch die katalytische Aktivität der PP2C geblockt wird (Region 1). Die richtige Positionierung des *gate-loops* wird durch die Interaktion zwischen RCAR13-P112 und HAB1-R389 (Region 2) erreicht. HAB1-W385 und -Q386 werden zwischen dem RCAR13 *gate-* und *latch-loop* positioniert wodurch HAB1-W385 indirekt mit dem gebundenen ABA interagieren kann (Region 3). HAB1-W385 ist auch für die HAB1-SnRK2.6 (Cyan, PDB ID: 3UJG) Interaktion wichtig (B). Vier Regionen sind für die HAB1-SnRK2.6 Interaktion entscheidend, von denen drei in der Kinasedomäne liegen. HAB1 interagiert mit der SnRK2.6-Aktivierungsschleife (Blau) welche es dephosphoryliert, dem katalytischen Zentrum der PK (Gelb) und der α -G Helix dieser (Rot) (Soon et al., 2012). Zusätzlich ist die SnRK2.6 mit der PP2C über die flexible ABA-Box verbunden (nicht gezeigt, siehe Abb. 1-5). SnRK2.6 belegt dieselben Interaktionsflächen in HAB1 wie RCAR13, wodurch es zur Konkurrenz der beiden Interaktionspartner kommt. Die Überlagerung der beiden Kristallstrukturen zeigt die Ähnlichkeit der Interaktionsflächen (C, ABA in Gelb).

Basierend auf: Zhang, X.L., Jiang, L., Xin, Q., Liu, Y., Tan, J.X., and Chen, Z.Z. (2015). Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front. Plant Sci.* 6.

Interaktion zwischen der α G-Helix der PK mit HAB1-E323 und HAB1-T324. Durch diese beiden Interaktionen wird die PP2C über der Aktivierungsschleife der PK positioniert, wodurch es zur Dephosphorylierung des kritischen S175 in SnRK2.6 durch die PP2C kommt (Soon et al., 2012). Zusätzlich interagieren die beiden Proteine über ionischen Wechselwirkungen zwischen der ABA-Box und der positiv geladenen Oberfläche der PP2C (vgl. Abb. 1-5 und Abschnitt 1.6.1). Durch *in vitro* Bindestudien zwischen den beiden Proteinen (SnRK2.6 und HAB1) konnte gezeigt werden, dass die Mutation einer einzelnen Interaktionsfläche nicht ausreichend ist, um die Interaktion der beiden Proteine zu stören. Nur bei gleichzeitiger Mutation der ABA-Box-Interaktion und einer Interaktionsfläche innerhalb der Kinasedomäne konnte die Interaktion der beiden Proteine unterbunden werden (Soon et al., 2012). Durch diese und andere Studien etablierte sich das Modell eines tetrameren Proteinkomplexes zwischen RCAR, ABA, PP2C und SnRK2 bei dem, abhängig von der ABA-Konzentration der PP2C Interaktionspartner zwischen RCAR und SnRK2 wechselt. Durch die flexible Verknüpfung der PP2C und SnRK2 über die ABA-Box kann der Komplex schnell und reversibel zwischen beiden Bindungspartnern hin und her wechseln, wodurch eine genaue Regulation der SnRK2-Aktivität möglich ist (Xie et al., 2012; Ng et al., 2011; Soon et al., 2012).

1.8 Rekonstruktion der ABA-Signaltransduktion in Hefe

Die Entdeckung des ABA-Rezeptors in 2009 (Ma et al., 2009; Park et al., 2009) und seine strukturelle Aufklärung (Melcher et al., 2009) im Komplex mit der regulatorischen PP2C haben unser Verständnis der ABA-Signaltransduktion geprägt. Der ABA-abhängige Wechsel des PP2C-Interaktionspartner zwischen dem RCAR-Rezeptorprotein oder der SnRK2-Proteinkinasen haben sich zum zentralen Paradigma dieser Signalkaskade entwickelt (Soon et al., 2012). Der relativ simple Aufbau der ABA-Signalkaskade und das heutzutage gute Verständnis der beteiligten Signalkomponenten führte schon früh zu dem Versuch, die ABA-Signalkaskade durch transiente Expression seiner Komponenten nachzustellen. Durch die Expression des Transkriptionsfaktors ABF2, der aktivierenden Kinase SnRK2.6, der inhibitorischen PP2C ABI1 und der ABA-bindenden Rezeptoruntereinheit RCAR11 konnten die Prozesse der ABA-Signalkaskade in Arabidopsis Protoplasten geprüft werden (Fujii et al., 2009). Allerdings basierte dieses System weiterhin auf der pflanzlichen Zelle und erfasst nur die aktivierenden und inaktivierenden Effekte der einzelnen Signalkomponenten im pflanzlichen Hintergrund. Ob diese vier ABA-Signalkomponenten alleinig für eine funktionelle ABA-Signalkaskade entscheidend sind und auch außerhalb der pflanzlichen Zelle eine funktionale Signalkaskade bilden können, konnte bisher nicht beantwortet werden.

Die sich neu entwickelnde Forschungsrichtung der synthetischen Biologie versucht, auf Grundlage des bestehenden Verständnisses molekularer Prozesse, diese auf neue Art zu kombinieren oder in artfremde Systeme zu transferieren, um lebende Systeme mit neuen Eigenschaften und Funktionen zu generieren (Nemhauser and Torii, 2016). Zwei unterschiedliche Ziele lassen sich durch den Transfer eines biologischen Prozesses in einen anderen Organismus verfolgen. Auf der einen Seite lassen sich durch den schöpferischen Aspekt dieser Forschungsrichtung neue, zuvor nicht mögliche, Anwendungen kreieren. So schaffte es eine amerikanische Forschergruppe durch die Expression der humanen Cytochrom-P450 2E1 Monooxygenase in Pappel die Metabolisierung giftiger Trichlorethylene zu steigern, um diese aus kontaminierten Böden zu entfernen (Doty et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Samuel Zeeman konnte kürzlich durch die Expression verschiedener Gene des Stärke-Metabolismus aus Arabidopsis Stärke-ähnliche unlösliche Glucane in Hefe erzeugen (Pfister et al., 2016).

Besonders Rezeptoren eignen sich im Bereich der synthetischen Biologie gut die zelluläre Reaktion als Antwort auf externe Signale zu steuern. Hierbei stellt sich aber die Schwierigkeit, das Rezeptorsignal in den Zellkern zu leiten und dort in ein expressionelles Signal zu transferieren. Bisherige Studien lösten dieses Problem indem vorhandene Signalkaskaden genutzt wurden und lediglich die Rezeptor-Komponenten geändert wurden. Durch den Transfer des Cytokinrezeptors CRE1 aus Arabidopsis in Hefezellen, denen der strukturell ähnliche Osmorezeptor SLN1 fehlte, konnte der letale Phänotyp der *sln1Δ*-Zellen durch die Applikation von Cytokin im Hefemedium aufgehoben werden. SLN1 führt bei normalen osmolaren Bedingungen zur Inhibition der MAPK-Kaskade. Durch die konstante Aktivität der Signalkaskade in *sln1Δ* sind die Zellen nicht mehr lebensfähig. Da CRE1 der gleichen Klasse an Rezeptoren entspricht wie SLN1, scheint dieser die SLN1-Funktion in Antwort auf das artifizielle Cytokin-Signal zu übernehmen (Inoue et al., 2001). Der ABA-Rezeptor RCAR11/PYR1 konnte durch umfangreiche Mutation in einer Weise verändert werden, dass er die Agro-Chemikalie Mandipropamid bindet und mit dieser einen funktionale RCAR/Mandipropamid/PP2C-Rezeptorkomplex bildet. Durch Überexpression des PYR1^{MANDI}-Rezeptors in Arabidopsis und Tomate konnte die Trockentoleranz der Pflanzen artifiziell durch die Applikation von Mandipropamid gesteigert werden (Park et al., 2015).

Der zweite Aspekt der synthetischen Biologie ist es, durch den Transfer eines molekularen Prozesses in einen anderen Organismus, diesen in einem heterologen System zu untersuchen, um Einflüsse durch endogene Faktoren auszuschließen. Durch die Konstruktion eines artifiziellen Auxin-Rezeptors, der durch die Proteinfusion eines Aux/IAA-Proteins mit der inhibitorischen Domäne des TOPLESS Co-Repressors generiert wurde, konnte die Auxin-abhängige Induktion des *Auxin Response Factors* (ARF) in *Saccharomyces cerevisiae* nachgestellt werden. Durch die Applikation von Auxin kommt es zur *Auxin*

Signalling F-Box (ABF) vermittelten Ubiquitinierung und Degradation des Aux/IAA-TOPLESS-Repressors durch das Hefe-Proteasom, wodurch die ARFs aktiv werden können und die Expression eines entsprechenden Reporters aktivieren (Pierre-Jerome et al., 2014). Durch diese Fusion aus pflanzlichen Signalkomponenten und molekularen Mechanismen der Hefe, konnten die Autoren ein System entwickeln um die regulatorische Funktion einzelner Aux/IAA-Proteine und ihrer Degradationsraten außerhalb der pflanzlichen Zelle zu untersuchen.

Die Erforschung der ABA-Signalkaskade, welche im Gegensatz zur Auxin-Signalkaskade hauptsächlich auf der reversiblen Phosphorylierung und Dephosphorylierung ihrer Signalkomponenten beruht (vgl. Abschnitt 1.3), erfolgte hauptsächlich auf Basis von transienter oder stabiler *in vivo* Untersuchungen der Signalkomponenten in der pflanzlichen Zelle oder der *in vitro* Charakterisierung der Enzymfunktion mit rekombinant exprimierten Proteinen. Während der erste Ansatz die Charakterisierung einzelner Genfunktionen im Hintergrund des pflanzlichen Proteoms betrachtet und so nur schwer ihre alleinige Funktion ohne die Beeinflussung durch andere Faktoren beschreiben kann, kommt es bei der Verwendung von rekombinanten Proteinen häufig zu fehlerhaft gefalteten Proteinen mit artifizieller Enzymaktivität, die in der lebenden Zelle durch die Kontrolle der Enzymfunktion und deren Abbau bei falscher Faltung nicht möglich wäre. Eine *in vivo* Methode zur Untersuchung der reversiblen Proteinphosphorylierung und funktionellen Beschreibung der ABA-Signalkomponenten wäre eine sinnvolle Ergänzung zu den gängigen Methoden im Bereich der Signaltransduktionsforschung. Die funktionelle Rekonstruktion der ABA-Signaltransduktion in *S. cerevisiae* würde auf der einen Seite die zentrale Rolle der Haupt-ABA-Signalkaskade bestätigen und könnte Aufschluss über die spezifische Funktion einzelner Faktoren geben. Besonders die integrative Phosphorylierung der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren durch ABA-abhängige- und Ca^{2+} -abhängige-Proteinkinasen könnte in einem heterologen System ohne die gegenseitige Beeinflussung der beiden Wege beschrieben werden. Auf Rezeptorebene hätte ein solches System den Vorteil, dass die ABA-Affinität einzelner Co-Rezeptoren *in vivo* beschrieben werden könnte. Vorschritte der synthetischen Biologie im Bereich der ABA-Signaltransduktion könnten eine inspirierende Wirkung auf die Erforschung anderer Hormon-Signalkaskaden haben und der Erforschung phosphorylierungsabhängigen Signalkaskaden einen neuen Blickwinkel ermöglichen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

ABA ist der zentrale Mediator der abiotischen Stressantwort (Vishwakarma et al., 2017; Finkelstein, 2013; Raghavendra et al., 2010). Die Umwandlung dieses chemischen Signals in ein für die Zelle interpretierbares molekulares Signal ist Aufgabe der ABA-Signalkaskade (Verma et al., 2016). Durch die inhibitorische Regulation der SnRK2-Proteinkinasen durch den ABA-Holo-Rezeptorkomplex und dessen Deaktivierung durch das Phytohormon, kommt es in einem dreistufigen Prozess zur Aktivierung der ABA-Antwort, an dessen Ende die Phosphorylierung und Aktivierung von Ionenkanälen im Cytoplasma und der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren im Nucleus steht. Ziel dieser Arbeit war es die ABA-Signalkaskade in dem heterologen Organismus *S. cerevisiae* (Hefe) nachzustellen und die Funktion einzelner Signalkomponenten unabhängig vom pflanzlichen Proteom zu untersuchen. Hierzu sollte die spezifische Bindung ABA-abhängiger Transkriptionsfaktoren an ihre ABRE-Promotorelemente genutzt werden, um deren Aktivität und Regulation durch Komponenten der Signalkaskade untersuchen zu können. Besonders die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren über Proteinkinasen der abiotischen Stressantwort wie den ABA-induzierten SnRK2s und den Ca²⁺-regulierten CPKs und CIPKs, sowie die Integration der beiden Signalwege auf Ebene der Transkriptionsfaktoren, sollte genauer betrachtet werden. Die ABA-abhängige Regulation der SnRK2-Proteinkinasen durch den ABA-Holorezeptor in Hefe sollte die Möglichkeit eröffnen, die Kombinatorik verschiedener Co-Rezeptoren sowie deren ABA-Affinität in einem heterologen *in vivo* System zu analysieren. Die Rekonstruktion der ABA-Signalkaskade in Hefe wäre der erste Nachweis einer funktionellen, natürlichen Phytohormon-Signalkaskade und würde der Forschung im Bereich der ABA-Signaltransduktion eine interessante Alternative zu den etablierten Methoden bieten. Das Potenzial und die Limitationen eines solchen Systems zu ergründen ist Ziel dieser Arbeit.

2 ERGEBNISSE

2.1 Etablierung des ABA-Transaktivierungsassays in Hefe

Transiente Reporterassays bieten die Möglichkeit dynamisch und flexibel die Funktion einzelner Gene *in vivo* untersuchen zu können (Yoo et al., 2007). Hierbei macht man sich die spezifische Aktivierung streng regulierter Promotoren zu Nutze, um über die Transkription spezifisch induzierter Gene Rückschlüsse auf die Induktion der Signalkaskade zu ziehen. Durch Verwendung einfach zu quantifizierender Reportergene wie β -Galactosidase, Fluoreszenzproteine oder Luciferase anstelle des endogenen Gens kann die Aktivierung der Promotoren ohne großen experimentellen Aufwand bestimmt werden.

Ein weit verbreitetes System zur *in vivo* Bestimmung der ABA-Signalkaskade ist der transiente Mesophyll-Protoplasten Assay (Yoo et al., 2007; Czap, 2015; Moes et al., 2008). Als induzierbaren Promotor nutzt man hierbei einerseits endogene Promotoren wie den pRD29B, pRAB18 (Moes et al., 2008) oder auch pHB6 (Christmann et al., 2006), aber auch synthetische Promotoren, welche spezifische Bindeelemente wie das ABRE *cis*-Element tragen. Die transiente Analyse von Effektoren in Protoplasten hat den Vorteil, den Einfluss eines Gens auf die ABA-Antwort analysieren zu können. Allerdings bringt sie auch den Nachteil mit sich, nicht unterscheiden zu können, ob es sich bei den gefundenen Effekten um eine direkte oder indirekte Regulation der ABA-Signalkaskade handelt. Durch das endogene Proteom des Protoplasten bleibt das Untersuchungssystem komplex und es können lediglich additive Effekte des transient exprimierten Gens auf die bestehende endogene Signalkaskade untersucht werden.

Zur Etablierung eines heterologen *in vivo* Systems bietet sich der Organismus *S. cerevisiae* (Hefe) an. Als eukaryotischer Organismus verfügt Hefe über ähnliche post-transkriptionelle Modifikationen wie pflanzliche Zellen, welche für die korrekte Proteinsynthese nötig sind. Zusätzlich bietet die Arbeit in Hefe ein breites Spektrum an molekularbiologischen und genetischen Methoden sowie einfache Kultivierungsbedingungen. Zur genaueren Untersuchung der ABA-Signalkaskade wurde in dieser Studie, in Anlehnung an das etablierte Protoplasten System, ein ABA-Reportersystem in Hefe entwickelt. Im folgenden Abschnitt soll die Etablierung des Reportersystems genauer erläutert werden.

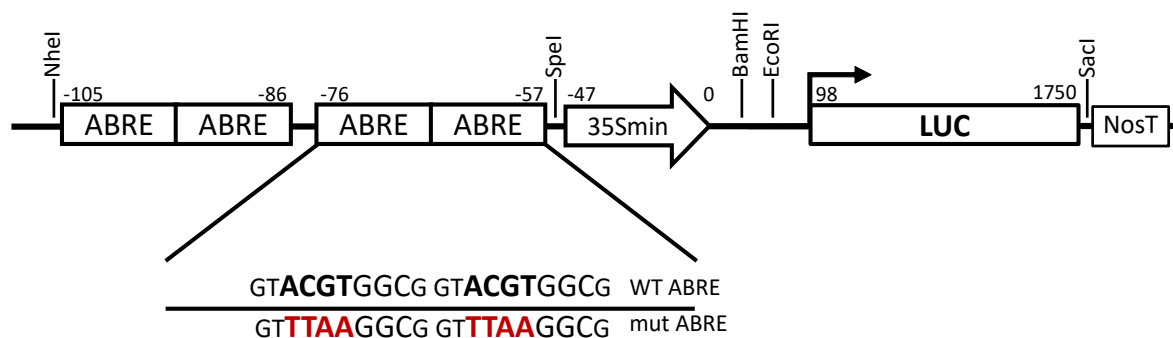


Abb. 2-1 Aufbau des synthetischen ABA-Responsepromotors (pSAR)

Zur Konstruktion des pSAR wurden insgesamt vier hintereinander geschaltete ABRE-Bindesequenz vor einen 35S-Minimalpromotor kloniert. Neben der wildtypischen ABRE-Bindesequenz (WT ABRE, funktioneller pSAR) wurde auch eine Reportervariante erzeugt, die statt dieser eine mutierte Version des ABRE Motives trägt (mut ABRE, nicht funktioneller pSAR), die keine Bindung der ABFs mehr erlaubt. Durch die nachgeschaltete *firefly luciferase* (LUC) ist es möglich, die Promotoraktivität indirekt über die LUC-Aktivität nachzuweisen. Das gesamte Reporterkonstrukt wurde in den *Lys2*-Locus der Hefe (BMA64-1A) integriert (basierend auf Czap (2015)).

2.1.1 Konstruktion des synthetischen ABA-Responsepromotors (pSAR)

Zur funktionellen Analyse ABA-abhängiger Transkriptionsfaktoren in Hefe wurde ein Luciferase basiertes Reportersystem entwickelt, welches die Bindung und Aktivität der ABFs über die nachgeschaltete Expression der *firefly Luciferase* (LUC) quantifiziert. Hierzu wurde ein synthetischer ABA-Responsepromotor (pSAR) entwickelt der neben einem 35S-Minimalpromotor, der für die korrekte Bindung der Polymerase und der Transkriptionsinitiation unerlässlich ist, vier ABRE-Sequenzen trägt um die effiziente Bindung der ABFs zu ermöglichen (Abb. 2-1). Neben dem funktionellen pSAR, mit der wildtypischen ABRE-Sequenz ACGTGGC (Choi et al., 2000), wurde auch ein nicht funktioneller pSAR mit mutierter ABRE-Sequenz konstruiert. Hierbei wurde die Konsensus-Sequenz ACGT durch TTAA ausgetauscht, wodurch eine Bindung der ABFs an das *cis*-Element nicht mehr möglich sein sollte. Das komplette Reportergen wurde in den *Lys2*-Locus der Hefe (Stamm BMA64-1A) integriert. Der resultierende Stamm wurde als pSAR-Reporterhefe (vgl. 4.4) bezeichnet.

2.1.2 Bindungsstudie der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren

Analog zum *Yeast-one-Hybrid* (Y1H) System (Clontech, 2012) wurden die ABFs an die Aktivierungsdomäne (AD) des GAL4-Transkriptionsfaktor fusioniert. Kommt es zur Bindung der ABFs an das ABRE-Motiv wird durch die AD die Transkription initiiert und die nachgeschaltete Luciferase exprimiert. Die Luciferaseaktivität zeigt indirekt die Bindungsstärke der ABFs an den Reporter an.

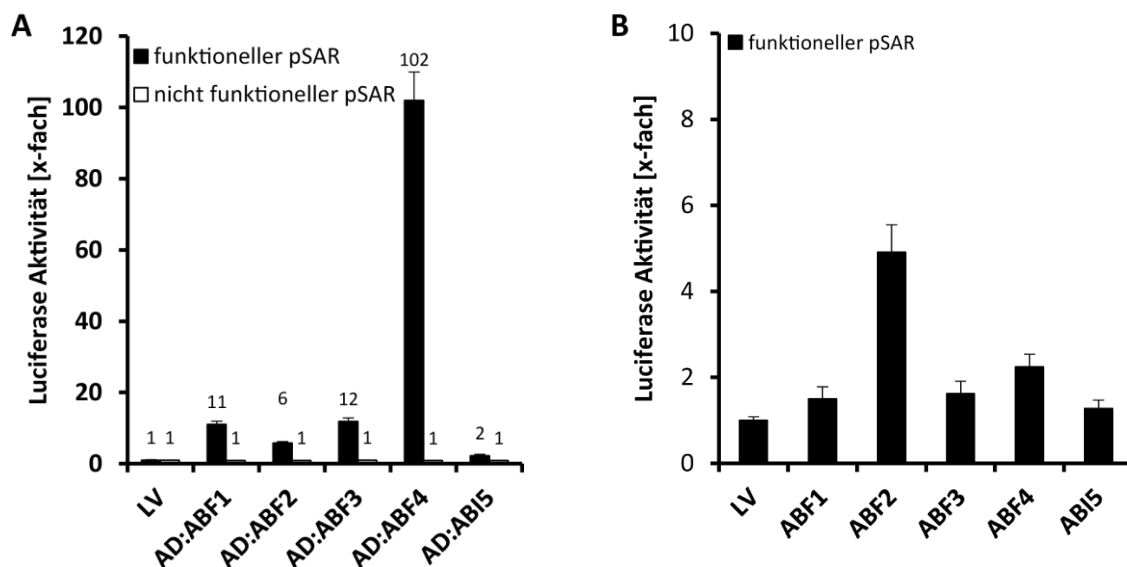


Abb. 2-2 ABF-Transaktivierung des pSAR

LUC-Aktivität in *S. cerevisiae* mit stabil integriertem funktionellen oder nicht-funktionellem pSAR nach Cotransformation mit ABFs. (A) Durch die Fusion der Gal4-AD (AD) wird die Bindung der ABFs an den pSAR gemessen. (B) pSAR Aktivierung der ABFs ohne AD Fusion. Die relative Luciferaseaktivität (rLUC, LUC-Aktivität/ Abs_{600}) wurde auf die rLUC der Leervektor-Kontrolle (LV) normalisiert, und als x-Faches dieser dargestellt. Fehlerbalken zeigen das 95%ige Konfidenzintervall (95% Konf. Int.).

Neben der Reporterhefe mit funktionellem pSAR wurde auch Hefe mit nicht-funktionellem pSAR (mut ABRE) als Kontrolle verwendet (Abb. 2-1). Durch die Mutation des ABRE kann es zu keiner Bindung der ABFs an das ABRE-Motiv mehr kommen, womit ein ABRE-unabhängiger Effekt der Aktivierung untersucht werden kann. Durch die Cotransformation der pSAR-Reporterhefe (*S. cerevisiae* BMA64-1A mit funktionellem pSAR) mit AD:ABF1, AD:ABF2 und AD:ABF3 kam es jeweils zu einem 6-12-fachen Anstieg der LUC-Aktivität (Abb. 2-2A). Im Gegensatz dazu zeigten Hefen, die mit AD:ABI5 transformiert wurden, keine signifikante Steigerung der Luciferaseaktivität. AD:ABF4 hingegen führte zu der mit Abstand stärksten Aktivierung des Reporters und steigerte die Luciferaseaktivität um das 102-Fache gegenüber der Leervektorkontrolle (LV). Wurde der nicht-funktionelle pSAR verwendet, konnte durch keinen der ABFs eine Induktion des Reporters erzielt werden. Die Aktivierung des pSAR durch ABF1 - 4 ist daher eindeutig auf die Bindung dieser an die ABRE-Motive zurück zu führen.

Durch die Cotransformation der wildtypischen (WT) ABFs (ohne AD-Fusion) kann getestet werden, ob die ABFs auch ohne artifizielle Aktivierungsdomäne fähig sind, die Expression der Luciferase zu induzieren (Abb. 2-2B). Mit Ausnahme von ABF2 und ABF4 zeigte keiner der anderen ABFs eine relevante Aktivierung des pSAR. Bei ABF2 kam es zu einer Steigerung der Luciferase Aktivität um das 4 bis 5-Fache gegenüber der Kontrolle. Auch ABF4 zeigte eine doppelt so hohe Luciferase Aktivität wie

die Kontrolle. Verglichen mit der 102-fachen Aktivierung die AD:ABF4 (Abb. 2-2A) erzielte, zeigte sich aber ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versionen. Die Aktivierung des pSAR durch ABF2 und ABF4 ohne AD Fusion belegt, dass die unfusionierten ABFs in der Lage waren den pSAR zu aktivieren. Der Unterschied zwischen den AD-Fusionen und den nicht fusionierten Transkriptionsfaktoren deutete auf die Inaktivität der ABF-eigenen Aktivierungsdomäne hin. Der Vergleich beider Versionen zeigte, dass ABF1 - 4 an den funktionellen pSAR binden konnten, diesen aber kaum aktivieren konnten. ABI5 hingegen schien weder an den pSAR zu binden noch diesen zu aktivieren, und ist daher ungeeignet für die Verwendung im pSAR-Transaktivierungs-Luciferase Assay (pSAR-TLA). Es hatte den Anschein, dass für die effiziente Funktion der Transkriptionsfaktoren eine Aktivierung dieser notwendig war, die in Hefe nicht stattfand. Hier könnte die Aktivierung durch ABF phosphorylierende Proteinkinasen (PK) eine wichtige Rolle spielen.

2.2 Transaktivierung mit SnRK2-Proteinkinasen

Die wichtigsten Aktivatoren der ABA-Signaltransduktion sind die Proteinkinasen der SnRK2-Familie. Die gut untersuchte SnRK2.6 sorgt neben der Phosphorylierung und Regulation der SLAC1 und KAT1 Ionenkanäle an der Plasmamembran auch für die Aktivierung der ABFs im Nucleus. Die Aktivierung der ABFs erfolgt durch spezifische Phosphorylierung in drei konservierten Bereichen im N-terminalen Bereich der Transkriptionsfaktoren (Yoshida et al., 2015; Furihata et al., 2006). Wie in Abschnitt 1.6.1 beschrieben, besitzt die SnRK2.6 neben der Kinasedomäne und einer kurzen N-terminalen Region, zwei

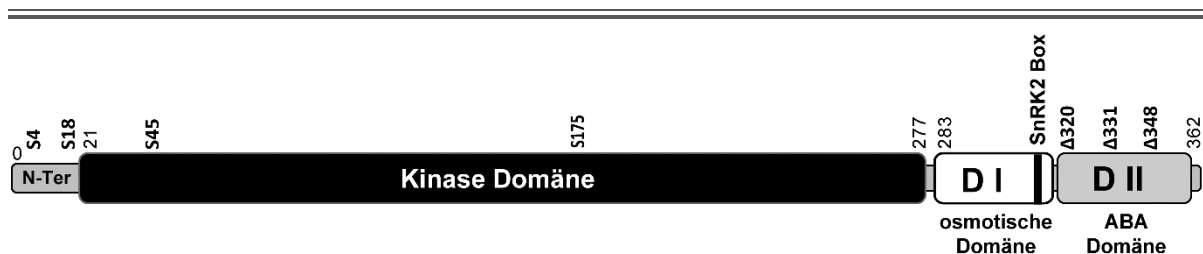


Abb. 2-3 Schematischer Aufbau der Proteinkinase SnRK2.6

SnRK2.6 ist ein 41 kDa (362 AS) großes Protein, welches neben der Kinasedomäne und einem kurzen N-terminalen Überhang zwei regulatorische Domänen (DI und DII) trägt. DI, auch osmotische Domäne genannt, ist für die Aktivität der SnRK2.6 obligat. Die durch die SnRK2-Box kodierte α -Helix spielt eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der SnRK2.6 (siehe 1.6.1). DII, oder auch ABA-Box, ist bei der Interaktion mit den PP2Cs beteiligt und wichtig für die ABA-abhängige Aktivierung der SnRK2.6. Durch die C-terminale Verkürzungen des Genes nach den Aminosäuren (AS) 348, 331 und 320, die jeweils Teile oder die komplette ABA-Box entfernen, kommt es zur Aktivierung der PK *in vitro* (Belin et al., 2009). Phosphorylierbare Serine (S4, S18, S35), die wichtig für die *in planta* Funktion der SnRK2.6 sind, sind ebenfalls markiert. Die Phosphorylierung des S175 in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne ist obligat für die Kinaseaktivität. Zahlen über den Domänen zeigen die entsprechende AS an. Das Schema ist maßstabsgetreu.

regulatorische Domänen (Abb. 2-3). Belin et al. (2009) konnten zeigen, dass die Deletion der ABA-Box zu einer 20%igen Steigerung der Kinaseaktivität führte, die unabhängig von der PP2C-Regulation ist. Darüber hinaus sind die potentiellen Phosphorylierungsstellen S4, S18 und S35 wichtig für die *in vivo* Funktion der Proteinkinase.

2.2.1 Transaktivierung von ABF2 durch SnRK2.6

Es wurden in dieser Arbeit acht Varianten der SnRK2.6 erzeugt und auf ihre Eigenschaft zur ABF2 Transaktivierung getestet (Abb. 2-4). Während ABF2 alleine eine schwache 4-fache Aktivierung gegenüber der LV Kontrolle zeigte, kam es bei der Cotransformation mit SnRK2.6 zu einer deutlichen Steigerung des Luciferasesignals auf das 129-fache gegenüber der LV Kontrolle bzw. einer 32-fachen Steigerung gegenüber der ABF2 Aktivität. Wurde statt der aktiven PK eine inaktive Version verwendet (SnRK2.6 S175A), bei der es durch Mutation des S175 zu keiner Aktivierung kommen kann (Vlad et al., 2010), kam es zu keiner relevanten Steigerung des Signals gegenüber der ABF2 + LV Kontrolle. Durch Cotransformation von SnRK2.6-Varianten, denen Teile der ABA-Box (DII) fehlen (SnRK2.6 Δ 348, Δ 331

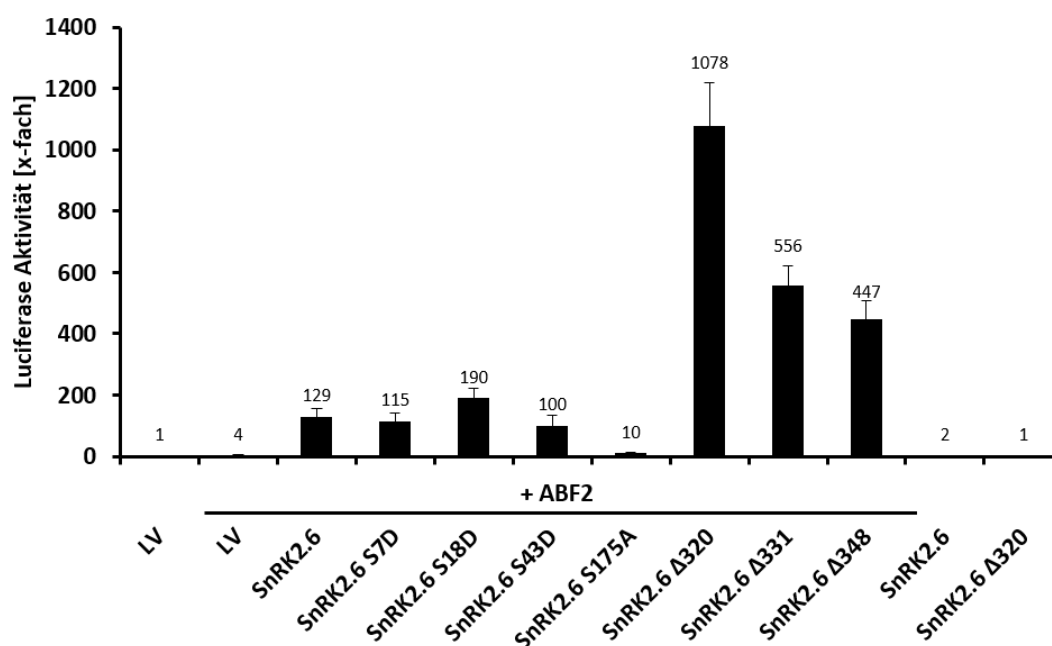


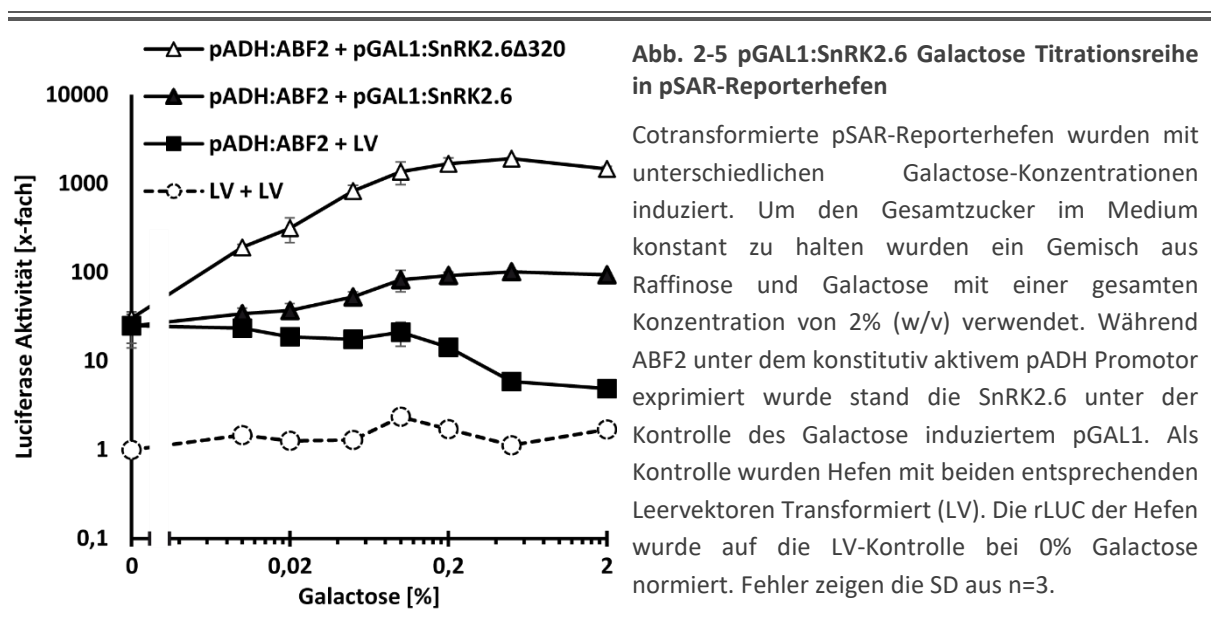
Abb. 2-4 Cotransformation von ABF2 mit verschiedenen SnRK2.6 Varianten in Hefe

Luciferaseaktivität der mit ABF2 und SnRK2.6 Varianten cotransformiert en pSAR-Reporterhefen. Die Anwesenheit von ABF2 wird durch einen horizontalen Strich markiert. Proben die kein ABF2 enthalten wurden stattdessen mit dem entsprechenden LV transformiert. Die rLUC wurde auf die Aktivität der Leervektorkontrolle (LV ohne ABF2) normalisiert. Die Zahlen über den Balken geben die rLUC-Aktivität im x-Fachen der LV Kontrolle an. Fehlerbalken zeigen das 95%ige Konf. Int.

und $\Delta 320$; Siehe Abb. 2-3), kam es zu einer schrittweisen Steigerung des Luciferasesignals. So zeigte die SnRK2.6 $\Delta 320$ eine 8-fach höhere Aktivität gegenüber dem SnRK2.6 WT und eine über 250-fache Aktivitätssteigerung gegenüber ABF2 allein. Die Deletion der halben ABA-Box (SnRK2.6 $\Delta 348$) zeigte hingegen nur eine 3,5-fache Aktivitätssteigerung gegenüber dem WT. Die Mutation der potentiellen Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Bereich der PK (SnRK2.6 S7D, S18D und S43D) führte zu keiner relevanten Änderung der Aktivität. Die Cotransformation der WT SnRK2.6 oder der hyperaktiven SnRK2.6 $\Delta 320$ ohne ABF2 zeigte keine Änderung des Luciferasesignals gegenüber der Kontrolle (Abb. 2-4). Die Steigerung der pSAR Aktivität ist strikt an die Anwesenheit von ABF2 und eine aktiven PK gebunden. Durch die Coexpression des ABF2 mit einer aktivierenden PK kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors, welcher wiederum über den pSAR die Genexpression der LUC aktiviert. Es kann daher über die Aktivität des Luciferasesignals Rückschlüsse auf die Transaktivierungsleistung der Proteinkinase gezogen werden.

2.2.2 Galaktose Induktion der Proteinkinase

In den zuvor gezeigten Versuchen stand die Proteinkinase unter der Kontrolle des Galactose-induzierbaren Promotors GAL1. Über die Induzierbarkeit des Promotors kann untersucht werden, inwiefern die Transaktivierung des pSAR über ABF2 von der Expression der Proteinkinase abhängt. Hierfür wurden die pSAR-Reporterhefen mit ABF2, welches unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven ADH-Promotors stand, und pGAL1:SnRK2.6 oder pGAL1:SnRK2.6 $\Delta 320$ transformiert (Abb. 2-5). Als Kontrolle diente Hefe die alleinig mit ABF2, der SnRK2.6 oder dem LV transformiert wurden. Zur



Induktion der SnRK2.6 Proteinsynthese wurde ein Gemisch aus Raffinose und Galactose als Zuckerquelle, mit einer Gesamtzucker Konzentration von 2 % (w/v) genutzt, wobei die Galactose Konzentration zwischen 0 – 2 % variierte. Die mit LV transformierten Hefen zeigten keine Änderung der LUC-Aktivität durch Änderung der Galactose Konzentration (Abb. 2-5, gestrichelte Linie). Anders verhielt es sich mit der Transaktivierung durch pADH:ABF2. Hier kam es durch 2% Galactose zu einer Reprimierung der pSAR-Transaktivierung auf 16 % des Ausgangswertes. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit HB6 unter Kontrolle des ADH-Promotors erzielt. Auch pADH:HB6 wurde mit steigender Galactose-Konzentration in seiner Transaktivierung gehemmt (Abb. 5-2). Anscheinend hat eine höhere Galactose-Konzentration einen inhibierenden Effekt auf die pADH-Aktivität. Im Gegensatz dazu kam es zu einem starken Anstieg des Luciferasesignals, wenn zusätzlich zum ABF2 die pGAL1:SnRK2.6 oder pGAL1:SnRK2.6 Δ 320 cotransformiert wurde (Abb. 2-5, gefüllte und offene Dreiecke). Während bei 0% Galactose die Cotransformanten die gleiche Aktivität aufwiesen wie die mit ABF2 + LV transformierten Hefen, steigerte sich das Signal auf das fast 100-fache mit der SnRK2.6, und auf das 2000-fache mit der SnRK2.6 Δ 320. Dabei wurde die maximale Induktion schon bei 0,2% Galactose erreicht und änderte sich bis zu 2% Galactose nur geringfügig. Für die weiteren Versuche wurden 2% Galactose verwendet um eine volle Induktion des Promotors bei gleichzeitig einfachen Medien-Bedingungen zu erreichen.

2.2.3 Qualitative Analyse der *in vivo* Luciferase Quantifizierung

Zur Etablierung der *in vivo* Luciferase Quantifizierung in Hefe wurden die oben beschriebenen, mit ABF2 und SnRK2.6 Δ 320 cotransformierten Hefen in Galactose-haltigem Minimalmedium (SD-Medium) angezogen und aus dieser Kultur eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diese Proben wurden verwendet um die lineare Abhängigkeit der eingesetzten Zellmenge und der Luciferaseaktivität zu überprüfen. Mit diesem Versuch sollte geprüft werden, ob es zur Substratlimitierung bei hoher Luciferaseaktivität kommt. Außerdem wurden die Proben verwendet, um eine Relation zwischen der Absorption bei 600 nm (Abs_{600}), der in Mikrotiterplatten gemessenen Hefekultur (100 μ l), und der Zelldichte (OD, gemessen in 1 cm Küvetten) herzustellen (Abb. 2-6). So wurde für die verwendete Hefe bei einer Abs_{600} von 1 eine Zelldichte von $9,78 \times 10^6$ Zellen/ml bestimmt, was einer optischen Dichte (OD) von 6,87 entsprach. Die Aktivität der Luciferase korrelierte mit der Zellzahl und zeigte keine Substratlimitation auch bei dicht gewachsenen Hefekulturen. Eine Normierung der Luciferaseaktivität auf die Abs_{600} war sinnvoll um Unterschiede in der Zelldichte der gemessenen Proben zu berücksichtigen. Aus den absoluten Luciferaseaktivitäten ergaben sich, nach der Normierung auf die Zelldichte, die relativen LUC-Aktivitäten (rLUC), die als Maßeinheit für die Reporteraktivierung verwendet wurden.

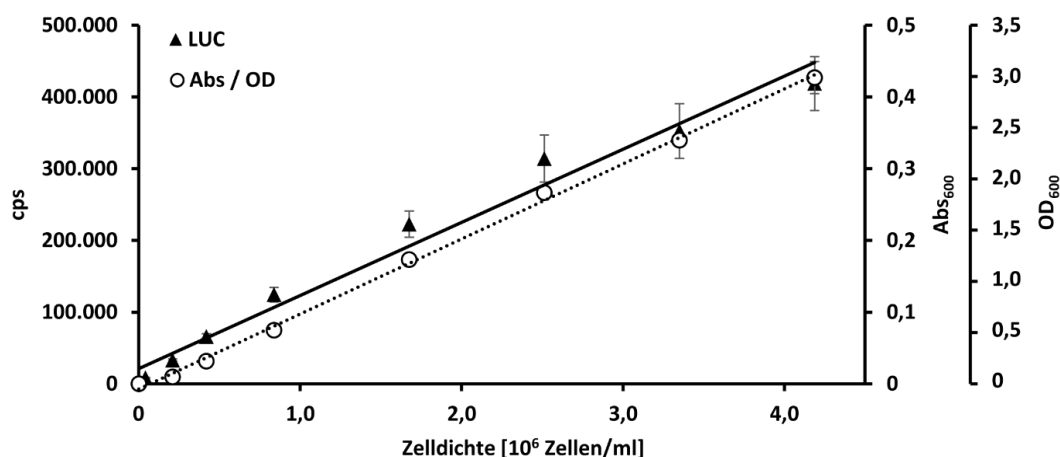


Abb. 2-6 Verdünnungsreihe der induzierten pSAR-Reporterhefen

Die mit ABF2 und SnRK2.6 Δ 320 cotransformierten pSAR-Reporterhefen wurden nach Anzucht in Glucosehaltigem SD-Minimalmedium in SD-Medium mit Galactose überimpft und für 20 h kultiviert. Die gewachsene Kultur wurde schrittweise in SD-Medium verdünnt und die Zelldichte der Verdünnung mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die LUC-Aktivität und die Absorption bei 600 nm (Abs_{600}) für jeweils 100 μ l Kultur in Mikrotiterplatten bestimmt, sowie die optische Dichte (OD_{600}) in Küvetten, und gegen die Zelldichte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die SD von n=3 technischen Replikaten.

2.2.4 Expressionszeitreihe der pSAR-Induktion

Zur Etablierung des Messzeitpunktes für die Transaktivierung des pSAR in Hefe wurden ABF2 exprimierende pSAR-Reporterhefen mit LV, SnRK2.6 oder SnRK2.6 Δ 320 transformiert. Nachdem diese Hefen bis zur exponentiellen Phase in Glucosehaltigem SD-Medium kultiviert wurden, wurden je drei Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Galactosehaltigem SD-Medium angeimpft und alle Proben gemeinsam nach Ende der Inkubationsdauer gemessen. Für jede Kultur wurde die Zelldichte (Abb. 2-7A) und die Luciferaseaktivität (Abb. 2-7B) bestimmt. Während das Zellwachstum nach einer kurzen 4-stündigen Lag-Phase weitgehend exponentiell über 24 h war, stieg die LUC-Aktivität sofort nach Galactose-Induktion stark an. Die Zunahme der LUC-Aktivität war innerhalb der ersten 8 h steil, flachte dann zwischen 8-12 h ab und erreichte nach 14 h ihre maximale Aktivität und änderte sich auch nach 24 h nicht mehr. Die Wachstumsunterschiede zwischen den Replikaten waren zwar klein, allerdings zeigten die Hefen, welche nur mit dem LV transformiert wurden, ein leicht verstärktes Wachstum. Im Hinblick auf die LUC-Aktivität zeigte sich die durch SnRK2.6 verursachte Induktion der Reporterexpression deutlich nach 8h. Während die LV Kontrolle, die ABF2 exprimierte, den pSAR schwach aber merklich transaktivierte, waren die Luciferasewerte mit dem SnRK2.6 WT ca. 5 - 10 Mal so hoch und mit der hyperaktiven SnRK2.6 Δ 320 bis zu 150 Mal so hoch wie in der Kontrolle. Im Falle

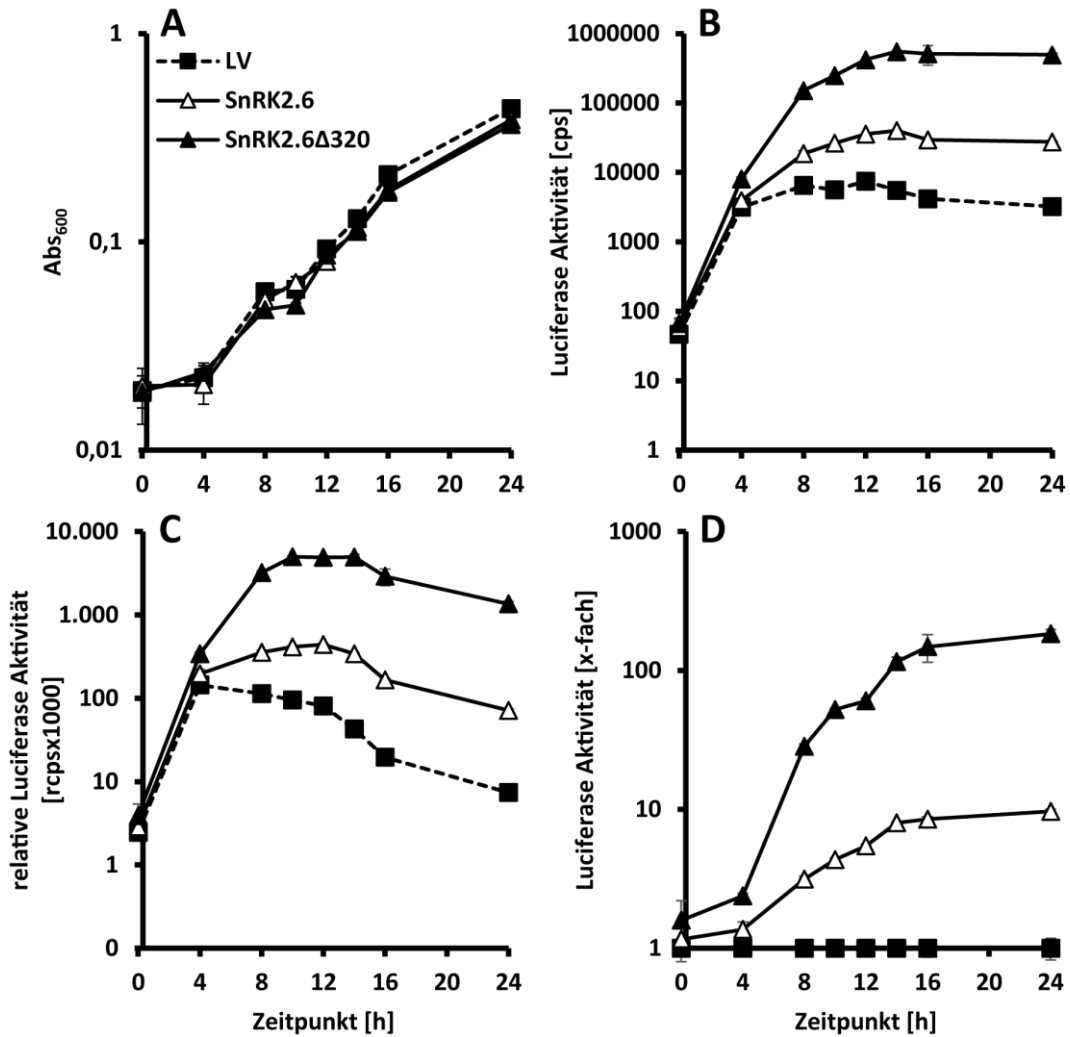


Abb. 2-7 Zeitreihe der ABF2-Induktion durch SnRK2.6 und SnRK2.6Δ320

ABF2 exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit LV, SnRK2.6 oder SnRK2.6Δ320 transformiert. Nach Kultivierung der Zellen in Glucose haltigem SD-Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase wurden diese zu verschiedenen Zeitpunkten in Galactose haltiges SD-Medium umgeimpft, um die Proteinexpression der SnRK2.6 zu induzieren. 24 h nach Induktion der ersten Kulturen wurden je 100 µl Hefekultur jeder Kultur zur Bestimmung der Zelldichte (A) und der LUC-Aktivität (B) verwendet. Um die relative LUC (rLUC; C) zu erhalten, wurde die LUC-Aktivität auf die Zelldichte bezogen. Für die ABF2-Induktionsraten (D) der SnRK2.6 Versionen wurde die rLUC der SnRK2.6 und der SnRK2.6Δ320 auf die rLUC der LV Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt normiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 technischen Replikaten.

der SnRKΔ320 kam es innerhalb von 14 h zu einem über 8000-fachen Anstieg der LUC-Aktivität die innerhalb der nächsten 10 h leicht abnahm.

Um Messfehler durch Unterschiede im Wachstum zwischen den Proben zu minimieren, wurden die Luciferasewerte auf die Zelldichte bezogen, woraus sich die relative Luciferaseaktivität (rLUC, Abb. 2-7C) ergab. Durch das konstante Wachstum und die stagnierende Luciferaseaktivität der Hefen nach

14 h zeigte sich nach Einbezug der Zelldichte ein deutlicher Abfall der rLUC nach 14 h. Dieser Abfall nahm in allen Kulturen einen ähnlichen Verlauf. Um die Induktionsraten der Proteinkinase zu bestimmen, wurde die rLUC der Proben auf die rLUC der Kontrolle, für jeden Zeitpunkt einzeln, normalisiert. Hierdurch ergab sich die normierte Transaktivierungsleistung der PK, bezogen auf die Eigenaktivität des ABF2 (Abb. 2-7D). Die Transaktivierung der SnRK2.6-Varianten zeigten einen exponentiellen Anstieg, bis diese nach 14 h abflachten und nach 16 – 24 h ihr Maximum erreichten. Im Falle der WT SnRK2.6 kam es zu einer fast 10-fachen Aktivierung des ABF2, während SnRK2.6 Δ 320 bis zu 180-fach induzierte. Um die Transaktivierungsleistung der Konstrukte zu optimieren und Schwankungen durch Varianzen des Messzeitpunktes zu minimieren, wurde für die Hefen eine Kultivierungsdauer von 16-20 h nach Induktion gewählt. In dieser Zeit blieb die Transaktivierungsleistung konstant auf einem hohen Niveau.

2.2.5 Transaktivierung der Transkriptionsfaktoren durch die Proteinkinase

Die Gruppe der ABRE-bindenden Transkriptionsfaktoren (ABFs) umfasst fünf Mitglieder (ABF1 - 4 und ABI5), von denen für ABF1 - 4 eine Bindung an den pSAR nachgewiesen werden konnte (siehe 2.1.2). Um die Spezifität der ABF-Aktivierung durch SnRK2.6 zu testen, wurde die WT-Version und eine

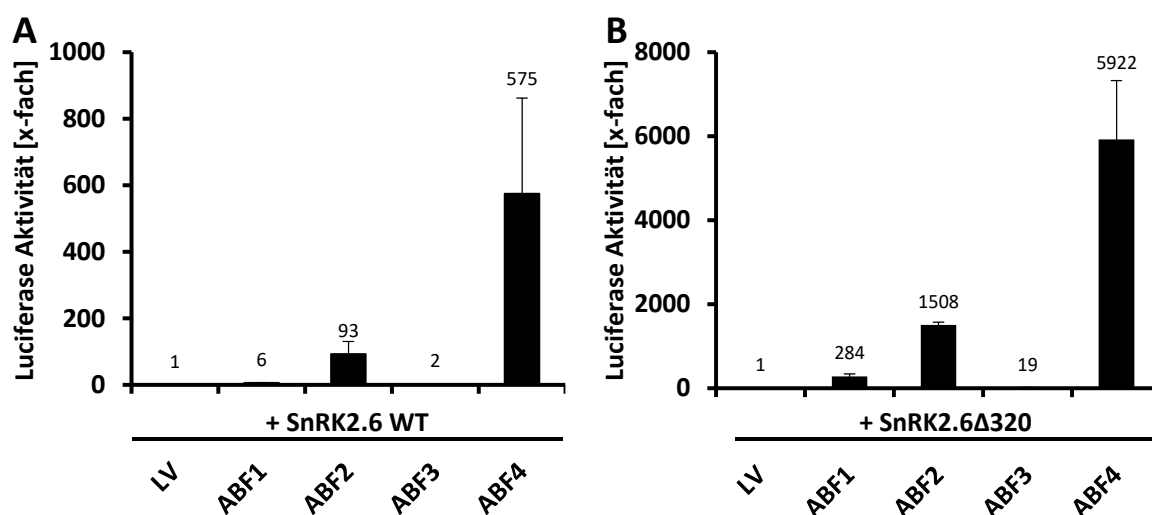


Abb. 2-8 Transaktivierung der pSAR-bindenden Transkriptionsfaktoren durch SnRK2.6

Coexpression der SnRK2.6 (A) und der hyperaktiven SnRK2.6 Δ 320 (B) mit ABF1, ABF2, ABF3 und ABF4. ABI5 wurde aufgrund der fehlenden Bindung an den pSAR nicht berücksichtigt. Die Aktivität des pSAR ist auf den LV normalisiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int. Basierend auf Ergebnissen von Burkart (2017)

hyperaktive Version der PK jeweils mit einem ABF cotransformiert und ihre Reporteraktivität bestimmt (Abb. 2-8).

Während die ABFs alleine keine oder nur eine geringe Induktion des Reporters zeigten (vgl. Abb. 2-2B), kam es bei Cotransformation mit SnRK2.6 WT zu einer starken Steigerung des Luciferasesignals (Abb. 2-8A). Hierbei fiel besonders die Probe mit ABF4 auf, die mit einer 575-fachen Induktion das stärkste Signal lieferte und ca. sechsmal so stark induzierte wie der Ansatz mit ABF2 und SnRK2.6 WT. Der Ansatz mit ABF1 hingegen transaktivierte den Reporter nur um das 6-fache. ABF3 zeigte mit einer 2-fachen Aktivität eine schwache Induktion des pSAR. Bei Cotransformation der hyperaktiven SnRK2.6 (Abb. 2-8B) änderte sich zwar die Transaktivierungseffizienz, nicht aber die Spezifität der Aktivierung. So aktivierte SnRK2.6 Δ 320 ABF4 um fast das 6000-fache der LV Kontrolle und damit etwa zehnmal so stark wie der WT. Auch hier zeigte die Proteinkinase die zweitstärkste Aktivität mit ABF2, während ABF1 und ABF3 nur schwach aktiviert wurden. Im Gegensatz zum SnRK2.6 WT transaktivierte SnRK2.6 Δ 320 ABF3 aber deutlich. Wird statt dem WT ABF4 ein AD-ABF4 Fusionsprotein verwendet, mit dem die Bindung des ABF4 an die DNA bestimmt werden kann, kam es zu keiner Änderung der DNA-ABF4 Bindung (Abb. 5-1). Da sich die Spezifität der ABF-Induktion weder mit der Bindungsstärke an den pSAR (Abb. 2-2A) noch mit der Eigenaktivität der ABFs (Abb. 2-2B) erklären ließ, deuteten die Ergebnisse auf eine spezifische selektive Transaktivierung der einzelnen Transkriptionsfaktoren hin. Es stellte sich somit die Frage, ob es, je nach verwendeter Kinase, ein spezifisches Aktivierungsmuster für die einzelnen Transkriptionsfaktoren gibt. Um dieser Frage nach zu gehen wurde die ABF-Transaktivierung auch mit andere Mitglieder der SnRK2 Familie untersucht.

2.2.6 Transaktivierung von ABF4 durch SnRK2 Proteinkinasen

Für die Transaktivierungsleistung der SnRK2s wurden diese in ihrer wildtypischen und C-terminal verkürzten Form kloniert. Für die C-terminale Verkürzung wurde analog zur SnRK2.6 Δ 320 die Proteinkinasen hinter der SnRK2-Box deletiert (Abb. 2-9).

Die SnRK2-Familie umfasst 10 Mitglieder, die sich nach Boudsocq et al. (2004) in zwei Gruppen aufteilen, wobei SnRK2.9 zu keiner der beiden Gruppen gezählt wird und eine Sonderrolle innerhalb der Familie einnimmt. Die Homologie innerhalb der Familie ist in Abb. 2-9 links in Form eines Dendrograms dargestellt. SnRK2.6, 2.2, 2.3, 2.7 und 2.8 bilden zusammen die Gruppe 1, welche sich durch ihre Induzierbarkeit mit ABA und hyperosmotischen Stress *in planta* auszeichnet, während Gruppe 2, mit seinen Mitgliedern SnRK2.1, 2.4, 2.5, und 2.10, sich nur durch hyperosmotischen Stress in Pflanzen aktivieren ließ (siehe Abschnitt 1.6.1). SnRK2.9 steht außerhalb dieser Gruppen, da sie durch keine der beiden Behandlungen aktivierbar war. Abgesehen von SnRK2.10 wurden alle

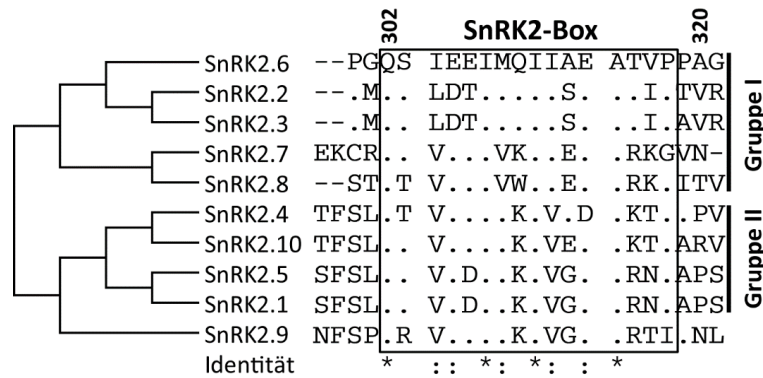


Abb. 2-9 Alignment der SnRK2-Box

Alignment der Proteinsequenz um die SnRK2-Box (schwarzer Kasten) der SnRK2 Proteinkinase Familie (Komplettes Alignment der Proteinsequenz ist in Abb. 5-5 zu finden).

Links des Alignments sind die Verwandtschaftsbeziehungen mittels Dendrogram dargestellt. Für die verkürzten SnRK2 Varianten wurde die Sequenz hinter der SnRK2-Box, analog zur Aminosäure 320 in SnRK2.6, deletiert. Die Einteilung in Gruppe 1 und Gruppe 2 basiert auf der Arbeit von Boudsocq et al. (2004). Punkte indizieren gleiche AS wie in SnRK2.6, Striche indizieren fehlende AS. Sterne unter dem Alignment zeigen gleiche AS in allen Sequenzen an während ähnliche AS durch Doppelpunkte gekennzeichnet sind.

Versionen zusammen mit ABF4 in die pSAR-Reporterhefe transformiert und auf ihre Transaktivierungsleistung hin getestet (Abb. 2-10). Interessanterweise ist SnRK2.6 der einzige Vertreter der Gruppe 1, der eine relevante Transaktivierung bewirkte. Die restlichen Vertreter dieser Gruppe I (SnRK2.2, 2.3, 2.7, 2.8) zeigten weder in der wildtypischen noch in der C-terminal verkürzten Version eine relevante Aktivierung.

Anders verhielten sich die SnRK2s der Gruppe 2. Hier kam es mit allen getesteten Mitgliedern sowohl in der WT wie auch der ΔC-Version zu einer starken Aktivierung des pSAR. Auffallend war hierbei, dass es zu keiner Aktivierung der PK durch die Deletion der ABA-Box kam. Alle drei Proteinkinasen zeigten sowohl in der WT wie auch in der verkürzten Form eine ähnliche bis doppelt so starke Transaktivierung wie SnRK2.6Δ320. SnRK2.9 hingegen zeigte in keiner der beiden Versionen Aktivität. Um Unterschiede in der Proteinsynthese als möglichen Grund für die differenzielle Transaktivierung auszuschließen, wurden alle SnRK2ΔC Konstrukte als FLAG:SnRK2ΔC Fusionsproteine kloniert und mit ABF4 in Hefe transformiert. Nach Aufschluss der Hefezellen wurde die Abundanz des Fusionsprotein mittels α-FLAG Antikörpern detektiert (Abb. 2-10 Insert). Für alle SnRK2s war ein eindeutiges Proteinsignal der korrekten Größe erkennbar. Die pSAR-Reporteraktivierung war in den FLAG-Fusionsproteinen vergleichbar zu den in Abb. 2-10 gezeigten Ergebnissen (nicht gezeigt). Die Unterschiede in der Aktivität ließen sich somit nicht auf Unterschiede in der Proteinsynthese zurückführen.

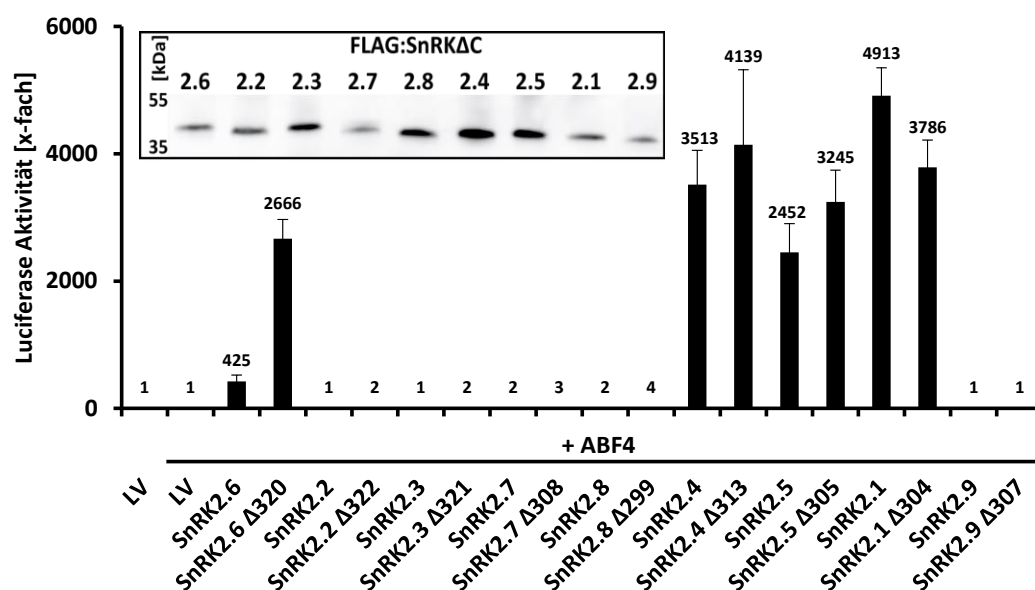


Abb. 2-10 ABF4-Transaktivierung durch die SnRK2 Familie

pSAR-Reporterhefen wurden mit ABF4 und SnRK2 WT oder C-terminal verkürzten (Δ C) Versionen cotransformiert. Die Luciferaseaktivität wurde auf die Aktivität der Hefe ohne SnRK2 normiert (ABF4 + LV). SnRK2s wurden anhand ihrer Homologie zu SnRK2.6 geordnet. Das Insert zeigt die Detektion der entsprechenden FLAG:SnRK2 Δ C Fusionsproteine 6 h nach Induktion mittels α -FLAG Antikörpern in Hefe. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int. Basierend auf Ergebnissen von Burkart (2017).

2.2.7 Spezifität der ABF-Transaktivierung durch SnRK2s

Wie für die SnRK2.6 gezeigt (Abb. 2-8) kommt es je nach cotransformiertem ABF zu einer stark unterschiedlichen Transaktivierung des pSAR. Dieses könnte durch die spezifische Bindung der ABFs an den pSAR bedingt sein, oder durch spezifische Transaktivierung der ABFs durch die SnRK2s. Für SnRK2.6 ergab sich eine starke Transaktivierung mit ABF4 während ABF3 nur schwach transaktiviert wurde. Eine solche Spezifität wäre auch für SnRK2.2 und 2.3 denkbar, die zwar eng mit SnRK2.6 verwandt sind, aber keine Aktivität mit ABF4 zeigten.

Um die spezifische Transaktivierung der ABFs zu untersuchen wurden diese zusammen mit den aktiven PKs in die pSAR-Reporterhefen Cotransformiert. Außerdem wurden auch die inaktiven SnRK2.2 und 2.3 mit allen ABFs cotransformiert um sicher zu stellen, dass die Inaktivität dieser mit ABF4 nicht auf eine mögliche strikte Spezifität zurückzuführen ist. Es zeigte sich auch mit den andere ABFs keine Steigerung der pSAR-Aktivität durch SnRK2.2 Δ 322 (Abb. 2-11B) oder SnRK2.3 Δ 321 (Abb. 2-11C) verglichen zum LV (Abb. 2-11A). Es ist davon auszugehen, dass die SnRK2.2 und 2.3 im Gegensatz zur SnRK2.6 die ABFs in Hefe nicht aktivieren können. Die SnRKs der Gruppe II zeigten ähnlich wie SnRK2.6

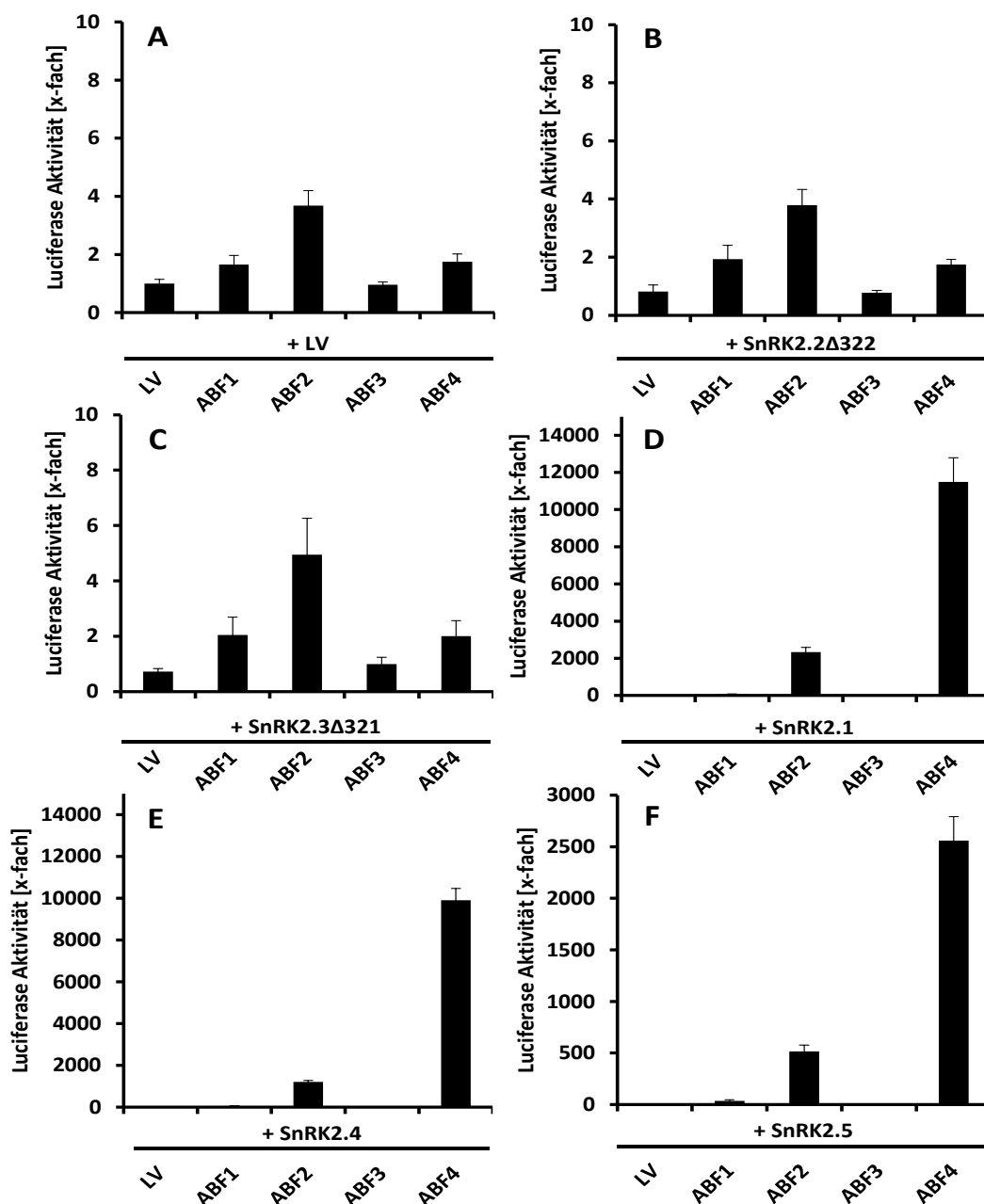


Abb. 2-11 ABF-Transaktivierung mit SnRK2.2, 2.3, 2.1, 2.4 und 2.5

pSAR-Reporterhefen nach Cotransformation mit ABF1 - 4 und LV (A), SnRK2.2Δ322 (B), SnRK2.3Δ321 (C), SnRK2.1 (D), SnRK2.4 (E) und SnRK2.5 (F). Die rLUC wurde jeweils auf die LV Kontrolle ohne ABF normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int. Basierend auf Experimenten von Burkart (2017).

die stärkste Transaktivierung mit ABF4, gefolgt von einer vierfach schwächeren Aktivität mit ABF2. Die Transaktivierungen mit ABF1 und ABF3 fielen dagegen schwach aus (35 – 70-fach mit ABF1 und 5 – 10-fach mit ABF3). Es zeigte sich somit, dass die Spezifität bezüglich der Transkriptionsfaktoren sich zwischen den aktiven SnRK2s nicht unterschied. Die Stärke, mit der sie die jeweiligen ABFs

zeigten keine Aktivierung des pSAR. Dieser Befund ließ allerdings keine Aussage über die Kinaseaktivität von BIN2 in Hefe zu. Möglicherweise wird auch die Kinaseaktivität von BIN2 streng reguliert und ist als WT Protein nicht aktiv. Ob BIN2 tatsächlich zu einer Phosphorylierung der SnRKs führt, kann daher im Hefesystem nicht bestätigt werden.

2.3 Transaktivierung mit Ca²⁺-abhängigen Proteinkinasen (CPKs)

Neben der Regulation durch die ABA-abhängigen SnRK2s wurde für die Aktivierung der ABFs auch eine Regulation durch Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen beschrieben. Als besonderer Vertreter dieser Gruppe ist die durch Korte (2009), Wellmann (2012), Czap (2015) und Pleißner (2015) beschriebene CPK23 (GCA2 im Landsberg Ökotyp) dafür bekannt einen starken Einfluss auf die ABA-Signaltransduktion und die Regulation der ABFs zu haben. Um die direkte Aktivierung der ABFs durch CPKs genauer zu bestimmen, sollten diese im pSAR-TLA untersucht werden.

2.3.1 ABF2-Transaktivierung mit CPK23

CPKs besitzen neben der Kinasedomäne eine Ca²⁺-bindende CML-Domäne (Zhang and Choi, 2001). Durch genetische Deletion der CPK23 CML-Domäne kann eine verkürzte Form erzeugt werden (CPK23-vk), die keine Calciumaktivierung benötigt (Abb. 2-13, vgl. Abschnitt 1.6.3). Die Mutation des katalytischen Aspartat (D193) zum Alanin resultierte wiederum in einer inaktiven PK (CPK23-vk-tk, CPK23-vk D193A), die keine katalytische Aktivität aufwies (Wellmann, 2012; Pleißner, 2015). Durch Verwendung dieser drei Versionen kann die Transaktivierung des pSAR auf die Kinasefunktion der CPK zurückgeführt werden. Außerdem kann für eine einfachere Analyse der CPK23-Funktion die Notwendigkeit der Ca²⁺-Aktivierung durch Verwendung der hyperaktiven CPK23-vk umgangen werden.

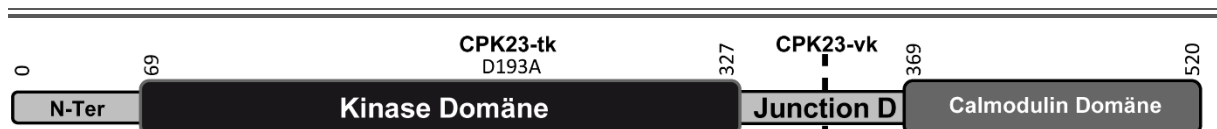


Abb. 2-13 Schematischer Aufbau der Proteinkinase CPK23

Bei der Calcium-abhängigen Proteinkinase (CPK23/CDPK23) handelt es sich um ein 58,6 kDa großes Protein, das aus zwei Domänen und zwei regulativen Bereichen aufgebaut ist. Nach einem N-terminalen Bereich (N-Ter) folgt eine für Serin- Threonin- Proteinkinasen typische Kinasedomäne. Diese ist über eine inhibitorische *junction* Domäne mit der Calmodulin-ähnlichen (CML) Domäne verbunden. Durch die Deletion der Calmodulin-ähnlichen Domäne und Teile der *junction* Domäne entsteht die hyperaktive Variante CPK23-vk. Diese wiederum kann durch Substitution eines kritischen Aspartat Restes durch Alanin (D193A), der obligat für die Kinaseaktivität ist, inaktiviert werden, wodurch die enzymatisch inaktive Proteinkinase CPK23-vk-tk entsteht. Zahlen über der Struktur zeigen die Aminosäure-Position. Die Struktur ist maßstabsgetreu.

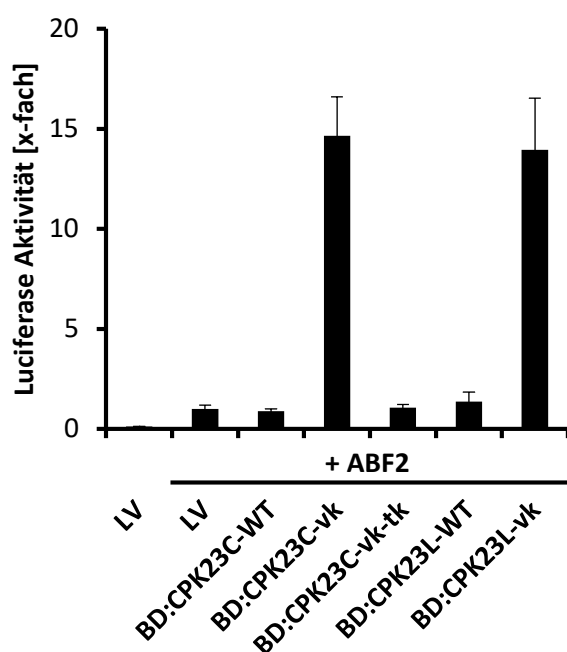


Abb. 2-14 Transaktivierung von ABF2 durch CPK23

Fusionsproteine aus der GAL4-Bindedomäne (BD) und CPK23 wurden zusammen mit ABF2 in pSAR-Reporterhefe transformiert. Für die Transformation wurde CPK23 aus zwei Ökotypen (CPK23C aus Col-0; CPK23L aus Ler-0) verwendet. CPK23C wurde als WT, vk und vk-tk Version verwendet, während für CPK23L die WT und vk Version genutzt wurden. Alle Effektoren standen unter der Kontrolle des pADH. Als Kontrolle wurden Hefen ohne PK, die nur die BD exprimieren, und Hefen ohne PK und ohne ABF2 verwendet. Zur Anzucht wurde SD-Medium mit 2% Raffinose verwendet. Die rLUC wurde auf ABF2 + LV normalisiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

Für erste Versuche wurden GAL4-BD:CPK23 Fusionsproteine, wie sie typischerweise im *Yeast-Two-Hybrid* (Y2H) System Verwendung finden, genutzt, um diese auf die Fähigkeit der ABF-Transaktivierung hin zu untersuchen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen SnRK2-Konstrukten befanden sich die exprimierten Faktoren unter der Kontrolle des ADH-Promotors. N-terminal war bei diesen Konstrukten die GAL4-Bindedomäne (BD) fusioniert. Es standen für CPK23 aus dem Ökotyp Columbia die drei oben beschriebenen Versionen (BD:CPK23C-WT, BD:CPK23C-vk und BD:CPK23C-vk-tk) zur Verfügung, sowie die hyperaktive und inaktive Version des Ökotyps *Landsberg erecta* (BD:CPK23L-vk und BD:CPK23L-vk-tk). Alle Versionen wurden zusammen mit ABF2 in die pSAR-Reporterhefe transformiert und auf ihre Transaktivierungsleistung hin getestet (Abb. 2-14). Während es mit ABF2 alleine zu einer schwachen Aktivierung des pSAR kam, zeigte die mit der hyperaktiven CPK23-vk cotransformierten Reporterhefen eine starke ABF2-Aktivierung. Hier stieg die rLUC auf das 15-fache der ABF2 + LV Aktivität an. Sowohl bei Verwendung der CPK23 aus Col-0 (CPK23C-vk) wie auch bei der Version aus Ler-0 (CPK23L-vk) kam es zu einer starken pSAR-Induktion. Im Gegensatz kam mit den wildtypischen (WT) oder den toten PKs (vk-tk) aus beiden Ökotypen es zu keiner Transaktivierung. Auch die GAL4-BD alleine zeigte keine Transaktivierung des pSAR (LV+ABF2). Es konnte somit eine klare Aktivierung des ABF2 durch CPK23 in den pSAR-Reporterhefen bestätigt werden, die eindeutig von der katalytischen Aktivität der CPK abhängt. Möglicherweise waren die intrazellulären Calciumkonzentrationen in Hefe nicht ausreichend, um die Version mit CML-Domäne zu aktivieren. Für die weiteren Versuche wurde die CPK23 Version aus Col-0 verwendet.

2.3.2 Ca²⁺-Aktivierung der CPK23 in Hefe

Für CPK23 wurde durch Pleißner (2015) eine Ca²⁺-abhängige Aktivierung mit einem K_D von 3 μM postuliert. Da das Ruhelevel an freiem Ca²⁺ in *S. cerevisiae* bei 50-200 nM liegt (Iida et al., 1990; Miseta et al., 1999), was weit unter der für die Aktivierung von CPK23 nötigen Ca²⁺-Konzentrationen liegt, sollte versucht werden, die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in Hefe zu erhöhen. Hierzu wurden pSAR-Reporterhefen, die CPK23 und CPK23-vk in Kombination mit ABF2 exprimierten, in SD-Medium mit erhöhten Ca²⁺ Konzentrationen kultiviert. Zusätzlich wurde die Ca²⁺-Permeabilität der Membran mit dem Ionophor A23187 (Sigma-Aldrich) oder DMSO (Dimethylsulfoxid) erhöht (Abb. 2-15). Im Vergleich zum WT zeigte die BD:CPK23vk Version unter diesen Kultivierungsbedingungen ein etwa 10-fach höheres Signal als der WT. Allerdings konnte keine Änderung der pSAR-Transaktivierung durch die unterschiedlichen Ca²⁺-Behandlungen, weder mit CPK23 WT noch mit der CPK23-vk, festgestellt werden. Da die intrazellulären Ca²⁺-Konzentration einer Zelle stark kontrolliert werden, ist es durchaus möglich, dass eine einfache Änderung des Mediums nicht ausreichend war, um eine für die CPK23 Aktivierung notwendiges Ca²⁺-Level zu erzielen. Es sollte auch die Notwendigkeit der spatiotemporalen Ca²⁺-Signaturen beachtet werden, wie sie in Abschnitt 1.6.2 beschrieben wurden. Für die weiteren Versuche zur Transaktivierung mit CPK23 wurde aufgrund der fehlenden Aktivität der WT CPK23 die CPK23-vk Version verwendet.

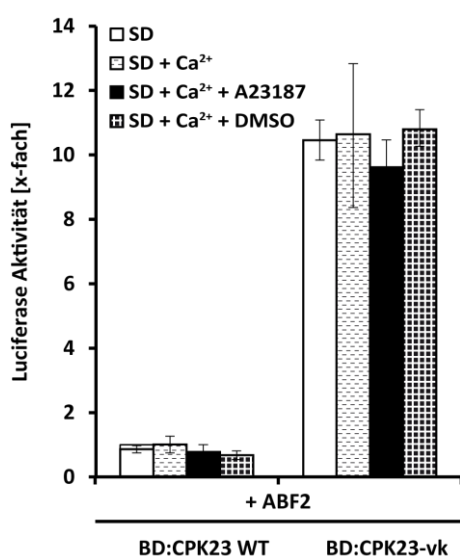


Abb. 2-15 Ca²⁺-Induktion der CPK23

pSAR-Reporterhefen wurden mit ABF2 sowie BD:CPK23 WT oder BD:CPK23-vk transformiert. Nach Kultivierung in SD-Medium mit 2% Glucose wurden die exponentiell wachsenden Hefen in SD-Medium mit 2% Raffinose umgeimpft. Um einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom zu erzeugen wurde nach 3h das Medium zusätzlich mit 50 mM Ca²⁺, 50 mM Ca²⁺ + 10 μM A23187 (Ionophor) oder 50 mM Ca²⁺ + 1 % DMSO versetzt. Nach zusätzlichen 16 h Wachstum wurde die rLUC bestimmt und auf den BD:CPK23 WT in SD Medium normalisiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

2.3.3 Intermolekulare Regulation der CPK23 durch ihren N-Terminus

Transfer der CPK23-vk in das pGREG Hefe-Expressions Vektorset

Für die weiteren Versuche mit CPK23-vk sollte diese aus dem pBRIDGE-Y2H Vektoren in den pGREG Hefeexpressionsvektor (Jansen et al., 2005) transferiert werden. Der pGREG-Vektor hat gegenüber dem zuvor verwendeten pBRIDGE-Vektor den Vorteil, dass die Proteine ohne BD-Fusion exprimiert werden und analog zu den Versuchen mit SnRK2.6 die CPK23 unter die Kontrolle des GAL1-Promotors gestellt werden. Außerdem weist das pGREG Vektorset eine große Auswahl an Auxothrophiemarkern auf.

Während CPK23-vk im pBRIDGE-Vektor die gewohnte Transaktivierung von ABF2 zeigte (Abb. 2-16), kam es mit CPK23-vk im pGREG-Vektor (Abb. 2-16, 3. Balken) zu keiner Transaktivierung. Auch die N-terminale Fusion einer Kernlokalisationssequenz (NLS) (Abb. 2-16, 4. Balken) oder der Austausch des pGAL1 gegen den pADH (Abb. 2-16, 6. Balken) führte zu keiner Transaktivierung des ABF2 durch CPK23-vk. Einzig die N-terminale Fusion der GAL4-BD-Domäne führte zu einer starken Transaktivierung. Hierbei kam es besonders bei der Verwendung des GAL1-Promotors zu einer 10-fachen Transaktivierung wie mit dem ursprünglichen Y2H-Konstrukt. Unter der Kontrolle des ADH-Promotors zeigte BD:CPK23 im pGREG-Vektorsystem im Gegensatz zum pBRIDGE-System mindestens ein 3-fache Aktivitätssteigerung.

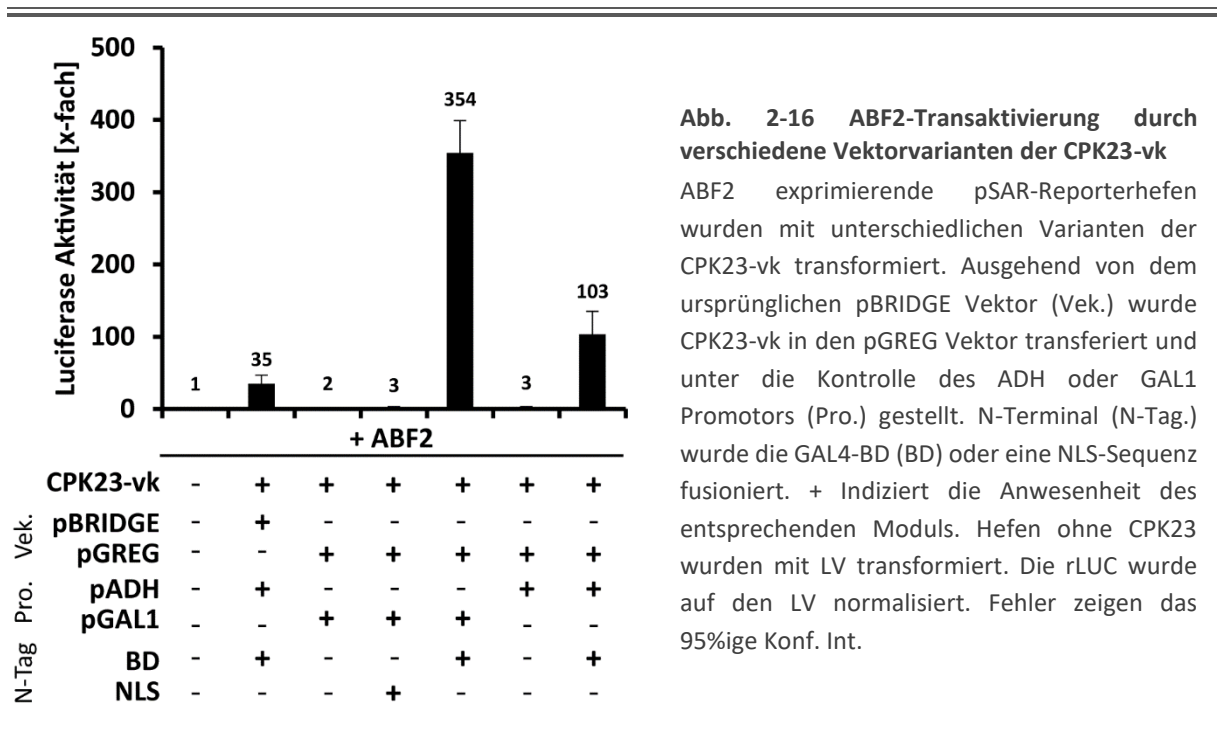


Abb. 2-16 ABF2-Transaktivierung durch verschiedene Vektorvarianten der CPK23-vk
 ABF2 exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit unterschiedlichen Varianten der CPK23-vk transformiert. Ausgehend von dem ursprünglichen pBRIDGE Vektor (Vek.) wurde CPK23-vk in den pGREG Vektor transferiert und unter die Kontrolle des ADH oder GAL1 Promotors (Pro.) gestellt. N-Terminal (N-Tag.) wurde die GAL4-BD (BD) oder eine NLS-Sequenz fusioniert. + Indiziert die Anwesenheit des entsprechenden Moduls. Hefen ohne CPK23 wurden mit LV transformiert. Die rLUC wurde auf den LV normalisiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

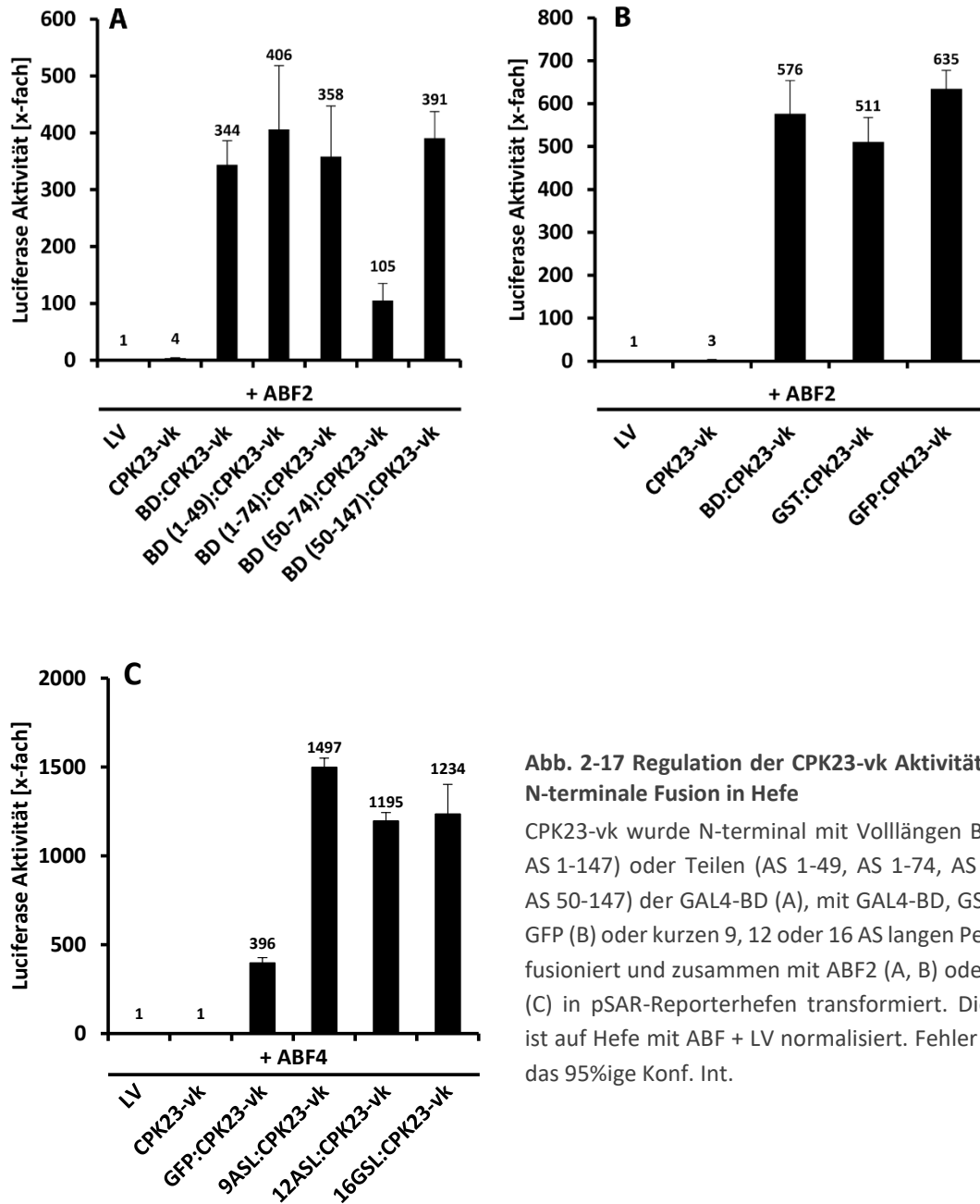


Abb. 2-17 Regulation der CPK23-vk Aktivität durch N-terminale Fusion in Hefe

CPK23-vk wurde N-terminal mit Volllängen BD (BD, AS 1-147) oder Teilen (AS 1-49, AS 1-74, AS 50-74, AS 50-147) der GAL4-BD (A), mit GAL4-BD, GST oder GFP (B) oder kurzen 9, 12 oder 16 AS langen Peptiden fusioniert und zusammen mit ABF2 (A, B) oder ABF4 (C) in pSAR-Reporterhefen transformiert. Die rLUC ist auf Hefe mit ABF + LV normalisiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

Für die Aktivität der CPK23-vk schien die Fusion der GAL4-BD notwendig zu sein. Dieser Effekt lässt sich auch nicht durch die Kernlokalisierungsfunktion der GAL4-BD erklären. Aus Abschnitt 2.3.1 geht hervor, dass die BD-Domäne alleine keinen Einfluss auf die Transaktivierung des pSAR hatte.

Einfluss der N-terminalen Proteinfusion auf die CPK23-vk Aktivität in Hefe

Neben der DNA-Bindedomäne (AS 1-50) beinhaltet die GAL4-BD eine Kernlokalisationssequenz (AS 1-74) und eine Dimerisierungsdomäne (AS 50-147). Um zu untersuchen, welcher Teil der GAL4-BD für

die Aktivierung der CPK23-vk notwendig war, wurden zusätzlich zur Volllänge (AS 1-147) vier Teilstücke der GAL4-BD N-Terminal an CPK23-vk fusioniert und mit ABF2 in die pSAR-Reporterhefen cotransformiert (Abb. 2-17A). Neben der BD-Volllänge zeigten auch die Teilstücke mit der DNA-Bindedomäne (AS 1-49), der Kernlokalisationssequenz (AS 1-74) oder der Dimerisierungsdomäne (AS 50-147) eine volle Aktivierung mit CPK23-vk. Einzig die Fusion mit dem Teilstück zwischen DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne (AS 50-74) zeigte eine schwächere Aktivität.

Die aktivierende Funktion der GAL4-BD konnte somit keiner Domäne zugeordnet werden. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass nicht die GAL4-BD als solches, sondern lediglich die N-terminale Fusion eines ausreichend großen Proteins entscheidend für die Aktivierung der CPK23 war. Es sollte geprüft werden, ob auch andere Fusionsproteine zu einer Aktivierung der CPK23 führen. Hierzu wurden neben der GAL4-BD auch GFP- und GST-Fusionsproteine erzeugt (Abb. 2-17B). In allen drei Fällen kam es zu einer vergleichbaren Aktivierung der CPK23-vk Aktivität. In Abb. 2-17C wurden neben GFP auch kleine Aminosäure Linker (9ASL: MVRPVARIE; 12ASL: MVRPVARIEFPG; und 16GSL: MGGGGSGGGGSGGGGS) für die N-terminale Fusion verwendet. Alle drei Peptide führten zu einer Aktivierung der CPK23, die sogar über die Aktivierung durch GFP hinausging. Hierbei erreichte die Fusion mit dem 9ASL die stärkste Transaktivierung mit dem fast 1500-fachen der LV Aktivität. Da in Abb. 2-17C allerdings ABF4 im Gegensatz zu ABF2 verwendet wurde, welches ein vier- bis fünffach schwächere Basissignal lieferte (vgl. Abb. 2-2) und somit zu höheren x-fachen Induktionen bei gleicher rLUC Aktivität führte, waren die normalisierten Transaktivierungssignale mit ABF2 und ABF4 nicht direkt vergleichbar.

Aus den Experimenten ließ sich der Schluss ziehen, dass die N-terminale Proteinfusionen für die Aktivierung der CPK23 nötig ist. Dieser Mechanismus war bislang noch nicht bekannt und wurde in dieser Weise hier zum ersten Mal beobachtet.

Einfluss des N-Terminus auf die CPK23-vk Aktivität in Hefe

CPK23 besitzt einen 68 AS langen N-terminalen Bereich vor der Kinasedomäne (Abb. 2-18). Strukturell ist über diesen Bereich wenig bekannt. Er weist keine bekannten Sekundärstrukturen auf, und auch in der Kristallstruktur der verwandten TgCPK1 (Wernimont et al., 2011) ist der N-Terminus nicht aufgelöst, was auf eine hohe Dynamik dieser Domäne hindeutet. PROSITE Motivanalysen (ExpASy Motif Scan) zeigten potentielle Myristilierungs- und Palmytilierungsstellen an AS G2 und C3 auf, wie sie in 27 der 34 Arabidopsis-CPKs vorkommen. Diese Acylierung führen häufig in Kombination mit mehreren basischen AS, wie sie in CPK23 zwischen AS 7-10 zu finden sind, zur Verankerung des Proteins an der Membran (Dammann et al., 2003). Zwischen den Acetylierungsstellen und dem poly-

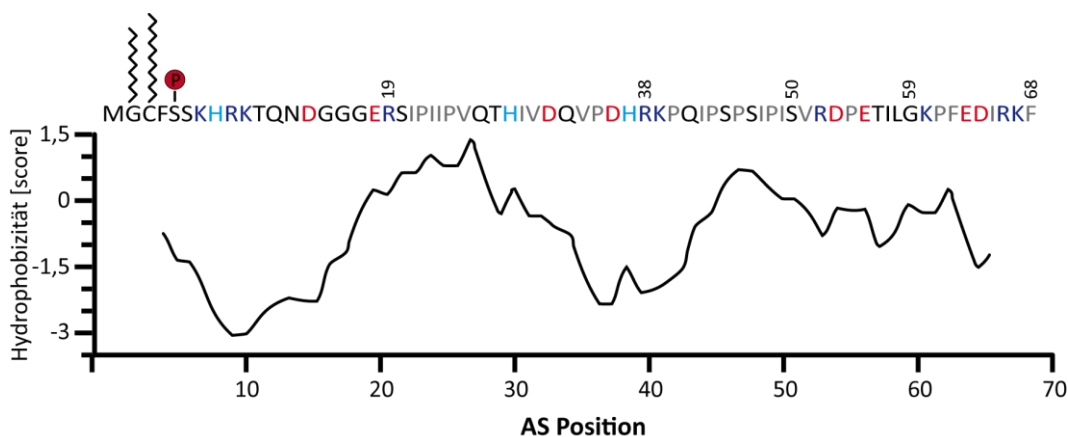


Abb. 2-18 Struktureller Aufbau des N-Terminus der CPK23

CPK23 besitzt einen 68 AS langen unstrukturierten N-Terminus vor der Kinasedomäne (oben; rot: saure AS; blau: basische AS; grau: aliphatische AS). Der Hydrophobizitätsplot (unten) zeigt die Ladungsverteilung über den N-terminalen Bereich (ExpASy – ProtScale; nach Kyte & Doolittle). Zusätzlich kann der N-Terminus potentiell an G2 myristyliert und an C3 palmyliert werden. S5 ist eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKC (PROSITE).

basischen Bereich ist in CPK23 eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKC (Proteinkinase C) an Position S5 zu finden (ExpASy Motif Scan).

Um den Einfluss des N-Terminus auf die CPK23-vk Aktivität zu untersuchen, wurde das Protein genetisch N-terminal verkürzt (jeweils AS 1 - 19, -38, -50, -59 und -68, Abb. 2-18) und zusammen mit ABF2 in die pSAR-Reporterhefen exprimiert (Abb. 2-19A). Es zeigte sich, dass eine partielle Deletion des N-Terminus bis zu AS 38 zu einer höheren Transaktivierung von ABF2 führte. Beide Versionen zeigten eine deutliche Aktivierung von ABF2 (25- bzw. 61-fach). Im Vergleich zur hyperaktiven GFP:CPK23-vk erreichte $\Delta 38$ CPK23-vk allerdings nur ein Drittel der Aktivität, während $\Delta 19$ CPK23-vk nur etwa 13% der Aktivität erreichte. Wurde der N-Terminus über AS 38 hinaus entfernt, kam es zur drastischen Reduktion der Transaktivierungsleistung (6-fache ABF2 Aktivierung mit $\Delta 50$ CPK23-vk) bis zur vollen Inaktivität der Proteinkinase ($\Delta 59$ und $\Delta 68$). Die alleinige Expression des N-Terminus, zusätzlich zum GST:CPK23-vk aktiviertem ABF2, führte zu keiner Änderung der CPK23-vk Aktivität (Abb. 2-19B). Der N-Terminus von CPK23 schien eine wichtige negative intermolekulare Funktion bei der Regulation der PK-Aktivität zu haben, die einerseits durch die oben gezeigte N-terminale Proteinfusion oder durch die Deletion des N-Terminus aufgehoben werden kann.

Um diesen regulatorischen Mechanismus weiter aufzuklären, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die N-terminalen Acylierung - (G2, C3) und Phosphorylierungsstellen (S5) haben. Um den Effekt der N-terminalen Acylierungsstellen zu untersuchen, wurden diese sowohl in CPK23-vk wie auch in der

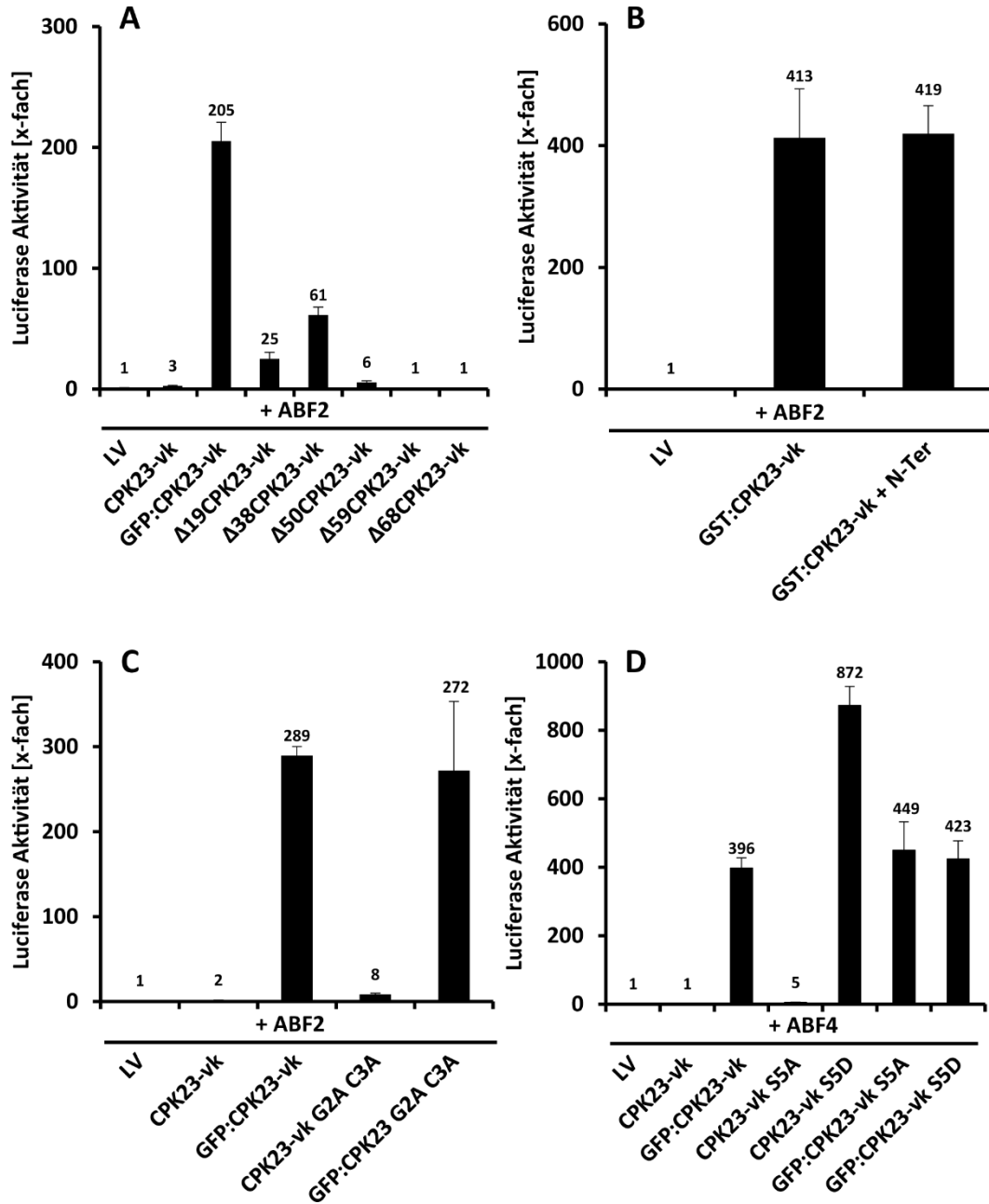


Abb. 2-19 Einfluss des N-Terminus auf die Aktivität der CPK23 in Hefe

ABF2 (A,B,C) oder ABF4 (D) Transaktivierungsassay in pSAR-Reporterhefen. In (A) wurde CPK23-vk N-terminal verkürzt, während in (B) der gesamter N-Terminus (AS 1-68) zusätzlich zu GFP:CPK23-vk exprimiert wurde. Modifikationen der Myristilierungs- und Palmitoylierungsstelle (C) oder potentieller Phosphorylierungsstellen (D) und deren Einfluss auf die Aktivität der CPK23-vk in Hefe wurden ebenfalls untersucht. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int. aus n=6 Proben.

aktiven GFP:CPK23-vk jeweils durch Alanin substituiert und zusammen mit ABF2 in die pSAR-Reporterhefen transformiert (Abb. 2-19C). Es zeigte sich, dass die Substitution keinen Einfluss auf die Transaktivierungsleistung der GFP:CPK23-vk hatte, während es zu einer schwachen Aktivierung mit der

nicht fusionierten CPK23 kam (CPK23-vk G2A C3A). Diese erreichte aber bei weitem nicht die Aktivität der GFP fusionierten Version. Im Gegensatz dazu führte die Pseudophosphorylierung an der Position S5 (Substitution durch Aspartat, S5D) zu einer starken Aktivierung der CPK23-vk (Abb. 2-19D). Wurde S5 hingegen zum nicht phosphorylierbaren Alanin mutiert, kam es zu keiner Aktivierung der Kinase. Auch führte die Substitution von S5 zu keiner Änderung der PK-Aktivität, wenn diese zusätzlich N-Terminal an GFP fusioniert worden war. Die negativ regulierenden Eigenschaften des CPK23 N-Terminus hingen somit nur schwach mit der möglichen Acylierung zusammen. Die Funktion wurde aber effektiv durch die Pseudo-Phosphorylierung des N-Terminus an S5 aufgehoben.

Einfluss N-terminaler Veränderungen auf die CPK23-vk Aktivität in Protoplasten

Um die in Hefe gefundenen regulatorischen Effekte des N-Terminus zu bestätigen, wurden die verschiedenen CPK23 Varianten in Arabidopsis Protoplasten (PP) getestet, um ihren Einfluss auf die ABA-Antwort zu untersuchen. Hierzu wurde, ähnlich wie im pSAR-TLA, die spezifische Aktivierung ABA-abhängiger Promotoren genutzt. Auch im Protoplasten Assay wird die Aktivierung des Promotors indirekt über die Aktivität der nachgeschalteten Luciferase ausgelesen. Im Gegensatz zu den Versuchen in Hefe wird im Falle der Protoplasten der natürliche Rd29B-Promotor verwendet, welcher mehrere ABRE-Bindesequenzen trägt. Neben dem Rd29B:LUC Reporter wurden die Protoplasten mit einem 35S:GUS internen Standard sowie dem gewünschten Effektor transfiziert. Der Einfluss des Effektors auf die ABA-Signalkaskade wird unter endogenen ABA-Level, sowie nach Induktion der ABA-Antwort, durch die externe Zugabe von ABA betrachtet. Durch die zelleigenen Signalkomponenten ist die Co-Transfektion von ABFs in diesem Falle nicht nötig. Im Gegensatz zu den Versuchen in Hefen kann keine Aussage getroffen werden, über welchen Weg die Effektoren Einfluss auf die ABA-Signalkaskade nehmen. Für die Aktivitätsstudien in Protoplasten wurden die CPK23-Varianten in ein Protoplasten-kompatibles Expressionssystem transferiert und ihr Einfluss auf die Reporteraktivität getestet.

Auch in PP zeigte sich, dass die CPK23-vk ohne N-terminale Modifikation keine Aktivierung der ABA-Antwort ermöglichte (Abb. 2-20A). Auch hier war eine N-terminale Fusion nötig um die PK zu aktivieren. So wurde mit dem 9 AS-Linker (9ASL) eine 10-fache Aktivierung der ABA-Antwort bei endogenen ABA Leveln und eine 30-fache mit exogenem ABA erreicht. Bei Fusion des 12 ASL zeigt sich mit ABA sogar eine über 50-fache Aktivierung. Interessanterweise wurde CPK23 nicht durch N-terminale Proteinfusion mit GFP oder GST in Protoplasten aktiviert. Hier zeigte sich eine eindeutige Diskrepanz zwischen den in Hefe und Protoplasten erzielten Ergebnissen.

Durch die Deletion des N-Terminus kam es auch in PP zu einer Aktivierung der PK (Abb. 2-20B), allerdings erst ab einer Deletion von über 50 AS. Die $\Delta 59$:CPK23-vk führte zu einer ca. 30-fachen

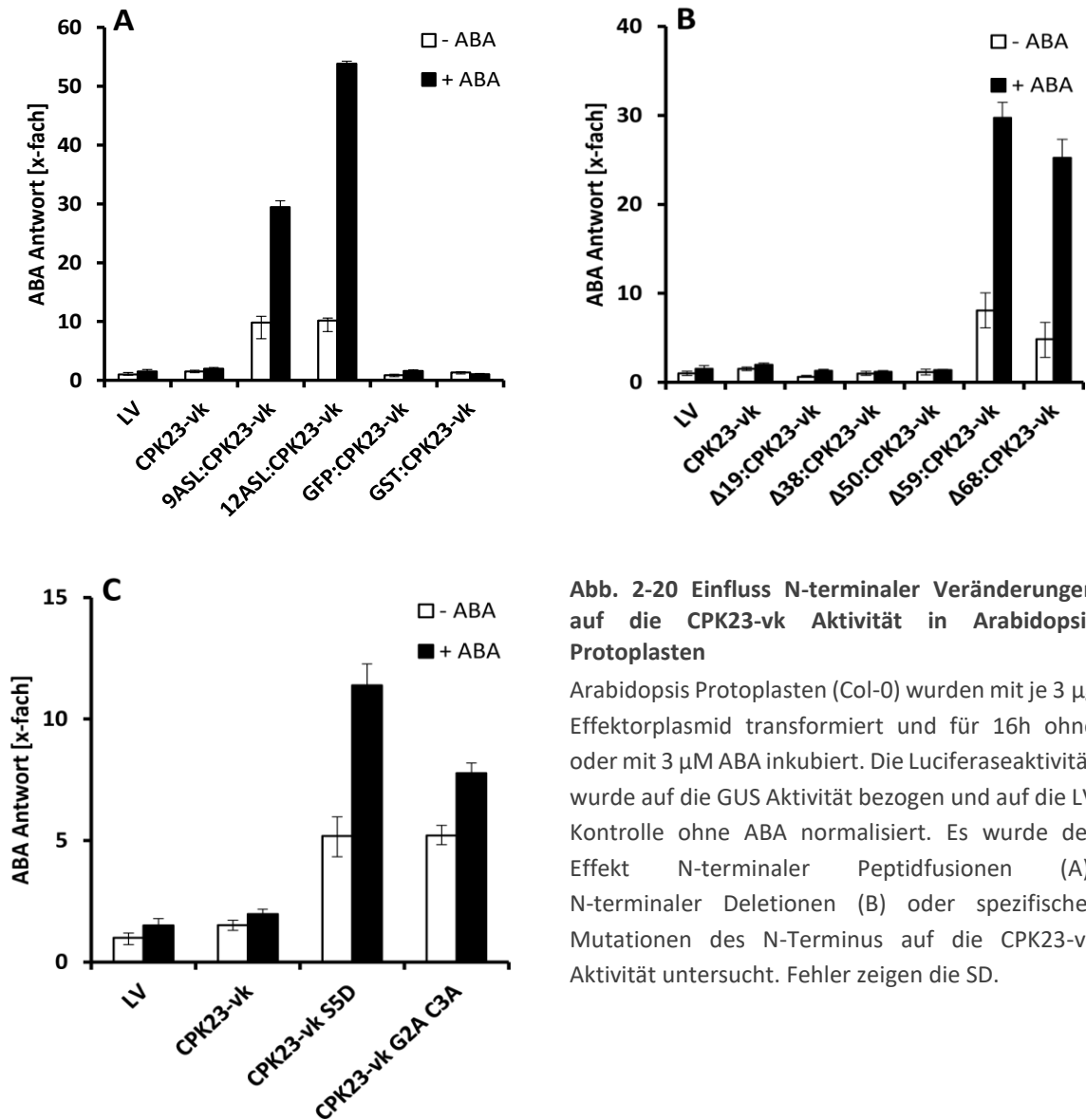


Abb. 2-20 Einfluss N-terminaler Veränderungen auf die CPK23-vk Aktivität in Arabidopsis Protoplasten

Arabidopsis Protoplasten (Col-0) wurden mit je 3 μ g Effektorplasmid transformiert und für 16h ohne oder mit 3 μ M ABA inkubiert. Die Luciferaseaktivität wurde auf die GUS Aktivität bezogen und auf die LV Kontrolle ohne ABA normalisiert. Es wurde der Effekt N-terminaler Peptidfusionen (A), N-terminaler Deletionen (B) oder spezifischer Mutationen des N-Terminus auf die CPK23-vk Aktivität untersucht. Fehler zeigen die SD.

Aktivierung der ABA-Antwort bei externe ABA Applikation. Auch die Δ 68:CPK23-vk Version zeigte einen ähnlichen Einfluss auf die ABA-Antwort. Kürzere Deletionen führten, im Gegensatz zu den in Hefe gefundenen Daten, zu keiner Aktivierung der Kinase. Auch die in Hefe untersuchten Mutationen des N-Terminus können in Arabidopsis Protoplasten bestätigt werden. Sowohl die S5D-Substitution, wie auch die Mutation der Acylierungsstellen (G2A und C3A) des N-Terminus (Abb. 2-19C) führten zur Aktivierung der CPK23. Hierbei scheint der Einfluss der Acylierungsstellen in Protoplasten stärker zu sein als in Hefe, während die S5D-Phosphomimic-Version keinen so drastischen Einfluss in Protoplasten zeigte wie in Hefe.

Durch die CPK23 Transaktivierungsversuche in PP konnte der inhibitorische Effekt des N-Terminus bestätigt werden. Es zeigten sich allerdings Unterschiede zwischen den Ergebnissen in Hefe und Protoplasten. Besonders die fehlende Aktivierung durch die N-terminale Proteinfusion in Protoplasten war überraschend. Hier verbleibt es zu klären, ob diese Unterschiede auf pflanzenspezifische Effektoren zurückzuführen sind, die in Hefe nicht vorhanden sind, oder ob dieser Unterschied durch einen spezifischen Mechanismus der Hefezellen ausgelöst wurde.

2.3.4 ABF-Transaktivierung durch andere CPKs in Hefe

Um auf die Spezifität der ABF-Aktivierung zu testen, sollten neben der CPK23 auch strukturell und funktionell eng verwandte CPKs untersucht werden. Hierzu wurden die eng verwandten CPK21, und CPK22 sowie CPK4 und CPK11, für die ebenfalls eine Regulation der ABFs beschrieben wurde (Zhu et al., 2007), verwendet (vgl. Abschnitt 1.6.3). Alle CPKs wurden ohne CML-Domäne N-terminal mit GFP fusioniert und zusammen mit ABF2 in pSAR-Reporterhefen transformiert. Zur Expressionskontrolle wurde die Abundanz der Fusionsproteine mittels GFP-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 2-21A).

Während CPK23, 21 und 22 eine vergleichbare Proteinabundanz mit der erwarteten Proteingröße zeigten, war das Proteinsignal für CPK4 und CPK11 deutlich schwächer. Betrachtet man die in den selben Proben gemessene Luciferaseaktivität (Abb. 2-21B), so zeigte sich eine starke Aktivierung des

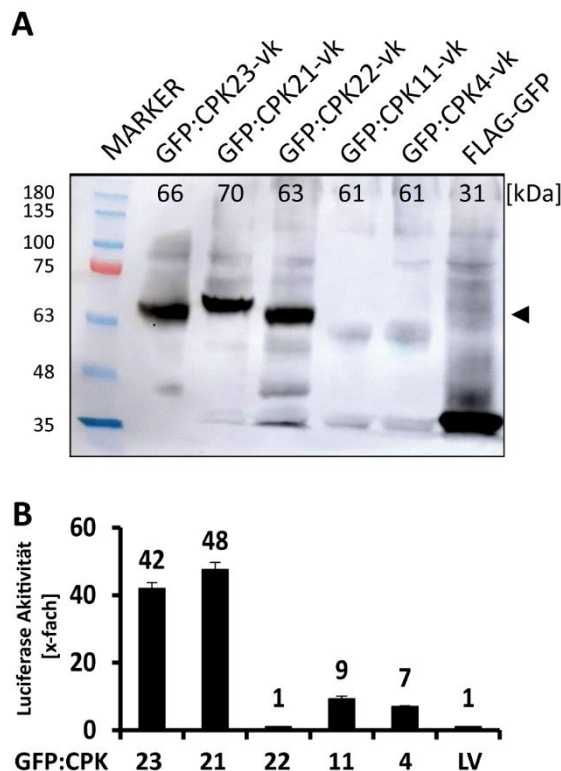


Abb. 2-21 CPK-Abundanz und Transaktivierung in pSAR-Reporterhefen

CPK23, 21, 22, 11 und 4 wurden als GFP:CPK-vk Konstrukt zusammen mit ABF2 in pSAR-Reporterhefen transformiert und für 6h mit 1% Galactose induziert. Die geernteten Hefen wurden für die Detektion der Fusionsproteine mittels anti-GFP Antikörpern (A) sowie der pSAR Aktivierung genutzt (B). Die theoretische Größe der Fusionsproteine sind im oberen Teil des Bildes in kDa angegeben. Höhe der GFP:CPK23-vk ist durch einen Pfeil markiert (A). Die relativen LUC Aktivitäten sind auf den LV normalisiert. Fehler zeigen die SD aus n=3 technischen Replikaten (B).

pSAR mit CPK23 und CPK21, während es zu keiner Transaktivierung mit CPK22 kam. Die schwach exprimierten CPK4 und 11 zeigten eine schwächere, aber doch deutliche Aktivierung des pSAR. Auch wenn es Unterschiede in der Proteinabundanz gab, war die Transaktivierung von ABF2 doch spezifisch. CPK22 konnte trotz guter Proteinexpression ABF2 nicht aktivieren. Die schwächere Transaktivierung von CPK4 und CPK11 ließe sich durch die geringere Proteinmenge erklären.

2.4 ABF-Phosphorylierung in Hefe

Der hier etablierte pSAR-TLA bietet, gegenüber dem Protoplasten Transaktivierungsassays, den Vorteil der spezifischen Genexpression. Die oben beschriebene Aktivierung der ABFs war obligat abhängig von der Anwesenheit einer passenden Proteinkinase. Die schwachen oder nicht vorhandenen Aktivitäten der ABFs ohne diese ließ den Schluss zu, dass die ABFs durch hefeeigene Proteinkinasen nicht aktiviert werden konnten und die Transaktivierung allein auf die Phosphorylierung durch die co-exprimierte Proteinkinase zurückzuführen war. Die ABF-Aktivierung in Hefe ermöglichte so spezifische Phosphorylierungsstellen der Proteinkinasen zu bestimmen und zu untersuchen.

2.4.1 ABF2 Phosphorylierungsstellen

Aus vorherigen *in vitro* Phosphorylierungsstudien mit CPK23 (Pleißner, 2015) sowie *in planta* Phosphorylierungsstudien mit ABF2 (Furihata et al., 2006) waren eine Reihe von putativen ABF2 Phosphorylierungsstellen bekannt (Abb. 2-22). Darüber hinaus wurden die CPK23-spezifischen Phosphorylierungsstellen in den pSAR-Reporterhefen bestimmt. Hierzu wurden Hefen mit ABF2 und der hyperaktiven GFP:CPK23-vk sowie der inaktiven GFP-CPK23-vk-tk transformiert. 6 h nach Induktion der CPK23-Proteinexpression wurden die löslichen Proteine aus der Hefe isoliert und für die Bestimmung der ABF2-Phosphorylierungsstellen genutzt. Die qualitative Analyse der

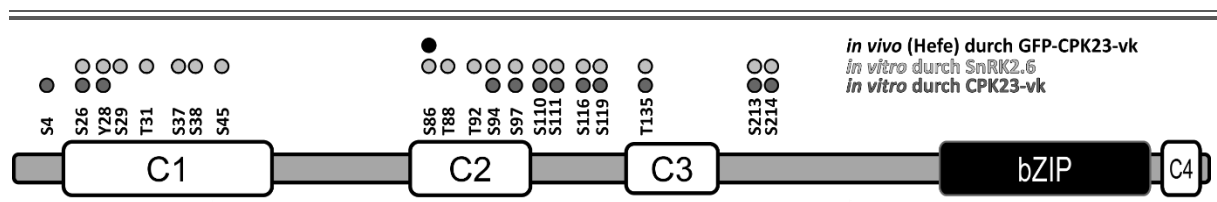


Abb. 2-22 Potenzielle Phosphorylierungsstellen in ABF2

Schematische Struktur des Transkriptionsfaktors ABF2 mit der C-terminalen DNA Bindedomäne (bZIP) und dem N-terminalen regulatorischen Bereich. Vier konservierte Bereiche (C1-4) zeigen starke Homologie zwischen allen ABFs. Potenzielle Phosphorylierungsstellen aus der *in vitro* Phosphorylierung mit CPK23-vk (dunkelgrau) und der *in vitro* Phosphorylierung mit SnRK2.6 (hellgrau) (Pleißner, 2015) sowie der in pSAR-Reporterhefen durchgeführten ABF2 *in vivo* Phosphorylierung (schwarz) sind über der Struktur markiert. Schwarze Linien unter der Struktur indizieren die in der *in vivo* Phosphorylierung gefundenen Peptide.

Tabelle 2-1 Bestimmung der in vivo Phosphorylierungsstellen in ABF2

(in Kooperation mit Martin Scholz, WWU Münster)

Peptid Intensitätsangaben für die massenspektroskopisch gefundenen Phospho-Peptide. Die Peptidsequenz sowie mögliche Phosphorylierungsstellen sind über der jeweiligen Tabelle angegeben. Die Zuordnung der jeweiligen Phosphorylierung zur entsprechenden AS ist durch ein kleines p Gekennzeichnet. Die Zahl hinter der pAS gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass es sich hierbei um die phosphorylierte AS handelt.

	LV + LV	ABF2 + LV	ABF2 + GFP:CPK23-vk	ABF2 + CPK23-vk-tk		LV + LV	ABF2 + LV	ABF2 + GFP:CPK23-vk	ABF2 + CPK23-vk-tk
S26	QGpS(1)IYSLTFDEFQSSVGK				S413	GGYFGNDANTGFSVEFQQPpS(1)PR			
Replikat					Replikat				
1					1			1096500	
2		92599			2		740260	4324700	932080
3			170450	88659	3		710020	973640	
4		161220	269960	119190	4				
5		81526	234110	97720	5		525920		562110
S86	QGpS(0.997)LpT(0.003)LPR				S411	RpT(0.627)EpS(0.373)GPW			
Replikat					Replikat				
1			453630		1		917910		867850
2			705850		2				
3			655720		3				701940
4			499950		4				
5			641040		5				

Phosphorylierungsstellen erfolgte durch massenspektroskopische Analyse der tryptisch verdauten und auf Phosphorylierung angereicherten Peptide (in Zusammenarbeit mit Martin Scholz, WWU Münster, AG Hippler). Insgesamt wurden 9 unterschiedliche ABF2 spezifische Peptide gefunden, von denen vier phosphoryliert waren (Abb. 2-22 und Tabelle 2-1).

Von den vier gefunden phosphorylierten Peptiden, mit den Phosphorylierungsstellen S26, S86, S413 und S411, war nur S86 spezifisch in allen Replikaten mit aktiver PK zu detektieren (Tabelle 2-1). Die Phosphorylierungsstellen S26, S413 und S411 wurden unspezifisch in allen ABF2-enthaltenen Proben gefunden (Ausnahme: S411 wurde nicht in der Probe mit GFP:CPK23-vk detektiert). Dabei war die Phosphorylierung dieser Peptide nicht in allen Replikaten reproduzierbar, was darauf hindeutet, dass es sich um unspezifische Phosphorylierungen des ABF2 durch Hefeeigene Proteinkinasen handelt. S86 konnte eindeutig als CPK23 spezifische Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Die geringe

Proteinabdeckung von ca. 30 % (vgl. Abb. 2-22) ließ keine Aussage zu, ob es sich hierbei um die einzige CKP23-spezifische Phosphorylierungsstelle handelte.

2.4.2 Transaktivierung von ABF2-Phosphosite-Mutanten

18 der 20 potentiellen Phosphorylierungsstellen in ABF2 (Abb. 2-22) wurden durch gerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*, SDM) durch die nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin (Phosphomutante, A) oder durch die negativ geladene Aminosäure Aspartat (Phosphomimic, D) ausgetauscht und ohne PK (Abb. 2-23), oder mit GFP:CPK23-vk und SnRK2.6Δ331 (Abb. 2-24) in pSAR-Reporterhefen auf ihre Transaktivierungseffizienz im Vergleich zum ABF2 WT hin untersucht. Ein Vergleich der Aktivitäten der ABF2-Phospho-(mimic)-Mutanten ohne aktivierende PK zeigte ein sehr diverses Bild (Abb. 2-23). Die Doppelmutation von Y28 und S29 zu Aspartat (D) war nicht mehr fähig, den pSAR über die Hintergrundaktivität hin zu aktivieren und erreichte nicht die typische 4-5-fache

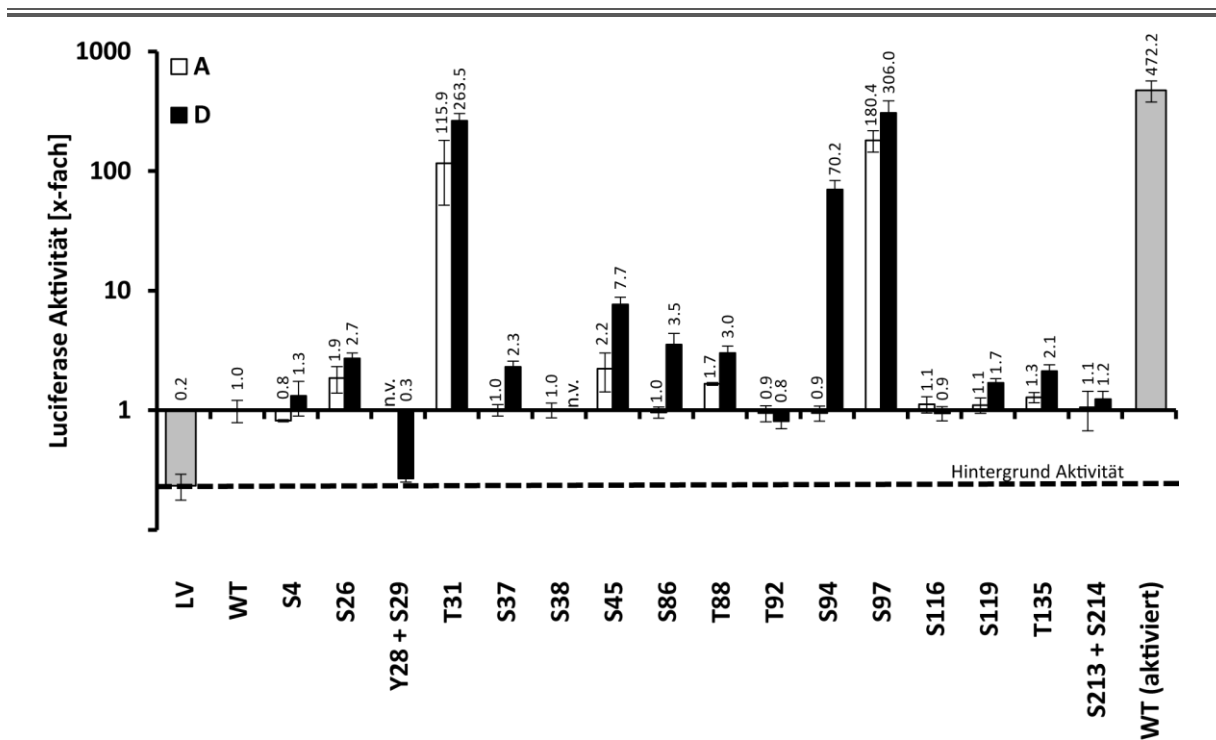


Abb. 2-23 pSAR-Transaktivierung durch ABF2-Phosphosite-Mutanten

pSAR-Reporterhefen wurden mit ABF2-Phospho-(mimic)-Mutanten transformiert und auf ihre Transaktivierung getestet. Jeweils eine potentielle Phosphorylierungsstelle wurde durch Aspartat (D, Phosphomimic) oder Alanin (A, Phosphomutante) substituiert. Die Aktivität der einzelnen Proben ist auf den ABF2 WT normalisiert und wird logarithmisch dargestellt. Zum Vergleich ist die rLUC ohne ABF2 (LV, gestrichelte Linie), sowie die Aktivität des durch GFP:CPK23-vk transaktiviertem ABF2 WT (WT, aktiviert) dargestellt. Nicht getestete ABF2-Versionen sind mit n.v. markiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int aus n=6. Die Abbildung basiert auf Messungen von Pflügler (2016).

ERGEBNISSE

Aktivierung des ABF2 WT. Diese Doppelmutation schien zu einem inaktiven ABF2 zu führen und wurde nicht weiter betrachtet. Die Mutationen an den Stellen S4, S38, S92, S116, S119, T135 und S213+S214 zeigten weder in der A noch der D Mutante eine relevante Änderung der pSAR-Transaktivierung. Einzelne Mutationen an diesen Stellen scheinen keinen Einfluss auf die ABF2-Aktivität zu haben. Mutationen an den Stellen S26, T31, S45 T88 und S97 wiesen unterschiedlich gesteigerte Aktivität, sowohl in der Phosphomimic-Mutante wie auch der Phosphomutante, auf. Die Mutationen an T31 sowie S97 führten zu einer ähnlichen Transaktivierungseffizienz wie die des aktivierten ABF2 WT (Abb. 2-23, grauer linker Balken). Bei diesen schien es sich um inhibitorische Stellen des ABF2 zu handeln. Die Phosphomimic-Mutationen an den Stellen S37, S86 und S94 führten zu einer leichten (S37D 2,3-fach, S86D 3,5-fach) bis starken (S94D 70-fach) Aktivierung des pSAR, während die Mutationen zu Alanin an diesen Stellen keinen Effekt auf die Transaktivierung hatten. Hierbei könnte es sich um wichtige Phosphorylierungsstellen handeln.

Mit Ausnahme der inaktiven Y28 + S29-Mutanten, sowie der S38-Mutanten wurden alle ABF2-Versionen auf ihre Fähigkeit, durch CPK23 oder SnRK2.6 transaktiviert zu werden, hin getestet (Abb. 2-24). Während sich alle Mutanten durch SnRK2.6 Δ 331 noch deutlich transaktivieren ließen (0,5- bis 1,8-fache der transaktivierten ABF2-WT-Aktivität, Abb. 2-24A) zeigte ABF2-S94A in Kombination mit CPK23 eine deutlich geringere Transaktivierungsleistung (0,06-fache der WT Aktivität). Im Gegensatz dazu zeigte ABF2-S94D ähnliche Aktivität wie der WT. Der Verlust der Phosphorylierungsstelle S94 scheint den transaktivierenden Effekt der CPK23 fast vollständig zu inhibieren. Da S94A immer noch eine deutliche CPK-abhängige Aktivierung im Gegensatz zum nicht aktivierten ABF2 zeigte, kann es sich bei S94 nicht um die einzige CPK23 spezifische Phosphorylierungsstelle handeln. Mutationen der anderen potentiellen Phosphorylierungsstellen führten nur zu einer geringen Änderung der Transaktivierungseffizienz (0,4 – 2,5-fach). Besonders im Hinblick auf die gesteigerte Aktivität der ABF2 S94D ohne transaktivierende Proteinkinase (Abb. 2-23), schien es sich hierbei um eine für CPK23 relevante Phosphorylierungsstelle zu handeln. Im Gegensatz zu CPK23 konnte ABF2 S94A durch SnRK2.6 noch voll aktiviert werden, was darauf hindeutet, dass SnRK2.6 ABF2 über andere Stellen induziert wie CPK23. Alle untersuchten ABF2-Phosphomutanten konnten durch SnRK2.6 transaktiviert werden. Entweder wurde ABF2 durch SnRK2.6 über eine andere als die hier untersuchten Phosphorylierungsstellen aktiviert oder SnRK2.6 phosphorylierte ABF2 an multiplen Stellen. Im zweiten Fall wäre es möglich, dass die Mutation einzelner Phosphorylierungsstellen nicht ausreichend war, um einen Effekt auf die Transaktivierung zu detektieren.

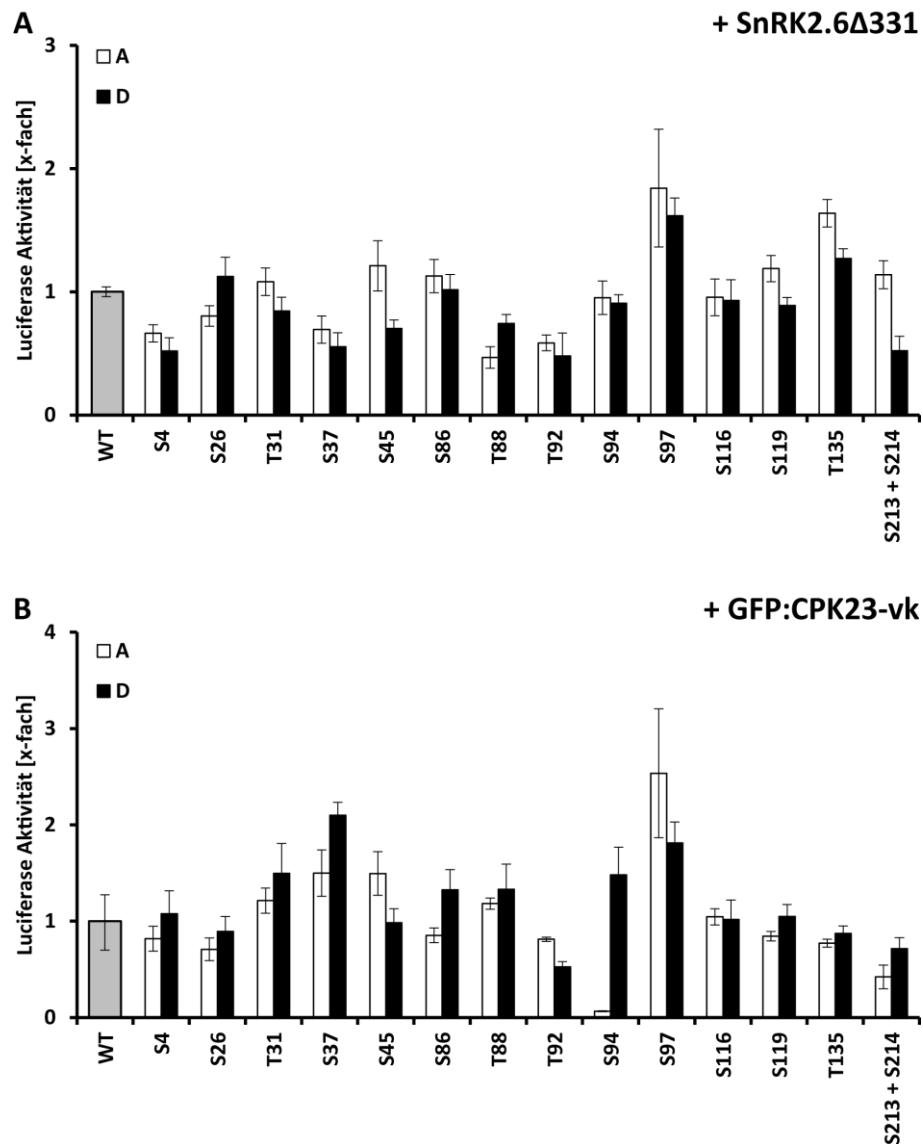


Abb. 2-24 Transaktivierung der ABF2-Phospho-(mimic)-Mutanten durch SnRK2.6 und CPK23

Cotransformation der ABF2 Phospho-(mimic)-Mutanten mit SnRK2.6Δ331 (A) und GFP:CPK23-vk (B) in pSAR-Reporterhefen. Potentielle Phosphorylierungssites wurden jeweils zu Aspartat (D) oder Alanin (A) mutiert. Die rLUC sind auf den ABF2 WT normalisiert (grauer Balken). Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int. Die Abbildung basiert auf Messungen von Pflügler (2016).

Um zu untersuchen, ob die in Abb. 2-22 gezeigte *in vivo* Phosphorylierungsstelle S86 für die verbleibende Transaktivierung der ABF2-S94A Mutante durch CPK23 verantwortlich ist, wurden ABF2-S94-S86 Doppelmutanten hergestellt und in Kombination mit LV, CPK23 oder SnRK2.6 in Hefe getestet (Abb. 2-25). Ohne aktivierende Proteinkinase zeigten die ABF2-S94-S86 Mutanten (sowohl in A wie auch in D) eine ähnliche Aktivität wie die ABF2-S94 Einfachmutante (nicht gezeigt). Während sich die ABF2-S86 Mutanten, sowie die ABF2-S94D und ABF2-S94D-S86D gut durch CPK23 transaktivieren ließen, zeigte ABF2-S94A eine geringe und ABF2-S94A-S86A keine Transaktivierung mit CPK23. Die

verbleibende Transaktivierung der ABF2-S94A Mutante lässt sich durch die zusätzliche Phosphorylierung an S86 erklären. Im Gegensatz dazu wurde die Doppelmutante durch SnRK2.6 weiterhin aktiviert. Zwar war die Transaktivierung von ABF2-S94A-S86A mit SnRK2.6 Δ 320 nur halb so stark wie mit dem WT, aber genau so stark wie mit der entsprechenden Phosphomimic-Mutante. Da die ABF2-S86D-S94D Mutante mit CPK23 keine verringerte Aktivität verglichen zum WT aufwies, könnte die geringere Transaktivierung der Doppelmutante durch SnRK2.6 ein Hinweis darauf sein, dass diese beiden Stellen auch bei der SnRK2.6 Phosphorylierung eine Rolle spielen. Der Unterschied der Transaktivierung mit CPK23 und SnRK2.6 zeigte eindeutig, dass beiden Proteinkinasen ABF2 über unterschiedliche Phosphorylierungsstellen zu aktivieren vermögen.

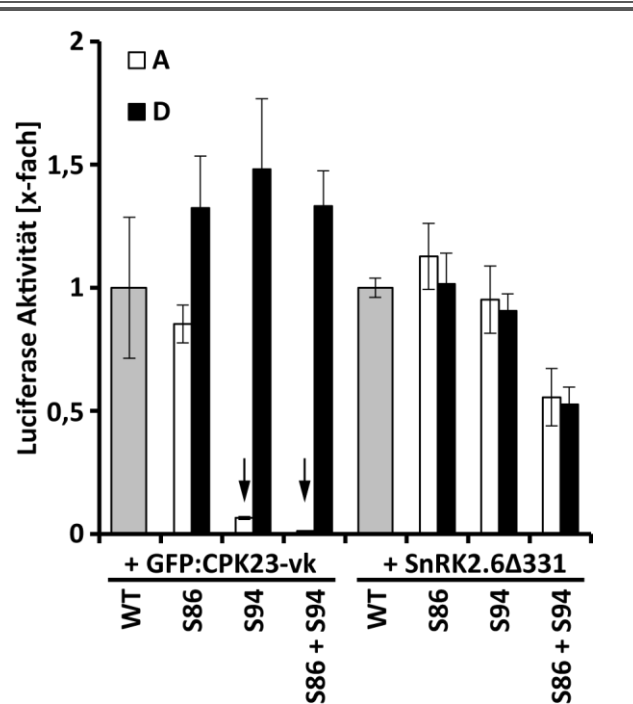


Abb. 2-25 Transaktivierung von ABF2 S86 + S94 Doppelmutanten

pSAR-Reporterhefen wurden mit ABF2 WT, S86, S94 und S86 + S94 Phospho- (mimic) Mutanten in Kombination mit GFP:CPK23-vk und SnRK2.6 Δ 331 transformiert. Die rLUC wurde jeweils auf den ABF2 WT normalisiert. Pfeile deuten auf die verringerte ABF2 Transaktivierung der Phosphomutanten durch CPK23. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

2.4.3 Additive Transaktivierung von ABF2 durch CPK23 und SnRK2.6

Neben der Phosphorylierung von ABF2 wird für die beiden beschriebenen Proteinkinasen auch eine gegenseitige Regulation vermutet. So wurde durch Wellmann (2012) die gegenseitige Phosphorylierung beider Proteinkinasen gezeigt und Czap (2015) beschrieb eine negative Regulation von SnRK2.6 durch CPK23 in Arabidopsis Protoplasten.

Die Spezifität der ABF2 Phosphorylierung zwischen beiden Proteinkinasen sollte genutzt werden, um einen möglichen Effekt beider Proteinkinasen aufeinander oder einen synergistischen Effekt der spezifischen Phosphorylierungssites zu analysieren. Hierzu sollte der ABF2 WT und die ABF2-S94A Mutante zusammen mit CPK23 und der SnRK2.6 verwendet werden (Abb. 2-26). Während beide Proteinkinasen ABF2 und ABF2-S94A, wie bereits beschrieben, aktivierten, kam es bei gleichzeitiger Expression beider PKs zu einer stärkeren, additiven Transaktivierung. Die Summe der Aktivitäten bei

einzelner Transaktivierung entsprach in etwa der Signalstärke bei simultaner Verwendung beider PKs. Es kam weder zu einem synergistischen Effekt der ABF2-Aktivierung, noch zu einer Inaktivierung der SnRK2.6 durch CPK23. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster beider Proteinkinasen schienen sich in ihrer Aktivität nicht zu beeinflussen und führten in Kombination zu vergleichbaren Aktivitäten. Es schien zu keiner direkten gegenseitigen Regulation beider Proteinkinasen zu kommen.

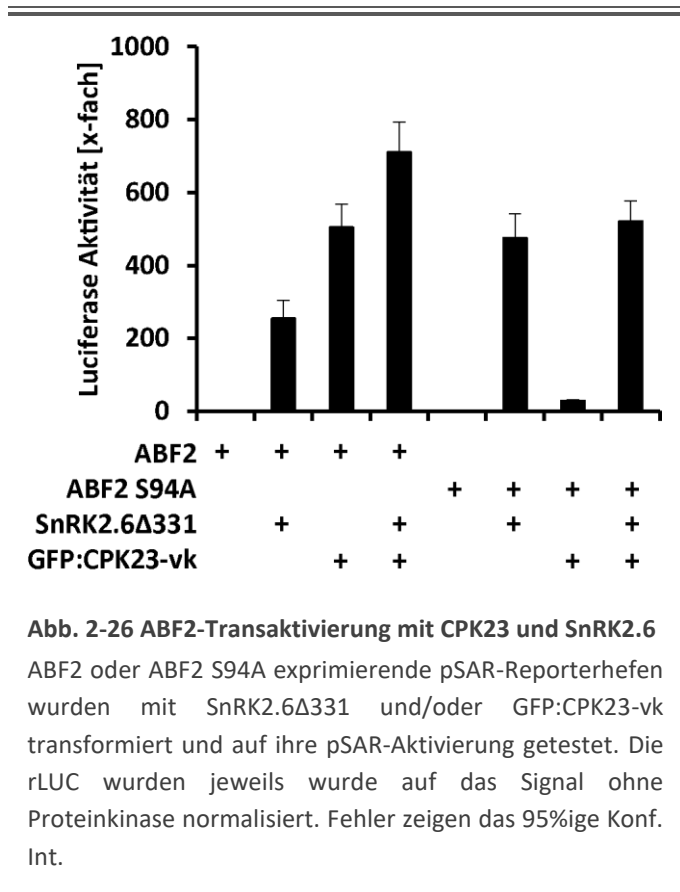


Abb. 2-26 ABF2-Transaktivierung mit CPK23 und SnRK2.6
 ABF2 oder ABF2 S94A exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit SnRK2.6Δ331 und/oder GFP:CPK23-vk transformiert und auf ihre pSAR-Aktivierung getestet. Die rLUC wurden jeweils auf das Signal ohne Proteinkinase normalisiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

2.5 Regulation der ABA-Antwort durch CBL-interagierende Proteinkinasen (CIPKs)

Neben den CPKs zählen auch die *CBL-interacting Proteinkinasen* (CIPK) zu den Ca^{2+} -abhängigen Kinasen. Im Gegensatz zu den CPKs werden die CIPKs nicht durch Ca^{2+} direkt reguliert, sondern interagieren mit den Ca^{2+} bindenden Proteinen *Calcineurin B-like Proteins* (CBL), die in der Regel zur Aktivierung der PK unter hohen Ca^{2+} -Leveln führen. Hierbei kommt es nach Bindung von Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung des CBLs, wodurch dieses mit der inhibitorischen NAF Domäne der CIPK interagiert. Durch die Interaktion löst sich die NAF Domäne vom *activation loop* der Kinase, wodurch dieser autophosphoryliert wird, und die PK in den aktiven Zustand übergeht (siehe Abschnitt 1.6.4). Neben der NAF Domäne besitzen die CIPKs auch eine Proteinphosphatase-Interaktionsdomäne (Abb. 2-27). In der Arbeit von Fuchs (2013) wurden eine Reihe von CIPKs als Interaktionspartner der ABA abhängigen PP2Cs beschrieben. Neben diesen in Hefe durchgeführten Interaktionsstudien beschreibt Fuchs im Besonderen für CIPK11, 14 und 2 einen Einfluss auf die ABA-Antwort in Arabidopsis Protoplasten. Auch im Hinblick auf die im Abschnitt 1.6.4 beschriebenen Interaktionen und Regulationen wichtiger Faktoren der ABA-Signalkaskade sollte untersucht werden, ob neben den SnRK2s und den CPKs auch die CIPKs einen Einfluss auf die Aktivität der ABA abhängigen Transkriptionsfaktoren nehmen.

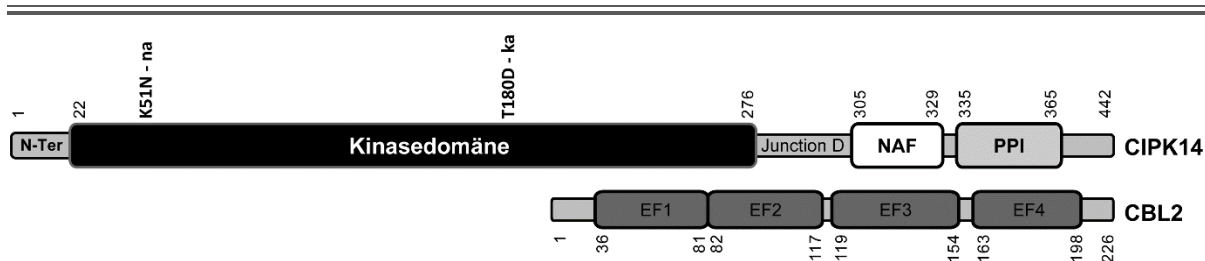


Abb. 2-27 Struktureller Aufbau der CIPK14 und seines Interaktionspartners CBL2

Die CIPK14 besteht aus einem kurzen N-Terminus (N-Ter), einer Kinasedomäne gefolgt von einer *Junction* Domäne und zwei regulatorischen Domänen. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen bindet die NAF Domäne an die Aktivierungsschleife innerhalb der Kinasedomäne und verhindert so die Aktivierung der PK. Bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen bindet Ca^{2+} an CBL2, wodurch dieses mit der NAF-Domäne der CIPK14 interagiert. Durch die Bindung kommt es zur Ablösung der NAF-Domäne aus der Kinasedomäne. Nach Autophosphorylierung des T180 in der Aktivierungsschleife geht die PK in den aktiven Zustand über. Mutation des T180 zum Aspartat führt zu einer konstitutiv aktiven (ka, T180D) Form der CIPK14. Im Gegensatz dazu führt der Austausch des Lysins 51 durch Asparagin zu einer nicht-aktiven (na, K51N) CIPK14. Neben der NAF-Domäne verfügt CIPK14 über eine C-Terminale Proteinphosphatase-Interaktionsdomäne (PPI).

Zahlen über der Struktur geben die AS Position in CIPK14 bzw. CBL2 an. Die Struktur ist maßstabsgetreu.

2.5.1 Einfluss der CIPKs auf die ABA-abhängige Keimung

Um den Einfluss der CIPK2, 11 und 14 zunächst auf die ABA-Signalkaskade *in planta* zu analysieren, wurden entsprechende T-DNA Insertionsmutanten (KO) (Qin et al., 2008; Fuglsang et al., 2007) oder 35S-Überexpressionslinien (OE) (Fuchs, 2013) konstitutiv aktiver Proteinkinasen (ka) verwendet und auf ihre Keimung bei exogener Applikation von ABA getestet (Abb. 2-28). In allen Linien kam es zur Inhibition der Keimrate durch die externe Applikation von ABA bis hin zur kompletten Inhibierung der Keimung bei 5-10 μM ABA. Im Vergleich zum WT zeigten die CIPK KO Pflanzen (Abb. 2-28A) nur geringe Unterschiede bezüglich ihrer Keimrate. Lediglich *cipk14-2* und *cipk14-2 x cipk11-1* zeigte einen leicht insensitiven signifikanten Phänotyp ($p=0.013$ für Col-0 - *cipk14-2*; $p<0.001$ für Col-0 - *cipk14-2xcipk11-1*; 2-Way ANOVA mit post-Hoc TukeyHSD test). Im Gegensatz dazu zeigte keine der OE-Linien einen Unterschied zum WT (Abb. 2-28B).

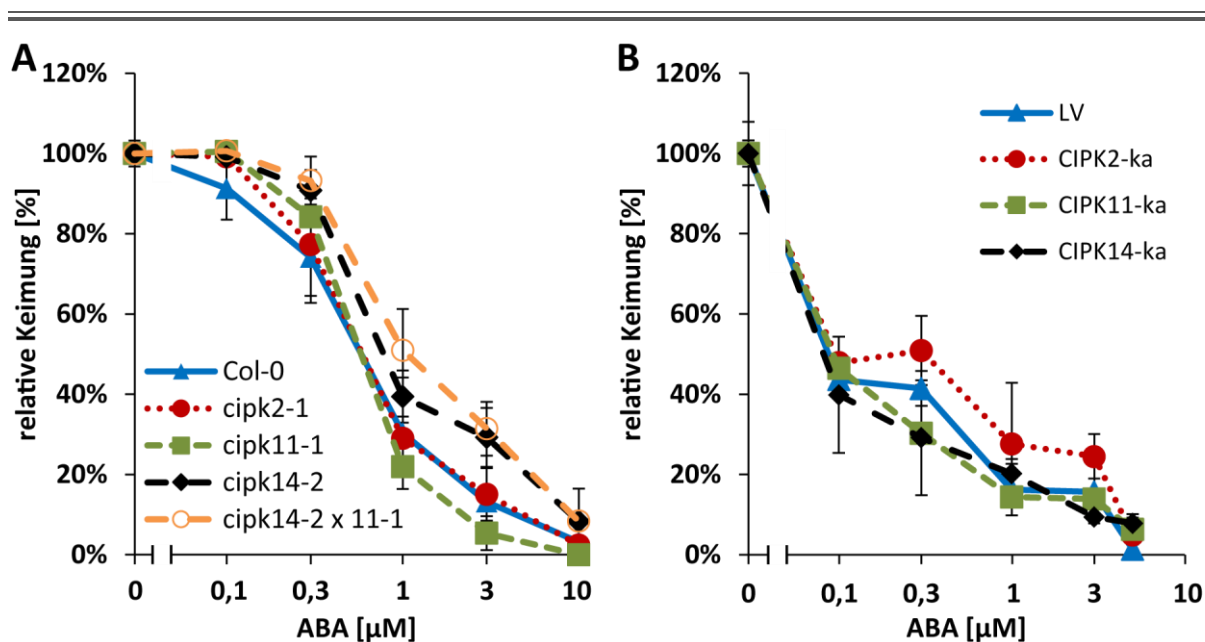


Abb. 2-28 Einfluss der CIPK2, 11 und 14 auf die ABA-abhängige Keimung

T-DNA Insertionslinien (A) der CIPK2 (*cipk2-1*; GK_031A02), CIPK11 (*cipk11-1/pks5-1*; SALK_108074), CIPK14 (*cipk14-2*; SALK_147899), und die homozygote Kreuzung aus *cipk11-1* und *cipk14-2* sowie Überexpressionslinien (B) der konstitutiv aktiven (ka) Version der CIPK2, 11 und 14 wurden im Vergleich zum WT (Col-0 in A) oder der mit Leervektor transformierten Linien (LV in B) auf ihrer Keimung unter Einfluss exogenen ABAs untersucht. Die Keimrate wurde auf den Wert bei 0 μM ABA normalisiert und in % dargestellt. Die Keimung bei 0 μM ABA lag bei allen Linien zwischen 95-99 %. Fehler zeigen die SD aus 3 unabhängigen Versuchen mit je 30 – 50 Samen. Statistische Analyse der relativen Keimung mittels 2-Way ANOVA mit post hoc TukeyHSD Test ergab lediglich für den Vergleich Col-0 vs. *cipk14-2* ($p=0,013$) und Col-0 vs. *cipk14-2 x 11-1* ($p<0,001$) einen signifikanten Unterschied.

Durch die starke Redundanz der CIPK-Familie wäre es möglich, dass der Verlust einzelner Gene keinen Einfluss auf den Phänotyp hat. Der leicht insensitive Phänotyp der *cipk11-1 x cipk14-2* Doppelmutante unterstützte diese Vermutung. Der fehlende Phänotyp der OE-Linien ließ vermuten, dass die Aktivität der PK strikt reguliert war und eine Aktivierung durch CBLs und erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen benötigte. Hier schien auch die Verwendung der konstitutiv aktiven Form keine Abhilfe zu bringen. Um den Einfluss der CIPKs auf die ABA-Signalkaskade genauer untersuchen zu können, sollte auf die Transaktivierungsassays in Arabidopsis Protoplasten bzw. Hefe zurückgegriffen werden.

2.5.2 Regulation der ABA-Signalkaskade durch CIPKs

Für ihre Verwendung in Arabidopsis Protoplasten wurden die konstitutiv aktiven Varianten der CIPKs in ein Protoplasten-geeignetes Vektorsystem transferiert und unter die Kontrolle des 35S-Promotors mit *S1-enhancer* gestellt. Wie auch schon durch Fuchs (2013) beschrieben, hatten CIPK11 und CIPK14 einen negativen Einfluss auf die ABA-Antwort, während CIPK2 einen positiven Einfluss hatte (Abb. 2-29).

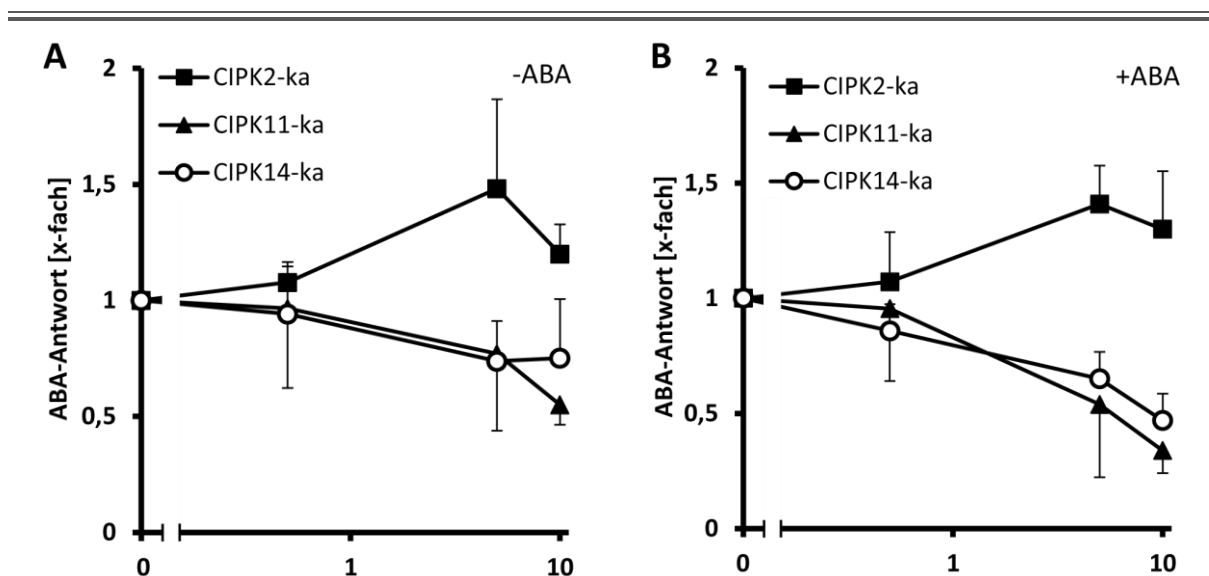


Abb. 2-29 Transaktivierung der ABA-Signalkaskade durch CIPK 2, 11 und 14 in At Protoplasten

Arabidopsis Protoplasten (Col-0) wurden mit internem Standard (35S:GUS), Rd29B:LUC Reporter und unterschiedlichen Mengen an konstitutiv aktiven (ka) CIPKs transfiziert. Nach Inkubation der Protoplasten für 16 h mit oder ohne 5 µM ABA im Medium, wurde die Luciferaseaktivität der Protoplasten bestimmt und auf die des internen Standards bezogen (rLUC). Die Aktivierung des Rd29B Promotors gibt indirekt Aufschluss über die Stärke der ABA-Antwort. Die rLUC Werte wurden jeweils auf die Aktivität ohne Effektor normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Fehler zeigen die SD aus drei unabhängigen Transfektionen.

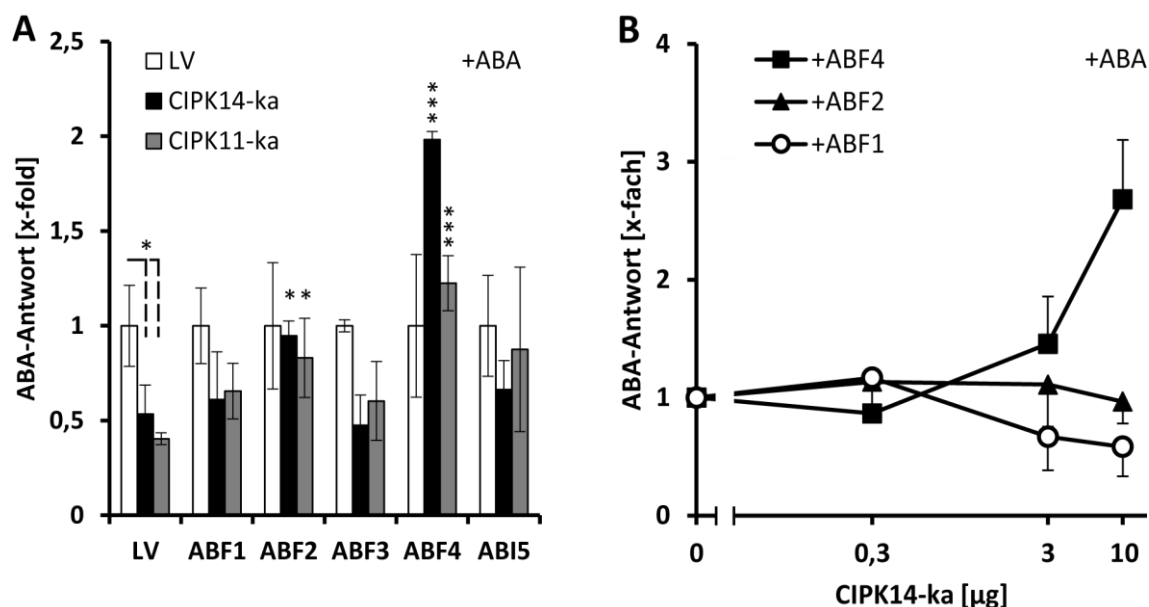


Abb. 2-30 Regulation der ABFs durch CIPK11 und 14 in Arabidopsis Protoplasten

cipk11-1 x cipk14-2 Protoplasten wurden mit Reporter, internem Standard, je 2 µg 35S:ABF Plasmid sowie 8 µg CIPK-ka Effektor (A) oder 0-10 µg CIPK14-ka (B) transfiziert und für 16 h mit oder ohne 5 µM ABA inkubiert. Die rLUC Werte wurden jeweils auf die LV Kontrolle ohne CIPKs normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte zwischen LV + LV und LV + CIPK11/14-ka (gestrichelte Linie), oder jeweils zwischen LV + CIPK11/14-ka und ABF + CIPK11/14-ka mittels Student's T-test (ungepaart, korrigiert für ungleiche Varianz) mit $p \leq 0.05$ * 0.01 ** 0.001 *** 0.

Besonders bei CIPK2 fiel dieser Effekt eher schwach aus (ca. 1,5-fache Aktivierung mit und ohne ABA). CIPK11 und CIPK14 hingegen inhibierten die ABA-Antwort um 66 % mit CIPK11 und 53 % mit CIPK14 (Abb. 2-29B; 10 µg Effektor). Im Gegensatz zu den oben gefundenen Ergebnissen in Pflanze, in denen der KO der CIPK11 und CIPK14 zu einer ABA Insensitivität führte, was auf einen positiven Regulator hindeutet, fungierten die CIPK11 und 14 in Protoplasten als negativer Regulator. Um den Einfluss der CIPK11 und 14 auf die ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren weiter zu untersuchen, wurden diese zusammen mit den ABFs in Protoplasten transfiziert (Abb. 2-30A). Während CIPK11 und CIPK14 ohne cotransfizierte ABFs die ABA-Antwort, auch in den hier verwendeten *cipk11-1 x cipk14-2* KO Linien, weiterhin um ca. 50 % inhibierte, wurde dieser Effekt bei der Cotransfektion mit ABFs teilweise aufgehoben. So zeigte sich mit ABF2 eine doppelt so starke ABA-Antwort im Vergleich zu den Transfektionen ohne zusätzliches ABF, während mit ABF4 die ABA-Antwort um das 4-Fache anstieg. In Kombination mit ABF4 änderte sich der negative CIPK14 Effekt zu einem positiven. Die Cotransfektion von ABF1, ABF3 und ABI5 hatten hingegen keinen Einfluss auf die Regulation der CIPKs. Diese Ergebnisse konnten durch Titration der CIPK14 bestätigt werden (Abb. 2-29B). Während CIPK14 die ABA-Antwort mit ABF1 weiterhin inhibierte und mit ABF2 kaum änderte, kam es mit ABF4 zu einer

ERGEBNISSE

deutlichen Induktion der ABA-Antwort. Der entgegengesetzte Einfluss der CIPK14 auf die Keimung (vergleiche Abschnitt 2.5.1) und die Effekte in Protoplasten ließen sich möglicherweise durch die differenzielle Expression der ABFs in den jeweiligen Entwicklungsstufen erklären.

Regulation der ABFs durch aktive und inaktive Versionen der CIPK

Um die gefundenen Effekte auf die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren durch CIPK zurückzuführen, sollte die Regulation der ABFs, zusätzlich zu konstitutiv aktiven Version, mit WT CIPKs und inaktiven CIPKs durchgeführt werden. Hierzu wurden diese wie in Abb. 2-27 beschrieben generiert. Die Kinaseaktivität wurde für CIPK14 in allen drei Varianten, in Anwesenheit und Abwesenheit des interagierenden CBL2, mittels *in vitro* Kinaseassays getestet (Abb. 2-31). Während es ohne oder mit inaktiver CIPK14 zu keiner Phosphorylierung der Kinase, des CBL2 oder des MBP kam, zeigte die aktive CIPK14-ka eine eindeutige Autophosphorylierung der Proteinkinase und Transphosphorylierung des

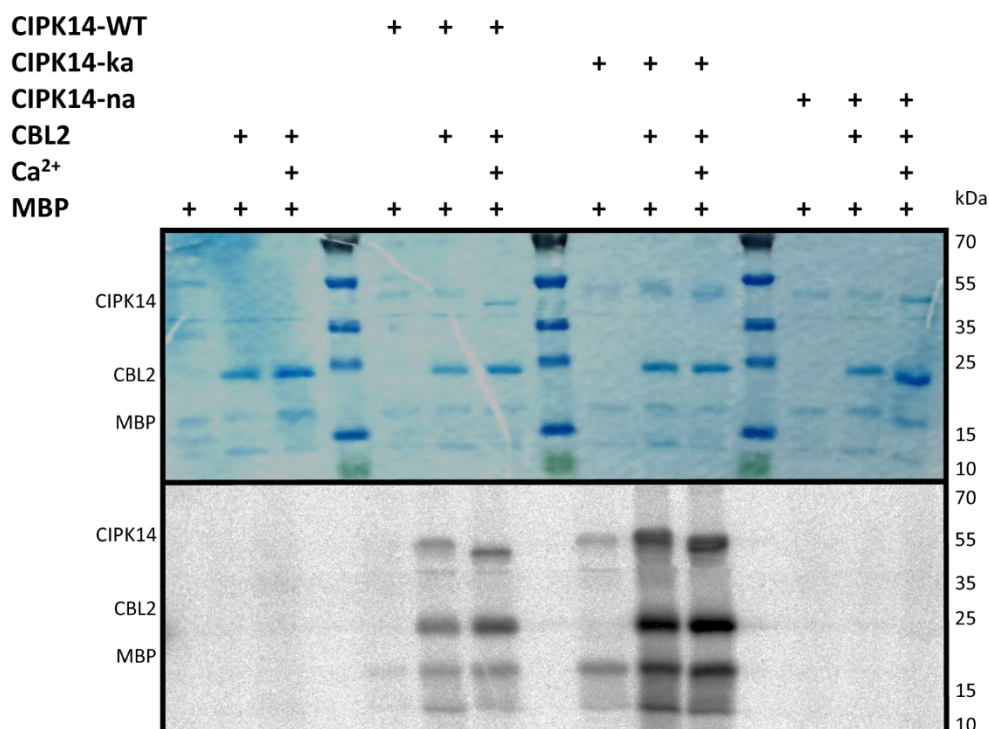


Abb. 2-31 *In vitro* Kinaseassay mit CIPK14 WT, CIPK14-ka und CIPK14-na

CIPK14 WT, CIPK14-ka, CIPK14-na sowie CBL2 wurden rekombinant aus *E.coli* gereinigt und mit *Mylic basic protein* (MBP) als Substrat in im Kinaseassay verwendet. Zur Ca²⁺ Regulation wurde der Kinasepuffer mit 1 mM Ca²⁺ (+) oder 1 mM EDTA versetzt. Nach Zugabe von P³³-ATP erfolgte die Reaktion für 1 h bei RT. Die Anwesenheit der eingesetzten Proteine wurde über Comassi-Färbung der SDS-PAGE (oben) detektiert während die Kinaseaktivität mittels Autoradiogram (unten) detektiert wurde. Dunkle Signale implizieren Phosphorylierung der entsprechenden Proteine. Die Laufhöhe der Proteine ist links markiert. Die entsprechenden Größen der Markerbanden sind rechts indiziert.

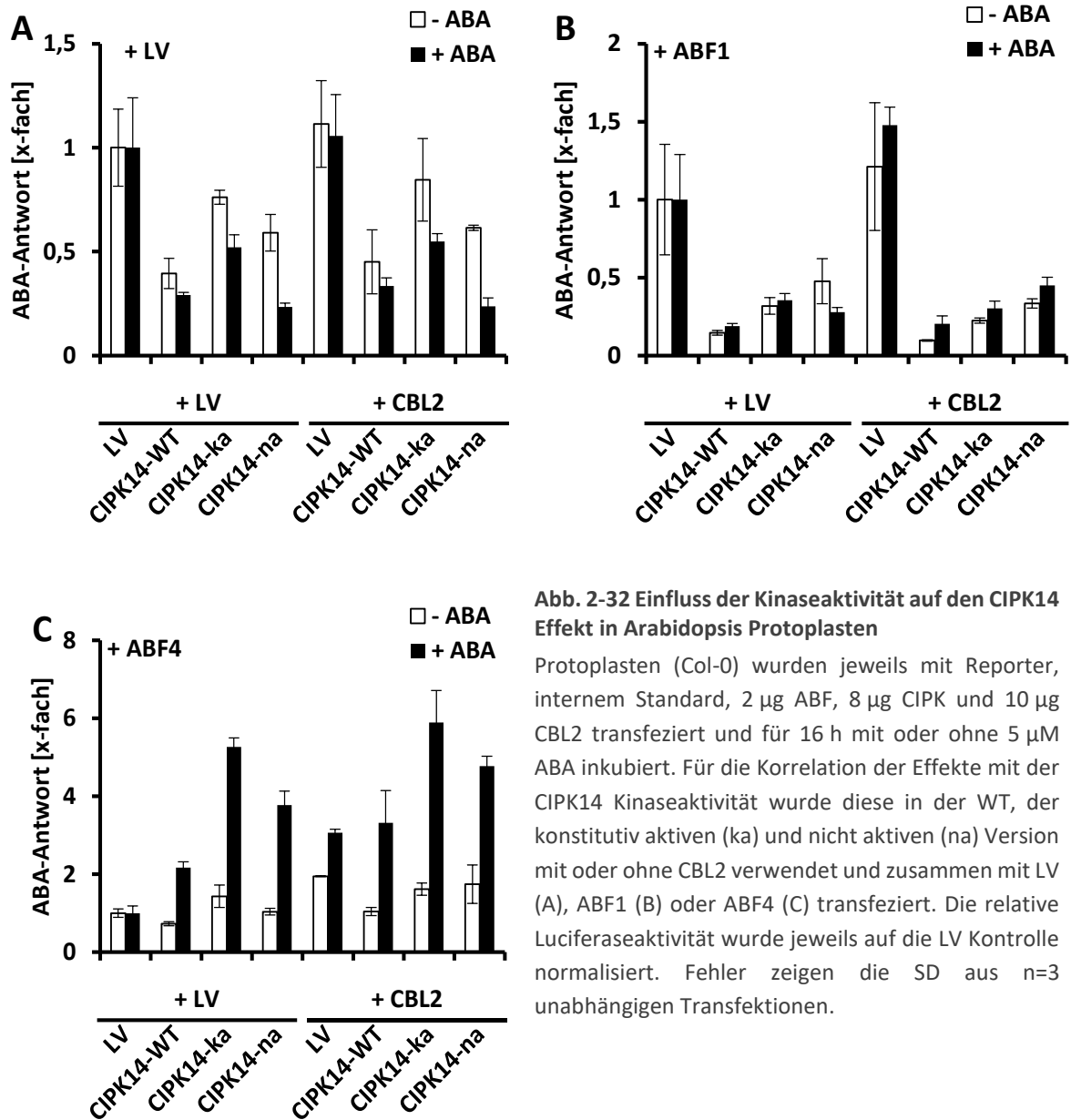


Abb. 2-32 Einfluss der Kinaseaktivität auf den CIPK14 Effekt in Arabidopsis Protoplasten

Protoplasten (Col-0) wurden jeweils mit Reporter, internem Standard, 2 µg ABF, 8 µg CIPK und 10 µg CBL2 transfiziert und für 16 h mit oder ohne 5 µM ABA inkubiert. Für die Korrelation der Effekte mit der CIPK14 Kinaseaktivität wurde diese in der WT, der konstitutiv aktiven (ka) und nicht aktiven (na) Version mit oder ohne CBL2 verwendet und zusammen mit LV (A), ABF1 (B) oder ABF4 (C) transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität wurde jeweils auf die LV Kontrolle normalisiert. Fehler zeigen die SD aus n=3 unabhängigen Transfektionen.

CBL2 und MBP Proteins. Dabei wurde die Kinaseaktivität durch die Anwesenheit von CBL2 stark gesteigert. Es konnte allerdings keine zusätzliche Steigerung der Kinaseaktivität durch die Erhöhung der Ca²⁺ Konzentration nachgewiesen werden. Die WT CIPK14 zeigte eine schwache Phosphorylierung des MBP Substrates. Im Gegensatz dazu kam es durch die T180D Mutation in CIPK14-ka zu einer Steigerung der MBP Transphosphorylierung und CIPK Autophosphorylierung. Die Aktivität beider Versionen wurde um ein Vielfaches durch die Anwesenheit von CBL2 gesteigert. Die Kombination aus WT CIPK14 + CBL2 erreichte ähnliche Level wie die CIPK-ka ohne CBL2, währenddessen die Aktivität der CIPK-ka durch CBL2 um das 2 - 3-fache gesteigert wurde. Für CIPK14-na konnte keinerlei

Kinaseaktivität festgestellt werden. Es zeigt sich somit, dass die Anwesenheit des interagierenden CBLs einen stärkeren Einfluss auf die Kinaseaktivität hatte als die Verwendung der konstitutiv aktiven Variante, und dass die Verwendung der drei verschiedenen CIPK14 Versionen gut geeignet war, um die in Protoplasten beobachteten Effekte auf die Kinaseaktivität zurückzuführen.

Alle drei Versionen wurden in Kombination mit CBL2 dazu genutzt, die Regulation der ABA-Antwort mit oder ohne cotransfiziertem ABF zu untersuchen (Abb. 2-32). Die negative Regulation der ABA-Antwort ohne ABF (Abb. 2-32A) oder mit ABF1 (Abb. 2-32B) konnte sowohl für CIPK14-ka wie auch CIPK14-WT bestätigt werden. Mit ABF1 inhibierte CIPK14-WT die ABA-Antwort auf etwa 15 – 20 %, währenddessen CIPK14-ka nur 30 – 35 % Inhibition erreichte. Dabei spielte es keine Rolle, ob die ABA-Antwort durch exogenes ABA induziert wurde oder nicht. Der Effekt wurde auch durch die Cotransfektion mit CBL2 nicht weiter gesteigert. Interessanterweise zeigte auch die inaktive CIPK14-na eine vergleichbare Inhibition der ABA-Antwort, wie die aktive CIPK14-ka. Ähnlich verhielt es sich mit dem positiven Effekt der CIPK14 auf die ABF4 vermittelte ABA-Antwort (Abb. 2-32C). Während CIPK14-ka zwar die stärkste Induktion der ABA-Antwort bei exogener Zugabe von ABA zeigte, kam es mit CIPK14-na zu einer vergleichbar starken Aktivierung, die sogar über der Aktivierung der CIPK14-WT lag. Auch hier zeigte sich kein Unterschied der Transaktivierung durch die Co-Transfektion mit CBL2. Im Gegensatz zu den Versuchen ohne ABF (Abb. 2-32A) oder mit ABF1 (Abb. 2-32B) hatte CBL2 alleine einen positiven Einfluss auf die ABF4 vermittelte ABA-Antwort (Abb. 2-32). Hier kam es auch ohne Proteinkinase zu einer dreifachen Steigerung der ABA-Antwort. Es konnte somit weder für den negativen Effekt der CIPK14 auf die ABA-Antwort ohne ABF oder mit ABF1, noch für die Induktion der ABF4 vermittelten ABA-Antwort eine Korrelation zwischen diesen Effekten und der Kinaseaktivität hergestellt werden.

Diese Daten wurden auch durch die Ergebnisse der CIPK11-ka, CIPK14-ka und CIPK14-ka + CBL2 zusammen mit ABF1 - 4 oder ABI5 im pSAR-TLA gestützt (Abb. 2-33). Keine der verwendeten CIPKs zeigte eine signifikante Änderung der rLUC verglichen mit der jeweiligen LV Kontrolle. Es sollte allerdings beachtet werden, dass für die CIPKs bislang keine eindeutige Aktivität in Hefe nachgewiesen wurde und auch diese Proteinkinasen multiplen regulativen Mechanismen unterliegen könnten, wie es für CPK23 und SnRK2.6 gezeigt wurde. Die in Protoplasten beobachteten Effekte lassen sich letztendlich eher auf die Anwesenheit der CIPK zurückführen und nicht auf ihre enzymatische Aktivität. Eventuell wird durch die Interaktion der CIPK14 mit andere Effektoren der ABA-Signalkaskade deren Einfluss gestört, wodurch es zu den beobachteten Effekten kommen könnte. Dabei war besonders eine Beeinflussung der PP2Cs, die als Interaktionspartner der CIPKs bereits beschrieben wurden (Fuchs, 2013), naheliegend.

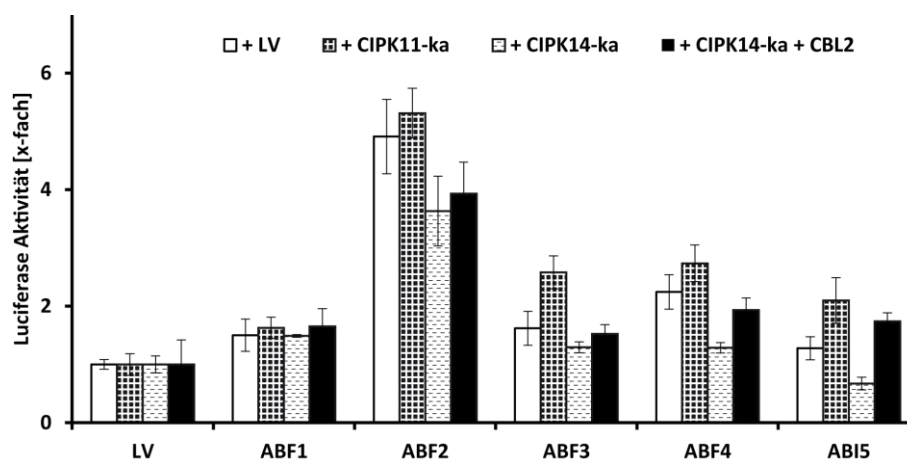


Abb. 2-33 Transaktivierung der ABFs in pSAR-Reporterhefen durch CIPK11 und CIPK14

pSAR-Reporterhefen wurden mit LV, ABF1 - 4 und ABI5 sowie LV, CIPK11-ka, CIPK14-ka und CIPK14-ka + CBL2 Cotransformiert und auf ihre Transaktivierung der ABFs getestet. Die rLUC ist auf die jeweilige LV-Kontrolle ohne ABF normalisiert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

2.5.3 Einfluss der CIPKs auf die PP2C vermittelte ABA-Antwort

Die Interaktion mit Proteinphosphatasen ist in der Familie der CIPKs weit verbreitet. Durch die C-terminal kodierte Phosphatase-Interaktions-Domäne (PPI; Abb. 2-27) bilden die CIPKs Phosphatase-Proteinkinase Heterodimere (Fuchs, 2013; Lan et al., 2011). Hierdurch könnte es einerseits zu einer Regulation der PK durch die Phosphatase kommen, wie es auch für SnRK2s beschrieben ist, oder einer Regulation der Phosphatase-Aktivität durch die PK. Neben dieser direkten Regulation wurde auch eine rein funktionelle Interaktion zwischen CIPKs und PP2Cs beschrieben, die auf die effiziente Regulation der Proteinsubstrate beider Effektoren abzielt (Lan et al., 2011). Im Folgenden sollte genauer untersucht werden, ob CIPK14 die ABA Signalkaskade durch Interaktion oder Regulation der PP2Cs beeinflusst. Hierzu wurden die Interaktionen zwischen CIPK14 und den neun ABA abhängigen PP2Cs mittels Yeast-Two-Hybrid (Y2H) genauer untersucht (Abb. 2-34).

Während keine der AD:PP2Cs Autoaktivität zeigte (PP2Cs + LV, -L-W-H), kam es mit BD:CIPK14 zu einer schwachen Autoaktivität. Lediglich die Cotransformation mit PP2CA zeigte ein leicht gesteigertes Wachstum verglichen zur Hintergrundaktivität. Allerdings sollte beachtet werden, dass der HIS3-Marker, eher auf schwache Interaktion selektiert. Im Gegensatz dazu zeigten die Hefen bei Selektion auf den stringenteren Adenin-Marker kein Wachstum (nicht gezeigt). Um die Interaktion zwischen CIPK14 und PP2CA zu bestätigen, wurde der Einfluss der PP2CA auf die CIPK14 Kinaseaktivität getestet. Hierzu wurde CIPK14-ka und CIPK14-ka + CBL2 im *in vitro* Kinaseassay zusammen mit ABI2, HAB1 und PP2CA verwendet, um zu untersuchen, ob die Proteinphosphatase der

		BD			
		-L-W		-L-W-H	
		LV	CIPK14	LV	CIPK14
AD	LV				
	ABI1				
	ABI2				
	HAB1				
	HAB2				
	HAI1				
	HAI2				
	HAI3				
	PP2CA				
	AHG1				

Abb. 2-34 Y2H-Interaktionsstudie zwischen CIPK14 und Protein Phosphatasen (PP2Cs)

CIPK14 wurde an die GAL4-BD fusioniert und zusammen mit GAL4-AD:PP2C Fusionsproteinen in den Hefestamm AH109 transformiert. Wachstum der Transformanten auf Minimalmedium ohne Leucin und Tryptophan (-L -W) zeigt die erfolgreiche Aufnahme beider Plasmide und Vitalität der Transformanten an. Nach Kultivierung der Transformanten bis zur exponentiellen Wachstumsphase wurden 1000, 100 und 10 Zellen auf SD-Selektionsmedium (-L -W) und SD- Selektionsmedium ohne Histidin (-L-W-H) aufgetropft. Das Wachstum der Hefe auf SD-Platten ohne Histidin ist ein Maß für die Interaktion beider Proteine.

Autophosphorylierung von CIPK14 oder der Transphosphorylierung von CBL2 entgegenwirkt (Abb. 2-35).

CIPK14-ka zeigte die typische Autophosphorylierung und Transphosphorylierung bei Anwesenheit von CBL2. Mit CBL2 kam es zu einer starken Aktivierung der CIPK. Durch die PP2Cs wurde die Autophosphorylierung der CIPK14-ka ohne CBL2 reduziert. Besonders PP2CA zeigte einen signifikant stärkeren Einfluss auf das Kinasesignal als ABI2 oder HAB1. Auch die Transphosphorylierung von CBL2 durch CIPK14-ka wurde durch die Anwesenheit der PP2CA reduziert. Darüber hinaus ließ sich eine starke Phosphorylierung von ABI2 und HAB1 durch CIPK14 detektieren. Die Phosphorylierung von PP2CA konnte nicht klar gezeigt werden, da diese auf gleicher Höhe mit der CIPK14 lief. Die stärkere Inhibierung der Kinaseaktivität durch PP2CA untermauert die durch den Y2H gefundene spezifische Interaktion dieser beiden Proteine. Darüber hinaus deutet die gegenseitige Phosphorylierung und De-Phosphorylierung auf eine Regulation der beiden Proteine hin.

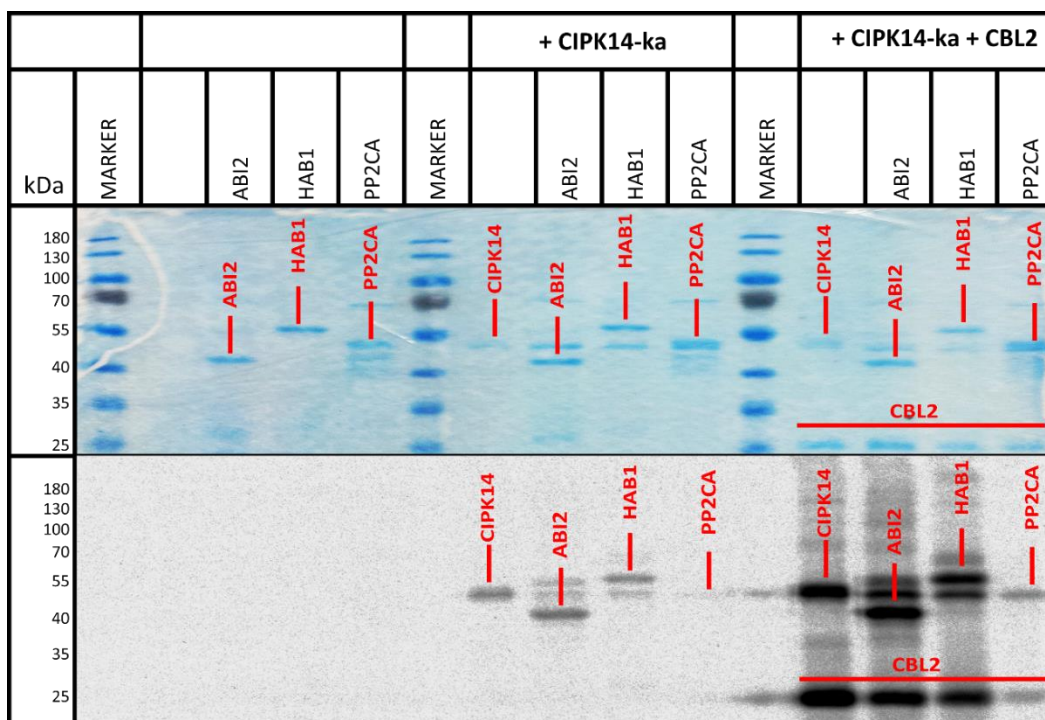


Abb. 2-35 Einfluss der PP2Cs auf die CIPK14 *in vitro* Kinase-Aktivität

ABI2, HAB1, PP2CA, CIPK14-ka sowie CBL2 wurden rekombinant aus *E.coli* gereinigt und im *in vitro* Kinaseassay verwendet. ABI2, HAB1 und PP2CA wurden entweder ohne und mit CIPK14-ka oder CIPK14-ka + CBL2 für 1h nach Zugabe von P³³-ATP inkubiert. Die SDS-PAGE (oben) zeigt die Größe und Anwesenheit der eingesetzten Proteine, während das Autoradiogramm (unten) die Phosphorylierung dieser zeigt. Die Laufhöhe der jeweiligen Proteine ist markiert. Die PP2Cs wurden von Christian Wunschel zur Verfügung gestellt.

Um zu testen, ob CIPK14 die PP2Cs regulieren, sollte der Einfluss der CIPK14 auf die PP2C vermittelte Inhibition der ABA-Antwort in Protoplasten untersucht werden (Abb. 2-36). Während die CIPK14-ka die ABA-Antwort um ca. 50 % hemmte, kam es mit HAB1 oder PP2CA zu einer sehr effizienten Inhibition der ABA-Antwort um über 95%. Durch die Co-Transfektion der CIPK14-ka mit HAB1 oder PP2CA wurde dieser Inhibitorische Effekt nicht reduziert. Ganz im Gegenteil kam es mit CIPK14 zu einer stärkeren Inhibition der ABA-Antwort. Hierbei war der negative Effekt der CIPK mit oder ohne PP2C vergleichbar. Hieraus lässt sich schließen, dass PP2C und CIPK keinen direkten Effekt aufeinander ausüben, sondern parallel zueinander arbeiten und die stärkere Inhibition der ABA-Antwort bei Co-Transfektion beider Effektoren sich aus der Summe ihrer einzelnen Effekte ergab.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass CIPK14 keinen direkten Einfluss auf die ABFs nimmt und die gezeigte Regulation der ABA-Antwort wahrscheinlich über noch unbekannte Effektoren läuft. Besonders die Versuche mit inaktiver CIPK14 waren ein eindeutiger Beweis für eine Phosphorylierungs-unabhängigen Effekt. Hier zeigte sich auch die hohe Robustheit der *in vivo*

Rekonstruktion in Hefe, bei der nur die direkte Regulation der ABFs abgebildet wird, und die in dem hier gezeigten Beispiel keine Hinweise auf die Regulation der ABFs gab. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass nicht bewiesen werden kann, ob die CIPKs in Hefe katalytische Aktivität besitzen und generell aktiv sind. Auch Transaktivierungsversuche mit dem Transkriptionsfaktor AtHB6, der als Interaktionspartner und Substrat der CIPK14 beschrieben wurde, zeigten keine Regulation der HB6-Antwort in Hefe (Abb. 5-3). Die Ca²⁺-Aktivierung des CIPK-CBL Komplexes könnte in Hefe, ähnlich wie mit CPK23, ein Problem darstellen und die Inaktivität der CIPK14 erklären.

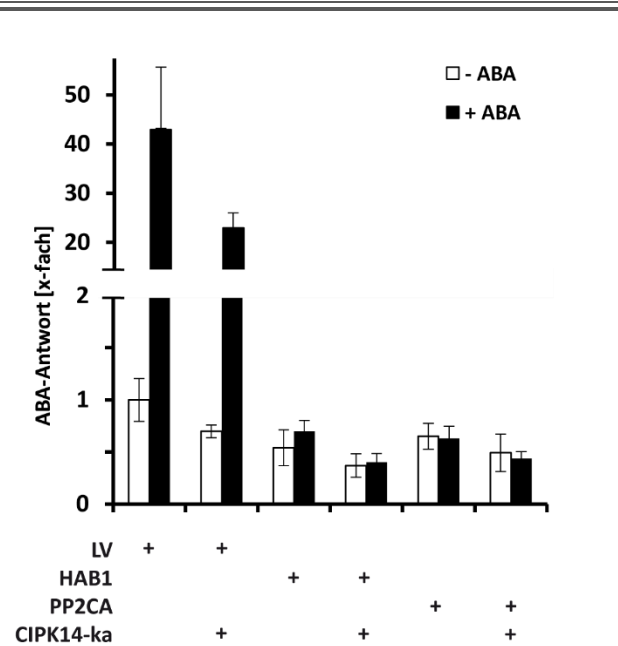


Abb. 2-36 Regulation der PP2C-Inhibierung durch CIPK14

cipk11-1 x cipk14-2 Protoplasten wurden mit Reporter, internem Standard, 2 µg PP2C und 8 µg CIPK14-ka transfeziert und für 16h ohne oder mit 5 µM ABA inkubiert. Die rLUC-Werte wurde auf die LV Kontrolle ohne ABA normalisiert. Fehler zeigen die SD aus n=3 unabhängigen Transfektionen.

2.6 Rekonstruktion der ABA-Signalkaskade in Hefe

Um eine ungewollte hohe Genexpression Stress-abhängiger Gene zu vermeiden, wird die Aktivität der ABF induzierenden Proteinkinasen in der Pflanze streng reguliert. Schon die diversen intramolekularen regulativen Mechanismen bei CPK23 und SnRK2.6, wie sie in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurden, weisen auf diverse *upstream* Regulatoren der Proteinkinasen hin. Während nur wenige Interaktionspartner für CPK23 bekannt sind, ist die Regulation der ABA-abhängigen SnRK2.6 gut untersucht. Als zentrale PK der ABA Signalkaskade wird SnRK2.6 direkt durch Komponenten des ABA-Rezeptorkomplexes inhibiert. Hierbei fungieren die PP2Cs als die inhibitorische Komponenten. Durch die Dephosphorylierung der Aktivierungsschleife und die gleichzeitige Blockade des aktiven Zentrums, kommt es zu einer effizienten Inhibierung der Kinaseaktivität in einem zweistufigen Prozess. Erst durch die ABA-vermittelte Bindung der PP2C an die RCARs, der regulatorischen Komponente des ABA-Rezeptors, kommt es zur Aufhebung dieser Interaktion und der damit verbundenen Inhibierung der SnRK2.6. PP2C und RCAR bilden zusammen mit ABA den funktionellen Holorezeptorkomplex. Für eine vollständige Rekonstruktion der ABA-Signalkaskade in Hefe bedarf es dieser beiden Komponenten, um eine ABA-abhängige Regulation des pSAR zu erreichen, und somit den Beweis der funktionalen Hormon-Signalkaskade in einem heterologen Organismus zu erbringen. Im folgenden Teil sollte die Regulation der SnRK2s durch den ABA-Holorezeptor genauer betrachtet werden.

2.6.1 Regulation der Proteinkinasen durch Proteinphosphatasen (PP2Cs)

Wie in Abschnitt 2.2 aktiviert die SnRK2.6 die ABFs in Hefe und führt damit zur Aktivierung des pSAR-Reporters. Co-exprimierte PP2Cs sollten dieser Aktivität entgegenwirken und die Proteinkinasen inhibieren. Da die ABA-Box für eine effiziente Interaktion der Phosphatase mit der SnRK2.6 (siehe Abschnitt 1.6.1) und deren Regulation *in planta* wichtig ist, sollte untersucht werden, ob sich die Aktivitäten der WT SnRK2.6 und der C-terminal verkürzten SnRK2.6-Versionen durch ABI1 inhibieren lassen. Hierzu wurden Proteinkinase und Proteinphosphatase zusammen mit ABF2 in pSAR-Reporterhefen transformiert und auf ihrer Aktivität getestet (Abb. 2-37).

Durch die Cotransformation der SnRK2.6 Versionen mit ABF2 kam es zur effizienten Aktivierung des pSAR. Mit ABI1 wurde diese Aktivität stark reduziert. Bezogen auf die Aktivität ohne PP2C kam es durch ABI1 zu einer Reduktion der rLUC-Werte um 80 - 90 %. Es war erstaunlich, dass alle SnRK2.6-Versionen durch ABI1 in ähnlichem Ausmaß inhibiert wurden, obwohl ihnen die für die Interaktion wichtige ABA-Box fehlte. Hier schien es durch die starke Expression der Proteine auch ohne die vermittelnde ABA-Box zur Interaktion zu kommen.

Um sicher zu stellen, dass die PP2C die SnRK2 direkt inhibierten, und nicht den Transkriptionsfaktor dephosphorylierten, wurden pSAR-Reporterhefen mit ABF2 und CPK23 oder SnRK2.6 genutzt und mit allen neun ABA-abhängigen PP2Cs transformiert (Abb. 2-38). Während es bei den ABF2 + SnRK2.6 Δ 331 exprimierenden Hefen zu einer ca. 80%igen Inhibierung der pSAR-Aktivität mit 8 von 9 PP2Cs kam, konnte die Aktivität in der mit ABF2 + GFP:CPK23-vk transformierten Hefe nicht inhibiert werden. Lediglich PP2CA zeigte eine leichte aber signifikante Inhibierung der CPK23-vermittelten Aktivität, die aber bei weitem nicht so stark ausfiel wie mit SnRK2.6. Vergleicht man die Phosphatasen bezüglich ihrer Fähigkeit SnRK2.6 zu inhibieren, so zeigte sich eine vergleichbare signifikante Inhibierung ($p < 0,001$; ungepaarter zweiseitiger Student's T-Test) mit allen PP2Cs außer AHG1. Hier kam es nur zu einer schwächeren, nicht signifikanten 30 %igen Inhibierung ($p = 0.06$).

Der inhibitorische Effekt der PP2C wirkte spezifisch auf die SnRK2 und nicht direkt auf den Transkriptionsfaktor. Da CPK23 andere Stellen in ABF2 phosphoryliert, als SnRK2.6 (vgl. Abschnitt 2.4) könnte die Dephosphorylierung der PP2Cs allerdings auch spezifisch für die SnRK2.6 Phosphorylierungsstellen sein. Um diese Möglichkeit genauer zu beleuchten, wäre es nötig, die ABF2 Phosphorylierung durch SnRK2.6 von der PP2C abhängigen Dephosphorylierung zu trennen, was in Hefe aber schwer realisierbar ist.

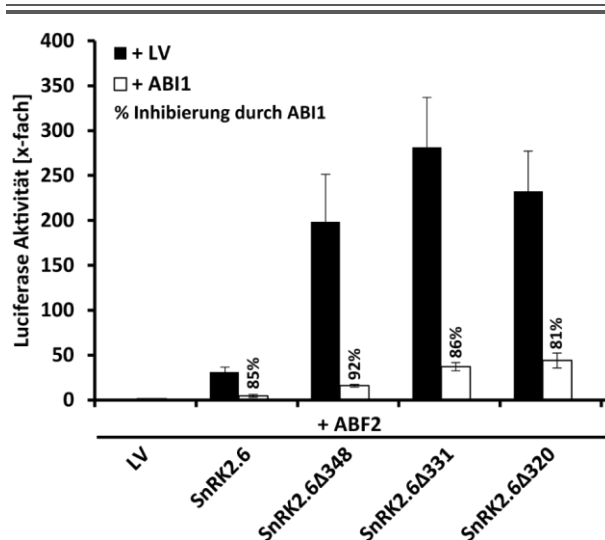


Abb. 2-37 Inhibierung der SnRK2.6-Transaktivierung durch ABI1

ABF2 exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit LV, WT SnRK2.6 und C-terminal verkürzten SnRK2.6 Versionen (Δ 348, Δ 331, Δ 320) in Kombination mit LV oder ABI1 cotransformiert. Die rLUC wurden auf die LV-Kontrolle normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Für die Inhibierung durch ABI1 wurde die Aktivität der Proben mit ABI1 auf die jeweilige Aktivität ohne ABI1 bezogen und als %-Inhibierung über den +ABI1 Balken angegeben. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

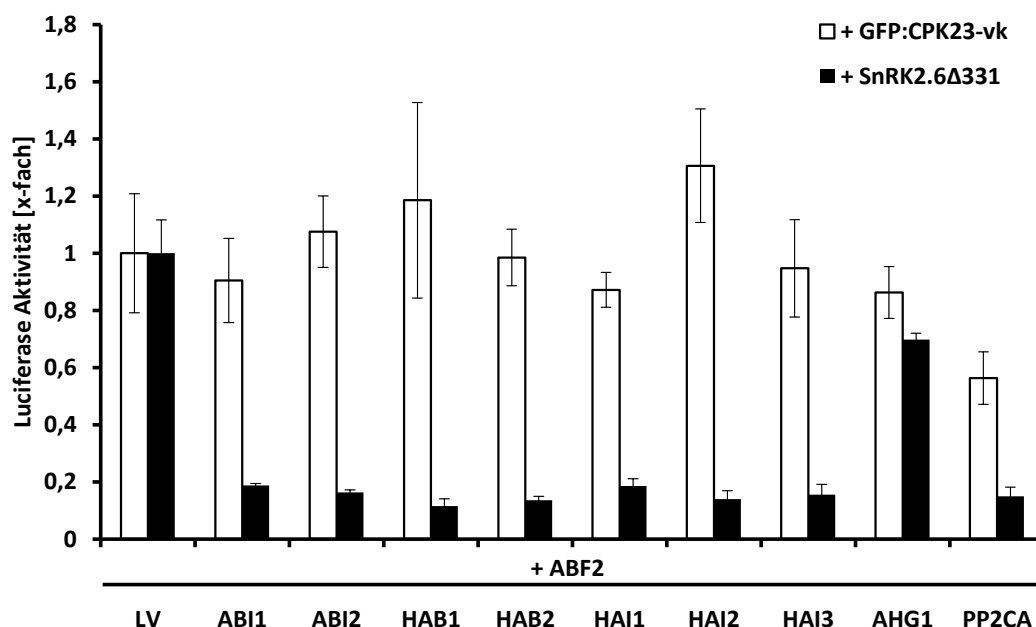


Abb. 2-38 PP2C Inhibierung des durch SnRK2.6 oder CPK23 aktivierten ABF2

pSAR-Reporterhefen, die ABF2 in Kombination mit CPK23 oder SnRK2.6 exprimierten, wurden mit neun PP2Cs transformiert. Die rLUC-Werte wurde auf die mit LV transformierte Hefe normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

2.6.2 Rekonstruktion des funktionellen ABA-Holorezeptors in Hefe

Nachdem die Inhibierung der Proteinkinase durch die PP2C erfolgreich in Hefe realisiert werden konnte, fehlte für die Rekonstruktion des ABA-Rezeptorkomplexes noch die regulatorische Komponente, die RCARs. Hierzu wurden 8 von 14 RCAR zusammen mit ABI1 in ABF2 + SnRK2.6Δ331 exprimierenden pSAR-Reporterhefen transformiert. Mit Ausnahme des Transkriptionsfaktors wurden alle Faktoren unter die Kontrolle des induzierbaren GAL1-Promotors gestellt. Um auf eine mögliche ABA-abhängige Regulation des Rezeptorkomplexes zu testen, wurde das Induktionsmedium zusätzlich mit 100 μM ABA versetzt (Abb. 2-39). Durch die Transformation von ABI1 in die ABF2 + SnRK2.6Δ331 exprimierende pSAR-Reporterhefe kam es zu einer effizienten Inhibierung der SnRK2.6 Aktivität, die auch durch die Zugabe von ABA nicht beeinflusst wurde. Hingegen kam es in Anwesenheit von RCAR zu einer ABA-abhängigen und ABA-unabhängigen Induktion der Reporteraktivität. Während RCAR 1,3, 4 und 6 auch ohne ABA, eine Aktivierung der pSAR-Aktivität zeigten, kam es mit RCAR 11, 12 und 14 lediglich mit ABA zu einer Aktivierung. RCAR9 zeigte eine schwache ABA-unabhängige, wie auch eine weitere ABA-abhängige Induktion der Reporteraktivität. Hierbei war auffällig, dass alle RCARs der Unterfamilie I (RCAR 1-4) den Reporter ohne ABA induzierten und durch ABA keine weitere Steigerung

des Signals erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten alle Vertreter der Unterfamilie III (RCAR 11-14) keine pSAR-Regulation in Abwesenheit von ABA, steigerten die Aktivität mit ABA aber auf ein der Gruppe 1 vergleichbares Level. Dabei kam es durch die Applikation von ABA zu einer 3 - 4-fachen Induktion. Die Vertreter der Unterfamilie II (RCAR 5-10) zeigten ein diverseres Bild, dass im Falle von RCAR6 der Gruppe 1 ähnelte und im Falle von RCAR9 keine der beiden Gruppen ähnelte. In allen getesteten Fällen konnten die RCARs die Inhibition der ABA-Signaltransduktion durch die Phosphatase hemmen und die Aktivität der SnRK2.6 auf ca. 50% des nicht inhibierten Signals wiederherstellen.

Die ABA abhängige Regulation des pSAR mit RCAR11, 12 und 14, zeigte somit die funktionelle Rekonstruktion der ABA-Signalkaskade. Hier konnte zum ersten Mal eine Steigerung der Reporteraktivität durch die Applikation des Hormonliganden beobachtet werden. Die Tatsache, dass die Applikation keinen Einfluss auf die Signalstärke ohne RCAR hatte, zeigte die Notwendigkeit des funktionellen ABA-Holorezeptors für eine ABA-abhängige Regulation. Dennoch konnte durch den Rezeptor-Liganden Komplex keine vollständige Wiederherstellung der SnRK2.6 Aktivität erreicht werden, was auf eine unvollständige Bindung der PP2C durch RCAR hindeutete. Um eine bessere

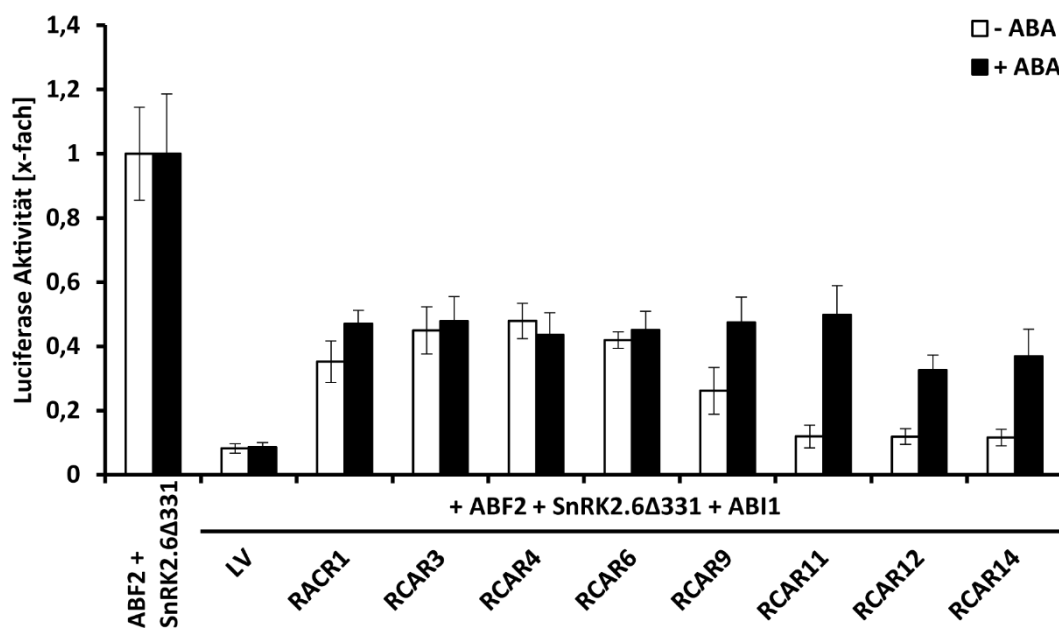


Abb. 2-39 ABA-abhängige Regulation der SnRK2.6Δ331 durch den ABA-Rezeptorkomplex

ABF2 und SnRK2.6Δ331 exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit pGAL1:ABI1 und verschiedenen pGAL1:RCAR Varianten transformiert und auf ihre Reporteraktivität mit und ohne 100 μM ABA im Induktionsmedium getestet. Die gemessenen rLUC Werte wurden jeweils auf die Aktivität der nicht-transformierten Hefe normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

ABA-abhängige Regulation des Systems zu erreichen, erschien es sinnvoll, die Stöchiometrie der Rezeptorkomponenten zu optimieren.

2.6.3 Stöchiometrische Optimierung der ABA-Rezeptorkomponenten

Die nicht vollständige Inhibierung von ABI1 durch die RCARs ließ sich vermutlich auf ein nicht optimales molares Verhältnis beider Komponenten zurückführen. Für eine optimale ABA abhängige Regulation des Rezeptors wären geringe Mengen an Phosphatase gepaart mit einem ausreichenden Überschuss an RCAR sinnvoll. Auf der anderen Seite würden geringe Mengen an Phosphatase zu einer schlechten Inhibierung der SnRK2.6 führen. Durch die Verwendung unterschiedlicher starker Promotoren, kann die Expressionsstärke der Effektoren in Hefe gesteuert werden (Lee et al., 2015; Chiasson, 2015). Hierzu wurde ABI1 unter die Kontrolle von sieben konstitutiv aktiven Promotoren und des induzierbaren GAL1-Promotors gestellt und in pSAR-Reporterhefen, mit oder ohne RCAR11, exprimiert (Abb. 2-40).

Je nach verwendetem Promotor kam es zu einer stufenweise stärkeren Inhibition der SnRK2.6 Aktivität durch ABI1 (Abb. 2-40A). Hierbei zeigt der eher schwache SAC6-Promotor keine signifikante Regulation der SnRK2.6, währenddessen es mit dem starken pTDH3 oder pGAL1 zu einer ca. 70%igen Inhibition des Signals kam. Die stärkste Inhibition wurden mit pGK1:ABI1 erzielt (76%). Bei keinem der untersuchten Varianten kam es zu einer signifikanten Änderung der rLUC Werte durch ABA. Wurde zusätzlich zu den ABI1 Promotor-Varianten RCAR11 cotransformiert (Abb. 2-40B), kam es hingegen bei allen untersuchten Varianten zu einem eindeutigen ABA-abhängigen Signalanstieg. Während die ABA-abhängige Induktion des Reporters bei allen Konstrukten ähnlich war, gab es große Unterschiede in der ABA unabhängigen Inhibition. So zeigte pSac6:ABI1, welches ohne RCAR11 keine Inhibition der Proteinkinase aufwies, mit RCAR11 eine starke Inhibition auf 32%. Anscheinend kommt es durch RCAR11 zu einer Stabilisierung des Rezeptorkomplexes oder der PP2C-Proteinstabilität, wodurch sich die Inhibitorische Leistung der PP2C auch ohne ABA ändert.

Die ABA-abhängige Aktivierung (Abb. 2-40, Formel I) bewegt sich, bezogen auf die volle Aktivität der SnRK2.6, zwischen 26%, bei pHHF1:ABI1, bis zu 46% bei pGK1:ABI1. Allerdings wird auch bei pGK1:ABI1 nicht die volle SnRK2.6-Aktivität wiederhergestellt. Es sollte bedacht werden, dass durch eine Änderung der ABI1-Proteinkonzentration sich sowohl das Gleichgewicht zwischen RCAR und PP2C, sowie zwischen PP2C und SnRK2.6 ändert (Abb. 2-40, Formel II). Somit ist die Aktivität der SnRK2.6 nicht nur abhängig von der Konzentration der PP2C, sondern auch des RCARs und wird von dem molaren Verhältnis beider Faktoren beeinflusst. Um eine vollständige Wiederherstellung der SnRK2.6-

Aktivität, nach Inhibierung durch ABI1 zu erreichen, ist daher auch die Expressionsstärke des RCARs von großer Bedeutung.

Ähnlich wie für ABI1 wurde RCAR11 unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gestellt, und zusammen mit pADH:ABF2, pGAL1:SnRK2.6Δ320 und pGK1:ABI1 in getestet (Abb. 2-41). Ohne ABA zeigten alle Hefen eine zur LV Kontrolle ähnliche Signalstärke. Erst durch die Zugabe von ABA im

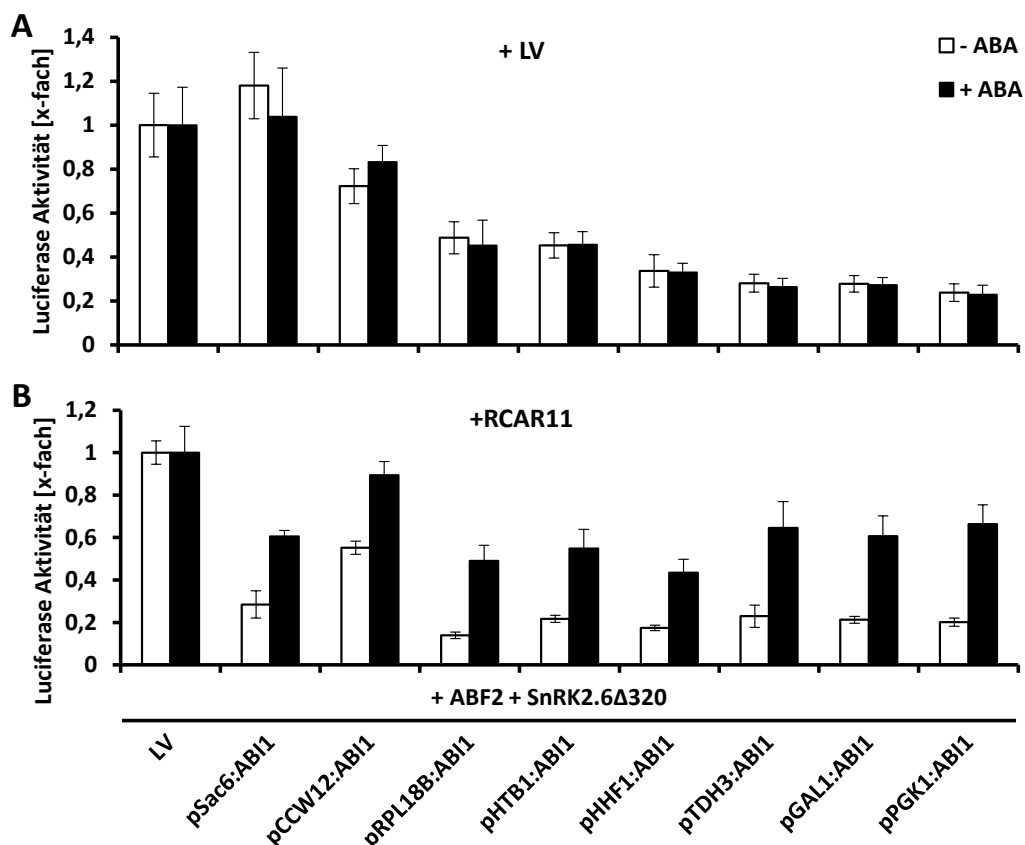


Abb. 2-40 Optimierung der ABI1-Promotorstärke

ABI1 wurde unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gestellt und in ABF2 + SnRK2.6Δ320 exprimierende pSAR-Reporterhefen, zusammen mit LV (A) oder pGAL1:RCAR11 (B) transformiert, und mit oder ohne 100 μM ABA gemessen. Die rLUC Werte wurden jeweils auf Hefe ohne ABI1 normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Die Proben wurden anhand ihrer Signalstärke (mit LV transformiert, (A)) ohne ABA absteigend sortiert. Die ABA-abhängige Aktivierung der SnRK2.6 lässt sich aus dem Vergleich der Aktivität (Akt) mit und ohne ABA nach Formel I berechnen.

Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

$$I) \quad \left(\frac{Akt^{+ABA} - Akt^{-ABA}}{1} \right) = ABA\text{-abhängige Aktivierung [\%]}$$

$$II) \quad ABI1_{aktiv} / SnRK2.6_{nicht\ Aktiv} \leftrightarrow SnRK2.6_{aktiv} + ABI1_{aktiv} \leftrightarrow RCAR1 / ABI1_{nicht\ aktiv}$$

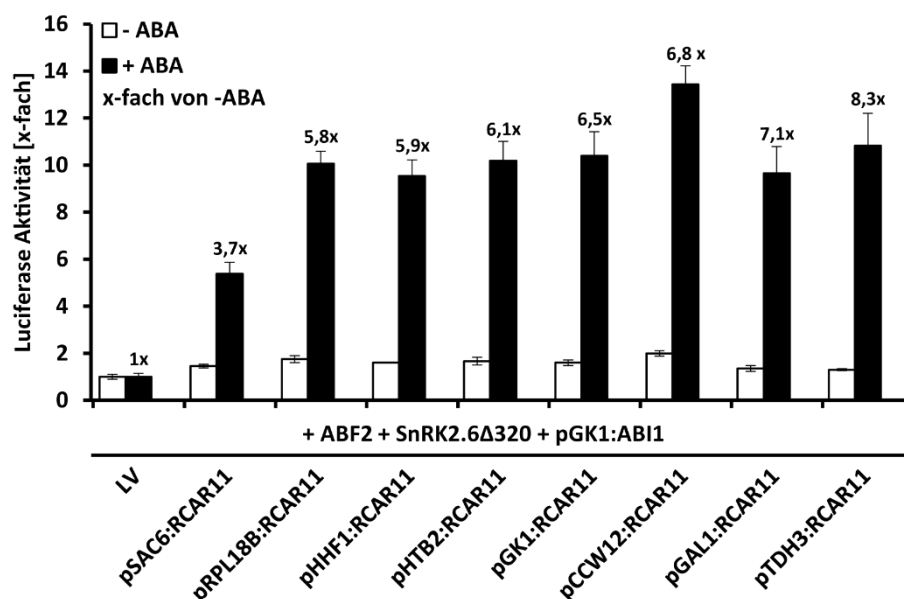


Abb. 2-41 Optimierung der RCAR11-Promotorstärke

RCAR11 wurde unter die Kontrolle verschiedener, in Hefe aktiver, Promotoren gestellt und in ABF2 + SnRK2.6Δ320 exprimierende pSAR-Reporterhefen, zusammen mit pGK1:ABI1 transformiert und mit oder ohne 100 μM ABA gemessen. Die rLUC Werte wurden jeweils auf Hefe ohne RCAR11 normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Das jeweilige +ABA Signal wurde auf das -ABA Signal der Probe bezogen um die ABA-Induktion zu berechnen (Formel I). Die Proben wurden anhand ihrer ABA-Induktionswerte aufsteigend sortiert. Fehler zeigen das 95%igeKonf. Int.

$$I) \frac{Akt^{+ ABA}}{Akt^{- ABA}} = ABA - Induktion [x - fach]$$

Medium kam es zu einem deutlichen Anstieg der pSAR-Aktivität in allen Proben. Hierbei hing die ABA-Induktion (Abb. 2-40, Formel I) stark von dem verwendeten Promotor ab. Während pSAC6:RCAR11 nur eine 5-fache Aktivität erreichte, zeigte pCCW12:RCAR11 eine fast 14-fache Aktivität. Allerdings war bei pCCW12:RCAR11 die Aktivität auch ohne ABA doppelt so hoch wie in der LV Kontrolle. Somit ergab sich für dieses Konstrukt nur eine 6,7-fache ABA-Induktion (Abb. 2-41). Die höchste ABA-Induktion erreichte pTDH3:RCAR11. Zwar zeigte pTDH3:RCAR11 mit einer 11-fachen Aktivität mit ABA eine etwas geringe Aktivität als pCCW12:RCAR11, aber durch die geringe Aktivität ohne ABA (1,3-fach) kam es zu einer guten ABA-abhängigen Regulation vom 8,3-fachen der Aktivität ohne ABA.

2.6.4 Einfluss der regulatorischen Domänen der Proteinphosphatase

Die Inhibierung der SnRK2.6 durch die PP2C erfolgt in zwei Schritten. Einerseits dephosphoryliert die PP2C die Aktivierungsschleife der SnRK2, wodurch dieser inaktiviert wird, und blockiert gleichzeitig sterisch das aktive Zentrum der PK (Soon et al., 2012). Hierbei spielen mehrere Interaktionsflächen

eine entscheidende Rolle. Einerseits interagieren SnRK2.6 und PP2C über die in Abb. 2-3 beschriebene ABA-Box miteinander, die durch ionische Wechselwirkungen zwischen der sauren ABA-Box und einem basischen Bereich der PP2C Phosphatase Domäne zustande kommt.

Diese Bindung bleibt auch bei der Komplexbildung zwischen PP2C und RCAR bestehen. Zusätzlich interagieren SnRK2.6 und PP2C über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander, bei der ein kritischer Tryptophanrest (W300) in ABI1 eine entscheidende Rolle spielt. W300 ist auch bei der ABI1-RCAR Interaktion beteiligt, weswegen die ABI1-RCAR und ABI1-SnRK2.6 Interaktion über diese Interaktionsfläche in direkte Konkurrenz zueinander stehen. In Abschnitt 2.6.1 wurde gezeigt, dass SnRK2.6 ohne ABA-Box immer noch effizient durch ABI1 Inhibiert werden kann. Hier zeigte sich, dass für die Regulation der SnRK2.6 diese Domäne nicht entscheidend war. Gleichzeitig kam es durch die Deletion der ABA-Box zu einer starken Aktivitätssteigerung der Kinase. Die Vermutung lag nahe, dass es, neben der Inhibierung der SnRK2.6 durch die PP2C, auch zu einer potentiellen Aktivierung dieser über die Bindung der ABA-Box kommen könnte. Da es allerdings gleichzeitig zur katalytischen Inaktivierung und der Kinaseaktivität durch die aktive PP2C kommen würde, hätte ein solcher Effekt keine direkte Auswirkung auf die SnRK2.6-Aktivität. Erst durch die Bindung der Phosphatase im Rezeptorkomplex würde die katalytische Inhibition der Proteinkinase aufgehoben werden, während die potentielle Aktivierung über die Bindung der ABA-Box bestehen bliebe. Um beide Schritte voneinander zu trennen, sollte der Einfluss einer katalytisch inaktiven PP2C (ABI1-D177A, Himmelbach et al., 2002) auf die SnRK2.6-Aktivität in Hefe untersucht werden.

Neben der Phosphatase-Domäne beinhaltet ABI1 einen 127 AS langen N-terminalen Bereich und einen kurzen C-terminalen Bereich (Abb. 2-42A). Besonders der N-Terminus bis AS 117 ist in Kristallstrukturen (PDB: 3NMN; Melcher et al., 2010) nicht aufgelöst, was auf eine flexible Struktur hindeutet. Darüber hinaus kodiert das ABI1 Gen einen kurzen C-terminalen Bereich, der außerhalb der Phosphatase-Domäne liegt, und eine NLS-Sequenz trägt. Durch Mutation des katalytisch wichtigen D177 (Mg^{2+} -Bindestelle, Homolog zu HAB1-D243) zum Alanin kann eine katalytisch inaktive Phosphatase erzeugt werden (NAP). Um den Einfluss dieser Domänen auf die Funktion der ABI1 sowie die oben beschriebene Regulation der SnRK2.6 durch inaktive ABI1 zu untersuchen, wurden sieben verschiedene Varianten des ABI1-Gens zusammen mit ABF2, RCAR11 und SnRK2.6 oder SnRK2.6 Δ 331 in pSAR-Reporterhefen getestet (Abb. 2-42B). Die mit SnRK2.6 Δ 331 transformierte Hefe zeigte eine 12 - 14-fache Aktivität im Vergleich zum WT. Beide Varianten wurden durch ABI1 effizient inhibiert, und durch RCAR11 und ABA wiederrum aktiviert. Weder durch die NAP von ABI1 (D177A) noch durch eine der D177A enthaltenden verkürzten Varianten konnte SnRK2.6 inhibiert werden. Allerdings wurde

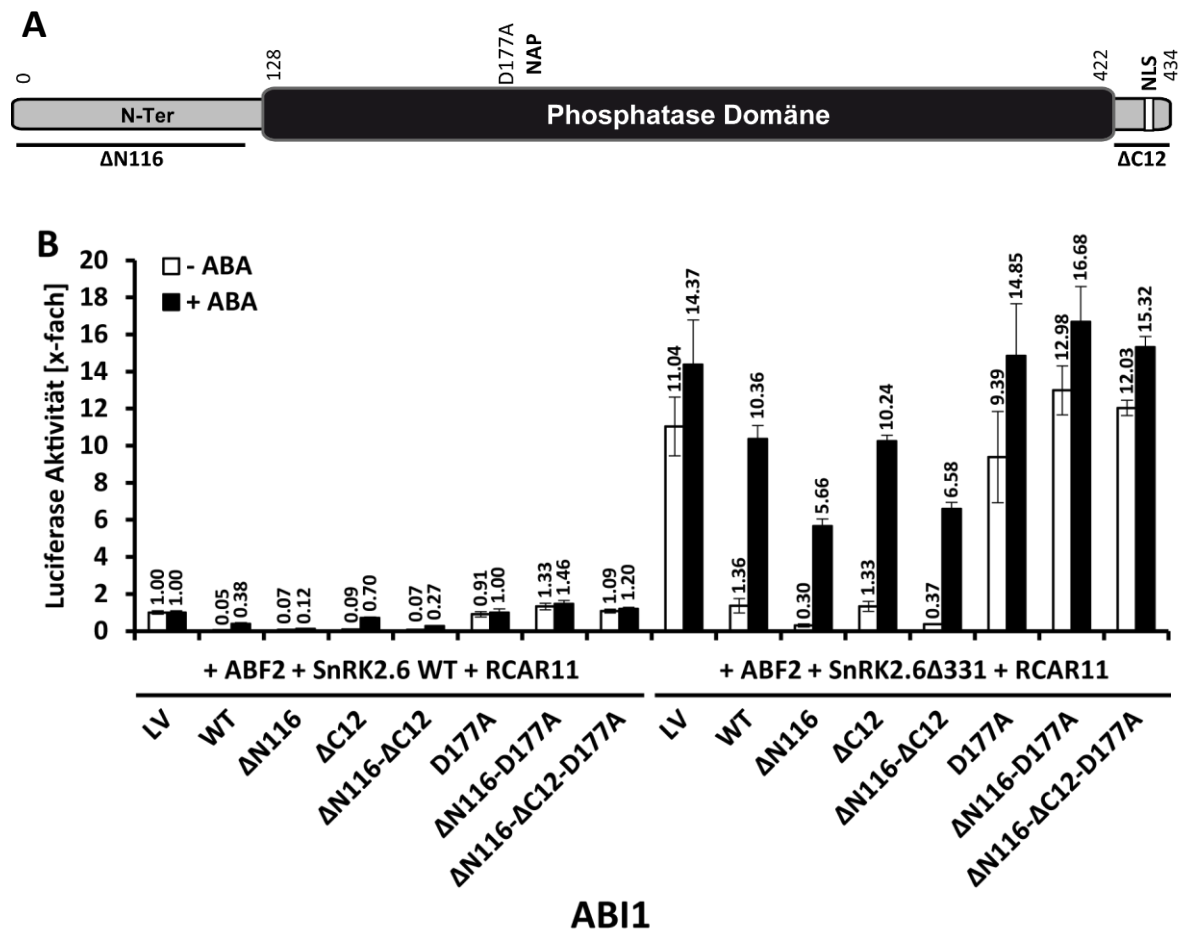


Abb. 2-42 Einfluss der regulatorischen ABI1-Domänen auf die SnRK2.6-Inhibierung

(A) Struktureller Aufbau von ABI1. Neben der Proteinphosphatase Domäne trägt ABI1 einen 127 AS langen N-terminalen und 12 AS langen C-terminalen Bereich. Während der N-terminale Bereich keine bekannten Domänen trägt, und in ABI1 Kristallstrukturen bis AS 116 nicht aufgelöst werden konnte, kodiert der C-terminale Bereich für eine NLS Sequenz. Durch Mutation des katalytisch wichtigen Asparat 177 zu Alanin (D177A) entsteht eine nicht aktive Phosphatase (NAP). (B) ABF2 + RCAR11 exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit SnRK2.6 oder SnRK2.6Δ331 und verschiedenen ABI1 Varianten transformiert und auf die Transaktivierung des pSAR mit oder ohne 100 μM ABA getestet. Die rLUC Werte wurden jeweils auf die Hefe mit ABF2 + SnRK2.6 WT + LV Kontrolle normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

der SnRK2.6 WT durch die Interaktion mit einer NAP in seiner Aktivität auch nicht gesteigert. Entgegengesetzt zu der oben beschriebenen Vermutung war die Interaktion der NAP mit SnRK2.6 WT nicht ausreichend, um diese in einem ähnlichen Maße zu aktivieren, wie es durch die Deletion der ABA-Box geschieht. Der C-Terminus, und die darauf kodierte NLS Sequenz, scheint für die PP2C Funktion in Hefe nicht notwendig zu sein. So zeigte ABI1-ΔC12 mit beiden SnRK2.6 Versionen keine veränderte Aktivität gegenüber dem ABI1 WT. Im Gegensatz dazu kam es mit der ABI1-ΔN116 oder der ABI1-ΔN116-ΔC12 zu einer stärkeren Inhibierung der SnRK2.6. Diese Versionen vermochten

SnRK2.6Δ331 auf 3% der vollen Aktivität gegenüber 12% mit dem ABI1 WT zu inhibieren. Allerdings konnten diese Versionen durch RCAR11 und ABA nicht in dem Maße inaktiviert werden, wie es mit dem ABI1 WT möglich war, und erreichten mit ABA nur etwa 50% der vollen SnRK2.6Δ331 Aktivität. Die Deletion des ABI1 N-Terminus scheint die Phosphatase-Aktivität in Hefe zu steigern oder die Interaktion mit der SnRK2.6 zu verbessern. Der genaue Mechanismus dieser Aktivitätssteigerung ist noch nicht bekannt. Schlussendlich kann durch die Verwendung dieser Version im pSAR-TLA die Restaktivität der SnRK2.6 auf unter 5% gesenkt werden.

2.6.5 Charakterisierung der ABA-Holorezeptoren in Hefe

Um das Potenzial des pSAR-TLA zu ergründen, sollte die ABA-Signalkaskade mit den wildtypischen und hyperaktiven und in der Expression optimierten Signalkomponenten in Hefe nachgestellt werden. Als aktivierende Transkriptionsfaktor wurde ABF4 gewählt, der die stärkste Bindung an den pSAR zeigte (Abb. 2-2) und viermal stärker als ABF2 durch SnRK2.6 transaktiviert wurde (Abb. 2-8). Es wurden verschiedenen Kombinationen an pADH:ABF4, pGAL1:SnRK2.6 oder pGAL1:SnRK2.6Δ320, pGK1:ABI1

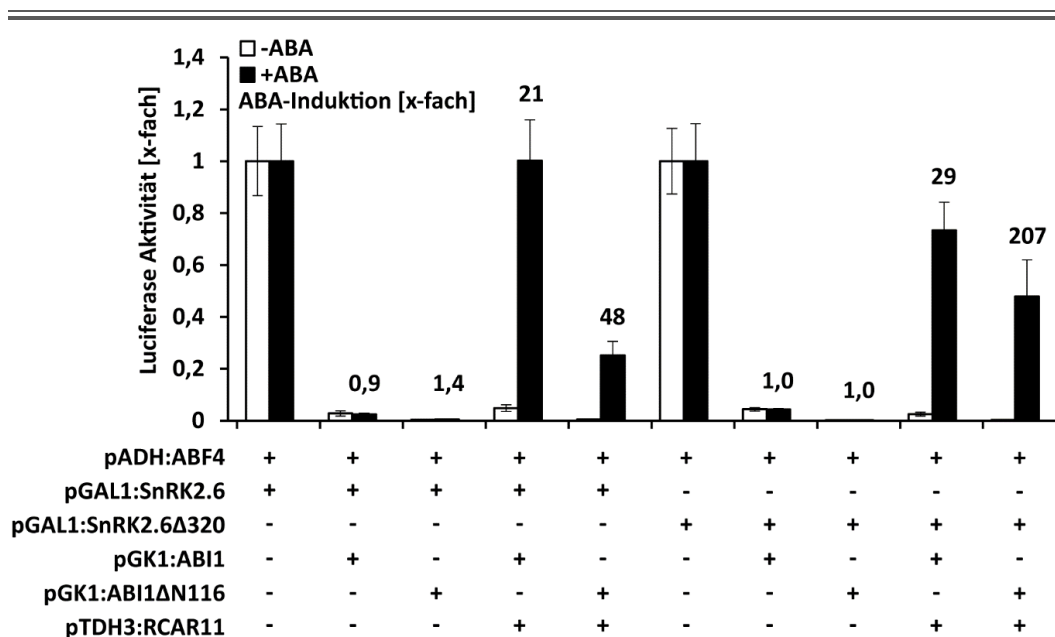


Abb. 2-43 ABA-abhängige Induktion des pSAR mit optimierten Effektoren

ABF4 exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit pGAL1:SnRK2.6 oder pGAL1:SnRK2.6Δ320, pGK1:ABI1 oder pGK1:ABI1ΔN116 und pTDH3:RCAR11 transformiert. (+) zeigt die Anwesenheit der entsprechenden Komponenten an. Bei (-) wurde der entsprechende LV verwendet. Die rLUC der Proben wurden auf Hefe, die nur ABF2 und die entsprechende PK exprimierten, jeweils für + ABA und - ABA normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Für die ABA-Induktion wurde der + ABA Wert durch den - ABA Wert geteilt und als x-Faches angegeben (Datenbeschriftung über den schwarzen Balken, vgl. Abb. 2-41 Formel I). Die Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

oder pGK1:ABI1ΔN116 und pTDH3:RCAR11 in pSAR-Reporterhefen transformiert und mit und ohne ABA auf ihre Transaktivierungseffizienz hin getestet (Abb. 2-43). Beide Versionen der SnRK2.6 wurden durch die Cotransformation von ABI1 auf unter 10%, und mit der hyperaktiven Variante ABI1ΔN116 sogar auf unter 1% ihrer Aktivität inhibiert. Ohne ABA zeigte RCAR11 in beiden Fällen nur einen geringen Einfluss, währenddessen es mit ABA zu einem starken Anstieg der Aktivität kam. Im Falle der wildtypischen Komponenten konnte durch ABA so die volle SnRK2.6 Aktivität wiederhergestellt werden. Durch die vergleichsweise hohe Restaktivität der SnRK2.6 ohne ABA kam es nur zu einer 20-fachen ABA-Induktion. Im Gegensatz dazu kam es durch die geringere Restaktivität mit ABI1ΔN116 zu einer fast 50-fachen ABA-Induktion. Obwohl die Reporteraktivität in diesem Falle nur auf 25% der vollen SnRK2.6 Aktivität anstieg, war die ABA-Induktion um ein vielfaches höher. Noch deutlicher wurde dieser Effekt bei Verwendung der hyperaktiven SnRK2.6Δ320 (vgl. 2.2.1). Hier konnte mit ABI1ΔN116, RCAR11 und ABA zwar nicht die volle SnRK2.6Δ320 Aktivität wiederhergestellt werden, allerdings wurde durch die Zugabe von ABA die Aktivität der SnRK2.6Δ320 von 0,23% auf fast 48% der vollen SnRK2.6 Aktivität gesteigert, was einer über 200-fachen ABA-Induktion entsprach.

Auf der einen Seite konnte durch die Optimierung der Expressionsstärken von ABI1 und RCAR11 die volle ABI1-Inhibition der SnRK2.6 aufgehoben werden, womit sich ein durch ABA-regulierbarer Bereich (dynamischer Bereich) von über 95% der SnRK2.6 Aktivität ergab. Auf der anderen Seite konnte durch die Verwendung hyperaktiver Effektoren die Restaktivität der SnRK2.6 so weit gedrückt werden, dass die ABA-Induktion des Systems um ein Vielfaches gesteigert werden konnte. Verglichen mit der anfänglichen 4-fachen ABA Induktion in Abb. 2-39 konnte die Regulation der ABA-Signalkaskade in Hefe um mehr als das 50-Fache verbessert werden (207-fache ABA-Induktion).

Das optimierte System bietet genug dynamische Regulation, um Unterschiede in der ABA-Affinität verschiedener Rezeptorkomplexe untersuchen zu können. In Abb. 2-39 wurde bereits gezeigt, dass es durch unterschiedliche RCAR-Proteine auch ohne ABA zu einer Inhibition der PP2C kommt. Im Falle der RCARs aus Untergruppe I war in Hefe keine Steigerung der RCAR-Funktion durch ABA mehr detektierbar. Es ist anzunehmen, dass es durch die starke Expression des RCARs in diesem Falle auch ohne ABA zur Absättigung der PP2C kam. Um die Affinitätsunterschiede zwischen RCARs der Untergruppe I und der Untergruppe III aufzuklären, wurde analog zu RCAR11 auch RCAR1 unter die Kontrolle des TDH3-Promotors gestellt und zusammen mit den wildtypischen Signal-Komponenten und ABF2 in pSAR-Hefen transformiert.

Um die ABA-Abhängigkeit beider Rezeptorkomplexe zu untersuchen, wurden die transformierten Hefen mit unterschiedlichen Konzentrationen an ABA inkubiert, um so über die Induktion des pSAR

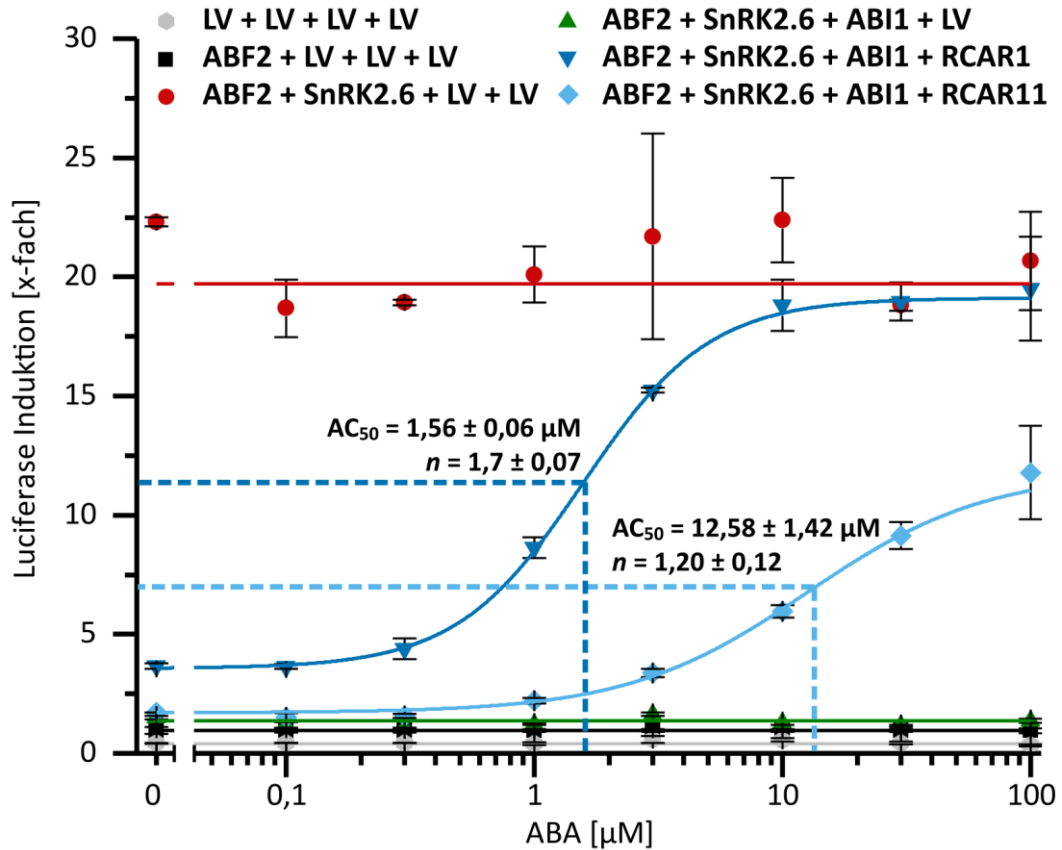


Abb. 2-44 ABA-Titration in pSAR-Reporterhefen

pSAR-Reporterhefen wurden mit an pADH:ABF2, pGAL1:SnRK2.6, pGK1:ABI1 und pTDH3:RCAR1 oder pTDH3:RCAR11 transformiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an ABA inkubiert. Die rLUC Werte wurden für jede Konzentration auf die Hefe, die nur ABF2 exprimierte (schwarzes Viereck), normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Durch die Datenpunkte wurden sigmoidale Hill-Kurven gefittet (nach Formel IV, Origin 2017, Funktion: Hill1 - Modified Hill function with offset) wobei k die halb-aktivierende Konzentration (AC_{50}) und n den Hill Koeffizienten angibt (nur für + RCAR). Fehler zeigen das 95%ige Konfidenzintervall.

$$l) \quad y = rLUC_0 + (rLUC_{100} - rLUC_0) \times \frac{x^n}{(k^n + x^n)}$$

$k = AC_{50}$

$n = \text{Hill-Koeffizient}$

$rLUC_0 = \text{niedrigster relative LUC Wert [x-fach]}$

$rLUC_{100} = \text{höchster relative LUC Wert [x-fach]}$

Rückschlüsse auf die ABA-Bindung des Holorezeptors zu erhalten. Um die Affinität der Rezeptoren besser beschreiben zu können, wurden sigmoidale Hill-Kurven durch die Datenpunkte gefittet, mit denen die halb aktivierende Konzentration (AC_{50}) sowie der Hill-Koeffizient (n) bestimmt wurde (Abb. 2-44). Hefen, die kein RCAR exprimierten, zeigten keine ABA-abhängige Regulation des Reporters. Durch die Reporteraktivität in Hefen mit aktiver SnRK2.6 (ABF2 + SnRK2.6, roter Kreis) und inhibierter SnRK2.6 (ABF2 + SnRK2.6 + ABI1; grüne Pyramide) wurde der durch RCAR-regulierbare dynamische

ERGEBNISSE

Bereich festgelegt. Wurde zusätzlich zur inhibierten Proteinkinase RCAR1 exprimiert, kam es auch ohne ABA zu einer Steigerung der Reporteraktivität. Durch die Zugabe von ABA konnte die anfängliche Aktivität um das 5,3-fache gesteigert werden und erreichte bei 10 μM exogenem ABA die volle Aktivität der nicht-inhibierten SnRK2.6. Hierbei wurde ein AC_{50} von $1,56 \pm 0,06 \mu\text{M}$ erzielt. Im Gegensatz dazu zeigten Hefen mit RCAR11 eine etwa 10-fach geringere Affinität zu ABA. RCAR11 induzierte den pSAR ohne ABA nur minimal und konnte die SnRK2.6 Aktivität bei 100 μM ABA nur zu knapp 50 % wiederherstellen. Die AC_{50} für RCAR11 lag bei $12,58 \pm 1,42 \mu\text{M}$ exogenem ABA. Allerdings erreicht RCAR11 auch mit 100 μM ABA keine volle Aktivierung der Reporteraktivität, was die Bestimmung der AC_{50} in diesem Falle weniger verlässlich machte. Interessanterweise wurde bei Verwendung von ABF4 als vermittelndem Transkriptionsfaktor (Abb. 2-43) eine 100 %ige Wiederherstellung der SnRK2.6 Aktivität bei 100 μM ABA durch RCAR11 erreicht. Der Unterschied der ABA-abhängigen Aktivierung bei Verwendung verschiedener Transkriptionsfaktoren deutet auf eine Beeinflussung der ABA-Affinität des Rezeptors durch die Änderung der anderen Signalkomponenten hin. ABA-Titrations in Hefe mit unterschiedlichen Signalkomponenten könnten sowohl Aufschluss über die ABA-Affinitäten des Rezeptorkomplexes, wie auch auf dessen Beeinflussung durch die interagierende Proteinkinase oder weitere Signalkomponenten geben.

Neben dem AC_{50} wird durch die Messung auch der Hill-Koeffizient (n) bestimmt. Der Hill-Koeffizient beschreibt die Steilheit der Kurve und ist ein Maß für die Kooperativität der Substratbindung. Ist $n > 1$ spricht man von positiver Kooperativität, wodurch die Affinitätssteigerung einer zweiten Liganden-Bindestelle durch die Bindung des Liganden an die erste Bindestelle beschrieben wird. n kann zwischen eins und der Anzahl der substratspezifischen Bindestellen liegen (Stefan and Le Novère, 2013; Hill, 1910). Während n für RCAR11 etwa bei 1 liegt, erreicht RCAR1 einen Hill-Koeffizient von 1,7. Dies könnte auf eine positive Kooperation hindeuten, was faktisch bedeuten würde, dass es durch die Bindung von ABA an den Rezeptor zu einer Steigerung der ABA-Affinität freier Bindestellen kommt. Da der RCAR1-ABI1 Rezeptorkomplex aber nur eine Bindestelle für ABA besitzt (Zhang et al., 2015) würde man eher von einer Kooperation zwischen den Rezeptoren ausgehen.

Um einen besseren Vergleich der RCARs und ihrer ABI1-Inhibierung zu erreichen, wurden alle RCARs unter die Kontrolle des pTDH3-Promotors gestellt und zusammen mit pGK1:ABI1 in ABF2 und SnRK2.6 exprimierende pSAR-Reporterhefen transformiert. Ähnlich wie in Abb. 2-39 inhibierten die RCARs der Unterfamilie I auch ohne ABA die Proteinphosphatase und induzierten daher die pSAR-Aktivität. Eine Ausnahme bildete das zuvor nicht getestete RCAR2, welches keine ABA-unabhängige Induktion zeigte. Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Versuchen, bei denen alle Effektoren unter der Kontrolle des pGAL1 standen, konnte mit den optimierten Varianten nun auch für die RCAR1 und RCAR6 eine ABA-

abhängige Regulation beschrieben werden. Interessanter weise zeigten RCAR3 und RCAR4 keine ABA-abhängige Steigerung der Aktivität. Möglicherweise müsste die Expression dieser Effektoren weiter gedrosselt werden, um einen ABA-vermittelten Effekt beobachten zu können. Es wäre aber auch denkbar, dass der Co-Rezeptorkomplex mit RCAR3 und RCAR4 durch ABA nicht weiter stabilisiert werden kann. Die RCARs der Unterfamilie II und III zeigten, mit Ausnahme von RCAR7, alle eine ABA-abhängige Induktion des pSAR wobei der ABI1-Effekt in unterschiedlichem Maße geblockt werden konnte. Mit RCAR11, 12, 13 und 14 konnte die SnRK2.6 Aktivität mit ABA zu fast 100% wiederhergestellt werden. RCAR7 zeigte weder eine ABA-abhängige noch eine ABA-unabhängige Regulation. Es wäre möglich, dass RCAR7 mit ABI1 keinen funktionellen Rezeptorkomplex bilden kann.

Letztendlich konnte durch die Expression der, für die ABA-Signalkaskade als essentiell beschriebenen Signalkomponenten eine funktionelle ABA-Signalkaskade in Hefe rekonstruiert werden. Die ABA-abhängige Induktion der pSAR-Aktivität mit 11 von 14 RCARs zeigt die Funktionalität dieses Systems. Die Relevanz der hier gewonnenen Daten sowie die fortführenden Möglichkeiten die das pSAR-Reportersystem bietet, sollen im anschließenden Diskussionsteil weitergehend betrachtet werden.

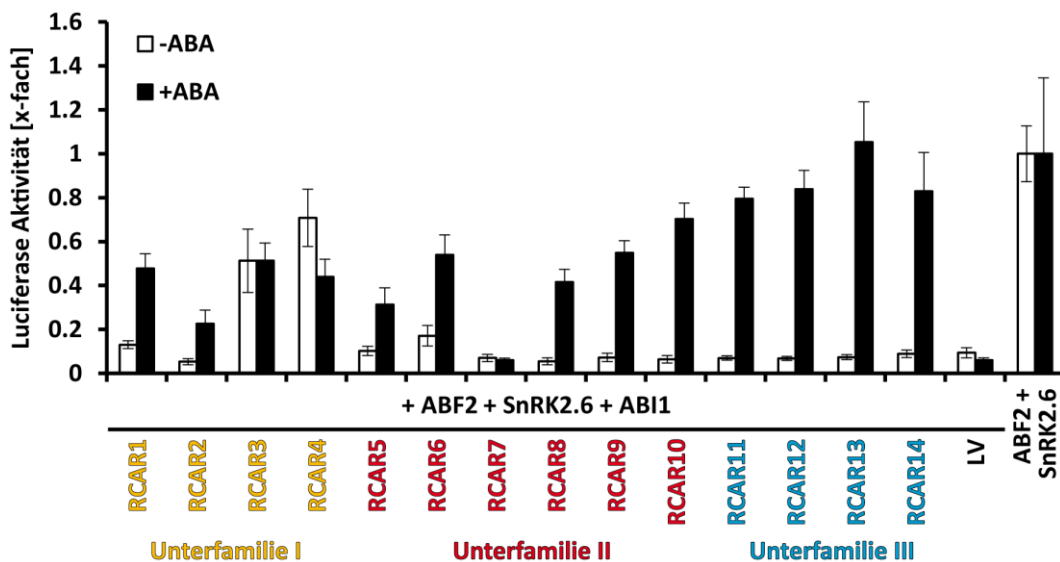


Abb. 2-45 ABI1-RCAR Corezeptoren im pSAR-TLA

ABF2 und SnRK2.6 exprimierende pSAR-Reporterhefen wurden mit pGK1:ABI1 und pTDH3:RCAR Konstrukten transformiert und im pSAR-TLA ohne und mit 100 µM ABA getestet. Die rLUC-Werte wurden jeweils auf die Aktivität der Probe ohne ABI1 und RCAR normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

3 DISKUSSION

3.1 Mehr als nur Bindung - Regulation eukaryotischer Transkriptionsfaktoren

Die Entwicklung und Funktion einer jeden Zelle wird durch die genaue und strikte Kontrolle der Genexpression bestimmt. Jede Änderung des Lebenszyklus, jedes hormonelle Signal und jeder externe Stimulus, der Einfluss auf die Entwicklung eines Organismus nimmt, spiegelt sich in der differenziellen Genexpression und der damit verbundenen Proteinsynthese wieder. Die Expression der Gene kann über diverse Mechanismen reguliert werden, und es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, auf alle einzugehen. Einer der grundlegendsten Mechanismen ist die Regulation der Promotoraktivität durch Transkriptionsfaktoren (TFs). Transkriptionsfaktoren binden meist an kurze 6-12 Basen lange Sequenzabschnitte auf der DNA (Spitz and Furlong, 2012), die als *cis*-Elemente bezeichnet werden und sich häufig in der direkten Promotorregion (*proximal promotor*) oberhalb der, für das entsprechende Protein, kodierenden Sequenz befinden. Aber auch Bereiche in größerer Distanz können als Verstärker oder Repressor wirken (Lenhard et al., 2012). Durch die Bindung der TFs an diese *cis*-Elemente kommt es häufig zur verstärkten Transkription der benachbarten DNA-Region, allerdings zeigt schon die hohe Spezifität der Genexpression, dass ein einfaches „Bindung-gleich-Aktivierung-Model“ schnell an seine Grenzen stößt. In der Regel wird die Expression eines Gens durch mehrere diverse *cis*-Elemente reguliert, an welche unterschiedliche Transkriptionsfaktoren binden können. Diese können durch Protein-Protein-Interaktionen, Chromatin-Modifikationen oder Änderung der DNA-Struktur gegenseitigen Einfluss aufeinander und auf die Genexpression nehmen. Dabei reichen die zwischen den verschiedenen TFs wirkenden Mechanismen von simpler Konkurrenz über kooperativen Synergismus bis zu obligater Notwendigkeit zweier oder mehrere Faktoren (reviewed in Spitz and Furlong, 2012). Darüber hinaus sollte man aber auch die TFs nicht als simple DNA-Bindeproteine verstehen. Durch diverse posttranslationale Modifikationen kann es zur Änderung der DNA-Bindeeigenschaften, der Protein-Protein-Interaktionen oder der Transaktivierungsleistung oder Funktion des TFs kommen. Die Breite der möglichen Modifikationen ist dabei ähnlich divers wie ihr Effekt. So wird der Zelltod-induzierende TF MYB30 zum Beispiel durch ABA-induzierte Sumoylierung in seiner aktiven Form stabilisiert (Zheng et al., 2012) und durch Ubiquitylierung inaktiviert und dem proteasomalem Abbau zugeführt (Marino et al., 2013). Besonders reversible posttranslationale Modifikationen steuern bei vielen TFs durch Änderung der Sekundär- oder Tertiärstruktur deren

Aktivität oder ändern die Interaktion mit anderen Proteinen oder der DNA (reviewed in Pireyre and Burow, 2015). Es wird vermutet, dass es in dem MYB-Transkriptionsfaktor R2R3 durch die Verschiebung des Redox-Potentials zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Monomeren kommt, was zur DNA-Bindung führt (Heine et al., 2004). Die wohl am besten studierte und am häufigsten beschriebene posttranslationale Modifikation ist die Protein-Phosphorylierung, die auch im Bereich der Transkriptionsfaktoren einen wichtigen Stellenwert einnimmt. Bekannt wurde der Mechanismus durch die Regulation der JUN-Transkriptionsfaktoren, die am Ende der MAPK-Kaskade stehen und durch die JUN-Kinase (JNK) phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung wird die Transaktivierungseffizienz von JUN erhöht, ohne die DNA-Bindeeigenschaften zu ändern (Kallunki et al., 1996; Chang and Karin, 2001).

Durch abiotischen Stress kommt es in der Pflanze zur Akkumulation von ABA und der Aktivierung der ABA-Signalkaskade, an deren Ende unter anderem (vgl. 1.3) die Phosphorylierung der ABFs steht. Der in dieser Arbeit in Hefe etablierte pSAR-TLA kann unter anderem dafür genutzt werden, die spezifische Phosphorylierung der ABFs und die damit verbundene Funktionsänderung genauer zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt soll auf die Regulation der ABFs im heterologen Hefesystem eingegangen werden.

Transkriptionsfaktoren der ABA-Antwort

In der Promotor-Region vieler ABA-induzierter Gene findet sich das *Abscisic Acid Response Element*, ein *cis*-Element mit der Konsensussequenz (C/T)ACGTGGC (Choi et al., 2000). Dieses Motiv wird durch die ABFs/ABRE bZIP-Transkriptionsfaktoren gebunden. In dem hier vorgestellten synthetischen ABA-Responsepromotor (pSAR) wurden vier in Tandem angeordnete ABRE *cis*-Elemente verwendet, um einen ABF-abhängigen Luciferase-basierenden Reporter zu konstruieren. Wie durch Fujita et al. (2011) berichtet, reicht ein einzelnes ABRE Element für die Bindung nicht aus. Das vierfache *cis*-Element GTACGTGGCG, welches im pSAR genutzt wird, führte zu einer effizienten Bindung der ABFs an den Reporter (Abb. 2-2A). Während ABF1, 2 und 3 eine vergleichbare Bindungsaffinität an den pSAR zeigten, interagierte ABF4 zehnfach stärker mit dem Reporter. In vergleichbaren ABRE-Bindestudien in Hefe wurde diese hohe Spezifität der ABF4 Bindung nicht beschrieben (Choi et al., 2000), allerdings wurde in diesen Studien auch ein leicht geändertes ABRE-ähnliches Motiv mit der Bindesequenz GGACACGTGGC verwendet. ABI5 hingegen zeigte keine Bindung an den pSAR. Zwar ist für ABI5 die Bindung an das ABRE-Motiv postuliert, allerdings wurde für Bindestudien in Hefe der natürliche *Early Methionine-labeled Promotor* (pEm6) anstelle eines synthetischen ABRE-Promotors verwendet der möglicherweise auch andere *cis*-elemente als die beschriebenen ABREs aufweist (Nakamura et al., 2001). Allerdings sollte beachtet werden, dass mit ABI5 zwar eine signifikante Bindung an den

DISKUSSION

Em6-Promotor beschrieben wurde, diese aber nur zwei- bis dreifach über der Aktivität der Kontrolle lag (Nakamura et al., 2001). ABI5 zeigte auch mit dem pSAR eine zweifache Induktion des Reporters, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Nakamura et al. ist. Verglichen mit ABF1 - 4 kann diese Bindung aber als sehr schwach bis unzureichend interpretiert werden. ABI5 spielt eine besondere Rolle im Bereich der Keimung, die im engen Zusammenhang mit ABI3 und ABI4 steht. Bei Versuchen in Mais-Protoplasten, bei denen der *pEm*-Responsereporter genutzt wurde, konnte ABI5 seine volle Aktivierung nur in Kombination mit dem Mais-Ortholog von ABI3 VIVIPAROUS1 (VP1) erreichen (Finkelstein et al., 2005). Transaktivierungsversuche in Hefe zeigten, dass die Promotoren ABI4-induzierter Gene nur schwach durch ABI4, ABI5, ABF1 oder ABF3 alleine induziert wurden, es hingegen aber zu einer starken Induktion bei der gleichzeitigen Verwendung von ABI4 in Kombination mit einem der andern bZIPs kam (Reeves et al., 2011). Die schwache Transaktivierung von ABI5 im pSAR-TLA lässt sich möglicherweise auf die obligate Interaktion mit anderen bZIP Transkriptionsfaktoren zurückführen. Es bleibt aber zu untersuchen, ob dabei die einfache Heterodimerisierung mit ABRE-bindenden ABFs ausreicht, um den pSAR zu induzieren, oder ob weitere *coupling* Elemente, wie das ABI4-bindende CE1 (Bossi et al., 2009), für eine effiziente Induktion nötig sind. Der pSAR-TLA würde dabei die nötige Spezifität und Flexibilität besitzen, um solche Untersuchungen durchzuführen. Durch Änderung der *cis*-Elemente im pSAR, oder der zusätzlichen Verwendung von CE1, könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Bindung und Regulation von ABI5 untersucht werden. ABI5, welches hauptsächlich bei der Keimregulation beteiligt ist (Skubacz et al., 2016), nimmt daher auch im pSAR-TLA eine Sonderrolle ein, währenddessen ABF1 - 4, welche besonders für die osmotische Stressantwort verantwortlich sind, sich ähnlich zueinander verhalten (Yoshida et al., 2015; Fujita et al., 2011).

Die ABF-pSAR-Transaktivierungsstudien (Abb. 2-2B) zeigten, dass es ohne aktivierende Proteinkinase zu keiner oder nur zur schwachen Aktivierung des Reporters kommt. Ein Vergleich mit der bis zu 2000-fachen Aktivierung des Reporters durch den Transkriptionsfaktor mit Proteinkinasen verdeutlicht, dass die nicht phosphorylierten ABFs zwar an die DNA binden, die Gentranskription aber nicht zu induzieren vermögen (Abb. 3-1A). Transaktivierungsversuche mit SnRK2.6 und dem N-terminale fusionierten AD:ABF4, mit dem die Bindung des ABFs an den Reporter untersucht werden kann, (vgl. 2.1.2) zeigten, dass es zu keiner Änderung der DNA-Bindung durch die Proteinkinase kam (Abb. 5-1). Diese Erkenntnis wird auch durch Überexpressionen von *ABF2* in Arabidopsis gestützt, bei der das wildtypische ABF2 zu keiner phänotypischen Änderung führte. Nur durch die Verwendung hyperaktiver ABF2-Varianten oder ABF2-Phosphomimic-Varianten konnte unter ungestressten Bedingungen die Induktion ABA-abhängiger Gene erreicht werden (Furihata et al., 2006; Fujita et al., 2005). Die schwache Aktivität der ABFs im pSAR-TLA ohne Proteinkinase lässt darauf schließen, dass

die ABFs in Hefe in ihrer inaktiven Form vorliegen. Allerdings konnte durch Analyse der ABF2-Phosphorylierungsstellen in Hefe, neben dem durch CPK23 phosphorylierten S86, auch S26 und S413/S411 als ABF2-Phosphopeptide bei Abwesenheit der PK gefunden werden (Tabelle 2-1). Bei S26 handelt es sich sogar um eine für die SnRK2 vermutete Phosphorylierungsstelle (Furihata et al., 2006). Zwar waren diese Phosphorylierungen nicht in allen Hefe-Proben zu finden, was auf unspezifische Phosphorylierung hindeutet, dennoch kann eine ABF2-Phosphorylierung durch hefeeigene Proteinkinasen nicht ausgeschlossen werden.

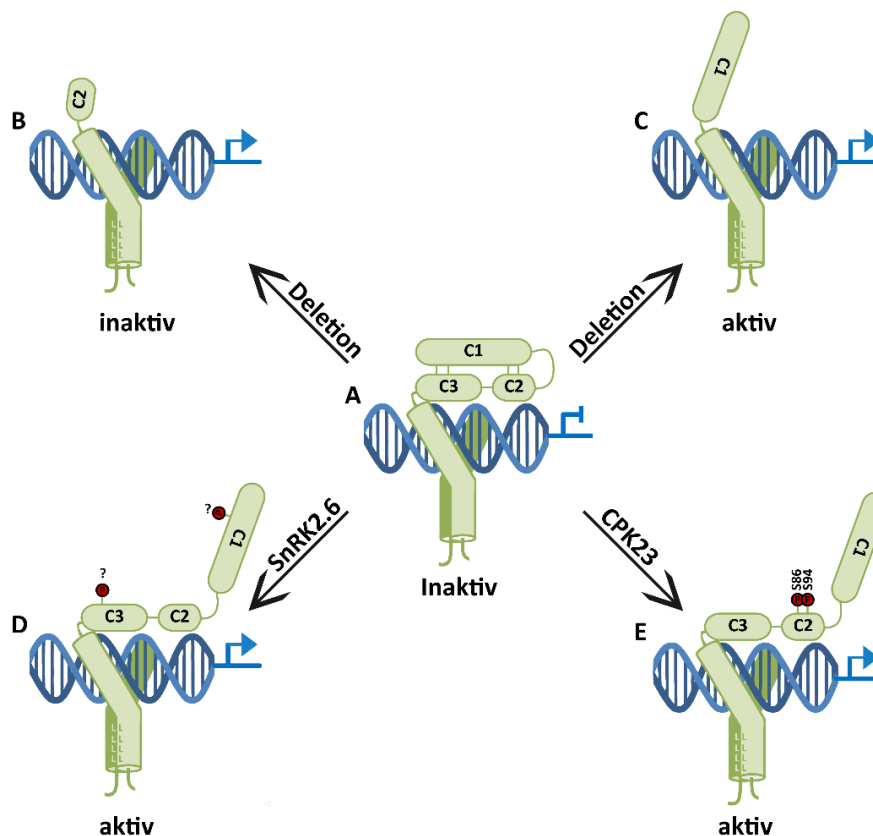


Abb. 3-1 Schematische Darstellung einer möglichen ABF2-Aktivierung

ABF2 bindet als Dimer mittels der basischen Domäne an die DNA. Die Dimerisierung wird über den Leucin-Zipper vermittelt. In seiner nicht modifizierten Form bindet ABF2 zwar an die DNA, aktiviert die Expression seiner Ziel-Gene aber nicht (A). Wird statt dem wildtypischen ABF2 eine Fusion aus DNA-Bindedomäne und dem N-terminalen C1-Teil verwendet ist ABF2 aktiv (C), währenddessen die Fusion zwischen DNA-Bindedomäne mit dem C2-Teil zu keiner artifiziiellen Aktivität führt (B). Durch Phosphorylierung (rote Kreise) im N-terminalen Bereich (C1/C2/C3) des Transkriptionsfaktors kommt es zur Aktivierung. Während CPK23 ABF2 an S86 und S94 in Hefe phosphoryliert (E) Transaktiviert SnRK2.6 ABF2 über andere noch unbekannte Phosphorylierungsstellen (D). Durch die Phosphorylierung könnte es zur Änderung der Proteinstruktur kommen, wodurch die aktivierende C1-Domäne von der inhibitorischen C2-Domäne gelöst wird und ABF2 aktiv wird. Die artifiziielle Fusion des C1-Teils mit der DNA-Bindedomäne (C) könnte diesen Prozess nachahmen.

Basierend auf Llorca et al., 2014. Aktivierungsdomäne ist nur für ein ABF gezeigt.

DISKUSSION

Durch die Verwendung verschiedener ABF2-Phosphomutanten in Hefe konnte die Funktion einzelner Phosphorylierungsstellen für die ABF2-Aktivität und -Transaktivierung untersucht werden. Während die Substitution zum Alanin in ABF2-S413 zu keiner Änderung der Aktivität in Arabidopsis-Protoplasten führte, kam es mit ABF2-S26A zu einer stark reduzierten ABF2-Aktivität in Anwesenheit von ABA (Fig. 3A in Furihata et al., 2006). Darüber hinaus zeigten die Autoren auch eine reduzierte Transaktivierung mit ABF2-Phosphomutanten an den Stellen S86, S94 und S135, welche durch eine 43 kDa große pflanzliche Proteinkinase phosphoryliert wurden. Furihata et al. postulierten, dass es sich hierbei um eine SnRK2-Proteinkinase handeln musste. In der vorliegenden Studie konnte durch die direkte Transaktivierung der ABF2-Phosphomutanten mit SnRK2.6 gezeigt werden, dass keine der beschriebenen Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die ABF2-Transaktivierung durch die SnRK2.6 hatte (Abb. 2-24). Im Gegensatz dazu phosphorylierte CPK23 ABF2 in Hefe eindeutig an den Positionen S86 und S94, und ABF2-S86A-S94A konnte nicht mehr durch CPK23 transaktiviert werden (Abb. 3-1E). In der Arbeit von Furihata et al. (2006) wurden kurze ABF2-Peptide, die entweder den C1-Teil (Phosphorylierungsstellen S26 und T31) oder den C2-Teil (Phosphorylierungsstellen S86 und S94) von ABF2 enthielten (vgl. Abb. 2-22), als Substrat in einem *In-Gel-Kinaseassay* verwendet. Für die Phosphorylierung der Peptide wurden Protein-Extrakte aus Arabidopsis-Protoplasten mit oder ohne vorheriger ABA-Behandlung genutzt. Während das C1-Peptid ohne ABA-Behandlung nicht phosphoryliert wurde, kam es mit dem C2-Peptid auch ohne vorherige ABA-Behandlung zu einem eindeutigen Phosphorylierungssignal. Durch Mutation des S26 zum Alanin bzw. der S86A-S94A-Doppelmutation blieb die Phosphorylierung in beiden Fällen aus. Der Unterschied der Phosphorylierungsintensität des C1-Peptids gegenüber dem C2-Peptid ohne vorherige ABA-Behandlung legt die Vermutung nahe, dass S86 und S94 durch eine andere Proteinkinase als S26 phosphoryliert werden. Im Zusammenhang mit der hier gezeigten spezifischen Phosphorylierung von ABF2-S86-S94 durch CPK23 (Abb. 2-25), stellt sich die Frage ob Furihata et al. nicht die Phosphorylierung des ABF2-C2-Peptids durch CPK23, oder eine andere eng verwandte CPK, beobachtet haben. Es sollte aber beachtet werden, dass die Autoren durch Ca^{2+} -Behandlung der Protoplasten ein zweites Phosphorylierungssignal des ABF2-C2-Peptids bei 60 kDa beobachtet haben und dieses einer Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase zuordneten. Da für die SnRK2.6 bisher keine spezifischen Phosphorylierungsstellen gefunden wurden, kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass SnRK2.6 neben weiteren Phosphorylierungsstellen auch S86 und S94 phosphoryliert. Darüber hinaus wäre es auch denkbar, dass die Substratspezifitäten der renaturierten PKs im *In-Gel-Kinaseassay* nicht so stringent sind, wie die der in Hefe exprimierten PKs.

Durch Transaktivierungsstudien in Arabidopsis-Protoplasten konnte gezeigt werden, dass ein ABF2-Fusionsprotein, welches aus dem C1-Bereich (AS 1-61, Abb. 3-1C) und dem DNA-bindenden Bereich (AS 318-417) besteht, auch ohne ABA in Arabidopsis-Protoplasten aktiv ist (Fujita et al., 2005). Eine Fusion des C2-Teils (AS 61 - 117, Abb. 3-1B) mit der DNA-Bindedomäne resultierte hingegen in einem inaktiven ABF2. Es wäre daher zu vermuten, dass es sich bei dem C2-Teil in ABF2 nicht um die eigentliche Aktivierungsdomäne handelt, sondern um eine inhibitorische Domäne. Die Phosphorylierung der ABF2-C2-Domäne an S86 und S94 durch CPK23 könnte eine Änderung der Proteinfaltung auslösen, wodurch die C1-Domäne von der inhibitorischen Aktivität der C2-Domäne befreit wird (Abb. 3-1E). Hierdurch würde sich auch die teilweise starke Autoaktivität einiger ABF2-Phosphomutanten erklären lassen (Abb. 2-23). So zeigten die Substitution von S31 oder T97 sowohl zum Aspartat wie auch zum Alanin, eine ähnliche Aktivität wie der transaktivierte ABF2-WT, obwohl diese Mutationen keinen Einfluss auf die ABF2-Transaktivierung mit CPK23 oder SnRK2.6 hatten (Abb. 2-24). Mutationen an diesen Stellen könnten die intramolekulare Faltung von ABF2 in einer Weise stören, dass nur noch die aktive Form eingenommen werden kann. SnRK2.6 könnte durch Phosphorylierung an anderer Stelle denselben intramolekularen Faltungsprozess auslösen (Abb. 3-1D). Dies würde auch die additiven Transaktivierungen von SnRK2.6 Δ 320 und GFP:CPK23-vk in Kombination mit ABF2 erklären (Abb. 2-26). Für eine eindeutige Antwort auf dieses Modell wäre es aber nötig, ABF2 in seiner inaktiven und aktiven Form strukturell zu untersuchen.

Während ABFs auch ohne Phosphorylierung an die DNA binden können, ist diese für die Aktivität der Transkriptionsfaktoren nötig. Sowohl CPK23 wie auch SnRK2s können die ABFs phosphorylieren und so aktivieren, scheinen dies aber über unterschiedliche Phosphorylierungsstellen zu erreichen.

3.2 Proteinkinasen - hoch regulierte Schaltzentralen

In allen Bereichen des eukaryotischen Lebens findet man Proteinkinasen (PK) die als Molekulare Signalgeber entscheidend für die Anpassung der Zelle an ihre Lebensbedingungen sind. PKs können durch diverse exogene Signale in ihrer Aktivität kontrolliert werden und dienen so als Relaisstation zwischen exogenen Stimuli und intrazellulären molekularen Prozessen. Da viele PKs selber durch Phosphorylierung reguliert werden, können auf diese Weise ganze Signal-Netzwerke gebildet werden, wodurch multiple zelluläre Signale miteinander verschaltet werden können. Das wohl prominenteste Beispiele für solche Kinase-Kaskaden ist die Regulation der *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), die wiederum über die MAPK-Kinase (MAPKK) phosphoryliert wird, welche wiederum über die MAPKK-Kinase (MAPKKK) in ihrer Aktivität reguliert wird. Jeder Faktor dieses dreistufigen Prozesses, an dessen Ende die Regulation der Genexpression steht, kann über diverse andere Faktoren reguliert

und über Proteinphosphatasen in ihrer Aktivität reguliert werden (reviewed in Arnaudeau et al., 2001). Eine der am weitest verbreiteten Regulationsmechanismen in PKs ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Aktivierungsschleife (vgl. 1.5). Durch Strukturaufklärung der zuerst kristallisierten S/T-Proteinkinase PKA und diversen darauffolgenden Kristallstrukturen konnten die PKs in zwei Gruppen geteilt werden: Solche, für die die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife wichtig ist, und solche, die auch ohne diesen Prozess aktiviert werden können. Alle PKs der ersten Gruppe tragen ein konserviertes Arginin vor dem katalytischen Aspartat und werden daher auch RD-Kinasen genannt. Über dieses Arginin wird die phosphorylierte Aktivierungsschleife gebunden und in der richtigen Konformation fixiert. Meistens kommt es erst nach dieser Bindung zur korrekten Positionierung des ATP- γ -Phosphats im aktiven Zentrum (Nolen et al., 2004; Johnson et al., 1996). Auch die in dieser Arbeit beschriebenen SnRK2s, CDPKs und CIPKs gehören zu der Gruppe der RD-Kinasen und besonders in der Familie der SnRK2s ist die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife von entscheidender Bedeutung für die Kinaseaktivität (siehe Abschnitt 1.6.1). Neben diesem für die Kinasedomäne typischen regulativen Prozess können PKs über viele andere Mechanismen in ihrer Aktivität kontrolliert werden. Hierfür sind meist regulative Domänen außerhalb der Kinasedomäne entscheidend. Dabei kommt es oft zur Verankerung von proteineigenen Pseudosubstraten, die eine ähnliche Struktur wie das Proteinsubstrat einnehmen und so das aktive Zentrum der Kinase blockieren können, wie es auch bei den pflanzlichen CPKs oder CIPKs der Fall ist (Wernimont et al., 2010; Chaves-Sanjuan et al., 2014). Auch die humane Proteinkinase C (PKC) wird über ein Pseudosubstrat in ihrer Aktivität inhibiert. Durch die sukzessive Bindung von Ca^{2+} an die regulative Domäne C2 und Diacylglycerin (DAG) an die regulativen Domänen C1A und C1B werden diese Domänen in der Plasmamembran verankert, wodurch es zur strukturellen Umfaltung des Proteins kommt und das Pseudosubstrat aus dem aktiven Zentrum gelöst wird. Erst nach diesem zweistufigen Prozess kann die PK aktiv werden (Steinberg, 2008). Nicht immer müssen diese regulativen Einheiten Teil desselben Proteins sein. Die Proteinkinase A, welche im Bereich der Proteinkinase-Forschung als Prototyp gilt, da ihre katalytische Domäne die erste war, die kristallisiert wurde, bildet aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten einen tetrameren-Holoenzym Komplex. Erst durch Bindung des cyclischen AMPs (cAMP) an die regulativen Untereinheiten wird die katalytische Untereinheit aus diesem Komplex freigesetzt und so aktiv (reviewed in Taylor et al., 2012). Die breite Diversität der PK-Regulation erstreckt sich so von Protein-Phosphorylierung, über Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionen bis zur Regulation über sekundäre Botenstoffe wie Ca^{2+} , DAG oder cAMP. Da die inaktive PK keine katalytische Aktivität besitzt, und daher keinem Selektionsdruck unterliegt, konnten sich diverse molekulare Mechanismen ausbilden, welche die Aktivität der Proteinkinasen kontrollieren

können (Dissmeyer and Schnittger, 2011). In vielen Fällen muss es erst zu massiven strukturellen Änderungen kommen, bevor die PK aktiv werden kann. Ohne Aufklärung der Proteinstruktur und der Struktur-Dynamik ist es daher schwierig vorherzusagen, welche Prozesse nötig sind, um eine PK vom inaktiven in den aktiven Zustand zu überführen.

Der in dieser Arbeit etablierte pSAR-TLA hat den Vorteil, dass durch die Verwendung eines nicht pflanzlichen Zellsystems die endogene Regulation der PKs in der pflanzlichen Zelle ausgeschlossen werden kann. Die Aktivität der getesteten Faktoren basiert somit rein auf der molekularen Struktur dieser und eventueller Modifikationen durch das hefeeigene Proteom. Spezifische pflanzliche Interaktoren oder sekundäre Effektoren, die für die PK-Aktivität von Nöten sind, haben durch die Untersuchungen im heterologen System keinen Einfluss. Durch die stringente Regulation der Aktivität vieler PKs steht man somit aber vor dem Problem, dass alle für die Aktivierung nötigen Mechanismen einer PK verstanden sein müssen, um diese in Hefe zu untersuchen.

Proteinkinasen der ABA-Antwort

Durch die Transaktivierungsstudien der ABFs in Hefe konnte die Aktivierung dieser über Proteinkinasen aus der Familie der SnRK2s gezeigt werden. pSAR-Transaktivierungsstudien mit unterschiedlichen Versionen der SnRK2.6 konnte der Domäne II - der ABA-Box - eine wichtige regulatorische Funktion zugesprochen werden. Durch Deletion dieser kam es zur Erhöhung der Transaktivierungsleistung der SnRK2.6 (vgl. 2.2.1). Auf diesen Effekt wurde *in vitro* schon durch Belin et al. (2009) hingewiesen, allerdings kam es hier durch die Deletion der ABA-Box (SnRK2.6 Δ 320) nur zu einer etwa 20%igen Steigerung der Kinaseaktivität. In den hier gezeigten Experimenten konnte die Transaktivierungsleistung der SnRK2.6 jedoch um mehr als das 8-fache gesteigert werden. Dieser Befund deutet auf einen noch nicht bekannten Mechanismus der intramolekularen negativen Regulation der ABA-Box hin. *In planta* konnte mit der SnRK2.6 Δ 320 die geringere Blatttemperatur der *snrk2.6*-Mutante nicht wiederhergestellt werden, während dieses mit der SnRK2.6 Δ 348 oder der wildtypischen SnRK2.6 möglich war (Belin et al., 2009). Dies deutet auf eine notwendige Funktion der ABA-Box bei der ABA-abhängigen Aktivierung der SnRK2.6 hin, die auch durch Versuche in Arabidopsis-Protoplasten bestätigt wurde (Yoshida et al., 2006). Bei der ABA-Box handelt es sich um eine von vier Interaktionsflächen zwischen SnRK2 und PP2C (siehe Abschnitt 1.7). Die ABA-Box bildet eine negative geladene Domäne, die mit der positiv geladenen Oberfläche der PP2C interagiert (Xie et al., 2012). Allerdings konnte diese Domäne in Röntgen-Kristallstrukturen nicht aufgelöst werden, was auf eine flexible Struktur hindeutet (Soon et al., 2012).

Im pSAR-TLA konnte gezeigt werden, dass SnRK2.6 Δ 320 (ohne ABA-Box) genauso gut durch PP2Cs inhibiert werden kann wie der WT (Abb. 2-37). Es scheint in Hefe auch ohne ABA-Box zur Interaktion zwischen SnRK2 und PP2C zu kommen. Dies lässt sich womöglich durch die hohe Abundanz beider Proteine, bedingt durch die Überexpression, erklären. Auch in Interaktionsstudien mit rekombinant gereinigten Proteinen konnte kein Unterschied in der Interaktionsstärke zwischen SnRK2.6 und HAB1 durch Mutation der HAB1-ABA-Box-Interaktionsfläche festgestellt werden. Allerdings konnte die Interaktion beider Proteine durch weitere Mutation an einer der drei verbleibenden Interaktionsflächen gestört werden (Soon et al., 2012). Es konnte somit gezeigt werden, dass die ABA-Box für die Dephosphorylierung der SnRK2.6 durch PP2Cs nicht von Nöten ist, allerdings essentiell für die Ausbildung des funktionellen SnRK2-PP2C Komplexes *in planta*. Die negative intramolekulare Funktion der ABA-Box, wie sie im pSAR-TLA beobachtet wurde, bleibt allerdings noch ungeklärt. Durch die fehlende Kristallstruktur der ABA-Box kann keine genaue Aussage über ihre Positionierung im SnRK2.6 Protein getroffen werden. Durch *in silico* Modellierung dieser - in Anlehnung an bekannte Kristallstrukturen - wurde vermutet, dass die ABA-Box eine α -Helix ausbildet, die durch einen flexiblen Linker mit der SnRK2-Box verbunden ist (Abb. 1-5; Xie et al., 2012). Die Ergebnisse in dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass Teile

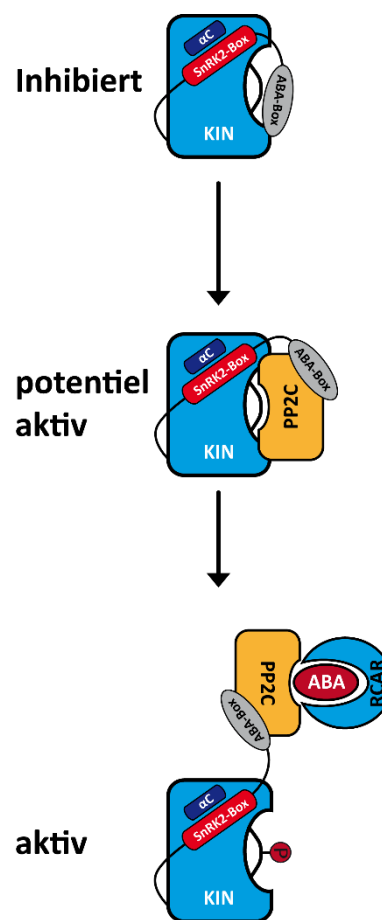


Abb. 3-2 Modell der SnRK2 Aktivierung

Die SnRK2.6 (oben) besteht aus einer Kinasedomäne (KIN, blau) und zwei regulatorischen Domänen. Die SnRK2-Box (rot) ist für die Aktivität der SnRK2.6 unerlässlich, da sie für die Stabilisierung der α -Helix (dunkelblau) der Kinasedomäne wichtig ist. SnRK2.6 wird durch die ABA-Box in seiner Aktivität inhibiert. Durch intramolekulare Interaktion der ABA-Box mit dem aktiven Zentrum der Kinasedomäne könnte die ABA-Box die native SnRK2.6 in einem inaktiven Zustand halten (oben). Durch Interaktion der SnRK2.6 mit der PP2C (orange) würde die SnRK2 in einen potentiell aktiven Zustand übergehen, zeitgleich aber durch die PP2C sterisch und katalytisch inhibiert werden (Mitte). Erst nach Rekrutierung der PP2C in den ABA-Holorezeptor könnte die SnRK2 in die aktive Form übergehen und ihre Aktivierungsschleife phosphorylieren (unten).

DISKUSSION

der ABA-Box mit der Kinasedomäne interagieren und diese in der inaktiven Form stabilisieren (Abb. 3-2). Durch die Bindung der ABA-Box an die PP2C könnte dieser Effekt aufgelöst werden, wodurch eine potenziell aktive Kinase entstehen würde. Allerdings würde es zeitgleich zur enzymatischen Inaktivierung der SnRK2 durch die PP2C kommen. Erst durch die Rekrutierung der PP2C im ABA-Holorezeptor könnte die SnRK2 schlussendlich in die aktive Konformation übergehen. Ähnliche Mechanismen sind auch für die Proteinkinase C (PKC) bekannt, bei der das cytosolisch gebildete Protein mit seinem N-Terminus zunächst in der Plasmamembran verankert werden muss, wodurch ein intramolekulares Pseudosubstrat aus dem aktiven Zentrum der Kinasedomäne gelöst wird. Erst nach der Membranverankerung der PKC geht diese in einen potenziell aktiven Zustand über und kann durch membrangebundenes Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden. Entgegen dieser Theorie konnte die wildtypische SnRK2.6 durch eine katalytisch inaktive PP2C nicht in ihrer Aktivität gesteigert werden (Abb. 2-42). Entweder ist die katalytische Aktivität der PP2C für die Interaktion entscheidend, oder die inhibitorische Funktion der ABA-Box kann nicht durch die PP2C Interaktion aufgehoben werden.

Vilela et al. (2015) zeigten, dass die ABA-Box von *Zea mays* (Zm) OST1 (Homolog zu AtSnRK2.6/OST1) durch die Proteinkinase Caseinkinase 2 (CK2) phosphoryliert wird, wodurch es zur Degradation des Enzyms über das Proteasom kommt (Litchfield, 2003). Darüber hinaus scheint die Phosphorylierung die Interaktion zwischen ZmOST1 und ZmABI1 zu stabilisieren. Es wäre denkbar, dass es auch in Hefe zur Phosphorylierung der SnRK2.6 durch die Hefe-eigene CK2 kommt (Bidwai et al., 1994). Hierdurch würde die Abundanz der WT SnRK2.6 im Gegensatz zur SnRK2.6 Δ 320 sinken, womit sich die geringeren Aktivitäten der WT SnRK2.6 erklären ließen. SnRK2.6 Δ 320 konnte zwar mittels Westernblot in Hefe detektiert werden (Abb. 2-10), allerdings wurde kein direkter Vergleich zwischen der Proteinabundanz des SnRK2.6 WT und der SnRK2.6 Δ 320 hergestellt. Aktuelle Messungen SnRK2.6-spezifischer Phosphorylierungstellen in Hefe konnten allerdings keine Phosphorylierungen der ABA-Box detektieren und keinen signifikanten Unterschied der Proteinabundanz zwischen SnRK2.6 WT und SnRK2.6 Δ 320 aufdecken (Julia Mergner, TU-München, persönliche Mitteilung). Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren zum ersten Mal eine mögliche regulative Funktion der ABA-Box für die Aktivität der SnRK2.6, die über die Interaktion der PK mit PP2Cs hinausgeht.

Es sollte allerdings beachtet werden, dass es sich bei SnRK2.6 um den einzigen Vertreter der SnRK2-Familie handelte, der diesen Effekt zeigte (Abb. 3-3). Keine weitere der nah verwandten SnRK2s aus Gruppe I (2.2, 2.3, 2.6, 2.7, 2.8) transaktivierte die ABFs. Überraschenderweise zeigten alle getesteten SnRK2s der Gruppe II (2.1, 2.4, 2.5), welche für ihre ABA-unabhängige Funktion bekannt sind (Boudsocq et al., 2004), starke Transaktivierung der ABFs (vgl. 2.2.6). Besonders stark wurde ABF4 durch alle SnRK2s der Gruppe II transaktiviert, gefolgt von ABF2, ABF1 und ABF3 (vgl. 2.2.7).

Durch Deletion der ABA-Box änderte sich die Aktivität bei diesen nur geringfügig (Abb. 2-10). Im Gegensatz zur Gruppe I enthält die ABA-Box der Gruppe II hauptsächlich Glutamate (Abb. 5-5), währenddessen die negative Ladung dieser in Gruppe I hauptsächlich über Aspartat erreicht wird. Auch SnRK2s der Gruppe II wurden über die PP2Cs in ihrer Aktivität gehemmt und durch die Interaktion mit RCAR1 und ABA wieder induziert (Abb. 5-4). Die Inhibition der SnRK2.4 durch ABI1 wurde auch durch Krzywińska et al. (2016) beobachtet. Hier konnte gezeigt werden, dass ABI1 mit SnRK2.4 interagiert und diese durch Dephosphorylierung der Aktivierungsschleife inaktiviert. Es bleibt somit weiteren Studien vorbehalten die Aktivitätssteigerung der SnRK2.6 durch den Verlust der ABA-Box weitergehend zu ergründen und die intramolekulare Funktion dieser Domäne aufzuklären

Über die Funktion der Gruppe II SnRK2s ist wenig bekannt. SnRK2.4 und SnRK2.10 werden *in planta* durch osmotischen Stress, aber nicht durch ABA aktiviert (Boudsocq et al., 2004). Während beide Proteinkinasen stark homolog zueinander sind (Abb. 5-5) und ähnliche physiologische Funktionen einnehmen, unterscheiden sie sich in ihrer

Proteinlokalisierung *in planta* (McLoughlin et al., 2012). SnRK2.4 wird im Cytosol der Wurzelspitze und in Zellen, welche das Seitenwurzel-Primordium umgeben, gebildet, während SnRK2.10 hauptsächlich im vaskulären Gewebe der Wurzel gefunden wurde. Beide Proteinkinasen nehmen Einfluss auf das Wurzelwachstum. Während es in *snrk2.4*-Mutanten zur Inhibition des Primärwurzelwachstums kommt, nimmt durch den Verlust der SnRK2.10 die Anzahl der Seitenwurzeln ab. In Kombination sind

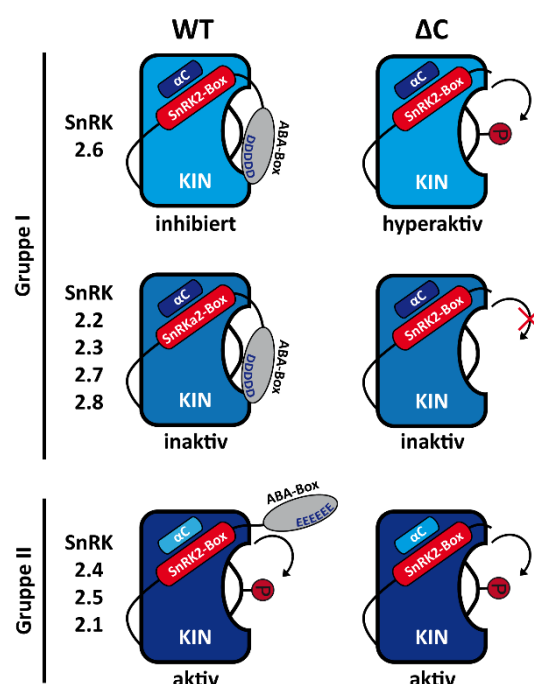


Abb. 3-3 Unterschied der SnRK2-Aktivierung

SnRK2.6 (oben) zeigt als einziger Vertreter der Gruppe I SnRK2s eine inhibitorische Funktion der ABA-Box (grau). Diese scheint die Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife (oben links) zu inhibieren. Durch Deletion der ABA-Box (ΔC) entsteht eine hyperaktive SnRK2.6 (oben rechts). Die restlichen SnRK2s der Gruppe I (2.2, 2.3, 2.7, 2.8; Mitte) zeigen weder mit (Mitte links) oder ohne ABA-Box (Mitte rechts) Aktivität. Wahrscheinlich ist bei diesen die Transphosphorylierung der Aktivierungsschleife durch andere PKs nötig. Die SnRK2s der Gruppe II (2.4, 2.5, 2.1; unten) sind sowohl mit und ohne ABA-Box aktiv. Der inhibitorische Effekt der ABA-Box tritt bei diesen nicht auf. Die Gruppe II Vertreter scheinen sich selbst zu phosphorylieren oder werden durch Hefe-eigene PKs phosphoryliert.

DISKUSSION

beide Proteinkinasen an der Architektur der Wurzel beteiligt (McLoughlin et al., 2012). Während die Proteinkinasen ohne Salzstress im Cytosol vorliegen, kommt es nach Salzbehandlung SnRK2.4:YFP-exprimierender Arabidopsis Keimlinge zur Akkumulation des Fluoreszenzsignals in membranhaltigen punktuellen Organellen (McLoughlin et al., 2012). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die SnRK2.4 und SnRK2.10, im Gegensatz zu SnRK2.6, mit der membrangebundenen Phosphatidsäure (PA) interagieren und diese Bindung entscheidend für ihre Funktion bezüglich des Wurzelwachstums ist (Julkowska et al., 2015). Für die SnRK2.1 und 2.5 sind keine physiologischen Funktionen beschrieben.

Im Gegensatz zur Gruppe II wurden die SnRK2s der Gruppe I, und insbesondere SnRK2.6, intensiv untersucht. SnRK2.2, 2.3 und 2.6 wurden als die wichtigsten Faktoren des Trockentoleranz, der Schließzellenregulation und der ABA-abhängigen Genregulation bekannt (Fujita et al., 2009; Fujii and Zhu, 2009). Aber auch SnRK2.7 und 2.8 sind funktionell eng mit den drei zuerst genannten verwandt und es konnte gezeigt werden, dass diese beiden an der Regulation der ABFs und ihrer Zielgene beteiligt sind (Mizoguchi et al., 2010). Während somit die Regulation der ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren für die SnRK2s der Gruppe I gut beschrieben ist, konnte in der hier vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Regulation dieser über die SnRK2s der Gruppe II beschrieben werden. Auf Grund der SnRK2-Aktivität nach Behandlung mit ABA oder durch osmotischen Stress wurde die, über die SnRK2s vermittelte, Induktion der Genexpression in einen ABA-abhängigen und einen ABA-unabhängigen Weg geteilt (Boudsocq et al., 2004; Kobayashi et al., 2004). Dennoch zeigen die hier gefundenen Ergebnisse, dass Vertreter aus beiden Gruppen dieselben Transkriptionsfaktoren aktivieren können. Da aktive Vertreter beider Gruppen über die gleichen PP2Cs inaktiviert werden (Abb. 5-4, Krzywińska et al., 2016) lässt sich die spezifische ABA-Aktivierung der Gruppe I SnRK2s nicht alleine durch ihre Inhibition durch ABA-abhängige PP2Cs erklären. Die unterschiedliche SnRK2-Aktivierung muss daher außerhalb der ABA-Signalkaskade gesucht werden. Während SnRK2.6 hauptsächlich durch die Interaktion und Inhibition der PP2Cs inaktiv gehalten wird und fähig ist, sich selbst zu aktivieren, zeigen die nah verwandten SnRK2.2 und 2.3 keine effiziente Autoaktivierung (Belin et al., 2006; Soon et al., 2012; Ng et al., 2011). Es ist daher anzunehmen, dass die Autoaktivierung der SnRK2.6 eine Besonderheit dieser ist und die anderen Mitglieder der Untergruppe I für ihre Aktivierung die trans-Phosphorylierung durch andere Proteinkinasen benötigen. So wird die Aktivität der SnRK2.2 und 2.3 durch die Proteinkinase BIN2/GSK3-like stark gesteigert, während SnRK2.6 auch ohne BIN2 hohe Autophosphorylierung und Aktivität zeigt (Cai et al., 2014). Im pSAR-TLA konnte die Transaktivierung der SnRK2.2 und 2.3 durch BIN2 nicht nachgewiesen werden (Abb. 2-12), was sich mit der unzureichenden Aktivität von BIN2 in Hefe oder der unzureichenden Grundaktivität der SnRK2.2 und 2.3 erklären ließe.

Bei einem Vergleich der SnRK2.6 und SnRK2.10 Phosphorylierung nach osmotischer oder ABA-abhängiger Aktivierung konnte gezeigt werden, dass zwei Phosphorylierungsstellen, S171/S175 in SnRK2.6 und S154/S158 in SnRK2.10, für deren Aktivierung wichtig sind. Während es in der katalytisch inaktiven SnRK2.6-S175A zu keiner Phosphorylierung der Proteinkinase nach ABA oder osmotischer Behandlung mehr kam, wurde die katalytisch inaktive SnRK2.10-S158A nach osmotischer Behandlung immer noch trans-phosphoryliert (Vlad et al., 2010). SnRK2.6 und SnRK2.10 zeigen unterschiedliche Regulationsmechanismen bei denen, neben der Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen, auch die Phosphorylierung über andere PKs eine Rolle spielt. Die zugrundeliegenden Mechanismen der SnRK2-Aktivierung scheinen sich innerhalb der Proteinfamilie stark zu unterscheiden und von reiner Autophosphorylierung, wie es bei SnRK2.6 der Fall ist, bis zur obligaten Transphosphorylierung bei SnRK2.2 und 2.3 zu variieren (Abb. 3-3). Ob die aktiven SnRK2 der Gruppe II (2.1, 2.4 und 2.5) in Hefe fähig sind, sich selbst zu aktivieren oder durch Hefe-eigenen Proteinkinasen aktiviert werden, bedarf weiterer Studien. Insgesamt sind die Aktivierungsmechanismen der SnRK2-PKs, außer für SnRK2.6, noch wenig verstanden und das bisherige Verständnis der aktivierenden Mechanismen und ihr Einfluss auf die ABA-Signalkaskade noch unklar.

Integration des Ca²⁺-Signals in die ABA-Antwort über Ca²⁺-abhängige Kinasen

Die Ca²⁺-abhängige Proteinkinase CPK23 wurde in diversen vorherigen Studien als wichtiger Regulator der ABA-Signaltransduktion beschrieben (Pleißner, 2015; Czap, 2015). Bemerkenswert ist, dass CPK23 im transienten Protoplasten-Assay die ABA-Antwort stärker induzierte als es mit SnRK2.6 geschah. Dennoch konnte durch die Analysen in Arabidopsis-Protoplasten und durch *in vitro* Kinastudien schlussendlich nicht geklärt werden, inwiefern sich die Transaktivierung der ABFs durch CPK23 und SnRK2.6 unterscheidet und ob diese einer gegenseitigen Regulation unterliegen. In dieser Arbeit konnte die direkte Transaktivierung der ABFs mit CPK23, 21, 11 und 4 bestätigt werden, während es zu keiner Transaktivierung mit CPK22 kam. Die Aktivitäten der PKs scheinen spezifisch für ihre Substrate zu sein.

Interessanterweise zeigte die CPK23 weder in ihrer vollen Länge, mit Ca²⁺-bindender CML-Domäne, noch in der hyperaktiven verkürzten Form (ohne CML-Domäne) signifikante Transaktivierung der ABFs. Erst nach Modifikation des N-Terminus konnte CPK23 ABF2 transaktivieren (vgl. 2.3.3). Sowohl die N-terminale Fusion eines Proteins oder kurzen Peptides als auch die Deletion des N-Terminus über die ersten 19 AS hinaus oder die Pseudophosphorylierung einer potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle an S5 führten zu einer bemerkenswerten Steigerung der ABF-Transaktivierung mit CPK23 (Siehe Abschnitt 2.3.3). Durch den Verlust der N-terminalen Acylierungsstellen, an denen typischerweise die

DISKUSSION

Fettsäurereste der Myristinsäure und der Palmitinsäure angehängt werden und der Membranverankerung dienen (Dammann et al., 2003), konnte die CPK hingegen nur schwach aktiviert werden. Die regulative Funktion des N-Terminus konnte auch in Arabidopsis-Protoplasten bestätigt werden (Abb. 2-20). Die Regulation der CPK23-Aktivität mittels ihres eigenen N-Terminus konnte für die Familie der CPKs in dieser Arbeit zum ersten Mal beobachtet werden und erweitert das Verständnis der CPK-Regulation um eine weitere Facette. Viele der CPKs tragen einen verlängerten N-terminalen Bereich vor der Kinasedomäne (Abb. 5-6; Hrabak et al., 2003) und häufig wird dieser durch Fettsäuren modifiziert (Lu and Hrabak, 2013; Dammann et al., 2003). Auch das *Landsberg erecta* Homolog zu CPK23 (GCA2) lokalisiert an der Plasmamembran (Korte, 2009). Für die aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*) stammende StCPK5 wurde gezeigt, dass diese durch den Verlust der N-terminalen Myristoylierungs- und Palmytoylierungsstellen nicht mehr an die Plasmamembran lokalisiert, und ihr Substrat StRBOHB nicht mehr phosphorylieren kann (Asai et al., 2013). Der Austausch der N-terminalen Domäne zwischen der *Nicotiana tabacum* NtCPK1 und der Arabidopsis AtCPK9 führte zur Änderung der Substratspezifität der AtCPK9, wodurch diese das NtCPK1 Substrat RSG (*Repression of Shoot Growth*) phosphorylieren konnte (Ito et al., 2014; Ito et al., 2010). Beide Mechanismen wären auch für CPK23 denkbar. Durch die Modifikation des N-Terminus könnte die Membranverankerung dieser gestört werden, wodurch CPK23 in den Zellkern einwandern könnte, um dort sein Substrat ABF2 (oder andere ABFs) zu phosphorylieren. In diesem Falle sollte die Mutation des Membranankers (CPK23-vk-G2A-C3A) einen ähnlich starken Effekt auf die *in vivo* Aktivität haben wie die N-terminale Deletion oder Proteinfusion. Sowohl in Hefe wie auch in Protoplasten konnte nur ein geringer Effekt dieser Modifikation festgestellt werden (Abb. 2-19 und Abb. 2-20). Auch die sukzessiv steigende Aktivität der CPK23 Aktivität bei partieller Deletion des N-Terminus deutet darauf hin, dass dieser eine regulative Funktion, welche über die Membranverankerung hinausgeht, beinhaltet. Auch die Substratspezifität könnte durch die Modifikationen des CPK23 N-Terminus gestört sein. Im Gegensatz zur NtCPK1 (Ito et al., 2010) kommt es durch die Deletion des N-Terminus aber nicht zum Verlust sondern zur Induktion der Substrat-Phosphorylierung. Sollte die Änderung der Substratspezifität der Grund für die gesteigerte Aktivität der modifizierten CPK23 sein, würde es bedeuten, dass die N-Terminale Protein- oder Peptidfusion, die N-terminale Deletion und die Pseudophosphorylierung im N-Terminus alle den gleichen Effekt der gesteigerten Substratbindung hätten. Es erscheint unwahrscheinlich, dass ein so spezifischer Mechanismus wie die Substraterkennung durch so diverse Modifikationen erreicht werden kann.

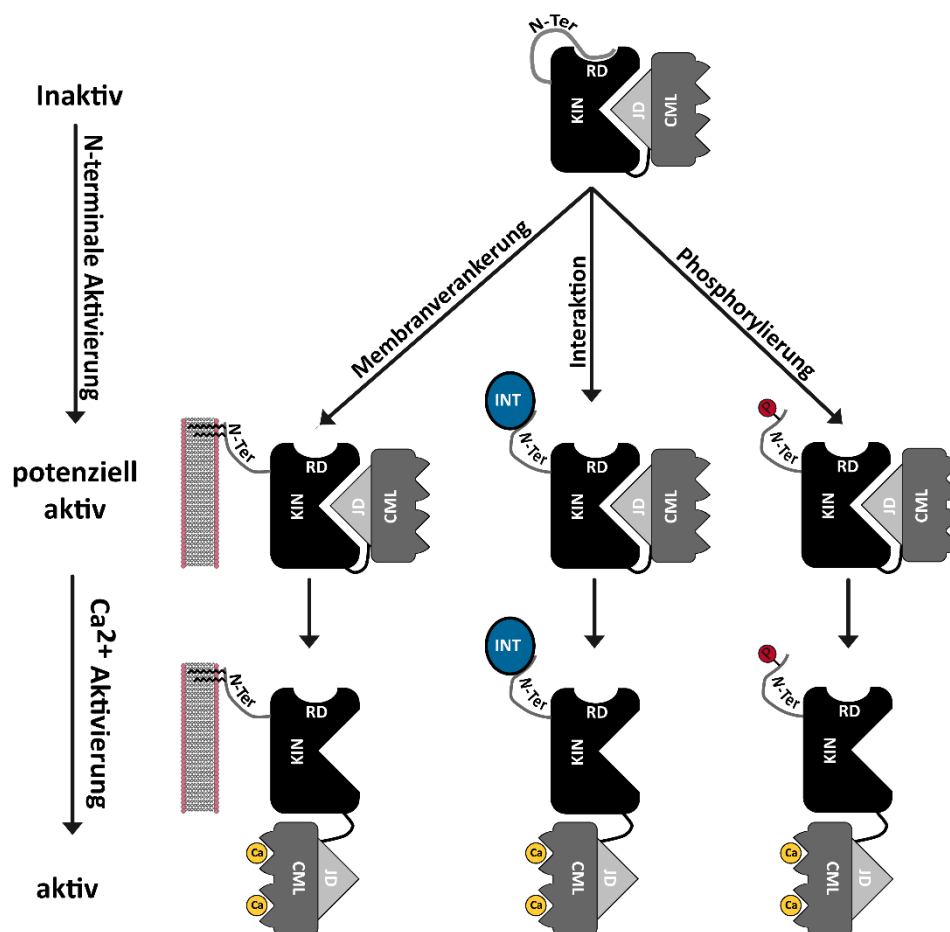


Abb. 3-4 Modell der CPK23-Aktivierung

Die Proteinkinase CPK23 besteht aus einer katalytischen Kinasedomäne (KIN, schwarz) und einer Ca²⁺ bindenden CML-Domäne (dunkelgrau). Zwischen den beiden liegt die inhibitorische *junction* Domäne (JD, hellgrau) die bei niedrigen Ca²⁺ Konzentrationen als Pseudosubstrat das aktive Zentrum der Proteinkinase blockiert (oben). Der flexible N-terminus (N-Ter) der Proteinkinase könnte an eine noch unbekannte regulatorische Domäne (RD) binden und so die Proteinkinase in der inaktiven Form halten. Durch ablösen des N-Ter aus der RD würde CPK23 in einen potenziell aktiven Zustand übergehen (Mitte). Dies könnte durch die Verankerung des N-Ter in der Membran (links), durch Protein-Protein Interaktionen (zentriert) oder durch Phosphorylierung des N-Ter (rechts) passieren. Erst nach dieser potenziellen Aktivierung würde es zur Ca²⁺ Aktivierung kommen können (unten).

Wahrscheinlicher ist es, dass der CPK23 N-Terminus neben der oben beschriebenen Membranverankerung eine regulatorische Funktion für die Kinaseaktivität des Proteins selbst hat. Über den molekularen Mechanismus kann aufgrund fehlender struktureller Information des N-Terminus allerdings nur spekuliert werden. Es wäre denkbar, dass der N-Terminus an eine noch unbekannte regulatorische Domäne (RD) bindet und diese blockiert, und die Proteinkinase so in einem inaktiven Zustand hält (Abb. 3-4). Durch Proteinfusion, Deletion des N-Terminus oder die Pseudophosphorylierung könnte diese Interaktion gestört werden, wodurch es zur potentiellen

DISKUSSION

Aktivierung der CPK kommt. An dieser intramolekularen Bindung könnten auch die N-terminal gebundenen Myristoyl- und Palmitoylreste beteiligt sein. Ein vergleichbarer Fall liegt bei der PKA (*Protein Kinase A*) vor. Hier wird der Myristoylrest in einer hydrophoben Bindetasche des Proteins gebunden und stabilisiert das Protein (Bastidas et al., 2012). Es wäre denkbar, dass CPK23 in der inaktiven Form stabilisiert wird.

Die Aktivierung der Proteinkinase wäre auf mehrere Arten denkbar. Durch die Verankerung des N-Terminus in der Plasmamembran, wie es für die nah verwandte CPK21 gezeigt wurde (Dammann et al., 2003), könnte der N-Terminus von der Kinasedomäne gelöst werden, womit die CPK potentiell aktiv wird (Abb. 3-4, links). Ähnlich wie bereits für die PKA oder die SnRK2.6 beschrieben, würde sich somit ein zweistufiger Prozess der Aktivierung ergeben, bei dem die Kinase erst durch die Ablösung des N-Terminus aus der RD in eine potentiell aktive Form gebracht wird, bevor sie durch die Ca^{2+} -abhängige Regulation aktiviert wird. Der gleiche Effekt könnte durch die N-terminale Proteinfusion in CPK23 eintreten. Durch die Protein- oder Peptid-Fusion könnte der N-Terminus nicht mehr an die Kinasedomäne binden, wodurch die potentiell aktive Konformation der CPK23 erzeugt würde (Abb. 3-4, mittig). Auch die Deletion des N-Terminus hätte einen ähnlichen Effekt zur Folge, da durch das Fehlen dieser Domäne die inaktive Form der Proteinkinase nicht mehr stabilisiert werden könnte (Abb. 3-4, rechts). *In planta* könnte der N-Terminus durch die Interaktion mit anderen Proteinen oder durch Phosphorylierung aus der RD gelöst werden. Während die erste Möglichkeit der N-terminalen Proteinfusion entsprechen würde, käme die Phosphorylierung des N-Terminus der CPK23-S5D Modifikation gleich, die im Gegensatz zur S5A Variante die Aktivität der Proteinkinase um ein Vielfaches steigert (Abb. 2-19). Dass dieser Effekt mit der fusionierten GFP-CPK23-vk-S5D nicht auftrat, legt nahe, dass Proteinfusion und Pseudophosphorylierung den gleichen Prozess steuern. Zusätzlich zu dieser potentiellen Aktivierung könnte die CPK23 über Ca^{2+} aktiviert werden, womit sich ein zweistufiger Prozess der CPK-Aktivierung abzeichnet (Abb. 3-4, unten). Es bleibt zu klären, ob die N-terminale Regulation auch *in planta* eine ähnlich wichtige Regulation einnimmt wie in den beiden gezeigten transienten Reportersystemen. Durch Überexpression der entsprechend modifizierten Varianten würde es zur Expression einer konstitutiv hyperaktiven Proteinkinase kommen, die auch ohne Ca^{2+} oder ABA-Induktion die ABA-abhängige Genexpression induzieren würde und so zu einer dauerhaften Trockentoleranz dieser Linien führen könnte.

Ob die Induktion über Ca^{2+} für die volle Aktivität der Kinase nötig ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die wildtypische Version der CPK23 mit funktioneller CML-Domäne zeigte keine ABF-Transaktivierung (Abb. 2-15). Im Vergleich hierzu konnte in Frosch-Oocyten durch die Aktivierung des SLAC1-Ionenkanals gezeigt werden, dass die Volllänge der CPK23 ca. 80% der Aktivität der um die CML-

DISKUSSION

Domäne verkürzten CPK23-vk Aktivität aufwies (Geiger et al., 2010). Auch Ca^{2+} -abhängige Kinaseassays bestätigten diese hohe Basisaktivität der CPK23 von 40 - 80 % der maximalen Aktivität (Geiger et al., 2010; Pleißner, 2015). Ganz anders verhielt sich die eng verwandte CPK21, welche eine geringe Basisaktivität, aber eine hohe Ca^{2+} -abhängige Dynamik besitzt. So ist die Ca^{2+} -Sensitivität bei CPK23 mit einem K_D von etwa 3000 nM um ein Vielfaches höher als bei CPK21 (250 - 500 nM) (Pleißner, 2015). Im Gegensatz zu der, in Oocyten und *in vitro* gefundenen, starken basalen Aktivität zeigte die volle Länge der CPK23 im pSAR-TLA keine Aktivität. Anscheinend reicht das geringe Ca^{2+} -Level in Hefe (ca. 50 - 200 nM freies Calcium, Iida et al., 1990; Miseta et al., 1999) nicht aus um die CPK23 zu aktivieren. Auch durch die Erhöhung der externen Calciumkonzentration (Abb. 2-15) konnte die CPK23 nicht aktiviert werden. Es bleibt zu klären, ob die bisher durchgeführte Ca^{2+} -Induktion nicht ausreichend ist, um CPK23 zu aktivieren oder ob CPK23 in Hefe nicht durch Ca^{2+} aktivierbar ist. Die schwache Ca^{2+} -Dynamik der CPK23 könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich diese Kinase von ihrer Ca^{2+} -regulierten Form zu einer Ca^{2+} -unabhängigen PK entwickelt hat. Hier sollte der Vergleich mit CPK21 ein besseres Verständnis der Ca^{2+} -Regulation beider CPKs bieten. Es sollte auch beachtet werden, dass die simple Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration möglicherweise nicht ausreicht, um die CPKs *in vivo* zu aktivieren. Wie in allen Eukaryoten werden auch in Hefe die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen stark reguliert. In Hefe kommt es zu spatiotemporalen Erhöhungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Antwort auf diverse extrazelluläre Stimuli. Besonders bei der sexuellen Verschmelzung der Hefen in Antwort auf den α -Faktor, ein wichtiges Hefe-Pheromon, kommt es zum Ca^{2+} -Spiking (Iida et al., 1990). Auch durch hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, hyperosmotischen Schock oder Depolarisation der Plasmamembran kann die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration temporär gesteigert werden (Wiesenberger et al., 2007; Bonilla and Cunningham, 2002; Denis and Cyert, 2002). Durch den aktiven Ca^{2+} -Transport in den extrazellulären Raum oder in die Vakuole wird dieser Anstieg schnell kompensiert (Denis and Cyert, 2002). Es wäre möglich, dass eine solche kurzzeitige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nicht ausreichend für die CPK23-Aktivierung ist, bzw. die Proteinkinase nicht lange genug aktiv bleibt, um eine messbare ABF-Aktivierung zu erreichen. Möglicherweise ist der wiederholte Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, oder sogar eine spezifische Ca^{2+} -Signatur (vgl. Abschnitt 1.6.2) nötig, um die CPK23 zu aktivieren. Um einen kurzen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zu erreichen, könnte man natürliche Effektoren, wie den α -Faktor (Iida et al., 1990) nutzen. Wiederholte Applikation solcher Effektoren könnte aber zur Desensibilisierung der Hefe gegenüber dem Effektor führen. Methodisch einfacher wäre es dagegen über elektrische Stimuli eine Depolarisation der Membran zu erzeugen. In Hefezellen reichte schon die geringe Applikation von 2-9 V/cm externer Spannung aus, um einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zu erzeugen. Auch wiederholte

DISKUSSION

Spannungsapplikation führte zu keiner Desensibilisierung gegenüber dem Signal (Vilanova et al., 2011). Eine andere Option den Ca^{2+} -Einstrom zu regulieren, würden lichtgesteuerte Ionenkanäle bieten. Das CatCh-System, das auf den Licht-gesteuerten Kationen-Kanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) basiert, bietet die Möglichkeit die Ca^{2+} -Permeabilität der Membran durch Blaulichtimpulse kurzzeitig stark zu erhöhen (Kleinlogel et al., 2011). Durch Expression dieses Kationenkanals in der Plasmamembran könnte man den Ca^{2+} -Einstrom in der Zelle sowohl zeitlich wie auch räumlich präzise steuern. Die beiden zuletzt genannten Prozesse würden es ermöglichen spezifische Ca^{2+} -Signaturen in Hefe zu erzeugen und die Aktivierbarkeit der Ca^{2+} -abhängigen PKs in Antwort auf unterschiedliche Frequenzen an Ca^{2+} -Impulsen zu untersuchen (Dodd et al., 2010). Ein solches System hätte den großen Vorteil, dass die Reaktionen der Ca^{2+} -Sensoren auf eine spezifische Ca^{2+} -Signatur *in vivo* ohne den Einfluss sekundärer Komponenten untersucht werden könnte, und sich die Theorie der Ca^{2+} -Signaturen und der darin kodierten Informationen auf molekularer Ebene verifizieren ließe.

Als zweite Familie der Ca^{2+} -abhängigen Kinasen sind auch Mitglieder der CIPKs dafür bekannt, Einfluss auf die ABA-Signalkaskade zu nehmen. CIPK11/SnRK3.22 und CIPK14/SnRK3.15 wurden als negative Regulatoren der ABA-Antwort in Arabidopsis-Protoplasten (Fuchs, 2013) und als zentrale Knotenpunkte des hormonalen *crossstalks* beschrieben (Lumba et al., 2014). Beide Proteine interagieren mit einer Reihe an PP2Cs und zeigen außergewöhnlich viele Interaktionen mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren. Darunter wurde auch der durch ABA-regulierte Transkriptionsfaktor HB6 gefunden, der als direktes Substrat von ABI1 beschrieben wurde (Himmelbach et al., 2002). Auch wenn für diese noch keine direkte Interaktion mit den ABFs beschrieben wurde, ließ die differenzielle Regulation ABRE-kontrollierter Gene in der *cipk14* KO-Linie (Qin et al., 2010) die Vermutung zu, dass auch CIPK14 und CIPK11 direkt an der Regulation der ABFs beteiligt sein könnten.

CIPK14 und CIPK11 agierten als negative Regulatoren der ABA-Antwort in Arabidopsis-Protoplasten (Abb. 2-29), aber als positive Regulatoren in ABA-Keimungsassays (Abb. 2-28). Diese kontroversen Daten werden auch in der Literatur wiedergespiegelt. Während die Transkription ABA-induzierte Gene in *cipk14* KO-linien reduziert war und diese Linien einen ABA-insensitiven Keimungsphänotyp aufwiesen (Qin et al., 2010), zeigten die *cipk14*- und *cipk11* KO-Linien einen ABA-hypersensitiven Keimungsphänotyp in den Studien von Lumba et al. (2014) und wurden als negative Regulatoren der ABA-Antwort beschrieben. Die in dieser Arbeit gezeigte differenzielle Regulation der ABFs, bei der CIPK14 als positiver Regulator von ABF4 und negativer Regulator von ABF1 agierte (Abb. 2-30), könnte die Diskrepanz der Phänotypen durch unterschiedliche Expression der ABFs erklären. ABF-Transaktivierungsstudien in Arabidopsis Protoplasten zeigten aber keinen Zusammenhang zwischen

der Kinaseaktivität der CIPK14 und der ABF4-Induktion besteht (Abb. 2-32) und auch im heterologen Hefesystem konnte keine Transaktivierung der ABFs oder des, als Substrat beschriebenen, Transkriptionsfaktors HB6 beobachtet werden (Abb. 2-33, Abb. 5-3, Lumba et al., 2014). Neben dem Einfluss auf die ABA-Antwort wurde CIPK14 auch eine Rolle in der Glucose-Sensitivität (Yan et al., 2014) und der Rotlicht-inhibierten Chlorophyllbiosynthese zugesprochen. Im zuerst genannten Fall konnte in *cipk14* KO-Linien durch hohe Glucose-Konzentrationen die Keimung deutlich stärker inhibiert werden als im WT, während in der zweiten Studie die gleiche Linie geringere Chlorophyllgehalte zeigte als der WT. Eventuell lassen sich die kontroversen Effekte auf die ABA-Antwort durch die Beeinflussung dieser Signalwege und Kreuzreaktionen zum ABA-Signalweg erklären.

Eine direkte Regulation der ABFs durch CIPK14 und CIPK11 erscheint unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten unwahrscheinlich. Neben der Regulation der ABFs wurde auch die Interaktion mit PP2Cs des ABA-Holorezeptors untersucht. Letztendlich konnte aber keine direkte Regulation der PP2Cs durch CIPK14 festgestellt werden (vgl. 2.5.3). PP2CA schien zwar spezifisch die CIPK14-CBL2 Autophosphorylierung zu unterdrücken (Abb. 2-35), aufgrund mangelnder funktioneller Substrate der CIPK14 konnte dieser Effekt aber nicht weiter untersucht werden. Letztendlich kann nicht gewährleistet werden, dass die in diesen Versuchen verwendeten hyperaktiven Formen der CIPK11/14, in Kombination mit CBL2, in den beschriebenen Transaktivierungsstudien aktiv sind. Es wäre durchaus denkbar, dass spezifische Ca^{2+} -Signaturen nötig sind, um CBL2-CIPK14 *in vivo* zu aktivieren. Die hier gezeigten Effekte der CIPKs lassen sich eher auf die Anwesenheit des Proteins zurückführen als auf die spezifische Phosphorylierung ihrer Substrate.

3.3 Rekonstruktion der ABA-Signalkaskade in Hefe

Nachdem die Bindung und Transaktivierung der ABFs durch verschiedene PK im pSAR-TLA erfolgreich demonstriert werden konnte (vgl. Abschnitt 3.2), sollte die Inhibition der SnRK2 durch Proteinphosphatasen (PP2Cs) und ihre Regulation über die ABA-bindenden RCARs in Hefe nachgestellt werden. Durch die Co-Expression von acht *clade A* PP2Cs (alle außer AHG1), welche als negative Regulatoren der SnRK2s beschrieben wurden, kam es zur Repression der ABF2-Transaktivierung bei Anwesenheit von SnRK2.6, während die PP2Cs keinen Einfluss auf das durch CPK23 transaktivierte ABF2 hatten (Abb. 2-38). Diese spezifische Inhibition der SnRK2s verdeutlicht die direkte Interaktion der SnRK2 mit der PP2C, während die Aktivität der Transkriptionsfaktoren oder die Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen CPKs durch die PP2Cs nicht beeinflusst werden.

AHG1 hat in der Familie der PP2Cs einen Sonderstatus, da es als einzige PP2C nicht das für die ABA/RCAR-Bindung und SnRK2.6-Interaktion wichtige Tryptophan trägt (Abb. 3-5). Kristallstrukturen von HAB1 im Komplex mit ABA und RCAR13 haben gezeigt, dass dieses Tryptophan als einzige AS der PP2C direkt an der ABA-Bindung beteiligt ist (Abb. 1-9) (Melcher et al., 2009; Zhang et al., 2015). Darüber hinaus ist diese AS auch an der PP2C-SnRK2.6-Interaktion beteiligt und sorgt für die richtige Positionierung der Aktivierungsschleife im aktiven Zentrum der Phosphatase (Soon et al., 2012). Durch die Valin-Substitution an dieser Stelle (Abb. 3-5) wird die AHG1-SnRK2.6 Interaktion geschwächt, wodurch sich die fehlende Inhibition der SnRK2.6 durch AHG1 in Hefe erklären ließe. Diese Sonderrolle wird auch durch AHG1-RCAR-Interaktionsstudien und durch *in vitro*

Phosphatase-Assays bestätigt. AHG1 interagiert im Y2H-Assay in Anwesenheit von ABA mit nur vier von 14 RCARs (1, 3, 5 und 9; Fuchs, 2013), und seine Phosphataseaktivität konnte durch sieben verschiedene RCARs nicht inhibiert werden (Antoni et al., 2012). Aktuelle Studien deuten aber darauf hin, dass AHG1 exklusiv mit RCAR1, 2, und 3 interagiert und mit diesen einen funktionellen Holorezeptor bilden kann (Tischer, 2016; Tischer et al., 2017). Auf Seite der SnRK2.6 konnte gezeigt werden, dass AHG1 mit SnRK2.6 zwar interagiert, diese aber nur schwach dephosphoryliert, während ABI1 die SnRK2.6 vollständig dephosphorylieren konnte. Im Gegensatz dazu konnte AHG1 die SnRK2.3 in ähnlicher Weise wie ABI1 dephosphorylieren (Umezawa et al., 2009). AHG1 wird besonders mit SnRK2.3, SnRK2.10 und ABI5 im trockenen Samen von Arabidopsis coexprimiert (Lynch et al., 2012). Zusammen mit RCAR1, 2 und 3 könnten diese Komponenten eine für den Samen spezifische ABA-Signalkaskade bilden und hier für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Dormanz verantwortlich sein.

Im pSAR-TLA wird weder CPK23 noch das durch CPK23 transaktivierte ABF2 durch die Proteinphosphatasen inhibiert. Interessanterweise wird SLAC1, nachdem es durch OST1, CPK21 oder CPK23 phosphoryliert wurde, durch ABI1 *in vitro* dephosphoryliert (Maierhofer et al., 2014; Brandt et al., 2015) und CPK23 oder CPK21 aktivierte SLAC1 Ionenströme werden durch die Anwesenheit von ABI1 in Frosch-Oocyten inhibiert (Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011). Allerdings kann hier nicht

	298	300		308	311
ABI1	KVTIQW	NGARV	FGV	LAMSR	SI
ABI2	...	R
HAB1	...	Q
HAB2	...	Q	S
HAI1	R	Y	D	P	L
HAI2	R	Y	D	...	L
HAI3	R	Y	DCP	...	L
PP2CAR	...	Y	D	...	L
AHG1	R	LVVD	...	E	I
Ident.	*:	:	**	*:	**

Abb. 3-5 Protein Alignment der PP2Cs

Das Alignment der PP2C Proteinsequenz zeigt, dass AHG1 als einzige PP2C der *clade* A kein Tryptophan an Position 290 trägt (Homolog zu ABI1-W300 oder HAB1-W385) welche sowohl an der ABA/RCAR, sowie der SnRK2.6 Bindung beteiligt ist. Darüber hinaus trägt AHG1 drei weitere einzigartige AS in diesem Bereich (L288, I298 und T300) die in den anderen PP2Cs konserviert sind.

DISKUSSION

zwischen der direkten Dephosphorylierung des Ionenkanals und der aktivierenden Kinase unterschieden werden. Die in dieser Studie gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ABFs, im Gegensatz zu cytosolischen Ionenkanälen, nicht durch PP2Cs dephosphoryliert werden, sondern es zu einer exklusiven Inhibition der SnRK2-Kinasen kommt. Ob die PP2Cs allerdings nur die Phosphorylierungsstellen der SnRK2.6 in ABF2 dephosphorylieren können und keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsstellen der CPK23 haben, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Dem RCAR-Protein kommt die hauptsächliche Aufgabe der ABA-Bindung zu. Dabei wird das ABA-Molekül in einer hydrophoben Bindetasche fast vollständig vom RCAR eingeschlossen. Lediglich ein Tryptophanrest der PP2C ragt in diese Bindetasche und ist an der ABA-Bindung als Co-Rezeptor beteiligt (Melcher et al., 2009). Die Affinität zwischen RCAR und PP2C wird durch die ABA-Bindung gesteigert, wodurch es zur Inhibition der katalytischen Aktivität der PP2C durch das RCAR kommt (Zhang et al., 2015). Für die Inhibition einer aktiven PP2C ist somit ein RCAR-Protein erforderlich. Quantitative Protein-Abundanz-Messungen in Arabidopsis zeigten, dass die PP2Cs in eher geringer Konzentration in der Zelle vorliegen, während die SnRK2.6 in fast fünffacher Menge vorkommt (Tabelle 3-1). Auffallend ist auch die hohe Abundanz der RCARs der Unterfamilie III, im Besonderen RCAR11 und RCAR12, welche 13,5-fach und 9,3-fach so häufig vorkommen wie ABI1. Anfängliche Versuche im pSAR-TLA zeigten, dass bei Verwendung der gleichen Promotoren für die Expression der SnRK2.6, ABI1 und RCAR11 die SnRK2.6-Antwort durch ABI1 nur auf ca. 10-20% reduziert werden konnte und mit

AGI	Protein	Protein Abundanz [ppm]	Verhältnis zu ABI1 [x-Fach]
AT3G50500	SNRK2.2	4.22	2.3
AT5G66880	SNRK2.3	5.78	3.2
AT4G33950	SnRK2.6	8.01	4.5
AT4G26080	ABI1	1.8	1.0
AT5G57050	ABI2	1.05	0.6
AT1G17550	HAB2	1.16	0.6
AT1G07430	HAI2	0.01	0.0
AT3G11410	PP2CA	0.28	0.2
AT5G51760	AHG1	0.29	0.2
At5g53160	RCAR3	0.04	0.0
At5g45860	RCAR5	1.14	0.6
At5g45870	RCAR6	0.02	0.0
At2g38310	RCAR10	2.57	1.4
At4g17870	RCAR11	24.3	13.5
At5g46790	RCAR12	16.7	9.3
At2g26040	RCAR14	0.68	0.4
ATCg00490	RBCL	154211	85672

Tabelle 3-1 Protein Abundanzen in *Arabidopsis thaliana*

Die Proteinabundanzen in Arabidopsis Pflanzen wurden mittels tandem MS bestimmt und in Relation zum gesamt Proteom in *parts per million* (ppm) angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Häufigkeit der einzelnen Proteine auf die Proteinabundanz von ABI1 bezogen und als x-Faches dieser dargestellt. PP2Cs und RCARs für die keine Daten vorhanden waren sind nicht gezeigt. Zum Vergleich wurde die große Untereinheit der RUBISCO (RBCL) mit aufgelistet.

Die Daten wurden der PaxDB⁴ entnommen (Datensatz: „*A.thaliana* - *Whole organism (Integrated)*“) (Wang et al., 2012).

DISKUSSION

RCAR11 und ABA auf nur 50% der ursprünglichen SnRK2.6-Aktivität angehoben werden konnte (Abb. 2-39). Durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren, welche die Expression der Signalkomponenten kontrollieren, konnte der durch ABA-regulierbare Bereich (dynamischer Bereich) der SnRK2.6 auf 95% erhöht werden (Abb. 2-43). In diesem optimierten System wurde die SnRK2.6 unter dem induzierbaren GAL1-Promotor, ABI1 unter dem konstitutiv aktiven GK1-Promotor und RCAR11 unter dem konstitutiv aktiven TDH3-Promotor exprimiert. Vergleiche der Promotorstärken dieser drei Promotoren, bei denen die Stärke der Promotoren über die Aktivität nachgeschalteter Fluoreszenzproteine quantifiziert wurde, zeigten, dass der GK1-Promotor der schwächste der drei Promotoren ist, gefolgt vom TDH3-Promotor (in etwa dreifach so stark wie pGK1) und dem voll induzierten GAL1-Promotor (etwa sechsmal so stark wie pGK1) (Lee et al., 2015). Es sollte aber beachtet werden, dass eine direkte Übertragbarkeit der Promotorstärke aus der Arbeit von Lee et al. in das hier beschriebene Hefesystem, aufgrund des unterschiedlichen Hefestammes und der Kultivierungsbedingungen, nur bedingt möglich ist. So zeigte der als zweitstärkste beschriebene CCW12-Promotor in Kombination mit ABI1 nur eine schwache SnRK2.6-Inhibition, während der als etwa gleich stark beschriebene TDH3-Promotor eine doppelt so starke Inhibition erreichte. Die Verbesserung des dynamischen Bereiches von 40 % auf 95 % zeigte jedoch die Notwendigkeit der richtigen stöchiometrischen Verhältnisse der Signalkomponenten.

Durch die Optimierung des dynamischen Bereiches der ABA-Regulation war es möglich, die ABA-abhängige Aktivierung des pSAR mit vollständig rekonstruierter ABA-Signalkaskade zu beobachten (Abb. 2-44). Die hierbei gemessene ABA-abhängige Aktivierung der SnRK2.6 und damit verbundene Inhibition von ABI1 durch RCAR1 und RCAR11 lag bei einer halb-aktivierenden externen ABA-Konzentration (AC_{50}) von 1,6 μM für RCAR1 und 12,6 μM für RCAR11. Auch wenn diese Werte keine Aussage über die absolute ABA-Affinitäten der Co-Rezeptoren zulassen, da die jeweilige intrazellulären ABA-Konzentrationen in Hefe nicht erfasst wurde, lassen sich die ABA-Affinitäten relativ zueinander gut vergleichen. *In vitro* Phosphataseassays bestätigen die stärkere ABA-Affinität von RCAR1 gegenüber RCAR11. Okamoto et al. (2013) beschrieben in Kombination mit HAB1 eine IC_{50} (inhibitorischen Konzentration für 50% PP2C Aktivität) von 64 nM mit RCAR1 und 307 nM mit RCAR11. Es ist nicht überraschend, dass die inhibitorischen Konzentrationen im *in vitro* System unter denen des heterologen *in vivo* Systems liegen, da die ABA-Verfügbarkeit hier nicht durch die Permeabilität der Plasmamembran oder intrazelluläre Transport- und Abbauprozessen gestört wird. Die Relation zwischen den *in vitro* gefundenen inhibitorischen Konzentrationen zwischen RCAR1 und RCAR11 deckt sich aber gut mit denen im pSAR-TLA bestimmten. Auch ABA-Titrations in Arabidopsis-Protoplasten

zeigen für RCAR11 eine AC_{50} zwischen 5 - 10 μM extern appliziertes ABA (Tischer, 2016) und entsprechen in etwa den im pSAR-TLA bestimmten externen ABA-Konzentrationen.

Inhibierungsstudien von ABI1 durch unterschiedliche RCARs zeigten, dass RCARs der Unterfamilie I ABI1 auch in Abwesenheit von ABA inhibieren können, während RCARs der Unterfamilie II und III für eine effiziente ABI1-Inhibierung ABA benötigten (Abb. 3-6). Interaktionsstudien zwischen RCARs und PP2Cs zeigten, dass ABA für die PP2C-RCAR Interaktion bei RCARs der Unterfamilie III und teilweise auch für die RCARs der Unterfamilie II obligat nötig ist (Fuchs, 2013). Auch Transaktivierungsstudien in Arabidopsis-Protoplasten bestätigen diesen Befund. Ein Vergleich des RCAR-Effekts in Arabidopsis-Protoplasten und im pSAR-TLA zeigt im Großen und Ganzen eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden (Abb. 3-6) und konnte die Notwendigkeit der ABA-Bindung für die Unterfamilie III bestätigen. Allerdings kommt es auch zu Unterschieden zwischen Hefe und Protoplasten. Im Falle von RCAR1, RCAR8 und RCAR9 zeigte sich eine sehr viel stärkere ABA-unabhängige Regulation in

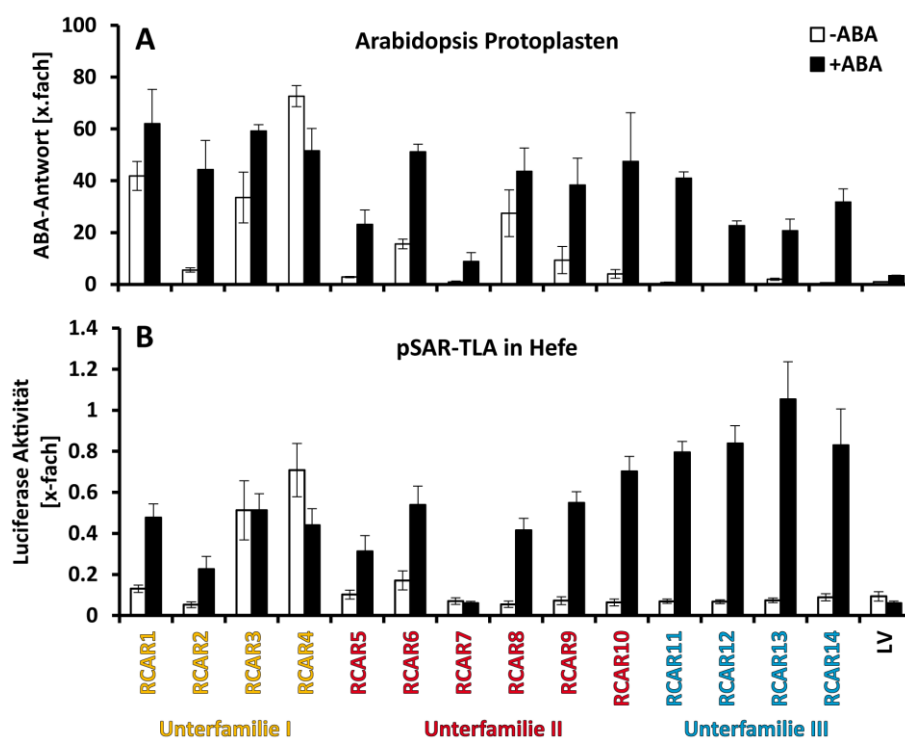


Abb. 3-6 Vergleich der RCAR abhängigen Regulation der ABA-Signalkaskade im pSAR-TLA und Arabidopsis Protoplasten

Der Effekt der RCARs auf die ABA-Signalkaskade wurde in Arabidopsis Protoplasten (A, (basierend auf Tischer, 2016)) und im pSAR-TLA (B) mit und ohne exogenes ABA (5 μM in A, 100 μM in B) untersucht. rLUC Werte in (A) wurden auf die LV Kontrolle ohne ABA normalisiert. rLUC Werte in B jeweils auf die Aktivität der Probe mit ABF2 und SnRK2.6 alleine (nicht gezeigt, entspricht 1, vgl. Abb. 2-45). Fehler zeigen in (A) die SD und in (B) das 95%ige Konf. Int. Die Protoplasten-Daten wurden von Stefanie Tischer zur Verfügung gestellt.

Protoplasten, als es im pSAR-TLA zu beobachten war. Durch spezifische posttranslationale Modifikationen in der pflanzlichen Zelle, oder Interaktionen mit anderen Faktoren wäre es möglich, dass die RCAR-Antwort in Protoplasten modifiziert wird, während in Hefe der Effekt der nicht modifizierten Proteine beobachtet wird. Die genaue Ursache solcher system-spezifischer Unterschiede könnte Aufschluss über bisher unbekannte RCAR-Regulationen erlauben.

3.4 Potential des heterologen Hefesystems

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Haupt-ABA-Signalkaskade, bestehend aus einem ABA-abhängigen Transkriptionsfaktoren (ABF), der aktivierenden Proteinkinase (SnRK2), der inhibitorischen Proteinphosphatase (PP2C) und der ABA-bindenden, regulatorischen Rezeptoreinheit (RCAR) in *S. cerevisiae* nachzustellen. Durch die erfolgreiche Induktion des synthetischen ABA-Responsepromotors (pSAR) nach ABA-Applikation in Hefezellen, die alle vier, für die Signaltransduktion nötigen, Komponenten exprimierten, konnte dieses Ziel erreicht werden. Durch einfache Kombination aller 14 RCARs mit den neun ABA-abhängigen PP2Cs wäre es möglich, die 126 (14 RCARs x 9 PP2Cs) möglichen ABA-Co-Rezeptorkomplexe auf ihrer ABA-Affinität in Hefe zu charakterisieren. In Kombination mit vier aktiven SnRK2s kann somit der Effekt von über 500 quartären-ABA-Signalkomplexe auf die Aktivität von vier ABF-Transkriptionsfaktoren untersucht werden (Abb. 3-7). Mit den bis zu diesem Stand verwendeten Komponenten der ABA-Signalkaskade würden sich so 2016 mögliche funktionelle ABA-Signalkaskaden ergeben (4 ABFs x 4 aktive SnRK2s x 9 PP2Cs x 14 RCARs). Durch die Verwendung unterschiedlicher ABA-Holorezeptoren konnte die spezifische Regulierung der ABA-Signaltransduktion durch einzelne Co-Rezeptoren in Abwesenheit und Anwesenheit von ABA oder anderen Liganden beobachtet werden (vgl. Abschnitt 2.6). Die im pSAR-TLA beschriebenen Charakteristika der Co-Rezeptoren spiegelten gut die in Arabidopsis-Protoplasten beschriebenen wieder und demonstrierten die Vergleichbarkeit der beiden Systeme (Abb. 3-6). ABA-Affinitätsstudien mit unterschiedlichen Co-Rezeptoren konnten durch die ABA-abhängige Induktion des pSAR-TLA eindeutig gezeigt und auch die erwarteten Affinitätsunterschiede zwischen RCAR-Proteinen der Unterfamilie I und III konnten bestätigt werden. Für die *in vivo* Bestimmung der enzymatischen Parameter ist die Bestimmung der intrazellulären Protein- und Liganden-Konzentrationen noch nötig (vgl. Abschnitt 2.6.5).

Darüber hinaus wurde auch die Regulation der ABFs durch vier Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen demonstriert, wodurch die Komplexität des heterologen Hefesystems um eine weitere Ebene erhöht werden kann.

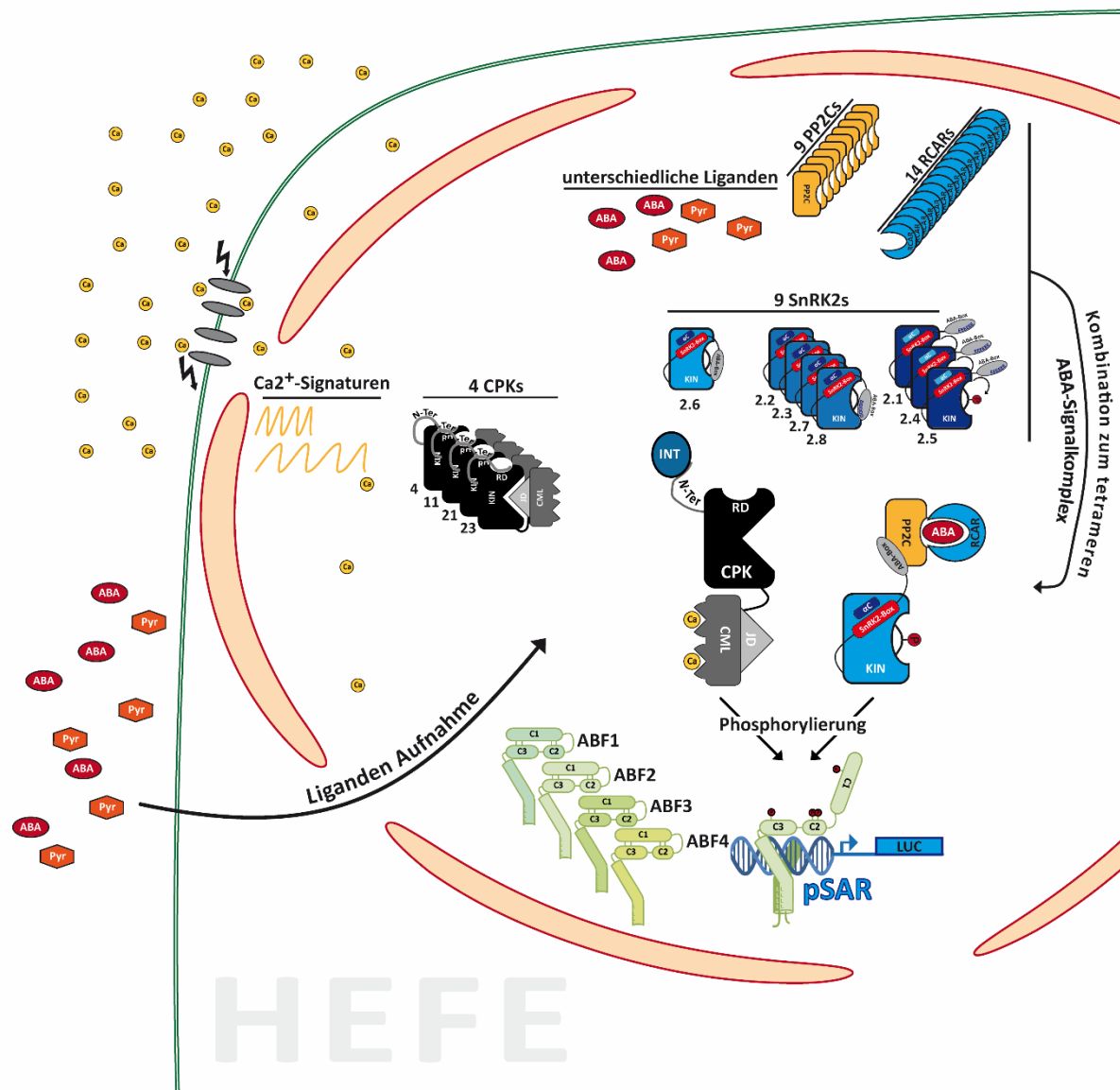


Abb. 3-7 schematische Darstellung der heterologen Rekonstruktion der ABA-Signalkaskade in Hefe

Durch Integration des ABA-Responsepromotors (pSAR) in Hefezellen und die transiente Expression der für die ABA-Signaltransduktion wichtigen Komponenten kann die ABA-Signalkaskade im Hefe nachgestellt werden. Durch die Kombination aus neun SnRK2s, neun PP2Cs und 14 RCARs können über 1000 tetramere ABA-Signalkomplexe auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, vier verschiedene ABFs zu transaktivieren. Darüber hinaus bietet das Hefesystem die Möglichkeit spezifische Phosphorylierung der Signalkomponenten durch aktive PK zu untersuchen. Neben den SnRK2s konnten die ABFs auch durch vier unterschiedliche CPKs transaktiviert werden. Durch die Co-expression beider Kinasen kann der synergistische Wirkung beider Faktoren auf die ABF-Aktivität untersucht werden. Darüber hinaus bietet das Hefesystem die Möglichkeit die Aufnahme und Wirkung von verschiedener Liganden (ABA, Pyrabactin; Pyr) des ABA-Signalkomplexes *in vivo* zu untersuchen. Durch spannungsregulierten Ca²⁺-Einstrom könnte die Regulation Ca²⁺-abhängiger Kinasen über spezifische Ca²⁺-Signaturen untersucht werden. Die einzelnen Komponenten sind analog zu den vorherigen Abbildungen dargestellt.

DISKUSSION

Zum ersten Mal war es möglich, die parallele Phosphorylierung von ABF2 durch die ABA-abhängige Proteinkinase SnRK2.6 und die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase CPK23 in einem nicht pflanzlichen *in vivo* System zu erforschen. Für beide Proteinkinasen konnten Hinweise auf bisher unbekannte intramolekulare Regulationsmechanismen gefunden werden. So konnte für CPK23 eine inhibitorische Funktion des N-Terminus beschrieben und in Arabidopsis-Protoplasten bestätigt werden, der für die Familie der CPKs bisher unbekannt war (vgl. Abschnitt 2.3.3) währenddessen für die SnRK2.6 eine neue inhibitorische Funktion der ABA-Box beschrieben wurde (vgl. Abschnitt 2.2.6). Neben der SnRK2.6 konnte auch für SnRK2s der Untergruppe II, die bisher nicht für ihre Funktion in der ABA-Signaltransduktion bekannt waren, eine Aktivierung der ABFs beschrieben werden. Die Regulation aller aktiven SnRK2s durch Komponenten des ABA-Holorezeptors wirft die Fragestellung auf, durch welche Mechanismen die selektive Induktion der Untergruppe I SnRK2s durch ABA (Boudsocq et al., 2004) in der pflanzlichen Zelle erreicht wird. Die Inaktivität der SnRK2.2 und SnRK2.3, die eng mit der SnRK2.6 verwandt sind und für die ABA-Antwort als essentiell beschrieben wurden (Fujita et al., 2009), wirft die Fragestellung nach den aktivierenden Prozessen dieser beiden Proteinkinasen im Unterschied zu SnRK2.6 auf. Letztendlich demonstrierte die Inaktivität der beiden PKs die Limitierung des heterologen Systems. Sind die für die Transaktivierung genutzten Proteinkinasen in ihrer Aktivität blockiert, wie es wahrscheinlich bei SnRK2.2/2.3 der Fall war, ist eine Analyse im heterologen System schwierig. Auch die inaktiven Formen der CPK23 (CPK23-vk-tk oder CPK23 ohne N-terminale Modifikation) zeigen eindrucksvoll, dass es zu keiner Hintergrundaktivität der Transaktivierung im pSAR-TLA kommt (vgl. Abschnitt 2.3.1).

Der pSAR-TLA konnte als wertvolle Ergänzung zu den bestehenden Untersuchungsmethoden im Bereich der ABA-Signaltransduktion etabliert werden und könnte wegweisenden Charakter für andere Forschungsfelder der Signaltransduktion haben. Darüber hinaus kann der pSAR-TLA als einfaches und schnelles *screening*-System genutzt werden, um unterschiedliche Liganden der ABA-Holorezeptoren zu finden und zu charakterisieren (Abb. 3-7). Erste Versuche der Rezeptorregulation mit ABA und dem funktionellen Homolog Pyrabactin wurden bereits unternommen und konnten unterschiedliche Bindeverhalten der beiden Liganden an einzelne Co-Rezeptoren zeigen (Abb. 5-7). Durch die Induktion des Ca^{2+} -Einstroms über Spannungsimpulse könnte zusätzlich die Regulation Ca^{2+} -abhängiger Kinasen in Hefe und ihr Einfluss auf die ABA-Signalkaskade untersucht werden (Abb. 3-7). Die Verknüpfung mehrere synthetischer Signalwege in einem heterologen System würde die Implementierung ganzer Signal-Netzwerke ermöglichen und könnte die Möglichkeit geben, die komplexen Wege im Bereich des Phytohormon-*Crosstalks* zu untersuchen (Nemhauser and Torii, 2016).

DISKUSSION

Das breite Spektrum an genetischen und molekularbiologischen Methoden, die Möglichkeit der eukaryotischen posttranslationalen Proteinmodifikationen und die einfache Kultivierung der Hefezellen haben das Potenzial, den pSAR-TLA als neue alternative Methodik im Bereich der ABA-Signalkaskaden-Forschung zu etablieren.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) und AppliChem (Darmstadt) bezogen.

4.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Gelelektrophorese-Netzteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Homogenisator	Fast-Prep 24	MP-Biomedicals
Inkubatoren	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshake	Gerhardt
Horizontalschüttler	Orbit LS	Labnet
Luminometer	Plate- CHAMELEON	Hidex
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
Mikroskope	HBO 50 Axioskop	Zeiss
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
NanoDrop-Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Gerät	Reprostar 3	Camag
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5242	Eppendorf
	Typ 5415R	Eppendorf
	Universal 16	Hettich
	Rotina 420R	Hettich

SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer	Protean Mini Tetra System	Biorad
Semi-dry Blotter	Trans-Blot SD	Biorad
Phospholuminescenc-Reader	Image-Quant LAS4000 mini	GE-Healthcare
Röntgenfilm-Reader	BAS-1800	Fujifilm

4.3 Software und Datenbanken

Für *in silico* Analysen wurden in dieser Arbeit folgende Software und online verfügbare Programme verwendet:

Name	Beschreibung	Adresse
TAIR	Zentrale Arabidopsis Datenbank	http://www.arabidopsis.org
ARAPORT	Zentrale Arabidopsis Datenbank	https://www.araport.org
NCBI BLAST	Protein und DNA-BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
BioGRID	Protein-Protein Interaktions-Datenbank	https://thebiogrid.org
Uniprot	Protein Datenbank	http://www.uniprot.org
PDB	Protein-Struktur Datenbank	http://www.rcsb.org/pdb
PlantTFDB	Datenbank für pflanzliche Transkriptionsfaktoren	http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/
PaxDB ⁴	Datenbank für Proteinabundanzen	http://pax-db.org/
GENTle (V. 1.9.4)	Software für <i>in silico</i> Molekularbiologie	http://gentle.magnusmanske.de/
Swiss Model	Proteinstruktur- und Motivvorhersagen	http://swissmodel.expasy.org/
Microsoft Office 2016	Text, Tabellen und Grafikbearbeitung	www.microsoft.com/DE/Office
R and R-Studio	Datenverarbeitung und Statistische Test (R-Studio, V. 0.99.491; R V. 3.2.3)	https://www.rstudio.com
Origin 2017	Curve-fitting und Statistische Auswertung (V. b9.4.0.220)	http://www.originlab.com/2017
Citavi	Literaturverwaltung (V. 5.5.0.1)	https://www.citavi.com/de
ImageJ	Bildbearbeitung und Auswertung	https://imagej.net

4.4 Verwendete Mikroorganismen und Pflanzen-Linien

Folgende Bakterien- und Hefestämme wurden in dieser Arbeit verwendet

Stamm	Organismus	Genotyp	Resistenz	Reverenz
DH5α	<i>E.coli</i>	<i>F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> <i>φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻</i>	keine	Invitrogen
XL1-blue	<i>E.coli</i>	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i>	Tetra-cyclin	Stratagene
TOP10	<i>E.coli</i>	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	Streptomycin	Thermo Fischer Scientific
Rosetta™ (DE3)pLysS	<i>E.coli</i>	<i>F⁻ ompT gal dcm lon? hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori_{p15A}](Cm^R)</i>	Chloramphenicol	Novagen / Merck
BMA64-1A	<i>S. cerevisiae</i>	MATa; ura3-1; trp1Δ 2; leu2-3,112; his3-11,15; ade2-1; can1-100	keine	http://www.euroscarf.de
pSAR-Reporterhefe (BMA64-1A)	<i>S. cerevisiae</i>	MATa; ura3-1; trp1Δ 2; leu2-3,112; his3-11,15; ade2-1; can1-100; <i>lys2::pSAR:LUC:tNOS</i>		diese Arbeit
AH109	<i>S. cerevisiae</i>	MATa, trp1-109, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	keine	Takara Bio USA (Clontech)

MATERIAL UND METHODEN

Folgende Pflanzenlinien wurden in dieser Arbeit verwendet

Organismus	Ecotype / Genotyp	Germplasm / Seed Stock
A. thaliana	Col-0 / WT	-
A. thaliana	Col-0 / cipk2-1	GK-031A02
A. thaliana	Col-0 / cipk11-1	SALK-108074
A. thaliana	Col-0 / cipk14-2	SALK-147899
A. thaliana	Col-0 / cipk11-1 x 14-2	Kreuzung aus SALK-108074 und SALK-147899, Homozygot
A. thaliana	Col-0 / 35S+S1:CIPK2-ka:tNos	(siehe Fuchs, 2013)
A. thaliana	Col-0 / 35S+S1:CIPK11-ka:tNos	(siehe Fuchs, 2013)
A. thaliana	Col-0 / 35S+S1:CIPK14-ka:tNos	(siehe Fuchs, 2013)

4.5 Analyierte Gene

Name	Synonym	AGI
ABF1		AT1G49720
ABF2	AREB1	AT1G45249
ABF3	DPBF5, DC3 PROMOTER-BINDING FACTOR 5	AT4G34000
ABF4	AREB2	AT3G19290
ABI5	GIA1	AT2G36270
HB6		AT2G22430
SnRK2.1	SRK2G, ASK2, SKP1-LIKE1	AT5G08590
SnRK2.2	SRK2D, SPK2-2	AT3G50500
SnRK2.3	SRK2I	AT5G66880
SnRK2.4	SRK2A, ASK1	AT1G10940
SnRK2.5	SRK2H,	AT5G63650
SnRK2.6	SRK2E, OST1, P44,	AT4G33950
SnRK2.7	SRK2F	AT4G40010
SnRK2.8	SRK2C	AT1G78290
SnRK2.9		AT2G23030
SnRK2.10	SRK2B	AT1G60940
CPK4		AT4G09570
CPK11	CDPK2	AT1G35670
CPK21		AT4G04720
CPK22		AT4G04710
CPK23		AT4G04740
CIPK2	SnRK3.2	At5g07070
CIPK11	SNRK3.22, PKS5	At2g30360
CIPK14	SnRK3.15, PKS24, ATSR1	At5g01820
CPK4		AT4G09570
CPK11	CDPK2	AT1G35670

MATERIAL UND METHODEN

CPK21		AT4G04720
CPK22		AT4G04710
CPK23		AT4G04740
BIN2	UCU1, SK21, DWF12, DWARF 12	AT4G18710
ABI1		AT4G26080
ABI2		AT5G57050
HAB1		AT1G72770
HAB2		AT1G17550
HAI1	SAG113	AT5G59220
HAI2	HONSU, AIP1, AIP1	AT1G07430
HAI3		AT2G29380
PP2CA	AHG3	AT3G11410
AHG1		AT5G51760
RCAR1	PYL9	At1g01360
RCAR2	PYL7	At4g01026
RCAR3	PYL8	At5g53160
RCAR4	PYL10	At4g27920
RCAR5	PYL11	At5g45860
RCAR6	PYL12	At5g45870
RCAR7	PYL13	At4g18620
RCAR8	PYL5	At5g05440
RCAR9	PYL6	At2g40330
RCAR10	PYL4	At2g38310
RCAR11	PYR1	At4g17870
RCAR12	PYL1	At5g46790
RCAR13	PYL3	At1g73000
RCAR14	PYL2	At2g26040

4.6 Kultivierung von Mikroorganismen

4.6.1 Kultivierung von *E.coli*

Bakterien wurden in *lysogeny broth* (LB)-Medium, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Für die Selektion auf Resistenzmarker wurden die folgenden Antibiotika in entsprechender Konzentration verwendet.

LB-Medium		Antibiotika	
Pepton	10 g/l	Ampicillin	100 µg/ml
Hefeextrakt	5 g/l	Kanamycin	25 µg/ml
NaCl	10 g/l	Spectinomycin	50 µg/ml
pH	7	Gentamycin	25 µg/ml
Agar (für fest Medium)	15 g/l	Chloramphenicol	34 µg/ml

4.6.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefekulturen wurden auf YPD-Platten (ohne Selektion) oder SD-Platten (mit Selektion) ausplattiert und aus einer Einzelkolonie in Flüssigkultur bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Die Kultivierung erfolgte je nach Anwendung in 100 ml oder 250 ml Erlenmeyerkolben oder 96-well

YPD-Medium	
Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l
pH	6,5
Agar (für Festmedium)	15 g/l
nach dem Autoklavieren steril zugeben	
Glucose	2 g/l

Mikrotiterplatten. Bei Verwendung von SD-Medium wurden je nach Applikation verschiedene Zuckerquellen genutzt. Für die Anzucht und Transformation wurde Glucose (Glu) verwendet, für die Messungen im pSAR-TLA Galactose (Gal) und für die rekombinante Proteinexpression eine Mischung aus Raffinose (Raff) und Galactose.

SD-Medium		10x Makrosalze:	
10x Makrosalze	100 ml/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10,24 g/l
1000x Mikrosalze	1 ml/l	KH ₂ PO ₄	10 g/l
pH	5,8	NaCl	1 g/l
Agar (für Festmedium)	20 g/l	CaCl ₂	1 g/l
nach dem Autoklavieren steril zugeben		(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g/l
10x Zucker-Quelle(Glu/Gal/Raff, 200 g/l)	100 ml/l		
AS-Dropout-Lösung (10x)	100 ml/l		
nach Bedarf 100xAS-Supplement (Supp)	10 ml/l		
1000x Mikrosalze		10x AS-Dropout Lösung (-Ura-Leu-His-Trp)	
Biotin	2 mg/l	L-Adenin Hemisulfatsalz	200 mg/l
Ca ²⁺ -Pantothersäure	400 mg/l	L-Arginin HCl	200 mg/l
Folsäure	20 mg/l	L-Isoleucin	300 mg/l
myo-Inositol	2 g/l	L-Lysin HCl	300 mg/l
Nicotinsäure	400 mg/l	L-Methionin	200 mg/l
p-Aminobenzoessäure	200 mg/l	L-Phenylalanin	500 mg/l
Pyridoxin-HCl	400 mg/l	L-Threonin	2000 mg/l
Riboflavin	200 mg/l	L-Tyrosin	200 mg/l
Thiamin-HCl	400 mg/l	L-Valin	1500 mg/l
Borsäure	500 mg/l		
Kupfersulfat	40 mg/l	AS-Supplements	
Kupfersulfat	40 mg/l	100x L-Histidin	2000 mg/l
Kaliumiodid	100 mg/l	100x L-Leucin	10.000 mg/l
Eisen-II-chlorid	200 mg/l	100x L-Uracil	2000 mg/l
Mangansulfat	400 mg/l	100x L-Tryptophan	2000 mg/l
Natriummolybdän	200 mg/l		
Zinksulfat	400 mg/l		

4.7 Arbeiten mit DNA

4.7.1 Plasmid Präparation aus *E. coli*

Für die Plasmid Präparation aus *E. coli* wurde das *NucleoSpin® Plasmid* oder *NucleoSpin® Plasmid Easy pure Kit* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.7.2 Plasmid Präparation aus *S. cerevisiae*

Für die Plasmid Präparation aus Hefezellen wurde 5 ml einer Übernacht-Hefekultur geerntet und in 1 ml Waschpuffer (10 mM EDTA, pH 8.0) gewaschen und anschließend in 600 µl Sorbitol Puffer (1,2 M Sorbitol, 10 mM CaCl₂, 100 mM Tris/HCl pH7,5, 35 mM frisches β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellwand mit 200 U Lyticase für 30 min bei 30 °C verdaut. Nach Ernten der Spheroplasten bei 2000 g erfolgte die Plasmid-Präparation parallel zur *E. coli* Plasmid-Präparation.

4.7.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsspaltung mittels Endonukleasen erfolgte mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem (Thermo Scientific) und unter entsprechenden Reaktionsbedingungen. Die Menge an Enzym (maximal 10% (v/v) des Reaktionsansatzes) und die Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge. Die Inkubationsdauer und Temperatur richtete sich nach den Herstellerangaben für das verwendete Enzym. Der Erfolg des Verdauens wurde mit einem Aliquot durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei einem präparativen Verdau wurde der gesamte Ansatz im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus diesem aufgereinigt.

4.7.4 Dephosphorylierung von DNA

Um nach Restriktionen von Vektoren eine Religation zu vermeiden, wurde der 5'-Phosphorylrest durch Zugabe 1U *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs) abgespalten. Das Enzym wurde nach Restriktionsverdau zum Reaktionsansatz pipettiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert.

4.7.5 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Ligation von Vektor und Insert DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von T4 DNA Ligase (Thermo-Fischer Scientific) nach Herstellangaben. In der Regel wurde ein molares Verhältnis von 1:3 (Vektor / Insert) verwendet. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde oder bei 16°C über Nacht (ü/N).

4.7.6 Golden-Gate Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der *klassischen* Klonierung auch das „Golden-Gate“ Verfahren zur Klonierung verwendet. Das Golden-Gate System basiert auf dem modularen Aufbau ganzer Expressionskassetten aus mehreren Teilen. Für die gerichtete Ligation der Elemente macht man sich dabei die benutzerdefinierte Generierung spezifischer „klebriger“-DNA-Enden durch die Verwendung von S2-Endonukleasen zunutze. Diese haben den Vorteil, dass sie außerhalb ihrer eigenen Erkennungssequenz schneiden und es so möglich ist, die geschnittenen DNA-Sequenzen flexibel zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde ein erweitertes System des durch Binder et al. (2014) publizierten Multigen-Expressionssystem verwendet. Durch die Erweiterung des Systems mit Hefe, Bakterien und Protoplasten-tauglichen Vektoren und sowie Hefe-typischen Promotoren und Terminatoren (Lee et al., 2015) konnte ein Organismenübergreifendes Klonierungssystem etabliert werden, mit dem es möglich ist, dieselben DNA-Elemente in verschiedenste Applikationen zu übertragen. Die Etablierung dieses Systems erfolgte in Kooperation mit David Chiasson (AG Parniske, LMU), dem an dieser Stelle großer Dank für die Zurverfügungstellung der Plasmide gilt. Die Methodik des Systems kann der Arbeit von Binder et al. (2014) entnommen werden.

Quick Cut-Ligation

Für die simultane Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten mittels Golden-Gate-Klonierung (Binder et al., 2014) wurden je 20-100 ng PCR-Produkt oder je 100 ng Plasmid-DNA in einem *Cut-Ligation* Ansatz mit dem entsprechenden Ziel-Vektor und

Cut-Ligation Cycle		
37°C	10 min	4 - 6 Zyklen
16°C	10 min	
65°C	20 min	

entsprechender S2-Endonuklease (Eco311/Bsal oder Bpil/BbsI, Thermo-Fischer Scientific) gemischt und im Thermocycler geschnitten und ligiert (*Cut-Ligation cycle*).

LI-Cut-Ligation		LII-Cut-Ligation	
Zielvektor [100 ng/μl]	1 μl	Zielvektor [100 ng/μl]	1 μl
PCR-Produkte [20 - 100 ng/μl]	je 1 μl	Plasmid-Elemente [100 ng/μl]	6 x 1 μl
Buffer G	1.5 μl	Buffer G	1.5 μl
ATP [10mM]	1.5 μl	ATP [10mM]	1.5 μl
Bpil [10 U/μl]	0.75 μl	Bsal [10 U/μl]	0.75 μl
T4 Ligase [5 U/μl]	0.75 μl	T4 Ligase [5 U/μl]	0.75 μl
H2O	auffüllen auf 15 μl	H2O	auffüllen auf 15 μl

4.7.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Flachbett-Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 - 2 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid vor dem Gießen versehen. Die elektrophoretische Auftrennung der in DNA-Ladepuffer (6% Glycerin, 10 mM EDTA, 0,025% Orange G, pH 8,0) gelösten Fragmente erfolgte mit 6 V/cm Elektrodenabstand in 1x TAE-Puffer bis zur gewünschten Auftrennung. DNA-Banden wurden durch Anregung der Fluoreszenz der Ethidiumbromid-DNA-Komplexe im UV-Licht nachgewiesen und fotografiert.

4.7.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde diese unter UV-Licht (322 nm) ausgeschnitten und mittels *NucleoSpin® PCR and Gel-Clean-up-Kit* aufgereinigt (Machery-Nagel). Für die Aufreinigung von PCR-Produkten entfiel der erste Schritt.

4.7.9 Polymerase Kettenreaktion

Mittels Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR) können Nukleinsäurebereiche selektiv vervielfältigt werden. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von einem Startmolekül, einem DNA-Oligonukleotid (Primer), einen neuen DNA-Doppelstrang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungszwecke wurde die *Phusion-Proofreading-Polymerase* (Thermo-Fischer Scientific) oder *Q5-Proofreading-Polymerase* (New England Biolabs) verwendet. Für die DNA-Analytik wurde die *GoTaq®*-Polymerase (Promega) verwendet. Der Reaktionsansatz erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

4.7.10 Kolonie-PCR

Für die schnelle Überprüfung von transformierten *E. coli*-Klonen wurde eine Einzelkolonie auf eine Replikaplatte übertragen und simultan in einem Kolonie-PCR-Ansatz gelöst. Die Anwesenheit der entsprechenden DNA-Fragmente wurde mittels Touch-Down-PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Kolonie-PCR-Ansatz		Touch-Down-PCR		
10x Pol-Puffer	4 µl	95°C	5min	
dNTP [10mM]	2 µl	95°C	30s	15x
Primer fw [100 µM]	0.1 µl	70°C (-1 °C/cycle)	20s	
Primer rev [100 µM]	0.1 µl	72°C	2 min	
Polymerase	0.1 µl	95°C	30s	30x
H2O	auf 20 µl auffüllen	55°C	20s	
		72°C	2 min	
		72°C	5 min	
		4°C	10 min	

4.7.11 Zielgerichtete Mutagenese (SDM)

Um einzelne Aminosäuren in Proteinsequenzen auszutauschen wurden die Plasmide mittels PCR zielgerichtet mutiert (SDM). Die dazu verwendeten Primer wurden nach dem Protokoll von Zheng (Zheng, 2004) entworfen und besitzen einen zueinander etwa 20 bp langen komplementären Bereich sowie einen etwa 10 bp langen nicht komplementären Bereich in 3' Richtung. Das Template Plasmid wird in der Reaktion komplett kopiert und durch die Primer die gewünschte Mutation eingefügt. Für die SDM wurde die Phusion-Polymerase (Thermo-Fischer Scientific) verwendet und 50 ng Template Plasmid eingesetzt. Das Ursprungplasmid wurde nach erfolgreicher PCR mit dem Restriktionsenzym DpnI für 2h bei 37°C geschnitten und 1µl des Ansatzes für die Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet. Ein Standard SDM Programm sieht wie folgt aus:

SDM-PCR		Program		
10x Phusion-HF-Buffer	4 µl	98°C	5min	
dNTP [10mM]	2 µl	98°C	20s	18x
Primer fw [10 µM]	1 µl	50 - 70 °C	20s	
Primer rev [10 µM]	1 µl	72°C	20 s/kb	
Phusion-Pol	0.1 µl	72 °C	5 min	
Template	50 ng			
H2O	auf 20 µl auffüllen			

4.7.12 Golden-Gate basierende zielgerichtete Mutagenese

Basierend auf der Arbeit von Binder et al. (2014) wurde zur Substitution einzelner AS in bestimmten Genen diese mit golden-Gate basierenden genspezifischen Mutagenese-Primern amplifiziert und die Substitution im Bereich der Bpil-Schnittstelle eingeführt. Durch die Amplifikation der Gensequenz vor und hinter der Substitution mit jeweils veränderter Bpil-Schnittstelle kann durch anschließende *LI-Cut-Ligation* ein mutiertes Genkonstrukt in den LI-Zielvektor eingebaut werden. Als Primerpaar wird jeweils ein elementspezifischer äußerer Primer mit einem Mutagenese-Primer kombiniert. Der Aufbau der elementspezifischen-Primer richtet sich nach dem zu klonierenden gen und kann der Publikation von

Binder et al. (2014) entnommen werden. Die inneren Mutagenese-Primer sind wie folgt aufgebaut. Die zu mutierende Base ist in **Fett** dargestellt. Die PCR-Fragmente wurden mittels Standard-*Proofreading*-PCR gewonnen und nach Gel-Reinigung in einem *LI-Quick-Cut-Ligation* Ansatz verwendet.

5'-Primer TAGAAGACAANNNN... (TA + Bpil + AA + 20-25 bp genspezifische Sequenz)
 3' Primer TAGAAGACAANNNN... (TA + Bpil + AA + 20-25 bp genspezifische Sequenz)

4.7.13 *Drag & Drop* Klonierung in Hefe

Die *Drag&Drop* Klonierung basiert auf der homologen Rekombination von DNA-Fragmenten in Hefe. Hierbei findet das pGREG-Vektorsystem Verwendung, welches eine breite Auswahl an Selektionsmarkern und genetischen Fusionen ermöglicht (Jansen et al., 2005). Für die *Drag&Drop* Klonierung werden an die zu klonierenden Gene mittels PCR kleine homologe Rekombinationssequenzen angehängt - sogenannte *rec-sites* - über welche die DNA nach Transformation der Fragmente und des linearisierten Ziel-Vektors in Hefe, durch die zelleigene homologe Rekombination in diesen eingebaut wird. Die zu verwendenden *rec-sites* können der Arbeit von Jansen et al. (2005) entnommen werden. Erfolgreiche Rekombinationsereignisse können über den Verlust des HIS3-Markergens mittels 5-Fluorooonsäure (5'FOA) oder Restriktionstestverdau der aus den transformierten Hefen gewonnen Plasmid-DNA überprüft werden.

4.8 Arbeiten mit Proteinen

Für die Charakterisierung der ABF2-Phosphorylierungsstellen, den Nachweis der Protein-Abundanz in Hefe und die Aktivitätsstudien der CIPKs wurde *E. coli* - (Rosetta) oder *S. cerevisiae* (BMA64-1A) zunächst mit den für die Expression entscheidenden Plasmiden transformiert und auf die Anwesenheit der Plasmide selektiert.

4.8.1 Proteinexpression und Proteinaufreinigung aus *E.coli*

Für die Proteinexpression in *E. coli* wurden der Stamm Rosetta™(DE3) pLys-S verwendet. Nach Selektion auf die pET24b-basierenden (erweitert um C-terminalen STREP-Tag) Expressionsplasmide wurden die Zellen 50 ml LB-Medium (mit Kanamycin und Chloramphenicol Selektion) angeimpft und über Nacht kultiviert. Die Proteinexpression erfolgte in 350 ml des gleichen Mediums. Nach Inokulation der Expressionskultur auf eine OD von 0,2 und anschließendem Wachstum bis OD 0,6 wurden die Zellen mit 1 % Lactose induziert und für 16 h bei 16 °C kultiviert. Die geernteten Zellen wurden mittels Ultraschall (100% Power, 9/10 cyclen, 4 x 1 min Aufschluss + 10 min auf Eis) aufgeschlossen und das

unlösliche Zellmaterial durch Zentrifugation (65.000g, 4 °C, 30 - 60 min) abgetrennt. Der wässrige Überstand wurde mittels eines 0,45 µm Staubfilter von unlöslichen Partikeln befreit und für die Proteinreinigung verwendet.

Die Reinigung erfolgte mittels STREP-Tactin-Superflow Säulen (IBA-GmbH, Göttingen) bei 4 °C. Nach Equilibrierung der Säulen mit 4 ml pH-10,5-Waschpuffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) bei 0,5 ml/min und anschließendem Spülen der Säulen mit pH-8-Waschpuffer (5 ml, 0,5 ml/min) wurde das Zelllysate mit 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nicht bindende Proteine wurden mit 10 ml pH-8-Waschpuffer ausgewaschen und die gebundenen Proteine mit 5 ml Elutionspuffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 2,5 mM Dasthio-Biotin, pH 8) von der Säule eluiert. Proteinproben aller Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE auf die Anwesenheit und Konzentration des gewünschten Proteins überprüft. Die Eluat-Fraktionen wurden auf 1 mg/ml Protein mit Waschpuffer eingestellt, mit 20% Glycerol versehen, und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.8.2 Proteinexpression in Hefe

Für die Proteinexpression in Hefe wurden die entsprechenden Expressionskonstrukte in pSAR-Reporterhefen transformiert und auf Anwesenheit der Plasmide selektiert. Für die Proteinexpression wurden 5 ml (für Westernblott und SDS-PAGE) oder 15 ml (Protein-Phosphorylierungs-Untersuchungen) selektives SD-Medium mit Raffinose als Zuckerquelle mit einer ü/N-Kultur auf OD 0,3 angeimpft und bis OD 0,5 - 0,8 kultiviert. Anschließend wurde die pGAL1-basierende Genexpression durch 1% Galactose induziert und die Zellen nach 6 h geerntet. Für die Analyse mittels denaturierender SDS-PAGE wurden die Zellen für 5 min in 0,1 M NaOH inkubiert und anschließend in 50 µl SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C lysiert.

Für die Messungen der Protein-Phosphorylierung wurden die Zellen in 10 mM EDTA, pH8 gewaschen und anschließend in vorgekühlten 600 µl *Yeast-Lysis-Buffer* (YLB) aufgenommen (Für spätere, in dieser Arbeit nicht gezeigte Phosphorylierungsstudien wurde ein

Yeast Lysis Buffer (YLB)	
Tris-HCL, pH 8	50 mM
DMSO	1 %
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
MS-HALT Phosphatase und Protease Inhibitor-Cocktail (Thermo-Fischer Scientific #78443)	1x

denaturierender UREA-YLB; 8M Urea, 50 mM Tris pH 8,5; 1 mM DTT; 1x MS-HALT Protease und Phosphatase Inhibitor verwendet). Nach Zugabe von 400 µl säuregereinigter Glaskugeln (0,2 mm Ø) wurden die Zellen im Homogenisator, für 4 x 20 s bei 4 m/s mit 1 min Kühlintervallen auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (20.000g, 4 °C, 20 min) wurde der Überstand für die Gesamtprotein-Bestimmung

verwendet (Bio-Rad Protein Assay, #500-0006; Nach Hersteller Angaben) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Protein-Phosphorylierungs-Untersuchungen erfolgten durch Dr. Martin Scholz (AG Hippler, WWU).

4.8.3 SDS-PAGE

Für die Proteinauftrennung wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell-System (Biorad) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Denaturierung der Proben in 1x SDS-Ladepuffer (95 °C, 5 min) in einem 15 %igen Trenngelen, überschichtet mit einem 4 %igem Sammelgel bei 60 - 100 mA pro Gel

Trenngel (15%), 500 ml		Sammelgel (4%), 100 ml	
Tris-HCL, pH 8,8	375 mM	Tris-HCL, pH 6,8	120 mM
SDS (w/v)	0,2 %	SDS (w/v)	1 %
Acrylamid (w/v)	15 %	Acrylamid (w/v)	4 %
Ammoniumpersulfat	0,1 %	Ammoniumpersulfat	0,6 %
Tetramethylethylendiamin	0,11 %	Tetramethylethylendiamin	0,2 %

für 1 - 1.5 h in SDS-Laufpuffer wie in Sambrook and Russell (2001) beschrieben. Als Größenstandart wurden 5 µl PageRuler® Prestained Protein Ladder (Thermo-Fischer) aufgetragen.

4.8.4 Antikörper basierender Protein-Nachweis

Nach Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-Page wurden diese auf eine Roti®-PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm, Roth) mittels Westernblott (Sambrook and Russell, 2001) bei 25 V in Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris-HCL pH 8,3; 192 mM Glycin, 10 % Methanol) übertragen. Anschließend wurden die freien Bindestellen der Membran mit Blockinglösung (5 % Milchpulver in TBST-Puffer) für 1 h bei RT abgesättigt. Die Anlagerung der Antikörper erfolgte entweder in der Blocking-Lösung oder nach 4-fachem waschen der Membran in TBST (jeweils 10 min) für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C. Wenn erforderlich erfolgte nach erneutem 4-fachen waschen die Anlagerung des sekundären Antikörpers. Anschließend wurde die Membran erneut vier Mal in TBST gewaschen und anschließend die detektierten Proteine mit 200 µl SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo-Fischer Scientific) mittels CCD-Kamera detektiert (ImageQuant LAS4000 mini, GE Healthcare).

Verwendete Antikörper	Verdünnung	TBST	
α-GFP from rabbit (Invitrogen #A11122)	1:3000	Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
α-FLAG from mouse (Sigma #F1804)	1:4000	NaCl	150 mM
Goat-anti-mouse:HRP (Biorad #172-1011)	1:4000	Tween20	0,05 %
Goat-anti-Rabbit:HRP (life technologies, #65-6120)	1:4000		

4.8.5 Kinaseassay

Die Auto- und *trans*-Phosphorylierung der CIPK-Proteinkinasen wurde mittels radioaktivem *in vitro* Kinaseassay bestimmt (modifiziert nach Pleißner, 2015). Hierzu wurden die entsprechenden Proteinkinasen, Substrate und eventuelle Proteinphosphatasen zusammen mit

Kinasepuffer	
Tris-HCl, pH8.0	20 mM
MgCl	5 mM
CaCl	1 mM
DTT	1 mM
ATP	10 μ M
γ - ³³ P-ATP	1 μ Ci

radioaktiven γ -³³P-ATP im Kinasepuffer gemischt und der Übertrag des γ -Phosphates auf die Substrate nach 1 h bei RT mittels anschließender SDS-PAGE und Detektion der radioaktiven Signale durch *Imaging*-Speicherphosphorplatten (Fuji) bestimmt. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte nach 1 - 16 h über den BAS-1800-Phosphor-Imager (Fuji). Die Eingesetzte Proteinmenge betrug jeweils 1 μ g in 20 μ l Reaktionsvolumen. Als unspezifisches Proteinsubstrat wurde *Myelin Basic Protein* (MBP) verwendet.

4.9 Arbeiten mit Hefe

4.9.1 Hefe-Transformation

Die Hefetransformation erfolgte wie durch Amberg et al. (2005) beschrieben. 50 ml selektives SD-Minimalmedium wurde mit einer \bar{u} /N-Vorkultur auf eine OD von 0.3 angeimpft und bis zu einer OD von 0.5 - 0.8 kultiviert. Nach Ernten der Zellen (1500g, 5 min, RT) und Waschen in H₂O wurden die Zellen in 100 mM Lithium-

Transformationsansatz (Einzel zugeben)	
PEG 4000 50%	240 μ l
1 M LiAc	36 μ l
Heringssperma-DNA (Sigma) (2 mg/ml in TE, pH 8)	50 μ l
Plasmid	jeweils 200 ng
H ₂ O	auffüllen auf 360 μ l

Acetat (LiAc) aufgenommen und auf 50 μ l aliquotiert, pelletiert und der Überstand abgenommen. Die pelletierten Zellen wurden nach Zugabe des Transformationsansatzes in diesem Resuspendiert, für 40 min bei 42 °C inkubiert und nach erneuter Ernte und Resuspension in Wasser auf selektive SD-Platten ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.9.2 Konstruktion des synthetischen-ABA-Responsepromotors (pSAR)

Der in dieser Arbeit generierte synthetische-ABA-Responsepromotor (pSAR) basiert auf dem durch Czap (2015) erzeugten 2x A-ABRE:-46 35S:LUC Reporterkonstrukt. Zusätzlich zu diesem wurde jeweils

ein weiteres wildtypisches oder mutiertes ABRE-tandem-Repeat Element in die NheI-Schnittstelle oberhalb des 2x A-ABRE Element mittels Oligoligation der entsprechenden Oligonukleotide (WT: #209/210; mut: #211/212) eingebracht und mittels Sequenzierung auf seine Orientierung kontrolliert. Die Sequenz des so entstandene pSAR, bestehend aus zwei ABRE-tandem-Repeats, dem -45bp-35S-minimal Promotor, dem LUC-Gen und dem NOS-Terminator ist im Anhang angegeben (siehe Abschnitt 5.7). Der pSAR wurde mittels NotI und Sall in den pIS385-LYS2-Desintegrationsvektor übertragen (Sadowski et al., 2007).

4.9.3 Integration des pSAR in Hefe

Für die Integration des pSAR in das Hefegenom wurde der mit NruI linearisierte pIS385:pSAR-Vektor (Sadowski et al., 2007) in den BMA64-1A Hefestamm transformiert und auf die Anwesenheit des *URA3*-Gens selektiert. Durch das Fehlen eines hefespezifischen *origin of replication* kann der Vektor transient nicht repliziert werden, und nur nach homologer Rekombination in das *LYS2*-Gen amplifiziert werden. *URA3* positive Einzelkolonien wurden auf SD-Medium (-URA) und YPD-Medium umplatiert und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Durch die Fehlende URA-Selektion auf den YPD-Platten kommt es zu einem zweiten Rekombinationsevent, bei dem der *URA3*-Marker aus dem Integrierten Konstrukt entfernt wird. Durch die negative Selektion auf den *URA3*-Marker mittels 5'-FOA (5-Fluoroonsäure, 1 mg/ml in SD-Medium), bei der durch die *URA3*-vermittelte Decarboxylierung aus 5'FOA das toxische 5'Fluorouracil entsteht, kann auf das zweite Rekombinationsereignis selektiert werden. Zur Kontrolle, auf erfolgreiche Integration des Reporters und Verlust des *URA3*-Markers, wurden Einzelkolonien auf YPD-Medium und SD-Selektionsmedium (-Lys) umplatiert. Hefen, die kein Wachstum ohne Lysin im Medium zeigen und auf 5'FOA-Platten wachsen können, haben den Reporter erfolgreich in das *LYS2*-Gen integriert und den *URA3*-Marker wieder verloren. Die korrekte Insertion des Reporters wurde mittels PCR mit *LYS2*-flankierenden Primern (Lys2 Yip-in, Lys2 Yip-out; #213/214) bestätigt und mittels Sequenzierung überprüft.

4.9.4 pSAR-Transaktivierungs-Luciferase-Assay (pSAR-TLA)

Messungen der Luciferase Aktivität in Hefe erfolgten *in vivo* basierend auf der Arbeit von Leskinen et al. (2003). Pro Messung wurden jeweils drei transformierte und auf Anwesenheit der Plasmide selektierte pSAR-Reporterhefen in 0,5 ml selektivem SD-Medium mit Glucose als Zuckerquelle angeimpft und ü/N bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Volumen auf 5 ml erhöht und die Zellen für weitere 4 h bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Von jeder Kultur wurde jeweils 1 ml geerntet und 1 ml für die Bestimmung der OD₆₀₀ verwendet. Basierend auf der

MATERIAL UND METHODEN

gemessenen Zelldichte wurden die geernteten Zellen auf eine OD₆₀₀ von 10 in H₂O eingestellt. Für die Messung der pSAR-Reporteraktivität wurde eine Messplatte (96-Well Multiwell Plate mit Deckel, *Flat-Bottom*, sterile; CytoOne) mit 245 µl selektivem SD-Medium mit Galactose als

Luciferin-Substrat	
Luciferin-Stock	
Phosphat-Puffer, pH 7,2	10 mM
D-Luciferin Kaliumsalz (Promega)	25 mM
Luciferin-Messpuffer (frisch)	
Citrat, pH 3	100 mM
D-Luciferin	1 mM

Zuckerquelle vorbereitet, um die Induktion der GAL1-basierenden Genexpression zu ermöglichen (i. d. R. stand die Transaktivierende Proteinkinase unter GAL1-Kontrolle). Bei Bedarf wurde das Medium mit ABA versetzt (2-cis-4-trans-(+)-Abscisinsäure, 5 mM Stock in 10 mM MES/KOH pH 7; London Bio Technology, China, <http://www.lomonbio.com>). Pro Replikat wurden je zwei Wells mit 5 µl der geernteten Kultur auf eine OD von 0,2 angeimpft und zeitgleich auf eine selektive Glucose haltige SD-Platte aufgetropft. Die Messplatte wurde mit einem sterilen atmungsaktiven Film (Breathe-EASIER™; DIVBIO, Dedham, US) verschlossen und bei 30 °C für 16 - 20 h und 200 rpm inkubiert.

Für die Bestimmung der LUC-Aktivität und der Zelldichte wurden am nächsten Tag je 100 µl der gewachsenen Kultur in eine Lumineszenz-taugliche Mikrotiterplatte (96-Well, PS, flat-Bottom, Weis, non-Binding, Greiner) und eine durchsichtige Mikrotiterplatte (96-Well Multiwell Plate ohne Deckel, *Flat-Bottom*; CytoOne) überführt und für die Messung verwendet.

Die Messung der LUC-Aktivität erfolgte im Platten-Luminometer (Hidex). Nach Messung der Hintergrundaktivität für 5s wurde die LUC-Aktivität nach Injektion von 100 µl frisch angesetztem Luciferin-Substrat für 5s als *counts per second* (cps) bestimmt. Die Zelldichte wurde bei 600 nm in Mikrotiterplatten mit 100 µl Kultur bestimmt (Abs₆₀₀). Eine Umrechnung zwischen Abs₆₀₀ und OD₆₀₀ ist in Abb. 2-6 zu finden.

Bei der beschriebenen Methode erreichen die induzierten Hefekulturen (pSAR-Reporterhefe mit ABF2 und SnRK2.6Δ320) eine Abs₆₀₀ von ca. 0,15 und eine absolute LUC-Aktivität von ca. 6x10⁵ cps nach 18 h Wachstum. Die Quantifizierung des LUC-Signals ist zwischen 1x10⁴ - 1x10⁷ linear von der Konzentration der Hefekultur abhängig und die Messung der Abs₆₀₀ zwischen 0,005 - 1,0 (Abb. 4-1). Der sicher zu quantifizierbare Bereich der Messung liegt daher zwischen dem 0,05 - 10-fachen der eingesetzten Hefekultur bzw. LUC-Aktivität.

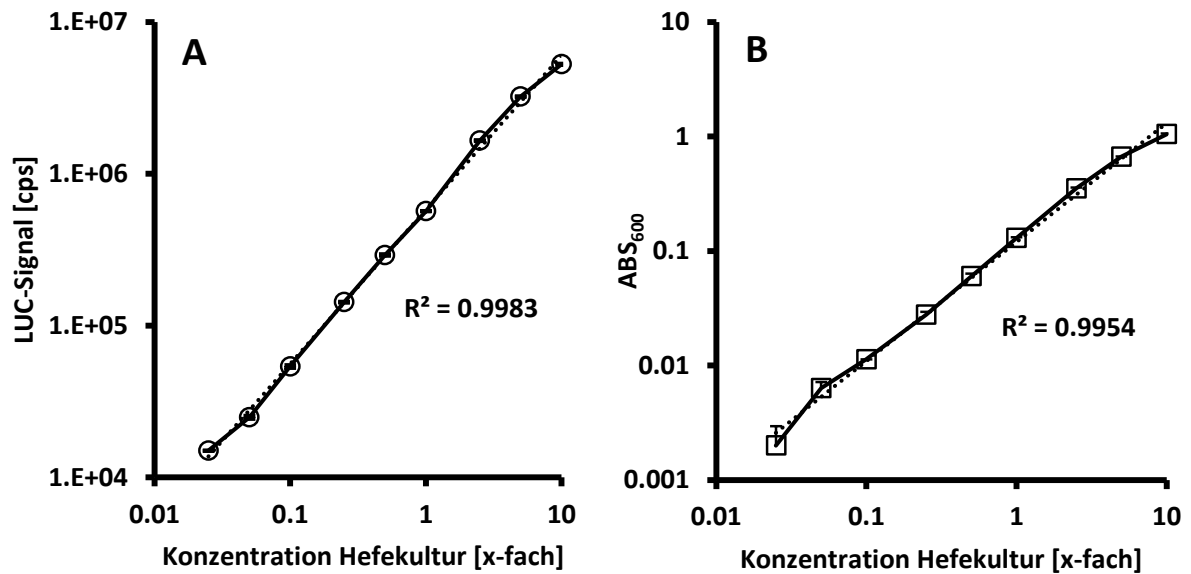


Abb. 4-1 Abhängigkeit des Luciferasesignals und der Abs₆₀₀ von der Dichte der Hefekultur

Um die Linearität des pSAR-TLA zu bestimmen, wurden eine für 18 h induzierte Hefekultur (pSAR-Reporterhefe mit ABF2 + SnRK2.6Δ320) auf das 10-fache ihrer Zelldichte aufkonzentriert und dann schrittweise bis zum 0,025-fachen der ursprünglichen Zelldichte verdünnt. Für alle Verdünnungsstufen wurde die LUC-Aktivität und die Abs₆₀₀ bestimmt und gegen den Verdünnungsfaktor aufgetragen. Beide Messungen zeigen zwischen dem 0,05 - 10-fachen der Hefekultur gute Linearität der Messung (R² = Korrelationskoeffizient). Fehler zeigen die SD aus jeweils drei technischen Replikaten.

4.9.5 pSAR-Bindestudien (Yeast one Hybrid Y1H)

Die ABF-pSAR Bindestudien wurden in Anlehnung an Nakamura et al. (2001) durchgeführt. Für die Bindestudien wurden die ABFs in den Y2H-Vektor pGAD424 (Clontech) kloniert und in pSAR-Reporterhefen transformiert. Durch die fusionierte Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) kommt es bei Bindung des Transkriptionsfaktors an den pSAR zur Induktion der nachgeschütteten Luciferase. Die Messung der LUC-Aktivität erfolgte wie für den pSAR-TLA beschrieben.

4.10 Arbeiten mit Protoplasten

Die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle zur Präparation und Transfektion von Arabidopsis Protoplasten basieren auf den Arbeiten von Abel and Theologis (1994). Für die Versuche mit Arabidopsis-Protoplasten (PP) wurde ein auf Yoo et al. (2007) basierendes und nach Tischer (2016) modifiziertes Protokoll verwendet.

4.10.1 Herstellung der Enzymlösung für die Protoplastenpräparation

Für die Herstellung der Enzymlösung wurden Cellulase und Mazerzyme in MES/KOH-Puffer mit 120 mg/l AEBSF gelöst und 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Enzymlösung in 28 mm Ø Dialyseschläuche gefüllt und gegen 5 L 10 mM MES/KOH pH 5,6 für 30 Minuten zwei Mal dialysiert. Nach der Dialyse wurden Mannitol, BSA und CaCl₂ zugegeben und das Volumen auf ein 1 L mit H₂O aufgefüllt. Nach vollständigem Lösen aller Komponenten wurde der pH auf 5.6 eingestellt die Lösung steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Enzymlösung	
MES/KOH pH 5.6	5 mM
Cellulase (Yakult, Japan)	1 %
Macerozyme (Yakult, Japan)	0,25 %
CaCl ₂	8 mM
BSA	0,6 %
AEBSF	ca. 2,5 nM

4.10.2 Protoplastenpräparation und Transfektion

Ca. 1,5 g abgeschnittene Rosettenblätter von 3-4 Wochen alten Arabidopsis Keimlingen wurden für 3 - 4 h Stunden in 20 ml Enzymlösung bei 25 °C und leichtem Schwenken verdaut. Anschließend wurden Blattüberreste mittels Filtration durch ein 200 µm Nylonnetz entfernt, das verbleibende Blattmaterial mit 10 ml W5-Lösung gewaschen und mit der restlichen Lösung vereinigt. Die PP wurden für 2 Minuten mit 60 g und minimaler Beschleunigung pelletiert, das Pellet in 10 ml W5-Lösung gewaschen, nach erneuter Zentrifugation in 5 ml MM-Lösung aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Anzahl lebender PP wurde in einem 50 µl Aliquot nach Färbung mit 0,5 µl Fluorezein Diacetat (5 mg/ml in Aceton) mittels Thoma-Zählkammer bestimmt und die gewonnenen PP wurden auf eine Zellzahl von 1 x 10⁶ Protoplasten/ml eingestellt.

PP-Transfektions-Ansatz	
Rd29B:LUC-Reporter (2 µg/µl)	3 µl
35S:GUS-Standart (2µg/µl)	2 µl
0.8M Manitol	15 µl
Modulator-DNA (1µg/µl)	x
Effektor-DNA (1µg/µl)	y
mit H ₂ O auffüllen auf	30 µl

Pro Probe wurden jeweils 3 Transfektionsansätze vorbereitet und in 2 ml Eppis vorgelegt. Für die Transfektion wurden 100 µl der eingestellten PP auf den Transfektionsansatz gegeben und mit 130 µl PEG-Lösung sofort durch sanftes, viermaliges Invertieren gemischt. Die drei technischen Replikate wurden in drei Runden unabhängig voneinander transfeziert. Nach ca. 7 min wurde die Transfektion mit 1 ml WIMK-Lösung abgestoppt, die PP bei 300 g für 2 min pelletiert und in 210 µl WIMK aufgenommen. Je 100 µl einer Probe wurden in einer 96-Well Mikrotiterplatte transferiert und mit oder ohne 5 µM ABA für 16 - 20 h bei 25 °C im Licht inkubiert.

MATERIAL UND METHODEN

W5-Lösung		MM-Lösung	
MES/KOH pH 5.7	2 mM	MES/KOH pH 5.7	5 mM
NaCl	154 mM	Mannitol	400 mM
CaCl ₂	125 mM	MgCl ₂	15 mM
KCl	5 mM		
WIMK-Lösung		PEG-Lösung	
MES/KOH pH 5.7	4mM	PEG 4000	40% PEG
Mannitol	500mM	Mannitol	200mM
KCl	20mM	CaCl ₂	100mM

Für die Messung der Reporteraktivität in PP wurden pro technischem Replikat jeweils 50 µl in schwarze (96-Well, PS, *flat-bottom*; schwarz, Greiner) und weiße (96-Well, PS, flat-Bottom, Weis, non-Binding, Greiner) Mikrotiterplatten transferiert. Für die Bestimmung der LUC-Aktivität wurden die Hintergrundaktivität der in weißen Platten vorgelegten PP für 5 s im Platten-Luminometer gemessen und nach Injektion von 100 µl PP-LUC-Substrat für 5s die LUC-Aktivität. Die GUS-Aktivität der in schwarzen Platten vorgelegten PP wurde nach Zugaben von 100 µl GUS-Substrat über den Umsatz des 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) bestimmt. Die kinetische Messung erfolgte bei 37 °C für 10 min.

PP-LUC-Substrat		GUS-Substrat	
Tricine/NaOH pH 7.8	20 mM	Phosphat-Puffer pH 7.0	50 mM
MgSO ₄	2,7 mM	EDTA	10 mM
EDTA	0,5 mM	DTT	1 mM
DTT	33,3 mM	Triton X-100	0,1 %
ATP	0,53 mM	4-Methylumbelliferyl-b-D-Glucuronid	0,5 mM
Magnesiumcarbonat	520 mg/l		
Coenzyme A	200 mg/		
D-Luciferin	150 mg/l		
Triton X-100	0,1 %		
partikelfrei filtriert.			

4.11 Arbeiten mit Pflanzen

4.11.1 Anzuchtbedingungen

Die Pflanzenanzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Nema oder Conviron, Kanada) unter Langtagbedingungen von 16 h Licht ($180 \mu\text{E m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22 °C, 50% Luftfeuchtigkeit) und 8 h Dunkelheit (17°C, 60% Luftfeuchtigkeit) in fein gesiebter Einheitserde (Typ 7) über einer Perlit Schicht.

Die Anzucht auf Agar-Platten erfolgte bei Dauerlicht ($60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22 °C).

4.11.2 Samensterilisation

Für die Sterilisation von Arabidopsis-Samen wurden diese für 20 min in 80% (v/v) Ethanol mit 0,1% (v/v) Triton-X-100 und anschließend 3 min in einer 3%igen (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung mit 0,1% (v/v) Triton-X 100 bei RT geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen der Samen mit H₂O wurden diese auf ½-MS-Platten ausgebracht.

MS-Medium	
MES/KOH pH 5,8	1 g/l
10x MS-Makrosalze	100 ml/l
400x MS-Mikrosalze	2,5 ml/l
Saccharose	10 g/l
Agar (für Festmedium)	9 g/l

MS-Makrosalze		MS-Mikrosalze	
KNO ₃	19 g/l	CuSO ₄ × 5x H ₂ O	0,01 g/l
CaCl ₂	3,32 g/l	Na ₂ EDTA	14,6 g/l
KH ₂ PO ₄	1,7 g/l	H ₃ BO ₃	1,2 g/l
MgSO ₄ × 7x H ₂ O	3,7 g/l	KI	0,3 g/l
NH ₄ NO ₃	16,5 g/l	MnSO ₄ × 4x H ₂ O	4 g/l
		Na ₂ MoO ₄ × 2x H ₂ O	0,1 g/l
		ZnSO ₄ × 4x H ₂ O	0,8 g/l
		FeSO ₄ × 7x H ₂ O	11,2 g/l
		CoCl ₂ × 6x H ₂ O	0,01 g/l

4.11.3 Keimungsversuche

Für die Analyse der ABA-abhängigen Keimung wurden sterile Samen auf ½-MS-Platten und unterschiedlichen ABA-Konzentrationen (2-cis-4-trans-(+)-Abscisinsäure, , 5 mM Stock in 10 mM MES/KOH pH 7; London Bio Technology, China, <http://www.lomonbio.com>) einzeln ausgebracht, für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert und die Keimrate nach 3 Tagen im Dauerlicht bestimmt. Pro Linie und ABA-Konzentration wurden drei Platten mit je 20 - 50 Samen gemessen. Die ABA-abhängige Keimrate wurde auf die Keimrate ohne ABA normalisiert.

5 ANHANG

5.1 AD-ABF4 Aktivierung

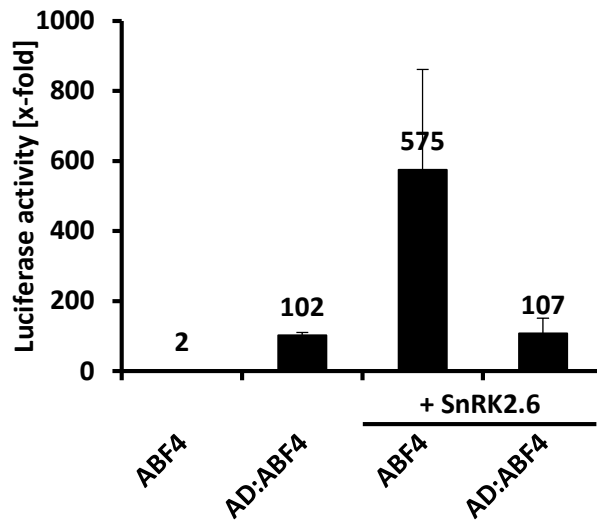


Abb. 5-1 Einfluss der ABF4-pSAR Bindung durch SnRK2.6

ABF4 oder AD:ABF4 wurden mit oder ohne SnRK2.6 in pSAR-Reporterhefen transformiert. Die relativen LUC-Werte wurden auf die jeweilige LV Kontrolle normalisiert (nicht gezeigt) und als x-Faches dargestellt. Fehler zeigen das 95%ige Konf.Int.

5.2 pHBBE-Reportersystem in Hefe

5.2.1 Galactose Induktionsreihe des pGAL1:AtHB6

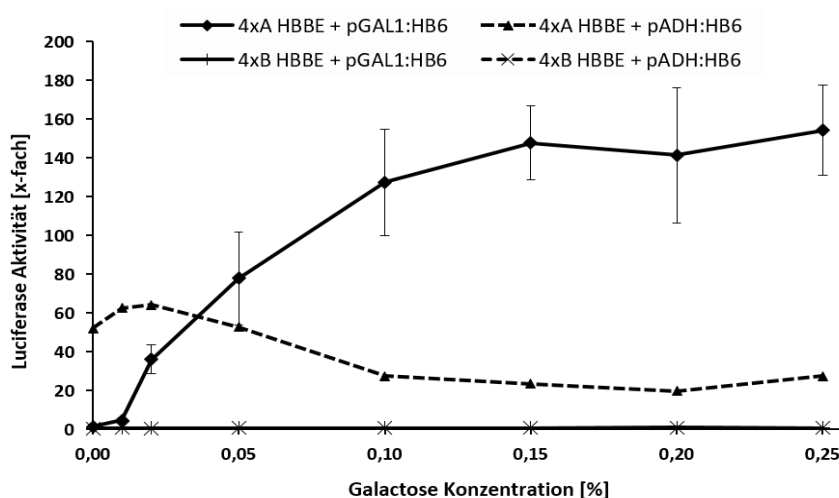


Abb. 5-2 pGAL1:HB6 Galactose Induktionsreihe in pHBBE-Reporterhefen

Die durch Czap (2015) beschriebene pHBBE-Reporterhefen mit integriertem funktionalem (4xA HBBE) und nicht funktionalem (4xB HBBE) Reporter wurden mit pADH:HB6 und pGAL1:HB6 transformiert. Nach Anzucht der Hefen in Glucose haltigem Minimalmedium bis zur exponentiellen Phase, wurden die pGAL1:HB6 Expression mit verschiedenen Konzentrationen an Galactose Induziert. Der Zuckergehalt wurde auf 2% (w/v) mit Raffinose aufgefüllt. Die Aktivierung des Reporters wurde indirekt durch die Aktivität der Luciferase bestimmt. Das Luciferasesignal der unterschiedlichen Kulturen wurde auf die Zelldichte bezogen und als x-Faches der Aktivität der 4x A HBBE + pGAL1:HB6 Kultur bei bei 0% Galactose dargestellt. Die Fehler zeigen die SD aus 5 Proben für pGAL1:HB6. Für pADH:HB6 ist n=1.

5.2.2 Transaktivierung von AtHB6 durch CIPK14 in Hefe

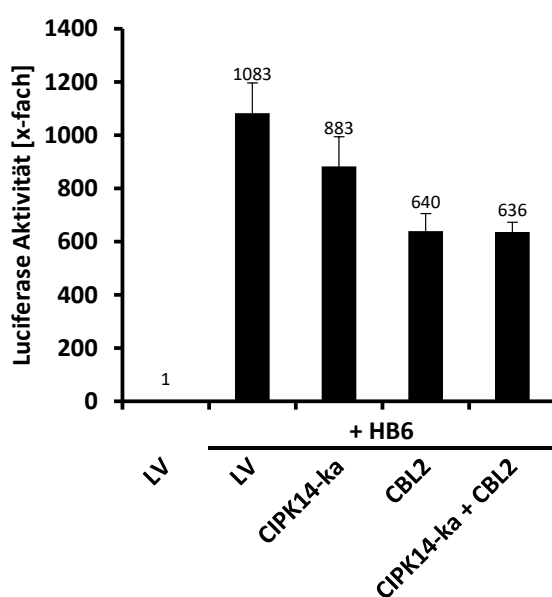


Abb. 5-3 Regulation von AtHB6 durch CIPK14 in Hefe

pHBBE-Reporterhefen wurden mit CIPK14-ka, CBL2 oder beidem, zusammen mit AtHB6 Cotransformiert. rLUC Werte wurden auf die Aktivität der mit LV transformierten Hefen normalisiert. Während die Transformation von AtHB6 zu einer deutlichen Induktion des pHBBE-Reporters führte, kam es durch die CIPK14-ka zu keiner signifikanten Regulation. CBL2 zeigte eine leichte Inhibierung der AtHB6 vermittelten Induktion, die sich bei Cotransformation von CIPK14-ka + CBL aber nicht änderte. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

5.3 ABA-abhängige Regulation der aktiven SnRK2s im pSAR-TLA

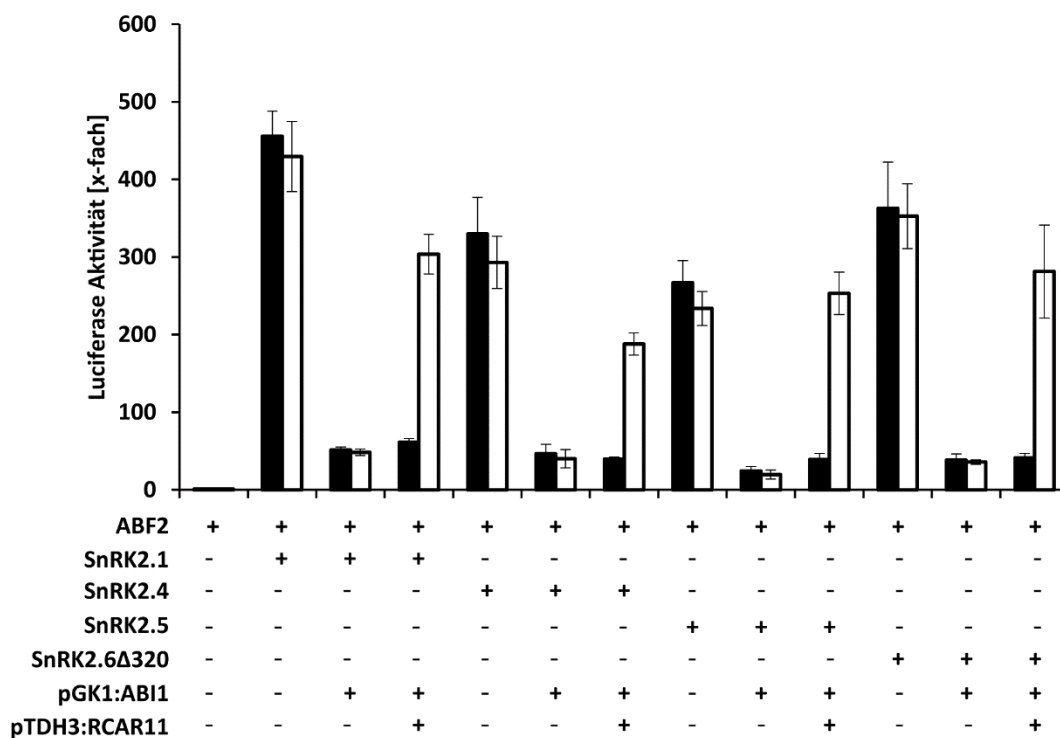


Abb. 5-4 ABA-abhängige Regulation der aktiven SnRK2s im pSAR-TLA

Die aktiven SnRK2s der Untergruppe II sowie SnRK2.6Δ320 wurden zusammen mit ABI1 und RCAR11 in ABF2 expremirende pSAR-Reporterhefen transformiert und mit und ohne 100 μM ABA gemessen. Die relativen rLUC-Werte wurden auf Hefen die nur ABF2 expremierten normalisiert und als x-Faches dieser dargestellt. Alle aktiven SnRK2s lassen sich in ähnlicher Weise durch ABI1 reprimierten und werden in Anwesenheit von ABA durch RCAR11 wieder aktiviert. Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int.

5.4 SnRK2 Protein Alignment

	P	P	Kinase	Nucleid binding	P	ATP Binding
SnRK2.6	MDRPA--VSG	PMDLPIHDS	DRYELVKDIG	SGNFGVARLM	RDKQSNELVA	VKYIERGEKI DENVKREIIN
SnRK2.2	..PATNSPIM	.I.....	..DF.....	T.RVTK.....Q.....
SnRK2.3	..AP-VTT	.L.M.....	..DF.....LTK.....D.....
SnRK2.7	-----	-----	M E..DILR.LK.V	E.ANG.FYL..H.Q.....
SnRK2.8	-----	-----	M E..I.....K.V	..F.K.F..F.....	Q.....H.Q..M.
SnRK2.4	-----	-----	M .K.....	A.....	KV.N.K.....	M.....P.....A.....
SnRK2.10	-----	-----	M .K.....	A.....	V.N.K.....	M.....P.....A.....
SnRK2.5	-----	-----	M .K.V..L	A.....L	H.ETK.....	M.....R.....A.....
SnRK2.1	-----	-----	M .K.DV..L	A.....L	H.DTK.....	M.....R.....A.....
SnRK2.9	-----	-----	M EK..M..L	F.....L.....	N..T.....	F.D..Y.....A.....
Identität			::*:::*:*:	*****:*:	: . * : *	::*:*:* ** ** *:*:*:*:

(Kinase)

SnRK2.6	HRSLRHPNIV	RFKEVILTPT	HLAIVMEYAS	GGELFERICN	AGRFSDEAR	FFFQQLISGV	SYCHAMQVCH
SnRK2.2SA	..Y.....I..
SnRK2.3ILS..I..
SnRK2.7	..D.K...I	..FV..AY.....G	YY.K.....I..
SnRK2.8	...I...I	...L..A	...L..A	...G..S	N...SL..I..
SnRK2.4	...I...I	...V..	...A..ASYI..
SnRK2.10	...I...I	...V..	...A..ASYI..
SnRK2.5	...I...IA	Y.....C	D...SL..I..
SnRK2.1	...K...ID..TA	Y.....C	D...SL..I..
SnRK2.9	..A.N...I	...V..	..G...ASS	V...A..	Y.....C	H.L..L..I..
Identität	** * *****	*****:*:	*::: *****	*****: **	***** *	::*:*:* **	* * *::*:*:

	(Kinase) site	Activation Loop	P	ABI1 INT	ABI1 INT	
SnRK2.6	RDLKLENTLL	DGSPAPRLKI	CDFGYKSSV	LHSQPKSTVG	TPAYIAPEVL LKKEYDGKVA DVWSCGVTLV	
SnRK2.2I..RQ.....L	
SnRK2.3RQ.....I	
SnRK2.7SSH..V.....SR...N..I	
SnRK2.8E..V..GTST...I	
SnRK2.4LRSRR...M	
SnRK2.10LMSRG...M	
SnRK2.5LRSRR...H	
SnRK2.1LISRR...H	
SnRK2.9NF CRS...SV	
Identität	*****	*** : : **	*****:	*** **:*	*****:*:	**:* ** *****:*:

(Kinase)

	ABI1 INT	ABI1 INT
SnRK2.6	VMLVGAYPFE	DPEEPKNERK
SnRK2.2Q..RDY..Q..S.T
SnRK2.3RDY..Q..S.K
SnRK2.7D.R.I.NQ..S.H
SnRK2.8SD..DG..KA
SnRK2.4Q.D.....QK.MA..
SnRK2.10Q.D...KQ..MA.K
SnRK2.5G.....DD.R...
SnRK2.1ND...NDQ..MA..
SnRK2.9KD.R...VQK.MA.N
Identität	*****	*****

ANHANG

	Domain I:	SnRK2 Box	Domain II: ABA-Box
SnRK2.6	K N L P A D L M N D N T M T T Q F D E S D Q-----P G Q S I E E I M Q I I A E A T V P P A G ---- --T Q N L N H Y L T G S L D I D--		
SnRK2.2	... G ... D E R . G S.. Q . P E ----- M .. L D T S .. I . T V R ---- -- N R C . D D F M A D N.. L ---		
SnRK2.3 E S N T G S .. Q . P E ----- M .. L D T S .. I . A V R ---- -- N R C . D D F M . D N.. L ---		
SnRK2.7	G P L V V P P E E E K C D N G V E.. E E E E E E K R .. V ... V K.. E .. R K G V N --- G T D N N G G.. G - L I D.. I . L ---		
SnRK2.8	... V E M Y E G S L. M N G P---- --ST. T V ... V W.. E .. R K.. I T V A T G L A G A G S G S S N. A I G S S ---		
SnRK2.4	... R E.. T E T A Q A A Y F K K.. N P --- T F S L.. T V ... K . V . D .. K T.. P V---- -- S R S I G G F G W. G N G D A D G		
SnRK2.10	... R E.. T E I A Q A A Y F R K.. N P --- T F S L.. V ... K . V E.. K T.. A R V ---- -- S R S I G A F G W. G G E D A E G		
SnRK2.5	... K E.. T E P A Q A A Y K R .. T P --- S F S L.. V . D .. K . V G.. R N.. A P S ---- -- S N A V K G F --- D D.. E E D V		
SnRK2.1	... K E.. L E S A Q A A Y K R D T --- S F S L.. V . D .. K . V G.. R N.. A P S ---- -- S A V K S S --- G S G A.---		
SnRK2.9	... R E.. K E P A Q A I Y Y Q R N V N L I - N F S P.. R V ... K . V G.. R T I . N L---- -- S R P V E S L G -----		
Identität	*. : *	* :: * : * : *	
(Domain II: ABA-Box)			
SnRK2.6	----- D D M E E D L E S D L D D L D I D S S G E I V Y A M----- --		
SnRK2.2	-----.. D -.. F D.. E - S E I .. V L ----- --		
SnRK2.3	-----.. D -.. F D.. E - S E I .. V L ----- --		
SnRK2.7	-----.. I D D A .. I Y D .. V .. D E E- R N.. D F.. C L ----- --		
SnRK2.8	----- S M D L D .. D T.. F .. I .--- T A D L L S P L----- --		
SnRK2.4	K E E D A E.. V E.. E E.. V E E E E D E .. E Y D K T .. K E V H A S - G E V R I S		
SnRK2.10	K E E ---.. A E.. V E.. V E E E E D E .. E Y D K T .. K Q V H A S M G E V R V S		
SnRK2.5	E D E V E E E E.. E E.. E E E E E E E .. E Y E K H .. K E A H S C Q E P P K A -		
SnRK2.1	---- E E E E E D V E A .. V E E E E D E .. E Y E K H .. K E A Q S C Q E S D K A -		
SnRK2.9	---- S .. K K D D .. E .. E Y.. A N E E W Y D D Y A----- --		
Identität	. : .		

Abb. 5-5 Aminosäure Sequenz Alignment der SnRK2-Familie

Die Aminosäuresequenz der SnRK2-Familie wurde untereinander über den Clustal-W Algorithmus aligned und basierend auf ihrer Homologie zu SnRK2.6 angeordnet (vgl. Abb. 2-9). Bekannte SnRK2.6 Phosphorylierungsstellen und Funktionale Domänen sind über der Sequenz angegeben. Positiv geladenen Aminosäurereste sind in Rot, negativ geladenen in blau und aliphatische in grün dargestellt. Punkte indizieren gleiche AS wie in SnRK2.6, Stricke eine Lücke. Sterne unter den Sequenzen indizieren Homologie in allen Sequenzen, Doppelpunkte starke Ähnlichkeit, Punkte Ähnlichkeit.

5.5 CPK/CDPK Protein Alignment

CPK1	-----MGNTCVGSPSRNGFLQSVSAAMWRPRDGDSDASMSNGDIASEAVSGELRS-RLSDEVQN	57
CPK2	-----MGNACVGPNI SGNGLQTVTAAMWRPRIGAEQASSSSHGNGQVSKAAASEPATDQVQN	58
CPK3	-----MGHRHSKSKSSDPPPPSSSSSSSGNVVHHVKPA-----GERRGSSG	40
CPK4	-----	-
CPK5	-----MGNSCRGSPFKDKLDEGDNNKPEDYSKTSTTNLSSNSDHSNAAD-----IIAQEF SK	52
CPK6	-----MGNSCRGSPFKDKIYEGNHSRPEENSKSTTTTVSVHS P-----TTDQDF SK	46
CPK7	-----MGN---CCGNPSSATNQSKQKPKNKNNPFYS-----NEYATTD R	37
CPK8	-----MGN---CCASPGSETG-SKKGKPKIKSNPFYS-----EAYTTNG-	35
CPK9	-----MGNCF AKNHG-LMKPQQNGNTRRSVEVGTNQ-----DPPSYT PQ	39
CPK10	-----MGNCNACVRPDSKESKPSKPKKPNRDRKLN P-----FAG-DFTR	39
CPK11	-----	-
CPK12	-----	-
CPK13	-----MGN---CCRSPAAVAREVKSNSYSGHDHARKD-----AAG---GK	34
CPK14	-----MGN---CCGTAGSLIQD--KQKKGFKLPNPF S-----NEYGNHHD	35
CPK15	-----MG-CFSSKHRNTESDIINGSVQSSIPTNQPEN-----HVS RDVLK	39
CPK16	-----MGLCFSSAAKSSGHNRSRPNHPHPPLTVVKS RPPRS PCSEMAVTIQKDHRTQPRRNA	58
CPK17	-----MGNCCSHGRSDADNGDALENGAS-----ASNA-----ANSTGPTA	35
CPK18	-----MGLCF S-SPKATRRGTGSRNPNPDSPTQ GKAS-----EKVSNKNKK	40
CPK19	-----MG-CLCINLKKVKKPTPDISGEOQTEVKSRE-----ITPKEQPR	39
CPK20	-----MGNTCVGPNLNPNGLQSVSAAVWRNQKPDSDIKSSKDESSRKKNDK---SVNGDDSN	55
CPK21	-----MG-CFSSKHRKTQ---DGG-EKSI PINPVQT-----HVV---PE	32
CPK22	-----MGNCCGSKPLTASD-----	14
CPK23	-----MG-CFSSKHRKTQ---DGGERSIPIIPVQT-----HIVDQVPD	36
CPK24	-----MGS---CVSSPLKGSPPGKR PVRRRHSNSRT-----SSVPRFDS	37
CPK25	-----MGNVCVHMVNNCVDTKNSNWRPTDLIMDHPLK PQLQDKPPQPLMKNKDDDKTKLNDT	58
CPK26	-----	-
CPK27	-----MG-CFSSKELQQS-----	12
CPK28	-----MGVCF S-AIRVTGASSRRSSQTKS-----KAA P-TPI	31
CPK29	MLQNQHKTTKNQRNKNIGTKYFLRKKIMGFCFSKFGKSQTHEIPISSSDSSPPHHYQP-----LPKPTVSQ	67
CPK30	-----MGNCIACVKFDPDNSKPNQK-KKPPRGRQRNP-----YDDPDGLR	39
CPK31	-----MG-CYSSKNLQQS-----	12
CPK32	-----MGN---CCGTAGSLAQNDNPKKGRKKQNPFS-----IDYGLHHG	37
CPK33	-----MGNCLAKKYGLVMKPPQNG--ERSVEIENRRR-----S-----	31
CPK34	-----MGNCCSHGRSDSDN---KEEPR---PENG-----GGGVG-AA	30
CPK1	KPPEQVTMPKPGTDVETK---DREIRTESK-----PETLEEISLE-----SKPETKQETKS-----ET	107
CPK2	KPPEPITMPSSKTNPETKLPDLEIQPEEKKEKVLAEETKQKVVEESKQEVVPEESKREVVVQPESAKPETKSESKPETTKPET	143
CPK3	SGTVGSSGSGTGSSRS-----	56
CPK4	-----	-
CPK5	DNNSNNNSKDPALVIPLR-----	70
CPK6	QNTN-----PALVI PVK-----	58
CPK7	SGAG-----	41
CPK8	SGTG-----	39
CPK9	ARTTQQPEKPGSVNSQPPPWRA-----	61
CPK10	SPAPIRV-----	46
CPK11	-----	-
CPK12	-----	-
CPK13	KSAPIR-----	40
CPK14	G-----	36
CPK15	PQKPPSPQIPTTTQSNHHHQESKPVNQI-----	69
CPK16	TAKKTPTRHTPPHGKVRKVIS-----	80
CPK17	EASVPQSKHAPSPPP-----	51
CPK18	NTKKIQLRHQG-----	51
CPK19	QRQP---APRAKFQIVVQPHKLPPLPQP-----	65
CPK20	GHVSSSTVDPAPSTLPTPS-----TPPPPVKMANE-----EPPPKP-----	90
CPK21	HRKP---QTPTPKPMTQPIHQQ-----	51
CPK22	-----	-
CPK23	HRKP---QIPSP-----	45
CPK24	STNLSRRL-----	45
CPK25	HGDPKLLGKKEKPAQKQTSQ-----GQGGKCSDE-----	88
CPK26	-----	-
CPK27	-----	-
CPK28	DTKASTKRRTG-----	42
CPK29	GQTSNPTSNPQPKPKPAPPPPP-----	89
CPK30	THAPLR-----	45
CPK31	-----	-
CPK32	GGDGGGRP-----	45
CPK33	--THQDPSKISTGTNQPPWNRN-----	51
CPK34	EASVRASKHPASPPP-----	46

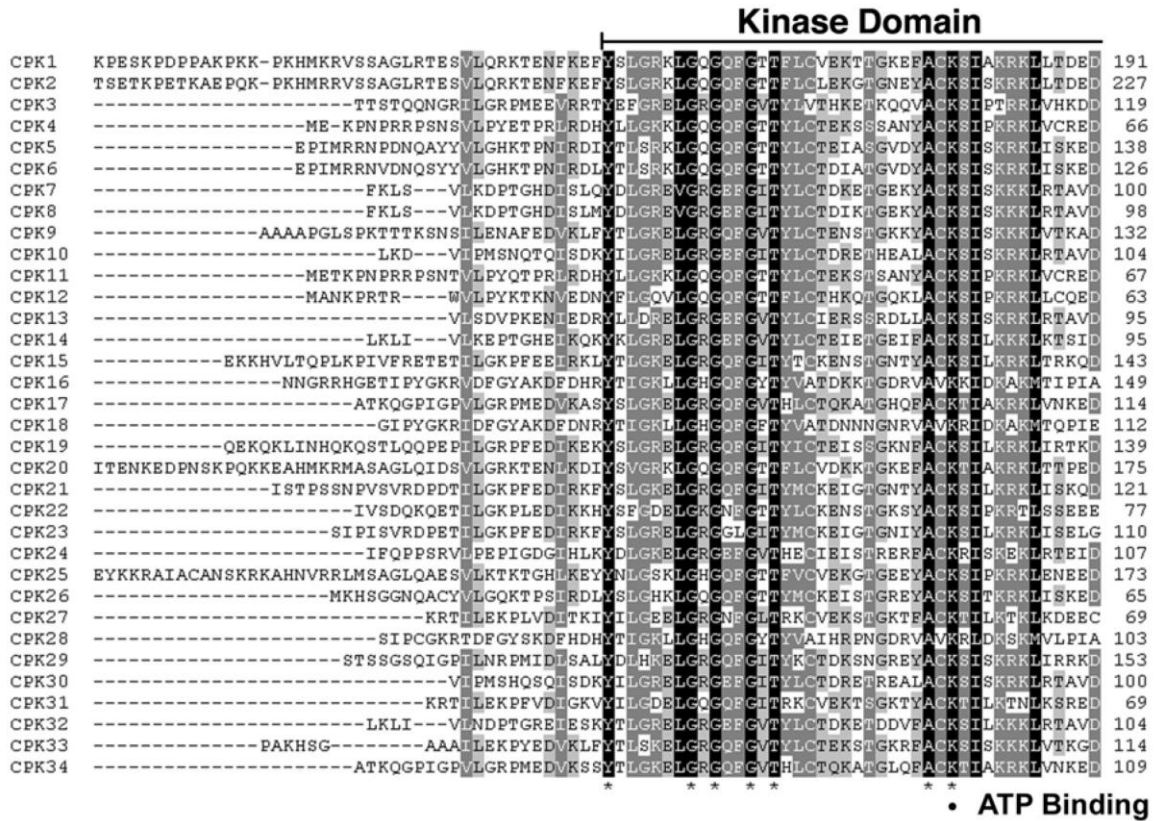


Abb. 5-6 Proteinallignment des CPK/CDPK N-Terminus

Die Proteinsequenz aller 34 CPKs/CDPKs wurde anhand über den ClustalW Allgoritmmus alligned. Dargestellt ist der N-terminale Bereich vor der Kinasedomäne.

Die Abbildung wurde durch Jen Sheen, *Department of Genetics, Harvard Medical School, Department of Molecular Biology*, bereitgestellt. [Online im Internet:] URL:

http://molbio.mgh.harvard.edu/sheenweb/cdpk_project.html; Stand 04.06.2017

5.6 ABA und Pyrabactin Titration im pSAR-TLA

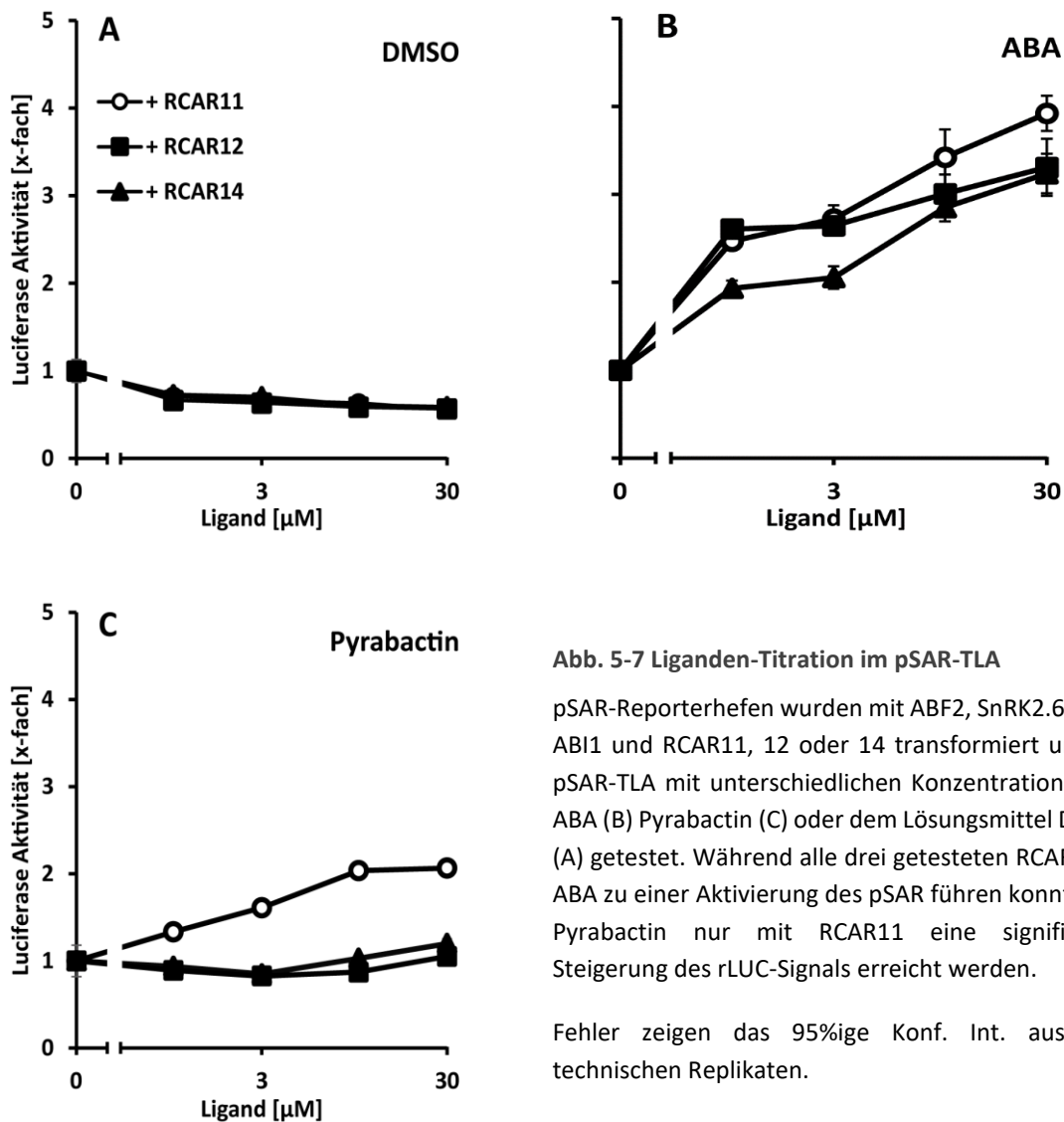


Abb. 5-7 Liganden-Titration im pSAR-TLA

pSAR-Reporterhefen wurden mit ABF2, SnRK2.6 Δ 331, ABI1 und RCAR11, 12 oder 14 transformiert und im pSAR-TLA mit unterschiedlichen Konzentrationen an ABA (B) Pyrabactin (C) oder dem Lösungsmittel DMSO (A) getestet. Während alle drei getesteten RCARs mit ABA zu einer Aktivierung des pSAR führen konnte mit Pyrabactin nur mit RCAR11 eine signifikante Steigerung des rLUC-Signals erreicht werden.

Fehler zeigen das 95%ige Konf. Int. aus vier technischen Replikaten.

5.8 Verwendete Plasmide

Tabelle 5-2 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Die Nummerierung bezieht sich auf die interne „Strainlist“ des Lehrstuhls für Botanik, AG Grill.

Für die im Golden-Gate verwendeten Plasmide sind nur die LI-Elemente aufgeführt. LII-Expressionskonstrukte wurden aus diesen erstellt.

interne Nr.	Organismus	Stamm	Vektor	Resistenz
Transkriptionsfaktoren				
5103	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG503ADHP ABF1	Amp,Kan, -HIS
5104	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG503ADHP ABF2	Amp,Kan, -HIS
6751	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG503:pADH:ABF3	Amp,Kan, -HIS
6750	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG503:pADH:ABF4	Amp,Kan, -HIS
4036	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG503-ADHP-ABI5	Amp,Kan, -HIS
7580	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S4D	Amp,Kan, -HIS
7581	<i>E.c</i>	DH5A α	pGREG503:pADH::ABF2 S26D	Amp,Kan, -HIS
7582	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 T31D	Amp,Kan, -HIS
7583	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S45D	Amp,Kan, -HIS
7584	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S94D	Amp,Kan, -HIS
7585	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S119D	Amp,Kan, -HIS
7586	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 T135D	Amp,Kan, -HIS
7587	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S4A	Amp,Kan, -HIS
7588	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S26A	Amp,Kan, -HIS
7589	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 T31A	Amp,Kan, -HIS
7591	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S94A	Amp,Kan, -HIS
7592	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S119A	Amp,Kan, -HIS
7593	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 T135A	Amp,Kan, -HIS
7594	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 T97A	Amp,Kan, -HIS
7595	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 T97D	Amp,Kan, -HIS
7596	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S116A	Amp,Kan, -HIS
7597	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S116D	Amp,Kan, -HIS
7598	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S119A	Amp,Kan, -HIS
7599	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 Y28A_S29A	Amp,Kan, -HIS
7600	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 Y28D_S29D	Amp,Kan, -HIS
7603	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S213A_S214A	Amp,Kan, -HIS
7604	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG503:pADH::ABF2 S213D_S214D	Amp,Kan, -HIS
3598	<i>E.c</i>	XL1blue	pBI221 35s ABF1	Amp
4502	<i>E.c</i>	XL1blue	psk 35s ABF2 CDS	Amp
5230	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK 35S ABF3	Amp
5233	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK 35S ABF4	Amp
3346	<i>E.c</i>	XL1blue	pBI221::p35S::ABI5	Amp
3594	<i>E.c</i>	XL1blue	pGAD ABF1	Amp, -LEU
5228	<i>E.c</i>	DH5 α	pGAD ABF2	Amp, -LEU
5235	<i>E.c</i>	DH5 α	pGAD ABF3	Amp, -LEU
5234	<i>E.c</i>	DH5 α	pGAD ABF4	Amp, -LEU
3590	<i>E.c</i>	XL1blue	pGAD ABI5	Amp, -LEU

ANHANG

5174	<i>E.c</i>	DH5 α	pGAD.HB5fl	Amp, -LEU
3949	<i>E.c</i>	XL1blue	pGADGH HB6	Amp, -LEU
5159	<i>E.c</i>	DH5 α	pGAD.HB7fl	Amp, -LEU
SnRK2s				
8000	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1-FL	Gent
8001	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_S7D	Gent
8002	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_S18D	Gent
8003	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_S29D	Gent
8004	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_S43D	Gent
8005	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_S43A	Gent
8006	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_S175D	Gent
8007	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_S175A	Gent
8008	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_Δ320	Gent
8009	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_Δ331	Gent
8010	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1_Δ348	Gent
8177	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_OST1+STOP	Spec
8276	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.1	Gent
8277	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.1Δ304	Gent
8278	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.2	Gent
8279	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.2Δ330	Gent
8280	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.3	Gent
8281	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.3Δ322	Gent
8282	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.4	Gent
8283	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.4Δ313	Gent
8284	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.5	Gent
8285	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.5Δ305	Gent
8286	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.7	Gent
8287	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.7Δ308	Gent
8288	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.8	Gent
8289	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.8Δ299	Gent
8290	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.9	Gent
8291	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.9Δ307	Gent
8292	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.10	Gent
8293	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_SnRK2.10Δ305	Gent
CPKs				
6850	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:GAL1:CPK23-vk	Amp, Kan, -Trp
6851	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:GAL1:CPK23-vk-tk	Amp, Kan, -Trp
6852	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:pADH:CPK23vk:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
6853	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:pADH:CPK23vk-tk:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
6854	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:pGAL1:BD-CPK23vk:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
6855	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:pGAL1:BD-CPK23vk-tk:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
6856	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:pADH:BD-CPK23vk:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
6857	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:pADH:BD-CPK23vk-tk:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
6864	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG504:GAL1:NLS:CPK23-vk	Amp, Kan, -Trp
6865	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG504:GAL1:NLS:CPK23-vk-tk	Amp, Kan, -Trp
7286	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:BDflaa1-147:CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7287	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:BDaa1-74:CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7288	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:BDaa50-147:CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7290	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:BDaa1-49:CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7291	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:BDaa50-74:CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7297	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG544:GST:rec1-CPK23vk-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
7298	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG544:GST:rec1-CPK23vk-tk-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Trp

ANHANG

7302	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG574:GFP:rec1-CPK23vk-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
7303	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG574:GFP:rec1-CPK23vk-tk-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
7304	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG574:GFP:rec1-gca2vk-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
7305	EC	DH5 α	pGREG574:GFP:rec1-gca2fl-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
7511	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504: Δ 1-19-CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7512	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504: Δ 1-38-CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7513	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504: Δ 1-68-CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7569	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504: Δ 1-50-CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7570	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504: Δ 1-59-CPK23vk	Amp, Kan, -Trp
7571	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S:CPK23C-vk	Amp
7572	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S:CPK23C-vk-tk	Amp
7573	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S:GFP-CPK23C-vk	Amp
7574	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S:GST-CPK23C-vk	Amp
7575	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S: Δ 1-19-CPK23vk	Amp
7576	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S: Δ 1-38-CPK23vk	Amp
7577	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S: Δ 1-50-CPK23vk	Amp
7578	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S: Δ 1-59-CPK23vk	Amp
7579	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S: Δ 1-68-CPK23vk	Amp
7626	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG504:GAL1:CPK23-vk_G2A_C3A	Amp, Kan, -Trp
7997	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_CPK23C-FL	Gent
7998	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_CPK23C-vk	Gent
7999	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_CPK23C-vk-tk	Gent
8105	<i>E.c</i>	TOP10	LI_CD_CPK23C-vk_S5A	Gent
8106	<i>E.c</i>	TOP10	LI_CD_CPK23C-vk_S5D	Gent
8107	<i>E.c</i>	TOP10	LI_CD_CPK23C-vk_S5-6AA	Gent
8108	<i>E.c</i>	TOP10	LI_CD_CPK23C-vk_S5-6DD	Gent
8188	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG574:GFP:CPK21vk	Amp, Kan, -Trp
8189	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG574:GFP:CPK22vk	Amp, Kan, -Trp
CIPKs/CBLs				
5893	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK Ascl CIPK2 na K41N	Amp
5894	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK Ascl CIPK11 na K50N G123N	Amp
5895	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK Ascl CIPK14 na K51N	Amp
6549	<i>E.c</i>	DH5 α	pET24b::CIPK14wt	Kan, Cam
6550	<i>E.c</i>	DH5 α	pET24b::CIPK14ka	Kan, Cam
6551	<i>E.c</i>	DH5 α	pET24b::CIPK14na	Kan, Cam
6552	<i>E.c</i>	Rosetta pLys	pET24b::CIPK14wt	Kan, Cam
6553	<i>E.c</i>	Rosetta pLys	pET24b::CIPK14ka	Kan, Cam
6554	<i>E.c</i>	Rosetta pLys	pET24b::CIPK14na	Kan, Cam
6572	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK Ascl:35S::CIPK14ka	Amp
6573	<i>E.c</i>	XL1blue	pET24b::CIPK11wt	Kan, Cam
6574	<i>E.c</i>	XL1blue	pET24b::CIPK11ka	Kan, Cam
6575	<i>E.c</i>	XL1blue	pET24b::CIPK11na	Kan, Cam
6576	<i>E.c</i>	Rosetta pLys	pET24b::CIPK11wt	Kan, Cam
6577	<i>E.c</i>	Rosetta pLys	pET24b::CIPK11ka	Kan, Cam
6578	<i>E.c</i>	Rosetta pLys	pET24b::CIPK11na	Kan, Cam
6592	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504::CIPK11wt	Amp, Kan, -Trp
6593	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504::CIPK11ka	Amp, Kan, -Trp
6594	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504::CIPK14wt	Amp, Kan, -Trp
6595	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504::CIPK14ka	Amp, Kan, -Trp
6613	<i>E.c</i>	XL1blue	pET24b-STREP2::CBL2	Kan, Cam
6616	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK:35S::STREP2:CBL2	Amp
6647	<i>E.c</i>	Rosetta pLys	pET24b-STREP2::CBL2	Kan, Cam

ANHANG

7206	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG:506:CBL2	Amp, Kan, -URA
7292	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:CIPK14na	Amp, Kan, -Trp
3648	<i>E.c</i>	DH5 α	pGBT CIPK11	Amp, -Trp
3651	<i>E.c</i>	DH5 α	pGBT CIPK14	Amp, -Trp
3659	<i>E.c</i>	DH5 α	pGBT CIPK22	Amp, -Trp
7063	<i>E.c</i>	DH5 α	pGBT:CIPK14ka	Amp, -Trp
PP2Cs				
8011	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_ABI1	Gent
8012	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_ABI1- Δ N348	Gent
8013	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_ABI1- Δ C36	Gent
8014	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_ABI1- Δ N348- Δ C36	Gent
8015	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_ABI1-FL_D177A	Gent
8016	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_ABI1- Δ N348_D177A	Gent
8018	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_ABI1- Δ N348- Δ C36_D177A	Gent
4063	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK Ascl 35S PP2CA	Amp
4530	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK Ascl 35S HAB1	Amp
4096	<i>E.c</i>	DH5 α	pSK Ascl 35S ABI2	Amp
7251	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-ABI1-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7252	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-ABI2-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7253	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-HAB1-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7254	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-HAB2-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7255	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-HAI1-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7256	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-HAI2-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7257	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-HAI3-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7258	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-PP2CA-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
7259	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG505:rec1-AHG1-rec2:Cyc1	Amp, Kan, -Leu
RCARs				
7497	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR1	Amp, Kan, -URA
7499	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR3	Amp, Kan, -URA
7500	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR4	Amp, Kan, -URA
7502	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR6	Amp, Kan, -URA
7503	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR7	Amp, Kan, -URA
7505	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR9	Amp, Kan, -URA
7507	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR11	Amp, Kan, -URA
7508	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR12	Amp, Kan, -URA
7510	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:RCAR14	Amp, Kan, -URA
8215	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR1	Gent
8216	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR2	Gent
8217	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR3	Gent
8218	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR4	Gent
8219	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR5	Gent
8220	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR6	Gent
8221	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR7	Gent
8222	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR8	Gent
8223	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR9	Gent
8112	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR11	Gent
8224	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR12	Gent
8225	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR13	Gent
8226	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR10	Gent
8227	EC	TOP10	LI_C-D_RCAR14	Gent
Sonstige				
6599	<i>E.c</i>	XL1blue	pSK::4xA ABRE oS: -46 35S:LUC	Amp

ANHANG

6600	<i>E.c</i>	XL1blue	pSK::4xB ABRE oS: -46 35S:LUC	Amp
6601	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG503::4xA ABRE oS: -46 35S:LUC	Amp, Kan, -HIS
6602	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG503::4xB ABRE oS: -46 35S:LUC	Amp, Kan, -HIS
6681	<i>E.c</i>	DH5 α	pIS385::4xA ABRE oS: -46 35S:LUC	Amp, -URA
6682	<i>E.c</i>	DH5 α	pIS385::4xB ABRE oS: -46 35S:LUC	Amp, -URA
6866	<i>E.c</i>	XL1blue	pGREG504:GAL1:NLS:dHIS:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
7284	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG544:GST:dHIS:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
7285	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG574:GST:dHIS:Cyc1	Amp, Kan, -Trp
4067	EC	XL1blue	pGREG503 ADHP:dHIS	Amp, Kan, -HIS
4128	EC	XL1blue	pGREG504:dHIS	Amp, Kan, -Trp
4129	EC	XL1blue	pGREG505:dHIS	Amp, Kan, -Leu
2001	EC	DH5 α	pGREG506:dHIS	Amp, Kan, -URA
7407	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:BIN2	Amp, Kan, -URA
7408	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:bin2-1	Amp, Kan, -URA
7409	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG506:bin2-2	Amp, Kan, -URA
7494	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:BIN2	Amp, Kan, -Trp
7495	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:bin2-1	Amp, Kan, -Trp
7496	<i>E.c</i>	DH5 α	pGREG504:bin2-2	Amp, Kan, -Trp
Golden Gate Elemente				
7896	<i>E.c</i>	DB3.1	LI-Bpi	Gent
7901	<i>E.c</i>	DB3.1	LIIc F 3-4	Amp
7913	<i>E.c</i>	DB3.1	LII F1-2 LEU	Spec
7914	<i>E.c</i>	DB3.1	LII F3-4 TRP	Spec
7915	<i>E.c</i>	DB3.1	LII F5-6 URA	Spec
7923	<i>E.c</i>	TOP10	LI_dy_A-B	Gent
7924	<i>E.c</i>	TOP10	LI_dy_B-C	Gent
7925	<i>E.c</i>	TOP10	LI_dy_C-D	Gent
7926	<i>E.c</i>	TOP10	LI_dy_D-E	Gent
7927	<i>E.c</i>	TOP10	LI_dy_F-G	Gent
7931	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pGAL1	Gent
7932	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pTDH3	Gent
7933	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pCCW12	Gent
7934	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pPGK1	Gent
7935	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pHHF1	Gent
7936	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pHTB2	Gent
7937	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pRPL18B	Gent
7938	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pSAC6	Gent
7939	<i>E.c</i>	TOP10	LI_A-B_pUBQ10	Kan
7945	<i>E.c</i>	TOP10	LI_B-C_GFP	Gent
7951	<i>E.c</i>	TOP10	LI_B-C_N-NLS	Gent
7952	<i>E.c</i>	TOP10	LI_B-C_N-NES	Gent
7962	<i>E.c</i>	TOP10	LI_C-D_GFP	Gent
7978	<i>E.c</i>	TOP10	LI_D-E_GFP	Gent
7991	<i>E.c</i>	TOP10	LI_E-F_tNos	Gent
7995	<i>E.c</i>	TOP10	LI_E-F_tTDH1	Gent
8109	<i>E.c</i>	TOP10	LI_B-C_12aapSK-Linker	Gent
8110	<i>E.c</i>	TOP10	LI_B-C_9aapSK-Linker	Gent
8111	<i>E.c</i>	TOP10	LI_B-C_14aaGS-Linker	Gent
8152	<i>E.c</i>	TOP10	LI_B-C_3C-3xFLAG	Gent

5.9 Verwendete Primer

Tabelle 5-3 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Die Nummerierung der Primer bezieht sich auf die eigene Primerliste des Autors

Nr.	Name	Sequenz 5' → 3'
105	CIPK2_qP_01_fw	GTCTACGGGGTTTGGTCTGG
106	CIPK2_qP_01_rev	TGAAGCAGGTTTTTGCACG
113	CIPK11_qP_02_fw	CCACGATGACGAGATCGAAGA
114	CIPK11_qP_02_rev	CCCGACAAATCCAATCCCGA
115	CIPK14_qP_04_fw	TGGACAGCTCTTCGGCAAAT
116	CIPK14_qP_04_rev	CCACTTTGATCGCAACGCTC
129	CIPK11_K50N_fw_01	CCGTGAACATCCTCAACAAGA
130	CIPK11_K50N_rev_01	TTGAGGATGTTACGGCGA
133	CIPK14_K51N_fw_01	CGATCAACGTGGTGAGCAA
134	CIPK14_K51N_rev_01	CTCACCACGTTGATCGCAAC
135	CIPK2_K41N_fw_01	AGCTATCAACATGATTGACAAGGA
136	CIPK2_K41N_rev_01	ATCATGTTGATAGCTACACTCTCG
155	cipk11-1_LP_01	CGCGTTTTAAACTCTTCACAGC
156	cipk11-1_RP_01	ATCTTTTTAAAAGCTCCGCG
157	cipk14-1_LP_01	ACTTGAGTTGGTTCTGGGTCC
158	cipk14-1_RP_01	AGGTTCTGCGAGGATCTTAGC
159	cipk14-2_LP_01	CATAACCAGCTCGTCCGTTAG
160	cipk14-2_RP_01	AATACGAGGTCGGAAAATTGG
161	cipk2_LP_01	TTCAAATGCAAACCTTTCTG
162	cipk2_RP_01	TCAACCAAACAGAGAGATCCG
177	CIPK14+BamHI_fw_01	ATAGGATCCATGGTAGATTCTGACCCGGTG
178	CIPK14+BamHI_rev_01	ATAGAGCTCCTCGTGTGGTCTCGTC
185	CIPK14_CA-SDM_fw_03	CCTCCTCCACGAACCTGTGGTACG
186	CIPK14_CA-SDM_fw_03	CCTCCTCCACAACCTGTGGTACGCCGGCG
201	pET24-14-Spel_fw	ATA ACTAGT ATGGTAGATTCTGACCCGGTG
202	pET24-14-Sall_re	ATA GTCGAC CGACGTCGTATGTACTTGAGTTG
203	pET24-11-Spel_fw	ATA ACTAGT GCAATGCCAGAGATCGAGATT
204	pET24-11-Sall_rv	ATA GTCGAC AATAGCCGCGTTTGTTGAC
205	pGBT_seq_fw	CGACATCATCATCGGAAGAGAG
206	pGBT_seq_rev	ACAGGAAAGAGTTACTCAAGAACAAG
207	pGAD_seq_fw	GACCAAACCTGCTATAACG
208	pGAD_seq_rev	ACTTGACCAAACCTCTGG
209	ABRE_wt_F3	CTAGCTAGCGTACGTGGC GGTACGTGGCGACTA
210	ABRE_wt_R3	CTAGTA GTCGCCACGTACGCCACGTACGC TAG
211	ABRE_mt_F3	CTAGCTAGCGTTTAAGGCGGTTTAAGGCGACTA
212	ABRE_mt_R3	CTAGTAGTCGCCTTAAACCGCCTTAAACGC TAG
213	Lys2 Yip-in	CCGCACTTCTAACATAGTTGC
214	Lys2 Yip-out	ATCTTACCTAATTGGACTGAACC
217	CBL-SDM_ATG_fw	AGGATCCGCTATGTGGAGCCACCC
218	CBL-SDM_ATG_rev	AGCTACAGGACGGACCAT
223	pADH_seq	TCCTCGTCATTGTTCTCGTTC
224	pCYC1_Seq	TTCGGTTAGAGCGGATGTGG
257	pGAL1_seq_fw	CATAACCACTTTAACTAATACTTTCAAC
260	NotI-ATG-NLS-fw	GGCC GC ATG GCT GCT CTAAGAAGAAGAGAAAGGTG A
261	SpeI-ATG-NLS-Re	CTAG T CACCTTTCTCTTCTTAGG AGC AGC CAT GC
262	Gal4-P26L_fw	CAAAGAAAACTGAAGTGCGCCAAG

ANHANG

263	Gal4-P26L_rev	GAGCACTTGAGCTTTTTAAGTC
264	GAL4-NLS-fw	ATAGCGGCCGCATGAAGCTACTGTCTTCTATC
265	GAL4-NLS-rev	ATAACTAGTTCGAGGAAAAATCAGTAGAAA
266	GAL4-Cter-fw	ATAGCGGCCGCATGACTAGGGCACATCTGACAGAA
267	GAL4-Cter-rev	ATAACTAGTCGATACAGTCAACTGTCTTTG
272	Sall-GFP_fw	ATAGTCGACATGAGTAAAGGAGAAGAACTT
273	Sall-GFP_rev	ATAGTCGACTTTGTATAGTTCATCCATGCC
274	Gal4-BDa49-rev	ATAACTAGTCAGCGGAGACCTTTTGTTTT
278	rec1-ATG-BD_fw	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACATG CAAAGACAGTTGACTGTATCG
279	rec2_pBrTer_rev	GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACATCATAAATCATAA GAAATTCGCC
280	rec1_ATG_AD_fw	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACATGTATAACTATCTAT TCGATGATGAAGATACC
281	STOP_pGAD_rec2_rev	GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACACTTGCGGGGTTTT TTCAGTATCTA
282	Gal1_fw	TTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGA
283	Cyc1_rev	TCATGTAATTAGTTATGTACGCTTACATTCAC
286	rec1-ATG-AD_fw_02	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACA ATG TATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACC
287	rec1_ATG_BD_fw_02	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACA ATG CAAAGACAGTTGACTGTATCG
288	Sall_cpk23vk_rev_03	GTCGACGAATTGCTTCATACGTGATAA
289	EcoRI-A-CPK23vk-fw	GAATTC AATGGGTTGTTTCAGCAGTAAA
294	EcoRI-A-CPK23aa1-68_fw	GCGAATTCGATGGGTTGTTTCAGCAGTAAA
295	Sall-CPK23aa1-68_rev	GCGTCGACAAATTTCTGATGTCTTCGAA
296	Bin2-2_T261l_fw	TGGTACACCAATTCGAGAAGAAATC
297	Bin2-2_T261_rev	AGAACTTTTATAATTTCAACGAGC
298	Bin2-1_E263K_fw	ACCAACTCGAAAAGAAATCCGTTG
299	Bin2-1_E263K_rev	GTACCAAGAACTTTTATAATTTCAACG
306	Bin2-2_T261l_fw_04	CTTGGTACACCAATTCGAGAAG
307	Bin2-2_T261l_rev_04	GGATTTCTTCTCGAATTGGTGATC
308	Bin2-1_E263K_fw_04	GTACACCAACTCGAAAAGAAATCC
309	Bin2-1_E263K_rev_04	CAACGGATTTCTTTTCGAGTTG
316	Sall_cpk23vk_rev_04	ATATGTCGACGAATTGCTTCATACGTGATAA
317	d1-19-CPK23-vk_fw	ATATGAATTCAATGTCAATTCCGATAATCCAGTT
318	d1-38-CPK23-vk_fw	ATATGAATTCAATGAAACCTCAAATCCCATCACCA
319	d1-68-CPK23-vk_fw	ATATGAATTCAATGTACAGCTTGGGGAGAGAATTA
324	d1-50-CPK23-vk_fw	ATATGAATTCAATGGATCCAGAGACGATTTTAGGT
325	d1-59-CPK23-vk_fw	ATATGAATTCAATGAAACCATTCTGAAGACATCAGG
326	SDM_T97_rev	AGCGTTTCGAGGCAGAGTC
327	SDM_T97A_fw	TAGTCAGAAGGCGGTTGATCAAG
328	SDM_T97D_fw	TAGTCAGAAGGACGTTGATCAAGTTTGAAAGATCTATCC
329	SDM_S116_rev	CCACTACTCCAACCTTG
330	SDM_S116A_fw	AGTAGGGGGAGCTAACTTGCTCAGGTG
331	SDM_S116D_fw	AGTAGGGGGAGATAACTTGCTCAGG
332	SDM_S119_rev	CCCCCTACTCCAACCTTC
333	SDM_S119A_fw	AAGTAACTGGCTCAGGTGGCTC
334	SDM_S119D_fw	AAGTAACTGGATCAGGTGGCTCAGG
335	SDM_T135_rev	TGACTCTGACTCTGACTCTG
336	SDM_T135A_fw	GAGGCAGCAAGCATTAGGTGAAG
337	SDM_T135D_fw	GAGGCAGCAAGATTTAGGTGAAGTAACTTTG
356	SDM_ABF2_T97A_fw	CAGAAGGCGGTTGATCAAGTT

ANHANG

357	SDM_ABF2_T97A_rev	ATCAACCGCCTTCTGACTAAG
358	SDM_ABF2_T97D_fw	CAGAAGGATGTTGATCAAGTTTG
359	SDM_ABF2_T97D_rev	ATCAACATCCTTCTGACTAAGCGT
360	SDM_ABF2_Y28A_S29A_fw	TCGATAGCCGCGTTGACGTTTGAT
361	SDM_ABF2_Y28A_S29A_rev	CGTCAACGCGGCTATCGAACCT
362	SDM_ABF2_S213D_S214D_fw	TTCAAGGTGATGATTTGCCTCTGAATGT
363	SDM_ABF2_S213D_S214D_rev	AGAGGCAAATCATCACCTTGAACCTGC
368	ABF2_S45A_fw	ATTTTGGGGCAATGAACATG
369	ABF2_S45A_rev_02	GTTTCATTGCCCAAATCTTTCC
370	CPK23_GC2AA_fw	GGAATTCATGGCTGCTTTTCAGCAGTAAACACCGGAAAACCTCAAAACGACGG
371	NFus-CPK23Cca_XbaI_fw	GCTACTCTAGAATGGTCCGTCCTGTAGCTAGG
372	NFus-CPK23Cca_XbaI_rev	GCTACGAGCTCTTACTTCATACGTGA
373	OST1 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATCGACCAGCAGTGAG
374	OST1 R1	TAGAAGACAACCTCATCTTCGCTGAAGCGGCCCT
375	OST1 F2	TAGAAGACAATGAGGGCAGGTTTTTCTTCCA
376	OST1 R2	TAGAAGACAAGTCTCCTCCATATCGTCATCTAT
377	OST1 F3	TAGAAGACAAGGACTTAGAGAGCGACCTTGAT
378	OST1 R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCATTGCGTACACAATCTCTCC
531	OST1 R3+STOP_02	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTACATTGCGTACACAATCTCTCC
379	CPK23 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCA CACC ATGGGTTGTTTCAGCAGTAAACA
380	CPK23 R1	TAGAAGACAA GTCC TCGAATGGTTTACCTAAAATC
381	CPK23 F2	TAGAAGACAA GGAC ATCAGGAAATTTTACAGCT
382	CPK23 R2	TAGAAGACAA CTTG ACATCTTCTCTACCCAGCTC
383	CPK23 F3	TAGAAGACAA CAAG ACAGAGATTCAGATCATGC
423	CPK23 R3_03	TAGAAGACAA ATCT TCATAAGAACCTTTGATCTC
424	CPK23 F4_03	TAGAAGACAA AGAT AGACATTCTGTACATTTGG
410	CPK_F5_02	TAGAAGACAA TCCT AAGAGACGAATCACTGC
411	CPK_R4_02	TAGAAGACAA AGGA TCTTCGGTTAGCATCTT
389	CPK23 R5-2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCA CTTT GTGGAATGGATACTGTTCCCT
390	GG_C-D_CPK23vk_r	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAATTGCTTCATACGTGATAA
391	GG_CPK23tkmut_fw	TAGAAGACAACCTCTCAAGCCTGAGAATTTCT
392	GG_CPK23tkmut_rev_02	TAGAAGACAAAGAGCTCGATGAATCACACCA
393	LI - O1_S7D_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATCGACCAGCAGTGGATGGTC
394	LI_O1_S18D_F	TAGAAGACAAGATGATAGGTATGAACTCGTCAAG
395	LI_OST1_S18D_R_02	TAGAAGACAACATCATCGTGCATAATCGGCAAATCC
396	LI_O1_S29D_F	TAGAAGACAAGACGGTAATTTTGGAGTTGCGAG
397	LI_O1_S29D_R	TAGAAGACAACGTCGCCAATATCCTTGACGA
398	LI_O1_S43D_F	TAGAAGACAAGATAATGAGCTTGTTGCTGTTAAATATA
399	LI_O1_S43D_R	TAGAAGACAATATCTTGCTTGCTCTCATCAATCTC
400	LI_O1_S175D_F	TAGAAGACAAGATACTGTTGGAACCTCTGCTTAC
401	LI_O1_S175D_R	TAGAAGACAATATCTTTTGGTTGCGAATGTAACACTG
402	LI_O1_S175A_F	TAGAAGACAAGCTACTGTTGGAACCTCTGCTTAC
403	LI_O1_S175A_R	TAGAAGACAATAGCTTTTGGTTGCGAATGTAACACTG
404	LI_C-D_OST1d320_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGGAGGAACAGTTGCTTCTGC
405	LI_C-D_OST1d331_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTGTGAGGTAATGGTTTCAGATTCTG
406	LI_C-D_OST1d348_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAAGGTCGCTCTCTAAGTCCTC
407	LI_O1_S43A_F	TAGAAGACAAGCTAATGAGCTTGTTGCTGTTAAATATA
408	LI_O1_S43A_R	TAGAAGACAATAGCTTGCTTGCTCTCATCAATCTC
409	LI_O1_S7D_F1L	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATCGACCAGCAGTGGATGGTCCAATGGATTTGC
425	ABF2S94A_T97A_fw	CTCAGAAGGCGGTTGATCAAG

ANHANG

426	ABF2S94A_T97A_rev	CAACCGCCTTCTGAGCAAGCG
427	ABF2S94D_T97D_fw_02	ATCAGAAGGACGTTGATCAAGTTTG
428	ABF2S94D_T97D_rev_02	GATCAACGTCCTTCTGATCAAGC
429	LI-ABI1_F1	AT GAAGACTT TACG GGTCTCACACC ATG GAGGAAGTATCTCCGGCG
430	LI-ABI1_R1	TAGAAGACAA AGGC CTTCTCCACAAATCGAAG
431	LI-ABI1_F2_03	TAGAAGACAA GCCT GAGATGGAAGATGCTGT
432	LI-ABI1_R2	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTGTTCAAGGGTTTGTCTTGAG
433	LI-ABI1_dN348_F	ATGAAGACTT TACG GGTCTCA CACC ATG AGTAGGAGTTTGTTTGAATTCAAGAG
434	LI-ABI1_dc36_R	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTCAAATCAACCACCACCACT
435	LI-ABI1_D177A_F	TAGAAGACAA CCGG CCATGGCGGTTCTCA
436	LI-ABI1_D177A_R	TAGAAGACAA CCGG CGTAAACACCGAAGAAATG
446	ABF2_T92_A_fw	CCT CGA GCG CTT AGT CAG AAG
447	ABF2_T92_A_rev	ACTAAGCGCTCGAGGCAGAGT
448	ABF2_T92_D_fw_02	CTGCCTCGAGACCTTAGTCAGAAGACG
449	ABF2_T92_D_rev_02	CTGACTAAGGTCTCGAGGCAGAGTCAAC
450	ABF2_S37_A_F	GAGTTTCAGGCCAGTGTAGGGAAAGATT
451	ABF2_S37_A_R	TCCCTACACTGGCCTGAAACTCATCAA
452	ABF2_S37_D_F	GAGTTTCAGGACAGTGTAGGGAAAGATT
453	ABF2_S37_D_R	TCCCTACACTGTCCTGAAACTCATCAA
454	ABF2_S38_A_F	TTTCAGAGCGCTGTAGGGAAAGATTTTG
455	ABF2_S38_A_R	CTTCCCTACAGCGCTCTGAAACTC
456	ABF2_S38_D_F	TTTCAGAGCGATGTAGGGAAAGATTTTG
457	ABF2_S38_D_R	CTTCCCTACATCGCTCTGAAACTC
458	ABF2_S86_A_F	AAGGCGCGTTGACTCTGCCTCGAAC
459	ABF2_S86_A_R	GCAGAGTCAACGCGCCTTGCTC
460	ABF2_S86_D_F	AAGGCGACTTGACTCTGCCTCGAAC
461	ABF2_S86_D_R	GGCAGAGTCAAGTCGCTTGCTC
462	ABF2_T88_A_F	AAGGCTCGTTGGCTCTGCCTCGAAC
463	ABF2_T88_A_R	GCAGAGCCAACGAGCCTTGCTC
464	ABF2_T88_D_F	AAGGCTCGTTGGATCTGCCTCGAAC
465	ABF2_T88_D_R	GGCAGATCCAACGAGCCTTGCTC
466	SnRK2.2 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATCCGGCGACTAATTCA
467	SnRK2.2 R1_04	TAGAAGACAAAGACGACTTGAATAACCAAA
468	SnRK2.2 F2_03	TAGAAGACAAGTCTGTTCTTCATTCCCAACC
469	SnRK2.2 R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAGAGCATAAACTATCTCTCCAC
470	SnRK2.2_R2dC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGTCGGAATCGTAGCCTCCGA
471	SnRK2.3 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATCGAGCTCCGGTGACC
472	SnRK2.3 R1	TAGAAGACAAAGACGACTTTGAATATCCAAAATC
473	SnRK2.3 F2	TAGAAGACAAGTCTGTTCTTCATTACAACCAAA
474	SnRK2.3 R2_03	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAGAGCGTAACTATCTCTCC
475	SnRK2.3 R2dC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGCGGGAATTGTGGCTCAGA
476	SnRK2.1 F1	ATGAAGAC TTTA CGGGTCTCACACCATGGACAAGTATGACGTTGTCAA
477	SnRK2.1 R1_03	TAGAAGAC AAGT CCCTATGACATATTTGCAAGG
478	SnRK2.1 F2_02	TAGAAGAC AAGG ACCTGAAGCTTGAGAACAC
479	SnRK2.1 R2_02	TAGAAGACAATTCATCTTCATCATCTTCTTCT
480	SnRK2.1 F3_02	TAGAAGACAATGAATACGAGAAGCATGTCAAAG
481	SnRK2.1 R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGCTTTGTGCACTCTTGACAAG
482	SnRK2.1 Rdc	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTGGAGCTGGATTCCCTTGCTC
483	SnRK2.7 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCA CACC ATGGAGAGATACGACATCTTAAG
484	SnRK2.7 R1	TAGAAGACAAGTCTCGCTGAATCTACCGG
485	SnRK2.7 F2	TAGAAGACAAGGACGAAGGAAGATATTATTTCAA

ANHANG

486	SnRK2.7 R2_02	TAGAAGACAAAAGATCTCTGTGACATATTTGCAT
487	SnRK2.7 F3_02	TAGAAGACAATCTTAAGCTCGAGAATACACTCT
488	SnRK2.7 R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTAGAGCACATACGAAATCACC
489	SnRK2.7 RdC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATTTACTCCCTTTCTTGCTTCCT
490	SnRK2.8 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAGAGGTACGAAATAGTG
491	SnRK2.8 R1	TAGAAGACAAGTCTCACTGAATCTTCCGG
492	SnRK2.8 F2	TAGAAGACAAGGACGAGGCAAGGTTTTTCTT
493	SnRK2.8 R2	TAGAAGACAATTGCAGACTGTGACAGTAATTAAC
494	SnRK2.8 F3	TAGAAGACAAGCAAATATGCCATAGAGATTTAAAG
495	SnRK2.8 R3	TAGAAGACAACGTTTTCCGAAAATCTTTAGGATC
496	SnRK2.8 F4	TAGAAGACAAAACGATCGGTCCGATTCTCAA
497	SnRK2.8 R4dC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGGTGATAGGTTTTCCGAGCTTC
498	SnRK2.8 R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCAAAGGGGAAAGGAGATCAGC
499	SnRK2.10 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTC ACACC ATGGATCGACCAGCAGTGAGT
500	SnRK2.10 R1	TAGAAGACAAGTCTCAAATGGGTATGCTCC
501	SnRK2.10 F2	TAGAAGACAAGGACCAAGAGGATCCCAAAAA
502	SnRK2.10 R2	TAGAAGACAATTCATCTTCTTCTTCTTCTACTTC
503	SnRK2.10 F3	TAGAAGACAATGAAGAAGATGAGTATGATAAGAC
504	SnRK2.10 R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTACTGACTCGGACTTCTCCCAT
505	SnRK2.10 R3dC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTACGAGCTGGAGTTTTTGCTC
506	SnRK2.9 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAGAAGTATGAGATGGTG
507	SnRK2.9 R1	TAGAAGACAAAGACGACTTTGAGTAGCCAAAAT
508	SnRK2.9 F2	TAGAAGACAAGTCTGTTCTGCACTCCAACC
509	SnRK2.9 R2	TAGAAGACAAAGGATCTTGAATGGATAAGCTC
510	SnRK2.9 F3	TAGAAGACAATCCTAAAGACCCTCGCAATTTTC
511	SnRK2.9 R3	TAGAAGACAAGTCTCGGATATGTGAACATAT
512	SnRK2.9 F4	TAGAAGACAAGGACTGCAGAAAAGTTACTATCT
513	SnRK2.9 R4dC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGTGGAAATGGTTCTTGCTC
514	SnRK2.9 R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTCGTAATCATCATACCATTCTTC
515	SnRK2.5 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGACAAGTATGAGGTTGTG
516	SnRK2.5 F2_02	TAGAAGACAAGCTTAGACACAAAGAAACCAAGAGCTCGTTG
517	SnRK2.5 R1	TAGAAGACAAAAGCAGACGAGCCACACCA
518	SnRK2.5 F3	TAGAAGACAATCCGGATGATCCGAGAAACTT
519	SnRK2.5 R2	TAGAAGACAACGGATCTTCAAACGGATAACC
520	SnRK2.5 F4	TAGAAGACAAGTCTAATGCCGTCAAGGGCT
521	SnRK2.5 R3	TAGAAGACAAAGACGACGGAGCTGGATTC
522	SnRK2.5 R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGCTTTGGGAGGCTCTTGACA
523	SnRK2.5 R4dC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCGAGCTGGATTCTTGCTTC
524	SnRK2.4 F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGACAAGTACGAGCTGGTG
525	SnRK2.4 R1	TAGAAGACAAGTCTTCAAATGGGTATGCT
526	SnRK2.4 F2_02	TAGAAGACAATCAGGAGGACCCCAAGAACTTCAGGAAAAC
527	SnRK2.4 R2_02	TAGAAGACAAGTCTCTCTCTTCTTCCACCTCTCCTCTTCTCTCTCCAC ATC TTCTGCATCTTCTCTTTTC
528	SnRK2.4 F3	TAGAAGACAAGGACGATGAGGATGAATACGA
529	SnRK2.4 R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTACTTATTCTCACTTCTCCACTTG
530	SnRK2.4 R3dC	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGGAGGCGGTGTTTTGGCG
532	RCAR11_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGCCTTCGGAGTTAACACCA
533	RCAR11_R1	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCGTACCTGAGAACCACTTC
534	CPK23_12aa-Nfus_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCATCTGAACAATGGTCCGTCTGTAGCTAG
535	CPK23_12aa-Nfus_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGCCGGATCCCGGGAATTCGATC
536	CPK23_9aa-Nfus_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGCCGAATTCGATCCTAGCTACAGG
537	GS_B-C_link_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCATCTGAACAATGGGTGGAGGAGGTTCTG GAG

ANHANG

538	GS_B-C_Link_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGCCGCTACCTCCGCCACCACTT
539	LI_CPK23-S5A_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACC ATGGGTTGTTTC GCC AGT AAACACCGGAAAACT
540	LI_CPK23-S5D_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACC ATGGGTTGTTTC GAC AGT AAACACCGGAAAACT
541	LI_CPK23-S5-6AA_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACC ATGGGTTGTTTC GCC GCT AAACACCGGAAAACT
542	LI_CPK23-S5-6DD_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACC ATGGGTTGTTTC GAC GAT AAACACCGGAAAACT
543	2.10 R1_02	TAGAAGACAAGTCTCAAATGGGTATGCTCCACCAGC
544	LI_CPK23-S6A_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGTTTCAGCGCTAAACAC CGGAAAACT
545	LI_CPK23-S6D_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGTTTCAGCGATAAACAC CGGAAAACT
546	LI_CPK23-G2D_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATTGTTTCAGCAGTAAACAC CGGAAAACT
547	LI_CPK23-K7E-K10E_F1	ACTGCAGAGGTACGGGTCTCACACCATGGGTTGTTTCAGCAGTGAACA CCGGGAAACTCAAACGACGG
548	LI_CPK23-H8D-R9E_F1	ACTGCAGAGGTACGGGTCTCACACCATGGGTTGTTTCAGCAGTAAAGA CGAGAAAACCAAACGACGG
549	LO_35S+S1_F1	AT GAAGACTT TACG GGTCTCAGCGGATGCCTCTGCCGACAGTGGTC
550	LO_35S+S1_F2	TA GAAGACAA CACG TTCCAACCACGACTTCAAAGCAAGTGG
551	LO_35S+S1_R1	TA GAAGACAA CGTG TTCTTTTCCACGATGC
552	LO_35S+S1_R2	AT GAAGACTT CAGA GGTCTCACAGATAGAGAGATAGATTGTAG
553	AHG1_F1	ATGAAGACTT TACG GGTCTCACACCATGACTGAAATCTACAGAACA
554	AHG1_R3	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTCTGAGAGCTATTCTTGAGATC
555	AHG1_F2_02	TAGAAGACAA ACTT CCGGCGGATATCGGGGG
556	AHG1_R1_02	TAGAAGACAA AAGT CCACCGATCTCTGACCT
557	AHG1_F3	TAGAAGACAA TGAC AATGACGGAGAACAAAA
558	AHG1_R2	TAGAAGACAA GTCA TCTTCTTGAGCCATTCT
559	ABI2_F1	ATGAAGACTT TACG GGTCTCACACCATGGACGAAGTTTCTCCTGCA
560	ABI2_R1	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTATCAAGGATTTGCTCTTGAA
561	HAB1_F1	ATGAAGACTT TACG GGTCTCACACCATGGAGGAGATGACTCCCGCA
562	HAB1_R5	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTGGTTCTGGTCTTGAACCTTCT
563	HAB1_F2	TAGAAGACAA ATCC AATGTTTTGATGAGGACGATGTATTGTCTG
564	HAB1_R1	TAGAAGACAA GGAT GACCCGCTTCTCGTATC
565	HAB1_F3	TAGAAGACAA GTTC ACGAGTTGTTTTCTAAC
566	HAB1_R2	TAGAAGACAA GAAC ACTTTATCCCACTGCAC
567	HAB1_F4_02	TAGAAGACAA TGTA GGATCAACTGCTGTTGT
568	HAB1_R3_02	TAGAAGACAA TACA GTCTCAGACGCAACAGC
569	HAB1_F5	TAGAAGACAA GGAC GAGTGTCTCATACTAGC
570	HAB1_R4	TAGAAGACAA GTCC TCTCTGACCGAGGCAT
571	HAB2_F1	ATGAAGACTT TACG GGTCTCACACCATGGAAGAGATTTACCTGCA
572	HAB2_R4	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTAGATCTGGTCTTGAACCTTCT
573	HAB2_F2	TAGAAGACAAAACCTTTATCTGAAGTGAGAAGTTTGTCTCTGATTTAG TGTAAC
574	HAB2_R1	TAGAAGACAA AGTT TTCTCTTCTGAAACACT
575	HAB2_F3	TAGAAGACAA TGAG TGTCTAATATTGGCCAG
576	HAB2_R2	TAGAAGACAA CTCA TCTCTCTAGCTCGTGG
577	HAB2_F4	TAGAAGACAA GGAC CAAGCGTGTCAAGCTGC
578	HAB2_R3	TAGAAGACAA GTCC TCTCTACACCTCTCTC
579	PP2CA_F1	ATGAAGACTT TACG GGTCTCACACCATGGCTGGGATTTGTTGCGGT
580	PP2CA_R1	TAGAAGACAA TCGC CTTCTACCACAAACCGA

ANHANG

581	PP2CA_F2	TAGAAGACAA GCGA GACATGGAAGATGCTGT
582	PP2CA_R2	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTAGACGACGCTTGATTATTCCT
583	HAI1_F1	ATGAAGACTT TACG GGTCTCACACCATGGCTGAGATTTGTTACGAG
584	HAI1_F2	TAGAAGACAA ATTC GTCGACGGTGACTTACA
585	HAI1_F3	TAGAAGACAA GAGA CGTGAAATGGAAGATGCCGTCGCTGTGCAT
586	HAI1_R1	TAGAAGACAA GAAT ACAGGTTCTTGTTCGCC
587	HAI1_R2	TAGAAGACAA TCTC CTCCACAGACTGAAGC
588	HAI1_R3	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTCGTGTCTCGTCGTAGATCAAC
589	HAI2_F1_02	ATGAAGACTTTACGGTCTCACACCATGGCGGATATTTGTTATGAGGAC GAGACGT
590	HAI2_R1_02	TAGAAGACAA ACTA TCTCAAGTGATACT
591	HAI2_F2_02	TAGAAGACAA TAGT GACGTCTCTATCTCCGA
592	HAI2_R2_03	TAGAAGACAA CGTT TTCTTCGACGGAATAAC
593	HAI2_F3_03	TAGAAGACAA AACG GTTAAAGAGACGGAT
594	HAI2_R3_02	TAGAAGACAA CCGC CTCCACGACCACTTTT
595	HAI2_F4_02	TAGAAGACAA GCGG CGAGGAGAAACACAGAC
596	HAI2_R4	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTAGCAACGTGTCTCTTTCTTCT
597	HAI3_F1	ATGAAGACTT TACG GGTCTCACACCATGGCCGAGATATGTTACGAA
598	HAI3_F2	TAGAAGACAATGCCTGCTCTGTAGCGCGTATGTGTCTCCGTGGTGGTG GGAGGAGACAAGATAATGAG
599	HAI3_R1	TAGAAGACAA GGCA GTCTCGTTTGACACAAC
600	HAI3_R2	ATGAAGACTT CAGA GGTCTCACCTTTCTTCTGAGATCAATCACAAC

6 LITERATUR

7 LITERATUR

- Abel, S., and Theologis, A.** (1994). Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J* **5** (3): 421–427.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411** (6841): 1053–1057.
- Amberg, D.C., Burke, D.J., and Strathern, J.N.** (2005). *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory course manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G.A., and Rodriguez, P.L.** (2012). Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *PLANT PHYSIOLOGY* **158** (2): 970–980.
- Arnaudeau, S., Kelley, W.L., Walsh, J.V., and Demaurex, N.** (2001). Mitochondria recycle Ca²⁺ to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J. Biol. Chem.* **276** (31): 29430–29439.
- Asai, S., Ichikawa, T., Nomura, H., Kobayashi, M., Kamiyoshihara, Y., Mori, H., Kadota, Y., Zipfel, C., Jones, J.D.G., and Yoshioka, H.** (2013). The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry* **288** (20): 14332–14340.
- Bastidas, A.C., Deal, M.S., Steichen, J.M., Keshwani, M.M., Guo, Y., and Taylor, S.S.** (2012). Role of N-terminal myristylation in the structure and regulation of cAMP-dependent protein kinase. *Journal of molecular biology* **422** (2): 215–229.
- Batistic, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K., and Kudla, J.** (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J.* **61** (2): 211–222.
- Batistič, O., and Kudla, J.** (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1820** (8): 1283–1293.

- Batistič, O., Rehers, M., Akerman, A., Schlücking, K., Steinhorst, L., Yalovsky, S., and Kudla, J.** (2012). S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses. *Cell Res* **22** (7): 1155–1168.
- Belin, C., Franco, P.-O. de, Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.-M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S.** (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol.* **141** (4): 1316–1327.
- Belin, C., Megies, C., Hauserová, E., and Lopez-Molina, L.** (2009). Abscisic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell* **21** (8): 2253–2268.
- Berg, J.M., Stryer, L., and Tymoczko, J.L.** (2003). *Biochemie* (Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.).
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D.** (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1** (1): 11–21.
- Bidwai, A.P., Reed, J.C., and Glover, C.V.** (1994). Casein kinase II of *Saccharomyces cerevisiae* contains two distinct regulatory subunits, beta and beta'. *Archives of biochemistry and biophysics* **309** (2): 348–355.
- Binder, A., Lambert, J., Morbitzer, R., Popp, C., Ott, T., Lahaye, T., Parniske, M., and van Damme, E.J.M.** (2014). A Modular Plasmid Assembly Kit for Multigene Expression, Gene Silencing and Silencing Rescue in Plants. *PLoS ONE* **9** (2): e88218.
- Bonilla, M., and Cunningham, K.W.** (2002). Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Sci. STKE* **2002** (127): pe17.
- Bossi, F., Cordoba, E., Dupre, P., Mendoza, M.S., Roman, C.S., and Leon, P.** (2009). The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *The Plant journal for cell and molecular biology* **59** (3): 359–374.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C.** (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **279** (40): 41758–41766.
- Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjärvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H., and Schroeder, J.I.** (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by

- CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109** (26): 10593–10598.
- Brandt, B., Munemasa, S., Wang, C., Nguyen, D., Yong, T., Yang, P.G., Poretsky, E., Belknap, T.F., Waadt, R., Alemán, F., and Schroeder, J.I.** (2015). Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells. *eLife* **4**.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L.** (2015). *Biochemistry & molecular biology of plants* (Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc).
- Burkart, M.-T.** (2017). Analyse einzelner Komponenten der Abscisinsäure-Signaltransduktion in Hefe. Bachelorarbeit. Lehrstuhl für Botanik. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Burney, J.A., Davis, S.J., and Lobell, D.B.** (2010). Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (26): 12052–12057.
- Cai, Z., Liu, J., Wang, H., Yang, C., Chen, Y., Li, Y., Pan, S., Dong, R., Tang, G., Barajas-Lopez, J.d.D., Fujii, H., and Wang, X.** (2014). GSK3-like kinases positively modulate abscisic acid signaling through phosphorylating subgroup III SnRK2s in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111** (26): 9651–9656.
- Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A., and Henry, Y.** (2004). *Arabidopsis* kinome: After the casting. *Functional & integrative genomics* **4** (3): 163–187.
- Chang, L., and Karin, M.** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410** (6824): 37–40.
- Chatr-Aryamontri, A., Oughtred, R., Boucher, L., Rust, J., Chang, C., Kolas, N.K., O'Donnell, L., Oster, S., Theesfeld, C., Sellam, A., Stark, C., Breitkreutz, B.-J., Dolinski, K., and Tyers, M.** (2017). The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Research* **45** (D1): D369-D379.
- Chaves-Sanjuan, A., Sanchez-Barrena, M.J., Gonzalez-Rubio, J.M., Moreno, M., Ragel, P., Jimenez, M., Pardo, J.M., Martinez-Ripoll, M., Quintero, F.J., and Albert, A.** (2014). Structural basis of the regulatory mechanism of the plant CIPK family of protein kinases controlling ion homeostasis and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Cheng, S.-H., Willmann, M.R., Chen, H.-C., and Sheen, J.** (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *PLANT PHYSIOLOGY* **129** (2): 469–485.

LITERATUR

- Chérel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H., and Thibaud, J.-B.** (2002). Physical and functional interaction of the Arabidopsis K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14** (5): 1133–1146.
- Chiasson, D.** (2015). "Golden-Gate based, universal, modular cloning Set (unpublished)". persönlicher Austausch (Lehrstuhl für Genetik, Ludwig-Maximilians-Universität München).
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S.Y.** (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of biological chemistry* **275** (3): 1723–1730.
- Choi, H.-i., Park, H.-J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.-Y., Seo, H.-H., Kim, Y.-W., Hwang, I., and Kim, S.Y.** (2005). Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *PLANT PHYSIOLOGY* **139** (4): 1750–1761.
- Christmann, A., Grill, E., and Huang, J.** (2013). Hydraulic signals in long-distance signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*
- Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A., Yang, Y., Tang, Y., and Grill, E.** (2006). Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)* **8** (3): 314–325.
- Clontech** (2012). Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System: User Manual.
- Cracker, L.E., and Abeles, F.B.** (1969). Abscission: Role of abscisic Acid. *Plant Physiol* **44** (8): 1144–1149.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679.
- Czap, G.U.M.** (2015). Die Proteinkinase CPK23, Ökotyp-spezifische Unterschiede und Funktion in der Abscisinsäure-Signaltransduktion.
- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G., and Harper, J.F.** (2003). Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol* **132** (4): 1840–1848.
- D'Angelo, C., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schültke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R., and Kudla, J.** (2006). Alternative complex formation of the Ca(2+)-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *Plant J.* **48** (6): 857–872.
- Dardick, C., Chen, J., Richter, T., Ouyang, S., and Ronald, P.** (2007). The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *PLANT PHYSIOLOGY* **143** (2): 579–586.

- Davies, W., and Zhang, J.** (1991). Root Signals And The Regulation Of Growth And Development Of Plants In Drying Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42** (1): 55–76.
- Denis, V., and Cyert, M.S.** (2002). Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *The Journal of cell biology* **156** (1): 29–34.
- Dissmeyer, N., and Schnittger, A.** (2011). The age of protein kinases. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) **779**: 7–52.
- Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D.** (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 593–620.
- Doty, S.L., James, C.A., Moore, A.L., Vajzovic, A., Singleton, G.L., Ma, C., Khan, Z., Xin, G., Kang, J.W., Park, J.Y., Meilan, R., Strauss, S.H., Wilkerson, J., Farin, F., and Strand, S.E.** (2007). Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (43): 16816–16821.
- Duan, L., Dietrich, D., Ng, C.H., Chan, P.M.Y., Bhalerao, R., Bennett, M.J., and Dinneny, J.R.** (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant cell* **25** (1): 324–341.
- Edel, K.H., and Kudla, J.** (2016). Integration of calcium and ABA signaling. *Current opinion in plant biology* **33**: 83–91.
- Endicott, J.A., Noble, M.E.M., and Johnson, L.N.** (2012). The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annual review of biochemistry* **81**: 587–613.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo, M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Shinozaki, K., Nakazono, M., Kamiya, Y., Koshiba, T., and Nambara, E.** (2008). Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* **147** (4): 1984–1993.
- Finkelstein, R.** (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book* **11**: e0166.
- Finkelstein, R., Gampala, S.S.L., Lynch, T.J., Thomas, T.L., and Rock, C.D.** (2005). Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. *Plant molecular biology* **59** (2): 253–267.
- Finkelstein, R.R., and Lynch, T.J.** (2000). The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Gene ABI5 Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *The Plant cell* **12** (4): 599.

- Fuchs, S.** (2013). Protein Phosphatases 2C of *Arabidopsis thaliana* in Stress Signaling. Dissertation. Lehrstuhl für Botanik. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., and Schweighofer, A.** (2013). Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J.* **280** (2): 681–693.
- Fuchs, S., Tischer, S.V., Wunschel, C., Christmann, A., and Grill, E.** (2014). Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111** (15): 5741–5746.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G., and Zhu, J.-K.** (2007). Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* **19** (5): 1617–1634.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.-K.** (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462** (7273): 660–664.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.-K.** (2011). Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** (4): 1717–1722.
- Fujii, H., and Zhu, J.-K.** (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (20): 8380–8385.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., MARUYAMA, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant cell* **17** (12): 3470–3488.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* **124** (4): 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., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators

- of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant & cell physiology* **50** (12): 2123–2132.
- Furihata, T., MARUYAMA, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (6): 1988–1993.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A.S., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T., and Hedrich, R.** (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science Signaling* **4** (173): ra32.
- 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., and Hedrich, R.** (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci USA* **107** (17): 8023–8028.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., and Toulmin, C.** (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* **327** (5967): 812–818.
- Gonzalez-Guzman, M.** (2002). The Short-Chain Alcohol Dehydrogenase ABA2 Catalyzes the Conversion of Xanthoxin to Abscisic Aldehyde. *THE PLANT CELL ONLINE* **14** (8): 1833–1846.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.-P., Gong, D., Halfter, U., and Zhu, J.-K.** (2002). A Calcium Sensor and Its Interacting Protein Kinase Are Global Regulators of Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell* **3** (2): 233–244.
- Hao, Q., Yin, P., Li, W., Wang, L., Yan, C., Lin, Z., Wu, J.Z., Wang, J., Yan, S.F., and Yan, N.** (2011). The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins. *Molecular cell* **42** (5): 662–672.
- Heine, G.F., Hernandez, J.M., and Grotewold, E.** (2004). Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. *The Journal of biological chemistry* **279** (36): 37878–37885.
- Hill, A.V.** (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves: Supplement. *The Journal of Physiology* (40): S. iv–vii.

- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B., and Grill, E.** (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J.* **21** (12): 3029–3038.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W.M., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.-K., and Harmon, A.C.** (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *PLANT PHYSIOLOGY* **132** (2): 666–680.
- Iida, H., Yagawa, Y., and Anraku, Y.** (1990). Essential role for induced Ca(2+) influx followed by Ca(2+) rise in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. A study of Ca(2+) in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *The Journal of biological chemistry* **265** (22): 13391–13399.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T.** (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* **409** (6823): 1060–1063.
- Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S., and Takahashi, Y.** (2010). Alteration of substrate specificity: The variable N-terminal domain of tobacco Ca(2+)-dependent protein kinase is important for substrate recognition. *The Plant cell* **22** (5): 1592–1604.
- Ito, T., Nakata, M., Ishida, S., and Takahashi, Y.** (2014). The mechanism of substrate recognition of Ca²⁺-dependent protein kinases. *Plant signaling & behavior* **6** (7): 924–926.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F.** (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **7** (3): 106–111.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y., and Whiteway, M.** (2005). Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**: 43–51.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Kong, L., Luo, J., and Gao, G.** (2017). PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research* **45** (D1): D1040-D1045.
- Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J.** (1996). Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* **85** (2): 149–158.

- Joshi, R., Wani, S.H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z.A., Lone, A.A., Pareek, A., and Singla-Pareek, S.L.** (2016). Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Front. Plant Sci.* **7**: 1029.
- Julkowska, M.M., McLoughlin, F., Galvan-Ampudia, C.S., Rankenberg, J.M., Kawa, D., Klimecka, M., Haring, M.A., Munnik, T., Kooijman, E.E., and Testerink, C.** (2015). Identification and functional characterization of the Arabidopsis Snf1-related protein kinase SnRK2.4 phosphatidic acid-binding domain. *Plant, cell & environment* **38** (3): 614–624.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., and Karin, M.** (1996). c-Jun Can Recruit JNK to Phosphorylate Dimerization Partners via Specific Docking Interactions. *Cell* **87** (5): 929–939.
- Kim, K.-N., Cheong, Y.H., Grant, J.J., Pandey, G.K., and Luan, S.** (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **15** (2): 411–423.
- Kleinlogel, S., Feldbauer, K., Dempski, R.E., Fotis, H., Wood, P.G., Bamann, C., and Bamberg, E.** (2011). Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci* **14** (4): 513–518.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., and Hattori, T.** (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *The Plant cell* **16** (5): 1163–1177.
- Korte, A.** (2009). Identifizierung und Charakterisierung des Abscisinsäure-Responsregulators GCA2 in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Lehrstuhl für Botanik. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Krzywińska, E., Bucholc, M., Kulik, A., Ciesielski, A., Lichočka, M., Debski, J., Ludwikow, A., Dadlez, M., Rodriguez, P.L., and Dobrowolska, G.** (2016). Phosphatase ABI1 and okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases inhibit salt stress-activated SnRK2.4 kinase. *BMC plant biology* **16** (1): 136.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., and Dobrowolska, G.** (2011). SnRK2 Protein Kinases—Key Regulators of Plant Response to Abiotic Stresses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **15** (12): 859–872.
- Lan, W.-Z., Lee, S.-C., Che, Y.-F., Jiang, Y.-Q., and Luan, S.** (2011). Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions. *Mol Plant* **4** (3): 527–536.

- Lee, M.E., DeLoache, W.C., Cervantes, B., and Dueber, J.E.** (2015). A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS synthetic biology* **4** (9): 975–986.
- Lee, S.C., and Luan, S.** (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ* **35** (1): 53–60.
- Lenhard, B., Sandelin, A., and Carninci, P.** (2012). Metazoan promoters: Emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nature reviews. Genetics* **13** (4): 233–245.
- Leskinen, P., Virta, M., and Karp, M.** (2003). One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast* **20** (13): 1109–1113.
- Levi, M., Brusa, P., Chiatante, D., and Sparvoli, E.** (1993). Cell cycle reactivation in cultured pea embryo axes. Effect of abscisic acid. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* **29** (2): 47–50.
- Litchfield, D.W.** (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J* **369** (Pt 1): 1–15.
- Liu, Y., Bergervoet, J.H.W., Vos, C.H.R. de, Hilhorst, H.W.M., Kraak, H.L., Karssen, C.M., and Bino, R.J.** (1994). Nuclear replication activities during imbibition of abscisic acid- and gibberellin-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Planta* **194** (3): 368–373.
- Llorca, C.M., Potschin, M., and Zentgraf, U.** (2014). bZIPs and WRKYs: Two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in plant science* **5**: 169.
- Lu, S.X., and Hrabak, E.M.** (2013). The myristoylated amino-terminus of an Arabidopsis calcium-dependent protein kinase mediates plasma membrane localization. *Plant molecular biology* **82** (3): 267–278.
- 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., and McCourt, P.** (2014). A mesoscale abscisic acid hormone interactome reveals a dynamic signaling landscape in Arabidopsis. *Developmental Cell* **29** (3): 360–372.
- Lynch, T., Erickson, B.J., and 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. *Plant Mol. Biol.* **80** (6): 647–658.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324** (5930): 1064–1068.

- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J.N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., S. Al-Rasheid, K.A., Luan, S., Kudla, J., Geiger, D., and Hedrich, R.** (2014). Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science Signaling* **7** (342): ra86.
- Marino, D., Froidure, S., Canonne, J., Ben Khaled, S., Khafif, M., Pouzet, C., Jauneau, A., Roby, D., and Rivas, S.** (2013). Arabidopsis ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. *Nature communications* **4**: 1476.
- McAinsh, M.R., Brownlee C., and hetherington, A.M.** (1990). Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature* **343** (6254): 186–188.
- McLoughlin, F., Galvan-Ampudia, C.S., Julkowska, M.M., Caarls, L., van der Does, D., Lauriere, C., Munnik, T., Haring, M.A., and Testerink, C.** (2012). The Snf1-related protein kinases SnRK2.4 and SnRK2.10 are involved in maintenance of root system architecture during salt stress. *The Plant journal for cell and molecular biology* **72** (3): 436–449.
- 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., and Xu, H.E.** (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462** (7273): 602–608.
- Melcher, K., Xu, Y., Ng, L.-M., Zhou, X.E., Soon, F.-F., Chinnusamy, V., Suino-Powell, K.M., Kovach, A., Tham, F.S., Cutler, S.R., Li, J., Yong, E.-L., Zhu, J.-K., and Xu, H.E.** (2010). Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nature structural & molecular biology* **17** (9): 1102–1108.
- Miseta, A., Fu, L., Kellermayer, R., Buckley, J., and Bedwell, D.M.** (1999). The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the vps33Delta vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **274** (9): 5939–5947.
- 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., and Tanokura, M.** (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462** (7273): 609–614.
- Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2010). Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell Physiol* **51** (5): 842–847.

- Moes, D., Himmelbach, A., Korte, A., Haberer, G., and Grill, E.** (2008). Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **54** (5): 806–819.
- Nakamura, S., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R.** (2001). Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **26** (6): 627–635.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual review of plant biology* **56**: 165–185.
- Nemhauser, J.L., and Torii, K.U.** (2016). Plant synthetic biology for molecular engineering of signalling and development. *Nature plants* **2**: 16010.
- Ng, L.M., Melcher, K., Teh, B.T., and Xu, H.E.** (2014). Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta pharmacologica Sinica* **35** (5): 567–584.
- Ng, L.-M., Soon, F.-F., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Suino-Powell, K.M., Chalmers, M.J., Li, J., Yong, E.-L., Zhu, J.-K., Griffin, P.R., Melcher, K., and Xu, H.E.** (2011). Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** (52): 21259–21264.
- Nguyen, D., Rieu, I., Mariani, C., and van Dam, N.M.** (2016). How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. *Plant Mol Biol* **91** (6): 727–740.
- Nieves-Cordones, M., Caballero, F., Martinez, V., and Rubio, F.** (2012). Disruption of the *Arabidopsis thaliana* Inward-Rectifier K⁺ Channel *AKT1* Improves Plant Responses to Water Stress. *Plant and Cell Physiology* **53** (2): 423–432.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G.** (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Molecular cell* **15** (5): 661–675.
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T., and Smith, O.E.** (1963). Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142** (3599): 1592–1593.
- Okamoto, M., Peterson, F.C., Defries, A., Park, S.-Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B.F., and Cutler, S.R.** (2013). Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- 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., and Cutler, S.R.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324** (5930): 1068–1071.
- Park, S.-Y., Peterson, F.C., Mosquana, A., Yao, J., Volkman, B.F., and Cutler, S.R.** (2015). Agrochemical control of plant water use using engineered abscisic acid receptors. *Nature* **520** (7548): 545–548.
- Pawson, T., and Scott, J.D.** (2005). Protein phosphorylation in signaling - 50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* **30** (6): 286–290.
- Pfister, B., Sanchez-Ferrer, A., Diaz, A., Lu, K., Otto, C., Holler, M., Shaik, F.R., Meier, F., Mezzenga, R., and Zeeman, S.C.** (2016). Recreating the synthesis of starch granules in yeast. *eLife* **5**.
- Pflügler, K.** (2016). Analyse von ABA-Signalweg-Komponenten in *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit. Lehrstuhl für Botanik. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Pierre-Jerome, E., Jang, S.S., Havens, K.A., Nemhauser, J.L., and Klavins, E.** (2014). Recapitulation of the forward nuclear auxin response pathway in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111** (26): 9407–9412.
- Pireyre, M., and Burow, M.** (2015). Regulation of MYB and bHLH transcription factors: A glance at the protein level. *Molecular plant* **8** (3): 378–388.
- Pleißner, S.** (2015). Proteinkinasen der Abscisinsäure-Signaltransduktion - in vitro Charakterisierung und Regulation. Dissertation. Lehrstuhl für Botanik. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Qin, X., and Zeevaart, J.A.** (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (26): 15354–15361.
- Qin, Y., Guo, M., Li, X., Xiong, X., He, C., Nie, X., and Liu, X.** (2010). Stress responsive gene CIPK14 is involved in phytochrome A-mediated far-red light inhibition of greening in *Arabidopsis*. *Sci China Life Sci* **53** (11): 1307–1314.
- Qin, Y., Li, X., Guo, M., Deng, K., Lin, J., Tang, D., Guo, X., and Liu, X.** (2008). Regulation of salt and ABA responses by CIPK14, a calcium sensor interacting protein kinase in *Arabidopsis*. *Sci. China, C, Life Sci.* **51** (5): 391–401.

- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., and Grill, E.** (2010). ABA perception and signalling. *TRENDS PLANT SCI* **15** (7): 395–401.
- Reeves, W.M., Lynch, T.J., Mobin, R., and 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. *Plant molecular biology* **75** (4-5): 347–363.
- Resh, M.D.** (1999). Fatty acylation of proteins: New insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1451** (1): 1–16.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., -Z., C., Jiang, 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., and -L. Yu, G.** (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* **290** (5499): 2105–2110.
- Saab, I.N., Sharp, R.E., Pritchard, J., and Voetberg, G.S.** (1990). Increased Endogenous Abscisic Acid Maintains Primary Root Growth and Inhibits Shoot Growth of Maize Seedlings at Low Water Potentials. *PLANT PHYSIOLOGY* **93** (4): 1329–1336.
- Sadowski, I., Su, T.-C., and Parent, J.** (2007). Disintegrator vectors for single-copy yeast chromosomal integration. *Yeast* **24** (5): 447–455.
- Sah, S.K., Reddy, K.R., and Li, J.** (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front. Plant Sci.* **7**: 571.
- Sambrook, J., and Russell, D.W.** (2001). *Molecular cloning a laboratory manual* (Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.-Y., Jamin, M., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., and Márquez, J.A.** (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462** (7273): 665–668.
- Schachtman, D., Schroeder, J., Lucas, W., Anderson, J., and Gaber, R.** (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* **258** (5088): 1654–1658.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., and Allen, G.J.** (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410** (6826): 327–330.
- Schulz, P., Herde, M., and Romeis, T.** (2013). Calcium-dependent protein kinases: Hubs in plant stress signaling and development. *PLANT PHYSIOLOGY* **163** (2): 523–530.

- Shi, J.** (1999). Novel Protein Kinases Associated with Calcineurin B-like Calcium Sensors in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* **11** (12): 2393–2406.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current opinion in plant biology* **3** (3): 217–223.
- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., and Szarejko, I.** (2016). The Role and Regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in Plant Development, Abiotic Stress Responses and Phytohormone Crosstalk. *Front. Plant Sci.* **7**: 1884.
- Smith, O.E.** (1969). Changes in abscission - accelerating substances with development of Cotton fruit. *New Phytol* **68** (2): 313–322.
- Soon, F.-F., Ng, L.-M., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Tan, M.H.E., Suino-Powell, K.M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M.J., Brunzelle, J.S., Zhang, H., Yang, H., Jiang, H., Li, J., Yong, E.-L., Cutler, S., Zhu, J.-K., Griffin, P.R., Melcher, K., and Xu, H.E.** (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science (New York, N.Y.)* **335** (6064): 85–88.
- Sornaraj, P., Luang, S., Lopato, S., and Hrmova, M.** (2016). Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: A molecular model of a wheat bZIP factor and implications of its structure in function. *Biochimica et biophysica acta* **1860** (1 Pt A): 46–56.
- Spitz, F., and Furlong, E.E.M.** (2012). Transcription factors: From enhancer binding to developmental control. *Nature reviews. Genetics* **13** (9): 613–626.
- Spollen, W.G., LeNoble, M.E., Samuels, T.D., Bernstein, N., and Sharp, R.E.** (2000). Abscisic Acid Accumulation Maintains Maize Primary Root Elongation at Low Water Potentials by Restricting Ethylene Production. *Plant Physiol.* **122** (3): 967–976.
- Stefan, M.I., and Le Novère, N.** (2013). Cooperative binding. *PLoS computational biology* **9** (6): e1003106.
- Steinberg, S.F.** (2008). Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological Reviews* **88** (4): 1341–1378.
- Taylor, S.S., Ilouz, R., Zhang, P., and Kornev, A.P.** (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13** (10): 646–658.
- Taylor, S.S., and Kornev, A.P.** (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **36** (2): 65–77.

- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., and Befort, B.L.** (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (50): 20260–20264.
- Tischer, S.V.** (2016). Charakterisierung der Abscisinsäure-Rezeptorkomplexe in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Lehrstuhl für Botanik. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Tischer, S.V., Wunschel, C., Papacek M., Kleingrewe, Karin, Christmann, A., and Grill, E.** (2017). Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and co-receptors from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (41): 17588–17593.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** (21): 11632–11637.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J.I., and Kangasjarvi, J.** (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452** (7186): 487–491.
- Verma, V., Ravindran, P., and Kumar, P.P.** (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology* **16**: 86.
- Vilanova, C., Hueso, A., Palanca, C., Marco, G., Pitarch, M., Otero, E., Crespo, J., Szablowski, J., Rivera, S., Domínguez-Escribà, L., Navarro, E., Montagud, A., Córdoba, P.F. de, González, A., Ariño, J., Moya, A., Urchueguía, J., and Porcar, M.** (2011). Aequorin-expressing yeast emits light under electric control. *Journal of biotechnology* **152** (3): 93–95.
- Vilela, B., Pagès, M., and Riera, M.** (2015). Emerging roles of protein kinase CK2 in abscisic acid signaling. *Frontiers in plant science* **6**: 966.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M., and Sharma, S.** (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front. Plant Sci.* **8**: 161.

- Vlad, F., Droillard, M.-J., Valot, B., Khafif, M., Rodrigues, A., Brault, M., Zivy, M., Rodriguez, P.L., Merlot, S., and 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. *The Plant journal for cell and molecular biology* **63** (5): 778–790.
- Waadt, R., Manalansan, B., Rauniyar, N., Munemasa, S., Booker, M.A., Brandt, B., Waadt, C., Nusinow, D.A., Kay, S.A., Kunz, H.-H., Schumacher, K., DeLong, A., Yates, J.R., and Schroeder, J.I.** (2015). Identification of Open Stomata1-Interacting Proteins Reveals Interactions with Sucrose Non-fermenting1-Related Protein Kinases2 and with Type 2A Protein Phosphatases That Function in Abscisic Acid Responses. *Plant Physiol.* **169** (1): 760–779.
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., and Kudla, J.** (2008). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *The Plant Journal* **56** (3): 505–516.
- Wang, M., Weiss, M., Simonovic, M., Haertinger, G., Schrimpf, S.P., Hengartner, M.O., and Mering, C. von** (2012). PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life. *Molecular & cellular proteomics MCP* **11** (8): 492–500.
- Weinl, S., and Kudla, J.** (2009). The CBL-CIPK Ca(2+)-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytol.* **184** (3): 517–528.
- Wellmann, C.** (2012). Charakterisierung der calciumabhängigen Proteinkinase GCA2 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Lehrstuhl für Botanik. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Wernimont, A.K., Amani, M., Qiu, W., Pizarro, J.C., Artz, J.D., Lin, Y.-H., Lew, J., Hutchinson, A., and Hui, R.** (2011). Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins* **79** (3): 803–820.
- Wernimont, A.K., Artz, J.D., Finerty, P., Lin, Y.-H., Amani, M., Allali-Hassani, A., Senisterra, G., Vedadi, M., Tempel, W., Mackenzie, F., Chau, I., Lourido, S., Sibley, L.D., and Hui, R.** (2010). Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nature structural & molecular biology* **17** (5): 596–601.
- Whalley, H.J., Sargeant, A.W., Steele, J.F.C., Lacoere, T., Lamb, R., Saunders, N.J., Knight, H., and Knight, M.R.** (2011). Transcriptomic Analysis Reveals Calcium Regulation of Specific Promoter Motifs in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **23** (11): 4079–4095.

- Wiesenberger, G., Steinleitner, K., Malli, R., Graier, W.F., Vormann, J., Schweyen, R.J., and Stadler, J.A.** (2007). Mg²⁺ deprivation elicits rapid Ca²⁺ uptake and activates Ca²⁺/calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **6** (4): 592–599.
- Wunschel, C.** (2017). Biochemische Charakterisierung des Rezeptorkomplexes für Abscisinsäure. Dissertation. Lehrstuhl für Botanik. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München.
- Xie, T., Ren, R., Zhang, Y.-y., Pang, Y., Yan, C., Gong, X., He, Y., Li, W., Di Miao, Hao, Q., Deng, H., Wang, Z., Wu, J.-W., and Yan, N.** (2012). Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the *Arabidopsis thaliana* abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. *The Journal of biological chemistry* **287** (1): 794–802.
- Yan, J., Niu, F., Liu, W.-Z., Zhang, H., Wang, B., Yang, B., and Jiang, Y.-Q.** (2014). *Arabidopsis* CIPK14 positively regulates glucose response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Di Wu, Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J., and Yan, N.** (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature structural & molecular biology* **16** (12): 1230–1236.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols* **2** (7): 1565–1572.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K.** (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* **281** (8): 5310–5318.
- Yoshida, T., Fujita, Y., MARUYAMA, K., MOGAMI, J., TODAKA, D., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic-acid signaling in response to osmotic stress. *Plant Cell Environ*: n/a.
- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2006). CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (19): 7506–7511.
- Yu, Q., An, L., and Li, W.** (2013). The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants. *Plant Cell Rep*.

- Zhang, X.L., Jiang, L., Xin, Q., Liu, Y., Tan, J.X., and Chen, Z.Z.** (2015). Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front. Plant Sci.* **6**.
- Zhang, X.S., and Choi, J.H.** (2001). Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *Journal of molecular evolution* **53** (3): 214–224.
- Zheng, Y., Schumaker, K.S., and Guo, Y.** (2012). Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109** (31): 12822–12827.
- Zhou, X., Hao, H., Zhang, Y., Bai, Y., Zhu, W., Qin, Y., Yuan, F., Zhao, F., Wang, M., Hu, J., Xu, H., Guo, A., Zhao, H., Zhao, Y., Cao, C., Yang, Y., Schumaker, K.S., Guo, Y., and Xie, C.G.** (2015). SOS2-LIKE PROTEIN KINASE5, an SNF1-RELATED PROTEIN KINASE3-Type Protein Kinase, Is Important for Abscisic Acid Responses in *Arabidopsis* through Phosphorylation of ABSCISIC ACID-INSENSITIVE5. *PLANT PHYSIOLOGY* **168** (2): 659–676.
- Zhu, S.-Y., Yu, X.-C., Wang, X.-J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.-C., Shang, Y., Du, S.-Y., Wang, X.-F., Wu, F.-Q., Xu, Y.-H., Zhang, X.-Y., and Zhang, D.-P.** (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **19** (10): 3019–3036.

8 DANKSAGUNG

Vielen Dank an,

Prof. Grill und dem ganzen Lehrstuhl für Botanik, für eine wunderbare Arbeitsatmosphäre, viel Unterstützung, noch mehr Geduld und all die Momente, welche die Arbeit in Freising so besonders machten.

Prof. Grill, Prof. Poppenberger-Sieberer und Prof. Hückelhoven dafür, dass sie sich die Zeit genommen haben diese Arbeit zu begutachten.

Dr. David Chiasson für sein „*Golden-Gate* Klonierungssystem“ und all die Vektoren, mit denen er meinen Arbeitsalltag um so vieles leichter gemacht hat.

Dr. Martin Scholz und Dr. Julia Mergner für die technische und theoretische Unterstützung im Bereich der Phosphoproteomics.

Klaus Pflügler und Mona Burkhard für ihren Ehrgeiz, ihren Fleiß und ihre Inspiration während ihrer Bachelorarbeiten. Ich wünsche beiden das Beste für ihr weiteres Studium.

Christoph Heidersberger und Christian Kornbauer für ihre Hilfe mit unzähligen Klonierungen und all der Unterstützung im Labor.

Der ganzen AG Kudla aus Münster, und im besonderen Kai Edel und Phillip Köster, für die Starthilfe mit den CIPKs und die vielen wertvollen Diskussionen und Gespräche über all die Jahre hinweg. Möge das Band zwischen Freising und Münster noch lange bestehen.

Dem SFB 924 und der ganzen „*Students Activity*“ für unendliche Möglichkeiten der Entfaltung, viele gute Diskussionen und die besten Lagerfeuer, Poolpartys und Stammtische während meiner Promotion.

Herbert, Theresa, Günter und Ilse dafür, dass sie Freising zu einem Zuhause gemacht haben.

Allen Doktoranden der „*Botany ALLSTARS and Friends*“. Ihr habt Freising zu dem wunderbaren Ort gemacht, der er ist und seid der Grund, dass die Arbeit an diesem Lehrstuhl nie langweilig geworden ist. Danke für die wunderbare Zeit.

“Some people step in our lives and leave footprints on our hearts” - Vielen lieben Dank von Herzen an Steffi, Natalie, Sebastian und Teresa. Dafür, dass ihr immer da seid, mich auch in schwierigen Stunden aufgefangen habt und für so viele wertvolle Erfahrungen, Erlebnisse und Momente. Und besonders für all eure Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit.

Meinen Eltern, Bastian, Miri und den Zwillingen für all eure Unterstützung, all eure Liebe und dafür, dass ihr eine so wunderbare Familie seid.

9 LEBENS LAUF

MORITZ RUSCHHAUPT

GEBURTSTAG: 19.10.1984

GEBURTSORT: BIELEFELD, DEUTSCHLAND

seit 10/2011	<p>Promotion an der Technischen Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Lehrstuhl für Botanik, AG Prof. Grill. Titel der Doktorarbeit: „Rekonstruktion und Charakterisierung der Signalkaskade des Phytohormones Abscisinsäure in Hefe“</p>
10/2005 - 07/2011	<p>Diplomstudium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart Lehrstuhl für Botanik, AG Prof. Heyer. Titel der Diplomarbeit: „Freezing tolerance of <i>Arabidopsis thaliana</i> - Improvement by genetical engineering and the role of ice nucleation“</p>
09/2009 - 05/2010	<p>Forschungs-Aufenthalt in Südafrika an der University of Cape Town Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie, AG Prof. Rybicki. Titel der Studienarbeit: „Replication of maize streak virus lacking RepA or RepA-pRBR interaction“</p>
07/2005 - 08/2005	<p>Praktikum bei Arthro-Kinetics-PLC Arbeit mit humanen Knorpelzellen zur Implantats-Herstellung</p>
06/2004 - 05/2005	<p>Zivildienst an der Biologischen Station Senne e.V.</p>
06/2004	<p>Abitur am Niklas-Luhmann-Gymnasium, Oerlinghausen</p>

PUBLIKATIONEN

Ruschhaupt, M., Martin, D.P., Lakay, F., Bezuidenhout, M., Rybicki, E.P., Jeske, H., and Shepherd, D.N. (2013). Replication modes of maize streak virus mutants lacking RepA or the RepA-pRBR interaction motif. *Virology* **442** (2): 173–179.

Edel, K.H., Scholz, M., Köster, P., Han, J., Schmitz-Thom I., Böhmer, M, Turnbull, M, Manishankar, P, Dong, Q., Ruschhaupt, M., Grill, E., and Kudla, J. Stress Induced Calcium signalling facilitates ABA mediated transcriptional adaption. *Nature* (submitted).

Meissner, M., Orsini, E., Ruschhaupt, M., Melchinger, A.E., Hinch, D.K., and Heyer, A.G. (2013). Mapping quantitative trait loci for freezing tolerance in a recombinant inbred line population of *Arabidopsis thaliana* accessions Tenela and C24 reveals REVEILLE1 as negative regulator of cold acclimation. *Plant Cell Environ* **36** (7): 1256–1267.