

Funktion der Calcium-abhängigen Proteinkinase (CPK) 23 in *Arabidopsis thaliana* und Unterschiede zwischen verschiedenen Ökotypen

Martin Sühnel

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Erwin Grill
2. Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer

Die Dissertation wurde am 09.02.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 15.05.2024 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis.....	I
II	Abkürzungen.....	III
III	Zusammenfassung.....	VII
IV	Summary.....	VIII
1	Einleitung.....	1
1.1	Abiotischer Stress.....	1
1.1.1	Abiotischer Stress – Trockenstress.....	1
1.1.2	Abiotischer Stress – Salzstress.....	2
1.1.3	Abiotischer Stress – Kältestress.....	3
1.1.4	Pflanzliche Resistenz-Mechanismen gegen abiotischen Stress.....	4
1.2	Phytohormone.....	8
1.2.1	Phytohormone – Wachstumsstimulierend.....	9
1.2.2	Phytohormone – Wachstumsinhibierend.....	12
1.3	Abscisinsäure.....	16
1.3.1	Abscisinsäure – Biosynthese.....	16
1.3.2	Abscisinsäure – Signaltransduktion.....	18
1.3.3	Abscisinsäure- Einfluss in Keimungsprozesse.....	20
1.4	Calcium-abhängige Proteinkinase (CPKs).....	22
1.4.1	CPKs – Aufbau und Regulation.....	23
1.4.2	CPKs – Einfluss auf ABA-abhängige abiotische Stress-Reaktionen.....	28
1.4.3	CPK23.....	30
1.4.4	Zielsetzung.....	32
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	33
2.2	Geräte.....	33
2.3	Software und Datenbanken.....	35
2.4	Verwendete Mikroorganismen und Pflanzen-Linien.....	37
2.5	Kultivierung von Mikroorganismen.....	39
2.5.1	Kultivierung von Bakterien.....	39
2.5.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	40
2.6	Arbeiten mit DNA.....	42
2.6.1	Klonierung mit dem Golden-Gate System.....	42
2.6.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.6.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	47

Inhaltsverzeichnis

2.6.4	Aufreinigung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
2.6.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	48
2.6.6	Zielgerichtete Mutagenese mittels <i>Golden-Gate</i>	49
2.6.7	Plasmid-Präparation aus <i>E. Coli</i>	49
2.6.8	Restriktionsverdau von DNA	49
2.7	Arbeiten mit Hefe.....	50
2.7.1	Hefe-Transformation.....	50
2.7.2	Transaktivierungs-Luciferase-Assay in pSAR-Hefen	50
2.7.3	Interaktionsstudien in Hefe (Y2H).....	51
2.8	Arbeiten mit Protoplasten.....	52
2.8.1	Herstellung der Enzymlösung für die Isolation von Protoplasten.....	52
2.8.2	Protoplastenpräparation.....	52
2.8.3	Protoplasten Transfektion.....	53
2.8.4	Interaktionsstudien in Protoplasten (<i>split</i> -Luciferase Assay).....	56
2.9	Arbeiten mit Pflanzen.....	57
2.9.1	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
2.9.2	Anzuchtbedingungen.....	58
2.9.3	Samensterilisation.....	58
2.9.4	Keimungsversuche.....	59
2.9.5	Messung des Wurzelwachstum.....	60
2.9.6	Messung der Blattoberflächentemperatur	60
2.10	Konfokale Mikroskopie.....	60
3	Ergebnisse.....	61
3.1	Funktionsanalyse von CPK23.....	61
3.1.1	CPK23 als Regulator der ABA-Antwort.....	61
3.1.2	Physiologische Untersuchung von transgenen Linien.....	64
3.1.3	Der Einfluss von CPK23 auf den Keimungsregulator ABI5.....	72
3.1.4	Einfluss der Kinase-Domäne verschiedener CPK23-Ökotypen.....	74
3.2	CPK23 in Kältestress-Signalwegen.....	80
3.2.1	Der Einfluss von Kälte auf Lokalisation und enzymatische Aktivität von CPK23.....	80
3.2.2	CPK23-abhängige Regulation von CRT/DRE Bindeproteinen (DREBs)	86
3.3	Über welche Faktoren beeinflusst CPK23 den ABA-Signalweg?	91
3.3.1	CPK23-abhängige Regulation von ABRE-Bindefaktoren (ABFs).....	91
3.3.2	Einfluss der aminoterminalen Domäne verschiedener CPK23-Ökotypen.....	95
3.4	Typ 2C Protein Phosphatasen (PP2Cs) in der CPK23-abhängigen ABA-Antwort.....	102
3.4.1	Der Einfluss von PP2Cs auf CPK23	102

Inhaltsverzeichnis

3.4.2	Der Einfluss von PP2Cs auf ABF1	108
3.5	N-terminale Modifikationen der CPKs.....	113
3.5.1	Diverse CPKs in der ABA-Antwort.....	113
3.5.2	Aminoternale Aktivierungsmechanismen für CPK23	119
3.5.3	Der Einfluss depalmitoylierender Enzyme auf CPK23 in Protoplasten	122
3.5.4	Die Frage der CPK23-Lokalisation in Hefe	124
3.5.5	Der Einfluss depalmitoylierender Enzyme auf CPK23 in Hefe.....	127
3.5.6	Die Etablierung einer geeigneten Positiv-Kontrolle für depalmitoylierende Enzyme	129
3.6	Analyse von CPK23-Mutanten im Ler-0 <i>background</i>	133
3.6.1	Die Phänotypen von <i>gca2-1</i> und <i>gca2-2</i>	134
3.6.2	Komplementation von <i>gca2-2</i> und <i>gca2-1</i>	138
4	Diskussion.....	142
4.1	Die Funktion von CPK23 im ABA-Signalweg	143
4.1.1	Die Rolle von CPK23 in der Membran – Transporterregulation in der Literatur	143
4.1.2	Die Rolle von CPK23 in der Membran – Stomata-Regulation	144
4.1.3	Die Rolle von CPK23 in Keimungsprozessen.....	146
4.1.4	Der aminoternale Kontrollmechanismus	151
4.1.5	Die Regulation der ABFs	154
4.1.6	CPK23 im ABA-Signalweg: Eine Frage der Lokalisation	158
4.2	Die Funktion von CPK23 in ABA-unabhängigen Signalwegen	168
4.2.1	Die Rolle von CPK23 in der Kältestress-Antwort	169
4.2.2	Der Einfluss von CPK23 auf DREBs.....	174
4.2.3	Die Rolle von CPK23 in der Nitrat-Antwort	178
4.3	Unterschiede zwischen CPK23-Ökotypen	182
4.3.1	Unterschiede zwischen CPK23 aus Bur-0 und Ler-0 – Die Kinase-Domäne	183
4.3.2	Unterschiede zwischen CPK23 aus Bur-0 und Col-0 – die N-terminale Domäne	186
4.3.3	Unterschiede zwischen CPK23 aus Ler-0 und Col-0 – der Phänotyp.....	190
5	Anhang.....	194
5.1	Protein-Sequenzen von CPK23	194
5.2	Alignment der drei CPK23-Proteinsequenzen.....	195
5.3	Verteilung des Arginin/Serin SNPs an Position 290.....	196
5.3.1	Verteilung in Europa.....	196
5.3.2	Von den Höhenmetern-abhängige Verteilung in Spanien	196
5.4	Einfluss von Kälte auf die Enzym Aktivität in Protoplasten.....	197
5.4.1	Kälte-abhängiger Einfluss auf den pRD29B:LUC-Reporter	197
5.4.2	Kälte-abhängiger Einfluss auf den pDR5:LUC-Reporter	199

Inhaltsverzeichnis

5.5	Keimungsphänotypen.....	200
5.5.1	Col-0 transformiert mit pCPK23::X::tCPK23	200
5.5.2	ABF- <i>Knockout</i> Linien.....	201
5.5.3	dABF1-Linien transformiert mit pCPK23::X::tCPK23	202
5.5.4	dABF2/3/4-Linien transformiert mit pCPK23::X::tCPK23	203
5.5.5	CPK23- <i>Knockout</i> Linien.....	205
5.6	Starke Expression von CPK23 in Hefe hemmt das Zellwachstum	206
5.7	ABF-Mutanten in transgenen Assays	207
5.8	RAF- <i>like</i> MAPKKKs sind keine Aktivatoren von CPK23	208
5.9	Primer	210
6	Quellen	220
7	Danksagung	240

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1: Der Einfluss von Trockenstress auf die pflanzliche Photosynthese	2
Abb. 1. 2: Kälte-responsive Signalnetzwerke in Arabidopsis.	7
Abb. 1. 3: Vereinfachtes Model des JA/ABA-Netzwerk unter abiotischen Stress.....	15
Abb. 1. 4: Ablauf der ABA-Biosynthese in Arabidopsis.	17
Abb. 1. 5: Die Hauptkomponenten der ABA-Signaltransduktion.	19
Abb. 1. 6: Dendrogramm der CPKs/CRKs aus Arabidopsis.	23
Abb. 1. 7: Aufbau einer prototypischen Calcium-abhängigen Proteinkinase (CPK).....	27
Abb. 1. 8: Der Einfluss verschiedener CPKs auf Elemente des ABA-Signalweges.	29
Abb. 1. 9: CPK23 Sequenz-Alignment von den 3 Ökotypen Col-0, Bur-0 und Ler-0.....	32
Abb. 3. 1: CPK23 als positiver Regulator des ABA-Signalweges.	63
Abb. 3. 2: Phänotypen und Keimungsverhalten von transgenen Linien.	66
Abb. 3. 3: Blatt-Oberflächentemperatur von transgenen Linien.	68
Abb. 3. 4: Keimungsrate von transgenen Linien unter Stickstoffmangel.....	70
Abb. 3. 5: Keimungsrate von cpk23-rescue Linien unter Stickstoffmangel.....	71
Abb. 3. 6: CPK23-abhängige Regulation des ABI5-Transkriptionsfaktors.	73
Abb. 3. 7: Einfluss von CPK23 aus verschiedenen Arabidopsis Ökotypen auf den ABA-Signalweg.	75
Abb. 3. 8: Einfluss der Aminosäure an Position 290 auf die Aktivität von CPK23.	79
Abb. 3. 9: Einfluss von Kälte auf Lokalisation und Aktivität von CPK23.	82
Abb. 3. 10: Einfluss von Kälte auf die CPK23-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Reporter.	85
Abb. 3. 11: CPK23-abhängige Regulation von DREB1-Transkriptionsfaktoren.	87
Abb. 3. 12: Einfluss von DREB1B auf den ABA-Signalweg.	89
Abb. 3. 13: CPK23-abhängige Regulation des DREB2A-Transkriptionsfaktors.....	90
Abb. 3. 14: CPK23-abhängige Regulation von ABF-Transkriptionsfaktoren.....	92
Abb. 3. 15: ABF1-Regulation durch membran-assoziiertes CPK23.	94
Abb. 3. 16: Einfluss verschiedener membran-assoziiertes CPK23-Ökotypen auf die ABF1-Regulation.....	95
Abb. 3. 17: Einfluss des CPK23-N-Terminus aus verschiedenen Ökotypen auf die ABF1-Regulation... ..	97
Abb. 3. 18: Einfluss einer Ökotyp-spezifischen Deletion/Insertion in CPK23 auf die Regulation von ABF1.....	99
Abb. 3. 19: Einfluss Ökotyp-spezifischer SNPs in CPK23 auf die Regulation von ABF1.	101
Abb. 3. 20: Interaktionen zwischen CPK23 und PP2Cs in split-Luciferase Assays.....	104
Abb. 3. 21: Einfluss von CPK23 auf die PP2CA-abhängige Reprimierung des ABA-Signalweges.	106
Abb. 3. 22: Interaktionen zwischen CPK23 und PP2Cs in Y2H Assays.	107
Abb. 3. 23: Interaktionen zwischen ABF1 und PP2Cs in split-Luciferase Assays.....	110
Abb. 3. 24: Interaktionen zwischen ABF1 und PP2Cs in Y2H Assays.....	112
Abb. 3. 25: Natürliche N-terminale Modifikationen von CPKs.	115
Abb. 3. 26: Regulation von ABFs durch N-terminal unmodifizierte CPKs.	118
Abb. 3. 27: Einflüsse von Myristoylierung und Palmitoylierung auf die CPK23-Aktivität.	121
Abb. 3. 28: ABAPT-abhängige Regulation von CPK23 in Protoplasten.....	123
Abb. 3. 29: Einfluss des Promotors auf die CPK23-Lokalisation in Hefe.	126
Abb. 3. 30: ABAPT-abhängige Regulation von CPK23 in Hefe.	128
Abb. 3. 31: Aufbau einer Positiv-Kontrolle für depalmitoylierende Enzyme (Hefe).	130
Abb. 3. 32: Aufbau einer Positiv-Kontrolle für depalmitoylierende Enzyme (Protoplasten).	132
Abb. 3. 33: Mutationen und Phänotypen von gca2-1 und gca2-2.	135
Abb. 3. 34: Keimungsverhalten und Blatt-Oberflächentemperatur von gca-1 und gca2-2.	137

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3. 35: Keimungsverhalten von <i>gca2-2-rescue</i> -Linien.....	139
Abb. 3. 36: Keimungsverhalten von, mit <i>gca2-2-rescue</i> Linien gekreuzten, <i>gca2-1</i> Linien.....	141
Abb. 4. 1: Duale Funktion von CPK23.....	145
Abb. 4. 2: Genexpression von CPKs im Samen.....	148
Abb. 4. 3: Die Proteinstruktur von CPK23.....	153
Abb. 4. 4: Ungeordnete Regionen und zusätzliche Bindestellen im CPK23-N-Terminus.....	154
Abb. 4. 5: Alignment der ABFs mit ABI5.....	155
Abb. 4. 6: Mögliche N-terminale Aktivierungsmechanismen für CPK23.....	161
Abb. 4. 7: Die Genexpression verschiedener CPKs unter Kälte.....	170
Abb. 4. 8: Mögliche CPK23-abhängige Mechanismen unter Kälte.....	173
Abb. 4. 9: Möglicher Mechanismus über welchen der ABA-Signalweg CPK23-abhängig unter Kälte inhibiert werden kann.....	177
Abb. 4. 10: Mögliche Mechanismen über welche CPK23 im Nitrat-Signalweg involviert sein könnte.	181
Abb. 4. 11: Der Einfluss der Position 290 auf die Proteinstruktur von CPK23.....	185
Abb. 4. 12: Ökotypische Unterschiede im CPK23-N-Terminus können zu einer differenziellen Aktivierbarkeit führen.....	189
Abb. 5. 1: Einfluss der Höhenmeter auf die Verteilung des SNPs an Position 290 in Spanien.....	197
Abb. 5. 2: Einfluss von Kälte auf Luciferase- und GUS-Werte.....	198
Abb. 5. 3: Einfluss von Kälte auf die Induktion eines Auxin-Reporters.....	199
Abb. 5. 4: Auch bei CPK23-Expression unter dem endogenen Promotor ist die Keimungsrate beeinflusst.....	200
Abb. 5. 5: ABF-Knockout Linien keimen unter abiotischen Stress schneller als der WT.....	201
Abb. 5. 6: Mit CPK23 und entsprechenden Kontrollen transformierte <i>dABF1</i> -Linien zeigen vergleichbare Effekte.....	202
Abb. 5. 7: Mit CPK23 und entsprechenden Kontrollen transformierte <i>dABF2/3/4</i> -Linien zeigen vergleichbare Effekte.....	204
Abb. 5. 8: CPK23-KO Linien zeigen keine gesteigerte Keimungsrate unter Stressbedingung.....	205
Abb. 5. 9: Expression von CPK23 hemmt das Hefewachstum abhängig von der Expressions-Stärke.....	206
Abb. 5. 10: CPK23 kann über <i>ABF1_S94A</i> den ABA-Signalweg induzieren, jedoch nicht über <i>ABF2_S86A_S94A</i>	208
Abb. 5. 11: CPK23 kann nicht durch RAF-like MAPKKs aktiviert werden.....	209

II Abkürzungen

AAO	Abscisin-Aldehydoxidase
ABA	Abscisinsäure
ABF	ABRE Bindefaktor
ABRE	<i>ABA response element</i>
ABI	<i>ABA insensitive</i>
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure
ACS	Aminocyclopropan-1-Carboxylase Synthase
AD	Aktivierungsdomäne
AHK	Arabidopsis-Histidin Kinase
APT	Acyl Protein Thioesterase
ARF	<i>Auxin response-factor</i>
AS	Aminosäure
ASP (D)	Aspartat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bp	Basenpaar
bZIP	<i>Basic leucin zipper</i>
BD	Bindedomäne
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BL	Brassinolide
BR	Brassinosteroide
Ca	Calcium
CAT	Catalase
CBF	CRT-Bindeprotein
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
CIPK	<i>CBL interacting</i> Proteinkinase
CBL	<i>Calcineurin b-like</i>
CDS	codierende Sequenz
CML	Calmodulin
Cys (C)	Cystein

Abkürzungen

DAGK	Diacylglycerol-Kinase
DREB	DRE-Bindeprotein
EMS	Ethylmethansulfonat
EF	Elongationsfaktor
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERF	Ethylen <i>response-factor</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
Fe	Eisen
GB	Glycin-Betain
GA	Gibberelline
Gly (G)	Glycin
GR	Gluthation Reduktase
HIS (H)	Histidin
IDR	intrinsische ungeordnete Region
JA	Jasmonsäure
KO	<i>Knockout</i>
LAR	Luciferase Assay Reagenz
LB	Luria-Bertani
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARCKS	<i>Myristoylated Alanine-Rich C-kinase substrate</i>
Mg	Magnesium
Mn	Mangan
MS	Murashige-Skoog
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
Met (M)	Methionin
Mo	Molybdän
MQ	MiliQ
MYB	Myeloblastis Onkogen
MYC	Myelocytomatose Onkogen
NaCl	Natriumchlorid
NCED	9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase

Abkürzungen

NLP	NIN- <i>like</i> Protein
NLS	nukleare Lokalisationssequenz
NMT	N-Myristoyltransferase
NPR	<i>None-Expressor of PR genes</i>
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
OE	Überexpression
Os	<i>Oryza sativa</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAT	Palmitoyltransferase
PKC	Proteinkinase C
PP	Proteinphosphatase
PP	Protoplasten
PP2C	Protein Phosphatase Type 2C
PYR	<i>Pyrobactin resistant</i>
PYL	<i>PYR1-like</i>
Pc	<i>Petroselinum crispum</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RIP	regulierte intramembrane Proteolyse
rpm	<i>rotations per minute</i>
RCAR	<i>Regulatory component of ABA receptor</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RLCK	Rezeptor-ähnliche cytoplasmatische Kinase
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SA	Salicylsäure
Ser (S)	Serin
Si	<i>Solanum lycopersicum</i>
SnRK2	<i>Sucrose non fermenting1 related</i> Proteinkinase
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SDM	<i>Site directed mutagenesis</i>
SDR	kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase

Abkürzungen

SD	<i>Synthetic</i> Dextrose
SOD	Superoxid Dismutase
St	<i>Solanum tuberosum</i>
T-DNA	Transfer DNA
TF	Transkriptionsfaktor
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
Thr (T)	Threonin
TK	Tote Kinase
TMD	Transmembrandomäne
TP	Terpen Synthase
Vk	verkürzt
Y2H	Yeast two hybrid
Zm	<i>Zea mays</i>
Zn	Zink

III Zusammenfassung

Calcium-abhängige Proteinkinasen (CPKs) dienen in Pflanzen der Integration des Calcium-Signals und fungieren als Regulatoren von Membran-Kanälen und Phytohormon-Signalwegen. Auch der Abscisinsäure (ABA)-Signalweg, welcher die pflanzliche Adaption unter abiotischen Stress steuert, wird durch diese reguliert. Die meisten der bisher hier beschriebenen CPKs sind aufgrund einer nukleären Lokalisation in der Lage direkt mit Transkriptionsfaktoren des ABA-Signalweges (ABFs) zu interagieren und diese zu phosphorylieren. CPK23 wird wegen der Phänotypen einer EMS-Mutante im Ler-0 *background* ebenfalls eine solche Funktion zugesprochen. Aufgrund der Membran-Assoziation durch Myristoylierung und Palmitoylierung konnten bis jetzt in transienten Reporter-Assays jedoch nur Nachweise einer solchen Regulation nach vorheriger artifizierlicher Modifikation des CPK23 N-Terminus erbracht werden. Diese Modifikationen führen durch Aufhebung der Membran-Assoziation zu einer veränderten Lokalisation. Die genomische Sequenz von CPK23 zeigt große Unterschiede zwischen verschiedenen Ökotypen, ein Umstand, der auf evolutionäre Anpassungen und differentielle Funktionen hinweist. Ziel dieser Arbeit war die Verifizierung der CPK23-Funktion in transienten Reporter-Assays und transgenen Pflanzenlinien, Analyse der Unterschiede zwischen 3 Ökotypen, sowie die Untersuchung möglicher Aktivierungsmechanismen, die eine Lokalisationsänderung des Proteins auslösen. Die Ergebnisse der Experimente bestätigen, dass es sich bei CPK23 um einen positiven Regulator des ABA-Signalweges handelt und diesen über Phosphorylierung der ABFs induziert. Trotz Hinweisen auf eine Membranablösung unter Kälte, konnte unter dieser Bedingung keine gesteigerte CPK23-abhängige Regulierung des ABA-Signalweges beobachtet werden. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass CPK23 unter Kälte den ABA-Signalweg über DREB1B negativ und ABA-unabhängige Signalwege positiv reguliert. Auch gibt es Hinweise auf eine ABF-abhängige Änderung der Lokalisation, da membrangebundenes CPK23 den ABA-Signalweg induzieren kann, wenn zusätzlich ABF1 in den Pflanzenzellen exprimiert wird. Diesen Befund teilt CPK23 mit anderen CPKs, aber nicht mit CPK23 aus anderen Ökotypen. In CPK23 aus den Ökotypen Ler-0 und Bur-0 verhindert eine fehlende Insertion im N-Terminus diesen Mechanismus. Nicht geklärt werden konnte unterdessen die Natur dieses unbekanntes Mechanismus. Eine Regulation durch bisher in Arabidopsis beschriebene de-palmitoylierende Enzyme konnte ausgeschlossen werden, weitere mögliche Regulatoren werden diskutiert. Auch Unterschiede in der Befähigung der verschiedenen CPK23-Ökotypen den ABA-Signalweg zu induzieren wurden bestätigt und erneut auf ein Serin an Position 290 in der Kinase-Domäne zurückgeführt. Die Expression von CPK23 in transgenen Pflanzenlinien geht mit einer verringerten Keimungsrate unter abiotischen Stressbedingungen einher. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CPK23 möglicherweise in mehreren Signalwegen involviert ist und dass es ökotypische Unterschiede in dessen Aktivität, Aktivierung und Regulation gibt.

IV Summary

Calcium-dependent protein kinases (CPKs) serve to integrate the calcium signal in plants and are known for their regulatory effects on membrane channels and phytohormone signaling pathways. The abscisic acid (ABA) signaling pathway, which controls plant adaptation under abiotic stress, is also regulated by those. Most of the CPKs described as positive regulators of ABA-signaling are able to interact directly with transcription factors of the ABA signaling pathway (ABFs) and to phosphorylate them due to their nuclear localization. CPK23 is also assigned such a function because of the phenotypes of an EMS mutant in the Ler-0 *background*. However, due to membrane association through myristoylation and palmitoylation, transient reporter assays have so far only provided evidence of such regulation after prior modification of the CPK23 N-terminus, which led to an abrogation of membrane binding. The genomic sequence of CPK23 also shows large differences between different ecotypes, a circumstance that may indicate evolutionary adaptations and differential functions. The aim of this work was therefore to verify the CPK23 function in transient reporter assays and transgenic plant lines, to analyze the differences between 3 different ecotypes, and to investigate possible activation mechanisms that can trigger a localization change of the protein. The results of the experiments confirm that CPK23 is a positive regulator of the ABA signaling pathway, which can trigger an induction of the signaling pathway directly via phosphorylation of ABFs. Membrane detachment might be induced by cold, although under this condition no increased CPK23-dependent regulation of the ABA signaling pathway can be detected. Rather, the results indicate that CPK23 regulates ABA-signaling negatively under cold-stress conditions via DREB1B while at the same time the ABA-independent pathway is induced. There is also evidence for an ABF-dependent change in localization, as membrane-bound CPK23 can induce the ABA signaling pathway in an ABF concentration-dependent manner. CPK23 shares this finding with other CPKs, but not with CPK23 of other ecotypes. In CPK23 from Ler-0 and Bur-0 ecotypes, a missing insertion in the N-terminus prevents this mechanism. Meanwhile, the nature of this unknown mechanism could not be clarified. Regulation by de-palmitoylating enzymes previously known in Arabidopsis could be ruled out; other possible regulators are being discussed. Differences in the ability of the different CPK23 variants to induce the ABA signaling pathway were also confirmed and again attributed to a serine at position 290 in the kinase domain. However, the expression of all variants in plants is associated with a reduced germination rate under abiotic stress conditions. The results of this work show that CPK23 may be involved in multiple signaling pathways and that there are ecotypic differences in its activity, activation and regulation, which indicate evolutionary adaptations.

1 Einleitung

Zwischen den Jahren 1960 und 2010 hat sich die Bevölkerungszahl mehr als verdoppelt (Faostat, 2020). Gleichzeitig stieg bis zu Beginn des 21. Jahrhunderts die Menge an durch Nahrung aufgenommenen Kalorien [kcal] von 2420 auf 2808. Ein halbes Jahrhundert zuvor war diese Entwicklung kaum absehbar und man vermutete, dass sich die Bevölkerungszahlen aufgrund begrenzter Ressourcen bei 3 Milliarden Menschen stabilisieren würden (Gilland, 2002). Dass dies nicht der Fall war, ist der Entwicklung von Mineral-Düngemitteln (Stickstoff-, Kalium und Phosphat-Dünger), Insekten-Kontrolle, Vergrößerung der bewässerten Flächen und der grünen Revolution zu verdanken. Dieser positiven Entwicklung wirkt jedoch der Klimawandel entgegen. Es wird vermutet, dass durch Trockenstress, Salzstress und extreme Temperaturen bis zu 50 % der jährlichen Ernteerträge verloren gehen (Barnabás et al., 2007). Diese Arten von Stress können unter dem Begriff „abiotischer Stress“ zusammengefasst werden.

1.1 Abiotischer Stress

1.1.1 Abiotischer Stress – Trockenstress

Durch die globale Erderwärmung nimmt die Verdampfung von Wasser zu und die Niederschlagsmenge ab (Lobell et al., 2008). Über 10 % des bewirtschafteten Ackerlands, besonders in bereits trockenen Regionen, sind in der Folge von Dürren betroffen. Wie stark sich Trockenheit und Dürre auswirken, hängt neben der Niederschlagsmenge und Verteilung auch von der Beschaffenheit des Bodens und dessen Kapazität zur Feuchtigkeits-Speicherung ab (Wery et al., 1994). Kann die Pflanze nur bedingt Wasser aus dem trockenen Boden aufnehmen, so resultieren die Ernteauffälle hauptsächlich auf (1) der reduzierten Absorption photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR), (2) der reduzierten Strahlungsnutzungs-Effizienz (RUE) und (3) dem Absinken des Ernteindex (HI) (Earl and Davis, 2003). Die Auswirkungen von Trockenstress auf die Pflanze können gravierend sein. Der Wasserstatus in den Pflanzengewebe sinkt, wodurch die Blattentwicklung eingeschränkt wird. In der Folge werden die Blätter seneszent und abgeworfen. Durch den daraus resultierenden Abfall an Photoassimilaten kommt es zu einer Verringerung von Carboxylierungs-Vorgängen. Dieser Vorgang wird noch weiter durch die Schließung der Stomata verstärkt, da die Diffusion von CO₂-Molekülen in die Pflanze reduziert wird. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Bildung von reaktiven-Sauerstoff-Spezies (ROS), die zu oxidativen Stress und der damit verbundenen Schädigung von Membranen und

photosynthetischer Pigmente führt (Hussain et al., 2016). All diese Vorgänge führen zu einem Rückgang der photosynthetischen Aktivität der Pflanze und werden in Abbildung 1.1 schematisch gezeigt.

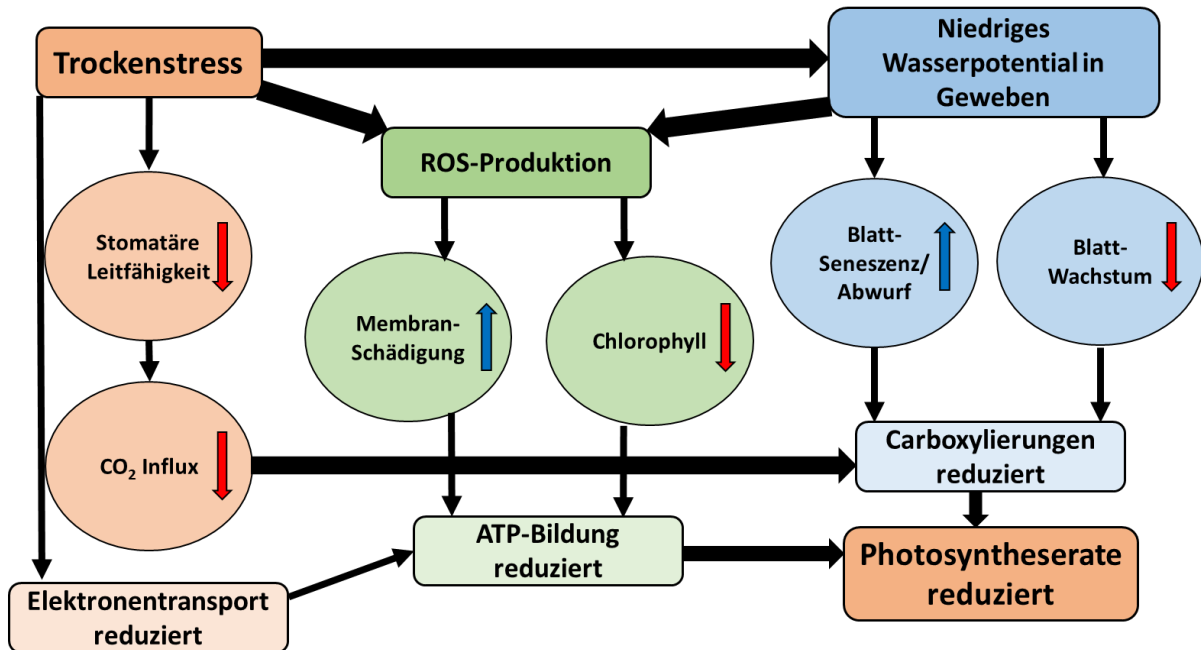


Abb. 1. 1: Der Einfluss von Trockenstress auf die pflanzliche Photosynthese.

Trockenstress löst eine Schließung der Stomata aus, wodurch die CO₂-Aufnahme sinkt (roter Weg). Durch Senkung des Wasserpotentials wird die Blattentwicklung gestört. Durch die daraus resultierende Reduktion der Photo-Assimilationsprodukte sinkt auch die Carboxylierungs-Geschwindigkeit (blauer Weg). Die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt zu oxydativem Stress, welcher sowohl die Membran als auch Photosynthesepigmente schädigt (grüner Weg). Alle Wege führen zu einer Reduktion der Photosyntheserate. Die Abbildung basiert auf (Hussain et al., 2016).

1.1.2 Abiotischer Stress – Salzstress

Bis zu 20 % des bewässerten Ackerlandes ist von Versalzung betroffen (Rodziewicz et al., 2014). Salzstress wirkt sich hierbei meist über zwei verschiedene Mechanismen negativ auf die Pflanzen aus: (1) schnell einsetzender osmotischer Stress und (2) langsam auftretende spezifische Toxizität von Ionen. Häuft sich Salz im Boden an, wird zuerst das Wasserpotential des Bodens herabgesetzt. Dadurch wird die Wasserleitfähigkeit der Pflanze negativ beeinflusst und diese muss mehr Energie darauf verwenden dem Boden das benötigte Wasser zu entnehmen (Munns, 2002). Diese Energie fehlt dann in anderen wichtigen Prozessen und führt zu einem verminderten Wuchs und Ernteertrag (Akram et al., 2002). Bereits 40 mM Salz reichen aus, um das Sprosswachstum einzuschränken. In sensitiven

Einleitung

Pflanzen wie Reis und Arabidopsis wird dieser Effekt bereits bei noch geringeren Konzentrationen ausgelöst (Munns and Tester, 2008). In den meisten Pflanzen-Spezien dominiert die osmotische Komponente von Salzstress die toxische Komponente. Erst bei sehr hohen Salzkonzentrationen oder langanhaltendem Stress wird Salz in älteren, nicht mehr wachsenden, Blättern eingelagert und führt deren Absterben herbei. Überschreitet die Menge an abgestorbenen Blattmaterial die der neugebildeten Blätter, kann die Pflanze nicht mehr genügend Kohlenhydrate über photosynthetische Prozesse herstellen um das weitere Wachstum zu gewährleisten (Munns and Tester, 2008). Natrium-Ionen spielen hierbei die größte Rolle und interferieren mit dem pflanzlichen Metabolismus. Da neben dem direkt toxischen Effekt der Natrium-Ionen im Cytosol auch das Kompetitieren der Natrium-Ionen um Kalium-Ionen-Bindestellen die Kalium-Homöostase im Zellinneren stört, kann die Zugabe von Kalium den Ionenstress abmildern (Munns, 2005).

1.1.3 Abiotischer Stress – Kältestress

Jede Pflanze hat einen Temperaturbereich, in welchem die Bedingungen optimal für Wachstum und Entwicklung sind. Wird dieser Bereich über- oder unterschritten, können je nach Sensitivität der Pflanze unterschiedliche Schädigungen auftreten. Pflanzen, die wie Bananen (*Musa sp.*) oder Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) an ein warmes Klima angepasst sind, zeigen bereits bei Temperaturen unterhalb von 15 °C kältebedingte Schädigungen (Guy, 1990). Als Reaktion auf die Kälte-Exposition ist das Blattwachstum reduziert. Bereits vorhandene Blätter verwelken und zeigen Anzeichen von Chlorose, die bis zu einem Absterben des Gewebes (Nekrose) führen. Dieser Vorgang kann auch die Antheren betreffen und Sterilität zur Folge haben (Wen, 2002). Der negative Effekt auf Pflanzen im reproduktiven Stadium ist einer der Hauptgründe für Ernteaufschläge bei Kulturpflanzen. Den Hauptschaden in den Pflanzen selbst verursacht Kältestress an der Plasmamembran, meist durch Stress-induzierte Dehydration (Uemura and Steponkus, 1994). Die Festigkeit bzw. Fluidität von Membranen, wird durch das Verhältnis von ungesättigten (eine oder mehr Doppelbindungen) zu gesättigten Fettsäuren (keine Doppelbindungen, vollständig gesättigt durch Wasserstoffatome) bestimmt. Je größer der Anteil gesättigter Fettsäuren, desto schneller verhärtet die Membran (Steponkus, 1984). Bei einer gewissen Übergangstemperatur wechselt die Membran von einem semi-fluiden zu einem semi-kristallinen Stadium. Kältesensitive Pflanzen weisen meist einen höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren auf und erreichen diesen Punkt bereits bei höheren Temperaturen. Kälteresistente Pflanzen hingegen haben einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren und vollziehen diesen Übergang erst bei deutlich niedrigeren Temperaturen (Yadav, 2010). Dehydration unter Kältestress wird bei extremen Temperaturen durch die Bildung von Eis begünstigt. Dieses wird

Einleitung

hauptsächlich im Apoplasten gebildet, da hier die Konzentration an wasserlöslichen Stoffen geringer ist. Durch den niedrigeren Dampfdruck kommt es zu einem Wasser-Gradienten zwischen Apoplast und umgebenden Zellen. Das Wasser fließt aus dem Cytosol in den apoplastischen Raum und führt dadurch zu einer mechanischen Belastung der Zellmembranen und Wände, die in der Folge reißen können (Olien and Smith, 1977). Der so entstandene Verlust der Membranintegrität führt zu einem Leck löslicher Stoffe. Zusätzlich wird die Integrität intrazellulärer Organellen zerstört, welches in einem Verlust der Kompartimentierung resultiert. Weitere Folgen von Kältestress sind die Störung photosynthetischer Abläufe, der Proteinassemblierung und allgemeiner metabolischer Prozesse (Yadav, 2010).

1.1.4 Pflanzliche Resistenz-Mechanismen gegen abiotischen Stress

Da es sich bei Pflanzen um sessile Organismen handelt, die Stress nicht durch einen Ortswechsel entgehen können, haben diese alternative Mechanismen entwickelt, um ihr Überleben auch unter erschwerten Bedingungen zu gewährleisten. Eine häufige Strategie, um mit Wasserstress umzugehen, sind Flucht-, Vermeidungs- und Toleranz-Reaktionen. Um Wasserstress zu vermeiden und in Trockenzeiten den Wasserverbrauch zu senken, kann die metabolische Aktivität und die Wachstumsrate gedrosselt werden. Alternativ gibt es Pflanzen, die ihren Lebenszyklus vor dem Einsetzen der Trockenperioden abschließen, indem sie zu günstigen Zeiten ihren Metabolismus und ihre Wachstumsrate erhöhen (Sherrard and Maherali, 2006). Eine andere Strategie ist die Überproduktion niedermolekularer wasserlöslicher Stoffe, um die Wasseraufnahme zu erleichtern. Diese akkumulieren im Cytoplasma und senken das osmotische Potential unterhalb der des Bodens ab (Serraj and Sinclair, 2002). Zu diesen Stoffen zählen (1) die Aminosäuren Prolin und Glycin, (2) die Zucker Trehalose, Glukose und Raffinose, sowie (3) Glycerol. Neben der osmotischen Anpassung hat die Bildung dieser Stoffe den Vorteil, dass sie dazu beitragen reaktive Sauerstoffspezies zu entziehen und Membranen, sowie Proteinstrukturen zu stabilisieren (Farooq et al., 2009). Um die Konzentration an vermehrt durch Trockenstress auftretenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-Reaktionen zu minimieren, die durch Interaktionen mit zellulären Elementen wie Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen und deren Oxydation irreparable Zellbeschädigungen hervorrufen können, bilden Pflanzen vermehrt Antioxidanten (Sheffield et al., 2012). Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören neben anderen die Superoxid-Dismutase (SOD), die Catalase (CAT) und die Gluthation-Reduktase (GR). Da auch Salzstress überwiegend durch die osmotische-Stress Komponente Einfluss auf die Pflanze nimmt, ist auch in diesem Fall die Osmoregulation in Form einer Überproduktion löslicher Stoffe ein entscheidendes Element. Hierbei wird Prolin hauptsächlich im Cytoplasma und Glycin-Betain (GB)

Einleitung

hauptsächlich in den Chloroplasten angereichert (Ketchum et al., 1991) (Genard et al., 1991). In den Chloroplasten kann GB die Thylakoidmembran schützen und somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der photosynthetischen Funktionen leisten. Auch das bei Salzstress absorbierte Natrium kann dabei helfen, die Ionen-Homöostase aufrecht zu erhalten: in der Vakuole kompartimentiert wirkt es dort als Osmolyt. Viele salztolerante Pflanzen (Halophyten) machen sich diesen Effekt zu Nutze (Zhu, 2001). Durch diese Strategie wird gleichzeitig vermieden, dass es zu einer toxischen Konzentration von Natrium kommt. Dies kann ebenfalls vermieden werden, indem Natrium aktiv über die Wurzeln abgegeben wird. Damit solche Prozesse ablaufen können, muss das Vorhandensein von abiotischem Stress erkannt und über Signaltransduktionsprozesse in der Pflanze weitergegeben werden. Obwohl Pflanzen innerhalb von Sekunden auf Salzstress reagieren können, ist kein Membranprotein bekannt, weder extra- noch intrazellulär, welches als Sensor für den Einstrom von Natrium-Ionen fungieren könnte (Munns and Tester, 2008). Bekannt ist jedoch, dass in Wurzelzellen als erste Reaktion auf externe Natrium-Applikation ein Calcium-Einstrom in das Cytoplasma ausgelöst wird. Dieser ermöglicht die Dimerisierung des *Calcineurin-B-like* Proteins CBL4/SOS3. CBL4 interagiert daraufhin mit dem CBL-*interacting* Protein CIPK24/SOS2. Der entstandene Komplex wird über einen kovalent-gebundenen Myristoylsäure-Rest an die Plasmamembran gelotst. Dort wird der Na^+/H^+ Antiporter SOS1 phosphoryliert und aktiviert (Qiu et al., 2002). Die Weiterleitung des Salzstress-Signals über weite Distanz von den Wurzeln zum Spross ist teilweise vom Phytohormon Abscisinsäure (ABA) abhängig (Fricke et al., 2006).

Auch für Kältestress ist noch kein spezifischer Membran-Rezeptor entdeckt worden. Jedoch spielt die LRR Rezeptor-ähnliche Kinase COLD1 bei der Wahrnehmung und Signaltransduktion eine wichtige Rolle (Edrisi Maryan et al., 2023). Allgemein wird angenommen, dass bereits die Versteifung der Membran in Folge von Kälte ausreicht, um die Expression Kälte-regulierter Gene zu induzieren. Experimente in Fettsäure-Desaturase-2 (FAD2) -Mutanten in Arabidopsis konnten zeigen, dass kälte-induzierte Membranverfestigung *upstream* des Diacylglycerol Kinase (DAGK) Signalwegs ansetzt. Pflanzen, die defizient für eine Oleat-Desaturase waren, zeigten hier extremere Kältereaktionen hinsichtlich der Membran-Versteifung als entsprechende Kontrollpflanzen (Vaultier et al., 2006). Ähnlich wie unter Salzstress, kann auch unter Kältestress ein Anstieg des cytosolischen Calcium-Levels beobachtet werden. In diesem Fall wird dieser durch mechanosensitive Kanäle (MCA1/2) ausgelöst, die durch die Membranversteifung aktiviert werden (Mori et al., 2018). Calcium-bindende Proteine können diese Änderungen im Calcium-Level registrieren und durch eine Calcium-abhängige Änderung ihrer Proteinstruktur mit anderen Enzymen interagieren und somit eine Phosphorylierungskaskade in Gang setzen. Dies wurde für das membranständige CPK28 gezeigt, welches unter Kältestress durch Calcium aktiviert wird, den cytosolischen Transkriptionsfaktor NIN-*Like* Protein 7 (NLP7) phosphoryliert und dessen nukleäre Translokation bewirkt (Ding et al., 2022). Durch solche Kaskaden können

Einleitung

Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die wiederum die Expression stress-relevanter Gene steuern und damit zur pflanzlichen Adaption unter ungünstigen Bedingungen beitragen (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Stress-relevante Gene können auf zwei Arten zum Schutz der Pflanze beitragen:

- (1) **Die Expression wichtiger metabolischer Proteine, die die Pflanze vor Effekten von Wasserstress schützt.** Hierzu gehören Proteine, die eine direkte Rolle in der Stress-Resistenz haben. Zu diesen gehören Chaperone, Osmotin, Anti-Freeze-Proteine, Schlüsselemente der Osmolyt-Biosynthese (beispielsweise für Prolin) und deren Transporter, Wasserkanal-Proteine, detoxifizierende Enzyme, Proteinase-Inhibitoren und Enzyme des Fettsäure-Metabolismus. Überexpressionslinien einiger dieser Elemente konnten zeigen, dass diese Stress-induzierbaren Gene zu einer Erhöhung der Stress-Toleranz führen (Cushman and Bohnert, 2000).
- (2) **Proteine, die in der weiteren Regulation der Signaltransduktion und Genexpression involviert sind.** Hierzu zählen in erster Linie Transkriptionsfaktoren (Myelocytomatose Onkogene (MYC), Myeloblastis Onkogene (MYB) und Dehydration-Responsive Bindeelemente (DREB)). Aber auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPK), Phosphatasen, Enzyme des Phospholipid-Metabolismus, Calmodulin-bindende Proteine und 14-3-3-Proteine sind hier involviert. Die Überexpression von Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe führte zu stresstoleranteren Phänotypen (Zhang et al., 2004). Dies wurde unter anderem für die Überexpression von MYB108L, MYB73, sowie DREB1 gezeigt (Ritonga et al., 2021).

Etwa 4-20 % des Arabidopsis-Genoms besteht aus Kälte-regulierten Genen. Transkriptionsfaktoren können mit konservierten Elementen in den Promotor-Regionen dieser Gene interagieren und ihre Expression steuern. In kälte-regulierten Genen handelt es sich dabei häufig um das C-Repeat (CRT)/DRE-Motif, welches zuerst im Promotor des *responsive to dehydration 29A* (RD29A) -Gens entdeckt wurde. Die Transkriptionsfaktoren, die dieses Motiv erkennen können, werden dementsprechend als CRT/DRE Bindeproteine (CBFs/DREBs) bezeichnet. Sie gehören zur Klasse der *ethylene-responsive element binding factors* (ERFs). In Arabidopsis gibt es drei für CBFs/DREBs kodierende Gene: CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C und CBF3/DREB1A. Alle drei CBFs werden bereits nach kurzer Kälte-Exposition exprimiert. Ermöglicht wird dies unter anderen durch den Master-Regulator *inducer-of-CBF-expression 1* (ICE1), ein Transkriptionsfaktor der MYC-type *basic helix-loop-helix* (bHLH) Familie (Chinnusamy et al., 2010). ICE1 wird konstitutiv exprimiert, muss aber erst durch Sumoylierung durch die *small ubiquitin-like modifier* (SUMO E3) Ligase SIZ1 an Lysin (K) 393 aktiviert und stabilisiert werden. Dies erfolgt Kälte-abhängig und wird wahrscheinlich durch eine Calcium-abhängige

Einleitung

Signalkaskade ausgelöst. Eine Involvement der Rezeptorkinase CRLK1 und des MAPK-Signalweges wird hier angenommen (Yuan et al., 2018). Besonders bei schnell einsetzenden Temperaturstürzen ist auch der Calmodulin (CaM)-abhängige Transkriptionsfaktor CAMTA3 in diesen Prozessen involviert (Kidokoro et al., 2017). Nach Aktivierung fördern CAMTA3 und ICE1 die Expression von CBFs/DREBs. ICE1 hemmt zusätzlich die Expression von MYB15, einem negativen Regulator der CBFs. Um die ICE1-Aktivität zu kontrollieren, wird unter Kälte eine Ring-Finger Ubiquitin E3 Ligase HOS1 vermehrt in den Nukleus lokalisiert. Diese markiert ICE1 etwa 12h nach Einsetzen des Kältestresses durch Poly-Ubiquitinierung für den Abbau (Chinnusamy et al., 2007). Die beschriebenen Zusammenhänge werden in Abbildung 1.2 schematisch aufgezeigt.

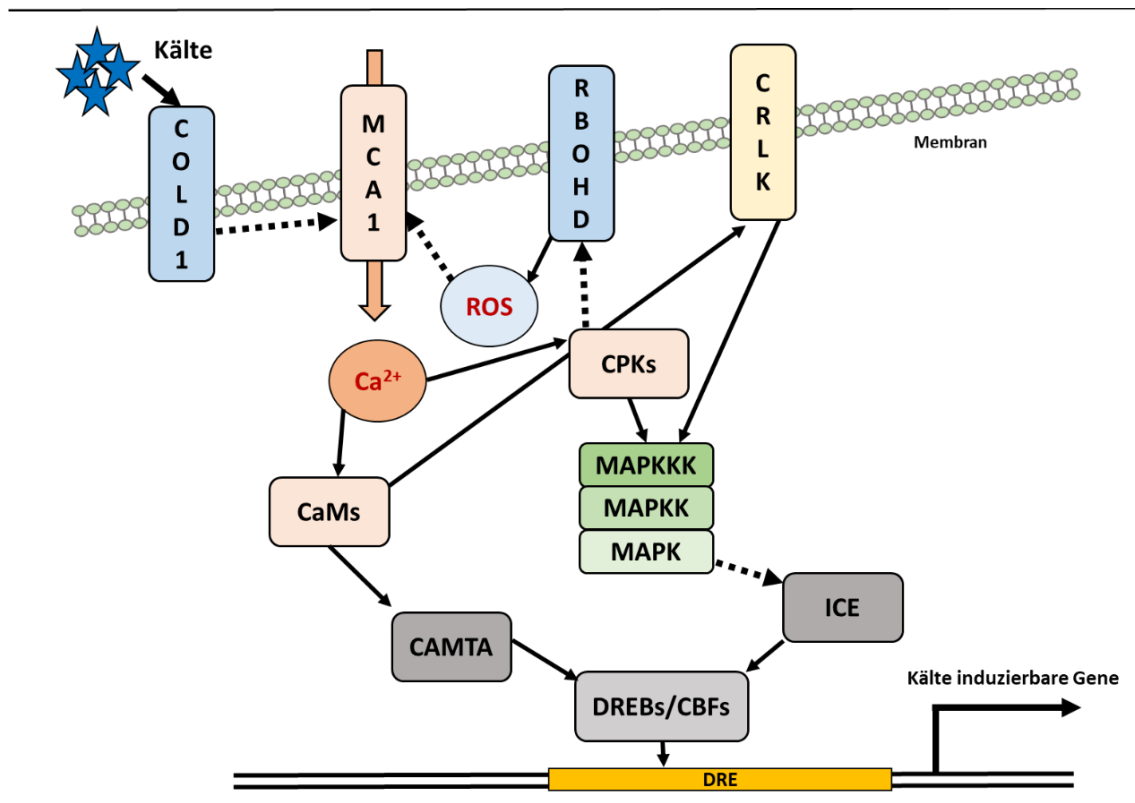


Abb. 1. 2: Kälte-regulierte Signalnetzwerke in Arabidopsis.

Kälte wird über Änderung der Membra-Versteifung oder den Kältesensor COLD1 wahrgenommen. Die darauffolgende Aktivierung von Calcium-Kanälen (MCA1/2) führt zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen, welche wiederum zur Aktivierung von Calmodulin (CaMs) und Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CPKs) führt. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über die Ca²⁺-abhängige Aktivierung der NADPH-Oxidase RBOHD verstärkt diesen Effekt. CaMs aktivieren sowohl den Calmodulin-Bindungs Transkriptionsfaktor CAMTA3 als auch die Calmodulin-regulierte Rezeptor-ähnliche Kinase CRLK1/2. CRLKs regulieren zusammen mit CPKs den MAPK-Signalweg und verhindern über diesen den Abbau des Transkriptionsfaktors ICE1. ICE1 und CAMTA3 induzieren die Expression des Master-Transkriptionsfaktors DREB1, welcher wiederum in der Expression von kalteregulierten Zielgenen involviert ist. Die Abbildung basiert auf (Yuan et al., 2018).

Einleitung

Neben DREB1A/B/C existieren im Arabidopsis-Genom auch Gene, die für DREB1D/E/ F kodieren und durch osmotischen Stress induziert werden, sowie die Salz- und Trockenstress induzierbaren Gene für DREB2A/B. Gemeinsam ist ihnen eine stark konservierte AP2/ERF DNA-Binde Domäne, die aus einem 3-strängigen β -Faltblatt und einer parallel zum β -Faltblatt liegenden α -Helix besteht. Der Kontakt mit der DNA erfolgt über einen Arginin- und Tryptophanrest des β -Faltblattes. Die Bindung an die DRE-Erkennungssequenz ist zusätzlich von einem konservierten Valin und einer Glutaminsäure abhängig (Lata and Prasad, 2011). Da ein Großteil der DREBs nicht durch eine Erhöhung des Abscisinsäure (ABA)-Levels induziert werden, ist der hier beschriebene Signalweg ein Bestandteil der ABA-unabhängigen Pflanzenantwort auf abiotischen Stress.

1.2 Phytohormone

Phytohormone sind organische Moleküle, die in Pflanzen synthetisiert werden und Wachstum und physiologische Prozesse bereits in sehr geringen Konzentrationen beeinflussen können. Sie wirken am Syntheseort, können aber auch in andere Pflanzenteile transportiert werden (Sezgin and Kahya, 2018). An ihrem Wirkort nehmen Phytohormone Einfluss auf Membraneigenschaften, Aktivität vorhandener Enzyme und Genexpression. Dadurch kann es zu Änderungen im Stoffwechsel und der Zellentwicklung kommen. Das hormonelle Signal kann durch Signaltransduktionswege verstärkt und schlussendlich mit spezifischen Zellantworten verknüpft werden (Reece et al., 2012).

Die 8 klassischen Phytohormone lassen sich anhand ihrer Wirkung in (1) Wachstums-stimulierend und (2) –inhibierend einteilen. Zu (1) zählen Auxin, Cytokinin, Gibberelin und Brassinosteroide. Zu (2) zählen Ethylen, Abscisinsäure, Jasmonsäure und Salicylsäure (Iten et al., 1999).

Einleitung

1.2.1 Phytohormone – Wachstumsstimulierend

Auxin spielt eine wichtige Rolle in den meisten Wachstumsprozessen, sowohl in der Pflanzenentwicklung (Organogenese, Differenzierung vaskularen Gewebes, Apikaldominanz und Wurzelinitierung) als auch bei zellulären Prozessen (Zell-Extension, -Teilung und –Differenzierung) (Guilfoyle and Hagen, 2007). Das wichtigste Auxin ist Indol-3-Essigsäure (IAA), welches aus Tryptophan (Trp) gebildet wird. Insgesamt werden 4 Biosynthese-Wege für IAA diskutiert: (1) Der YUCCA (YUC)-Weg, (2) der Indol-3-Pyruvatsäure (IPA)-Weg, (3) der Indol-3-Actetamid (IAM)-Weg und (4) der Indol-3-Acetaldoxim (IAOx)-Weg. Aktuelle Forschung lässt jedoch darauf schließen, dass für einen Großteil der Synthese von IAA die Umwandlung von Trp zu IPA mittels Tryptophan-Aminotransferasen aus Arabidopsis (TAA) erfolgt und dieses anschließend über YUCCA Flavin-Monooxygenasen in IAA umgewandelt wird (Mashiguchi et al., 2011). Eine Schlüsselrolle bei der Expression von Auxin-regulierten Genen nehmen die *Auxin Response factors* (ARFs) ein. 22 Gene für ARFs wurden bisher in Arabidopsis entdeckt und individuelle ARFs können jeweils bestimmte Entwicklungsprozesse steuern. ARFs binden an Auxin-regulierbare Elemente (AuxRE) im Promotorbereich auxinregulierter Gene, werden dabei jedoch im Auxin-freien Status durch den Repressor AUX/IAA reprimiert. Kommt es zur Auxin-Biosynthese, wird der Repressor durch die Aktivierung eines Ubiquitin-Ligase Komplex SCF^{TR1} ubiquitiniert und im 26S-Proteasom degradiert. Die ARFs werden nicht mehr reprimiert und können die Genexpression steuern (Li et al., 2016).

Cytokinine beeinflussen Wachstum und Entwicklung von Pflanzen, indem sie Blatt-Seneszenz, Apikaldominanz, Wurzelwachstum und Phyllotaxis regulieren. Das bekannteste Cytokinin ist trans-Zeatin (tZ), welches aus Dimethylallyl Diphosphat (DMAPP) und ATP (auch ADP und AMP sind hierfür geeignet) gebildet wird. In einem ersten Schritt wandelt eine Adenosin Phosphat-Isopentenyltransferase (IPT) diese beiden zu iPRT um. Im zweiten Schritt konvertiert die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP735A dieses zu tZRTP. Über Dephosphorylierungen und Deribosylierungen werden die TZ-Nukleotide in biologisch aktive Formen umgewandelt. Der letzte Schritt in der Umwandlung zu tZ wird durch die Cytokininnucleosid-5-Monophosphat Phosphoribohydrolase LOG vermittelt (Hirose et al., 2007). Die Signaltransduktion erfolgt in Arabidopsis über membranständige Arabidopsis-Histidin-Kinasen (AHKs) und zählt zu den Phosphorelay-Systemen. Solche auch als 2-Komponenten-System bezeichnete Signalwege kommen häufig in Bakterien vor und bestehen im Allgemeinen aus einer HIS-Sensor-Kinase und einem *response-regulator* Protein. Diese werden beide jeweils an Histidin (HIS) und Aspartat (ASP)-Resten phosphoriert. Die HIS-Kinase wird durch diverse Signale autophosphoriliert und überträgt das Phosphat auf den *Response*-Regulator, welcher dadurch aktiviert wird und eine Antwort auslöst. In diesen Prozess können auch noch zusätzliche

Einleitung

Phosphotransfer-Schritte involviert sein (Hwang, 2002). In diesem Fall binden synthetisierte Cytokinin-Moleküle an eine Transmembrandomäne der AHKs und bewirken die Autophosphorylierung konservierter HIS-Reste der N-terminalen Sensorkinase-Domäne und die Übertragung der Phosphorylierung auf ein konserviertes Aspartat in der C-terminalen Empfänger-Domäne. Die Phosphorylierung wird über HIS Phospho-Transferproteine (AHPs), die von einer cytosolischen zu einer nukleären Lokalisation übergehen, an die Arabidopsis Response Regulatoren (ARRs) weitergegeben. ARRs des Typ B sind Transkriptionsfaktoren, die sowohl die Expression von primären Cytokinin-Zielgenen, als auch von TYP A ARRs, bei denen es sich um negative Feedback-Regulatoren handelt, steuern (Hwang et al., 2012).

Gibberelline (GAs) kontrollieren verschiedene Aspekte der pflanzlichen Entwicklung und des Wachstums. Unter anderem beeinflussen bioaktive Gibberelline Keimung, Spross-Elongation, Blattwachstum und Blüten-, sowie Samen-Entwicklung (Macmillan, 2001). Von mehr als 100 bekannten GAs sind nur einige bioaktiv. Zu diesen gehören GA₁, GA₃, GA₄ und GA₇. Gemeinsam ist ihnen eine Hydroxyl-Gruppe an C3-Beta, eine Hydroxyl-Gruppe an C6 und ein Laktone zwischen C4 und C10. Inaktive GAs sind häufig Vorläufer für die Bildung der bioaktiven Varianten. Die Biosynthese beginnt mit Geranylgeranyl-Diphosphat (GGDP), ein häufiger C₂₀-Vorläufer für Diterpenoide. Für die Umwandlung von GGDP in GAs werden 3 Klassen von Enzymen benötigt: (1) Terpen-Synthasen (TPs), (2) Cytochrom-P450 Monooxygenasen (P450s) und (3) 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen (2ODDs). Zwei plastidäre TPs wandeln GGDP in einem ersten Schritt in ent-Kauren um. In einem zweiten Schritt wird ent-Kauren durch zwei P450 zu GA₁₂ oxidiert. Die zwei 2ODDs (GA20-Oxidase und GA3-Oxidase) oxidieren nun das C20 und C3 von GA₁₂. Durch das Einbringen einer 3β-Hydroxylgruppe werden die inaktiven GA-Vorläufer in bioaktive Varianten umgewandelt (Yamaguchi, 2008). Die GA-Antwort wird durch DELLA-Proteine, Wachstums-Repressoren, negativ reguliert. Ihren Namen haben sie von einer N-terminalen DELLA-regulatorischen Domäne. Wenn kein GA in der Zelle vorhanden ist, sind diese stabil und unterdrücken die GA-Antwort. Wird bioaktives GA synthetisiert, wird dieses durch den GA-Rezeptor GID1 gebunden. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung von GID1. Die Freilegung hydrophober Reste ermöglicht eine Interaktion mit DELLA Proteinen. An den entstehenden GID1-GA-DELLA Komplex kann ein E3-Ubiquitin-Ligase Komplex (SCF^{SLY1}), bestehend aus dem SKP1-Homolog ASK1, Cullin und dem SLY1 F-Box Protein, binden. Der SCF E3 Komplex katalysiert den Transfer von Ubiquitin von E2 auf Della. Anschließend wird DELLA im 26S-Proteasom abgebaut und die GA-Antwort ausgelöst (Nelson and Steber, 2016) (Ueguchi-Tanaka et al., 2007).

Brassinosteroide (BR) werden hauptsächlich mit physiologischen Reaktionen wie Stamm-Elongation, Pollenschlauchwachstum, Induktion der Ethylen-Biosynthese, Aktivierung von Protonenpumpen, Xylemdifferenzierung, Zellverlängerung, Proteinsynthese und Steigerung der Photosyntheserate in

Einleitung

Verbindung gebracht (Zhiponova et al., 2013). Die wichtigsten BRs umfassen Brassinolide (BL), 24-Epibrassinolide (24-EBL) und 28-Homobrassinolide (28-HBL) (Vardhini and Anjum, 2015). BL ist dabei das biologisch aktivste Brassinosteroid und zählt zu den C₂₈-Steroiden. Die Biosynthese beginnt mit dem pflanzlichen Sterol Campesterol. Dieses wird über 4 Reaktionen im frühen C-22 Weg zu Campestanol umgewandelt (Fujioka and Yokota, 2003). Je nach Anordnung der nun folgenden Hydroxylierungsreaktionen, gabelt sich der Weg in einen frühen oder späten C6-Oxidationsweg auf. Die Reaktionen, die durch diese zwei möglichen Wege zur Synthese von Brassinolid führen, werden durch P450-Enzyme vermittelt. Diese Enzymklasse zählt zu den Heme-Thiolat Monooxygenasen, die Elektronen über ein Flavoproteinsystem von NADPH auf ein Substrat übertragen und dadurch das Substrat hydroxylieren, oxidieren, isomerisieren und dehydrieren können (Choe, 2006). Die gebildeten bioaktiven Brassinosteroide können an eine membranständige Rezeptorkinase binden und über eine Signaltransduktionskaskade die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Der BR-Rezeptor in Arabidopsis heißt BRI1 und besitzt eine extrazelluläre Domäne (ECD), welche aus 25 Leucin-reichen-Wiederholungen (LRRs) besteht, die in Form einer Superhelix angeordnet sind. Die Bindung von BR an diese Domäne bewirkt durch Konformationsänderung die Freisetzung hydrophober Flächen, die für unbekannte Proteine als Andockstelle genutzt wird. Für die Aktivierung der BRI1 Kinase-Aktivität, wird die Co-Rezeptorkinase BAK1 benötigt. BRI1 phosphoryliert hierbei den Aktivierungs-Loop von BAK1, welches daraufhin BRI1 phosphoryliert (Nam and Li, 2002). Wenn der BR-Gehalt der Zelle gering ist, verhindert BAK1 durch Assoziierung an BRI1 den Kontakt von BRI1 mit BAK1. Nach BR-Bindung an BRI1 kann dieses BAK1 phosphorylieren. Dieses wiederum wird mittels nun möglicher Bindung an ein 14-3-3-Protein von BRI1 abgelöst (Wang et al., 2011). Verantwortlich für die Expression von BR-Zielgenen sind die Transkriptionsfaktoren BZR1 und BZR2/BES1. Bei niedrigen BR-Level werden diese durch den negativen Regulator BIN2 phosphoryliert, verlieren dadurch ihre DNA-Bindekapazität und werden aus dem Nukleus transportiert. Durch Bindung an ein 14-3-3 Protein werden die Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma festgehalten. Bei Anwesenheit von BR phosphoryliert das nun aktive BRI1 BSK1, eine membranverankerte Rezeptor-ähnliche cytoplasmatische Kinase (RLCK) (Liang and Zhou, 2018). BSK1 löst sich vom BRI1/BAK1-Komplex ab und aktiviert BSU1 durch Phosphorylierung. BSU1 dephosphoryliert den negativen Regulator BIN2, wodurch dieses die Transkriptionsfaktoren nicht mehr phosphorylieren und inaktivieren kann. Die Phosphatase PP2A entfernt durch Dephosphorylierung bereits vorhandene Phosphorylierungen an BZR1/2 und bewirkt damit die Aufhebung der Bindung an 14-3-3 Proteine. Der freie Transkriptionsfaktor wandert in den Nukleus und induziert die Expression von BR-Zielgenen (Wang et al., 2012) (Li and Jin, 2007).

Einleitung

1.2.2 Phytohormone – Wachstumsinhibierend

Ethylen ist ein Gas und bereits seit über 100 Jahren als Phytohormon bekannt. Es beeinflusst eine Vielzahl von Aspekten der pflanzlichen Entwicklung und des Pflanzenwachstums. Zu diesen zählen Keimung, Blatt- und Blütenseneszenz, Blattabwurf, Zell-Elongation, Fruchtreifung und Nodulation (Abeles et al., 1992). Die Ausgangskomponente für die Ethylen-Biosynthese ist die Aminosäure Methionin, welche durch die S-Adenosylmethionin (AdoMet)-Synthetase in AdoMet umgewandelt wird. Das Schlüsselenzym der Ethylen-Biosynthese, Aminocyclopropan-1-Carboxylase Synthase (ACS), wandelt AdoMet in 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) und 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) um. Um ausreichende Mengen an Methionin gewährleisten zu können, wird MTA über den Yang-Zyklus wieder zu Methionin recycelt. Die ACS-Genexpression wird durch verschiedene Stressarten ausgelöst. Neben Temperaturschwankungen, abiotischen Stress und Verwundungsreaktionen (vermittelt durch das Verwundungshormon Jasmonsäure), kann dies auch durch exogene Zugabe anderer Phytohormone (Auxin, Cytokinine und Brassinosteroide) erfolgen (Yang and Hoffman, 1984). Die ACC-Oxidase wandelt ACC schließlich in Ethylen, CO₂ und Cyanid um. Das entstehende Cyanid ist toxisch und kann durch die β-Cyanoalanin Synthase in β-Cyanoalanin umgewandelt werden. Dadurch werden toxische Cyanid-Konzentrationen verhindert (Argueso et al., 2007). Die Signalkaskade des Ethylen-Signalwegs ist deutlich komplexer als die Biosynthese und beginnt mit der Bindung von Ethylen an seinen Rezeptor. In Arabidopsis bilden ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 und EIN4 die Familie der Ethylen-Rezeptoren. Sie bilden Homodimere und sind über eine N-terminale Transmembrandomäne in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert. Hier erfolgt auch die Ethylenbindung (Binder, 2020). Die cytosolische GAF-Domäne vermittelt zusammen mit einer Kinase-Domäne die Signalweiterleitung an *down-stream* Elemente (Mayerhofer et al., 2015). Die Ethylen-Rezeptoren regulieren den Ethylen-Signalweg negativ. Bei Abwesenheit von Ethylen aktivieren sie die Ser/Thr-Kinase CTR1, die daraufhin dimerisiert und den positiven Regulator EIN2 durch Phosphorylierung inaktiviert. Im Nukleus wird der Transkriptionsfaktor EIN3/EIL1 in Abwesenheit von Ethylen durch die F-Box-Proteine EBF1/2 degradiert (Potuschak et al., 2003). Kommt es zur Bildung von Ethylen, bindet dies an den Rezeptor und verhindert dadurch die Aktivierung von CTR1. Das nicht mehr negativ regulierte EIN2 wird abgespalten und in den Kern transportiert. Dort stabilisiert es EIN3/EIL1. EIN3/EIL1 dimerisiert und induziert die Genexpression von Ethylen-Zielgenen (Merchante et al., 2013).

Salicylsäure (SA) gehört zur Gruppe der Phenole und besteht aus einem aromatischen Ring mit einer Hydroxylgruppe. Zusammen mit Jasmonsäure (JA) spielt es eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Abwehrantworten bei biotischem Stress. Verallgemeinert kann gesagt werden, dass SA in der

Einleitung

pflanzlichen Resistenz gegen biotrophe Pathogene und JA in der Abwehr herbivorer Insekten und nekrotropher Pathogene involviert ist (An and Mou, 2011). Daher sind der JA- und der SA- Signalweg voneinander abhängig in einem komplizierten Netzwerk verbunden. Auxin, Cytokinine und Brassinosteroide können die Wirkung von SA und JA unterdrücken, um Pflanzenwachstum zu priorisieren. Umgekehrt können SA und JA die Pflanzenabwehr auf Kosten des Wachstums stärken. ABA und Ethylen wiederum können synergistisch mit dem JA-Signalweg fungieren, während sie sich meist antagonistisch zur SA-Antwort verhalten (Pieterse et al., 2012). Der Shikimat-Phenylpropanoid Weg liefert die Ausgangsstoffe für die SA-Biosynthese, die über zwei mögliche Wege ablaufen kann: In einem ersten Weg wird Chorismat über eine Isochorismat-Synthase (ICS) in IC konvertiert und dieses wiederum in SA umgewandelt (Seyfferth and Tsuda, 2014). In einem zweiten Weg wird Phenylalanin über eine Phenylalanin Ammonium Lyase (PAL) zuerst in Zimtsäure konvertiert und diese durch Hydroxylierung und Oxidation der Seitenkette zu SA umgewandelt (Boatwright and Pajeroska-Mukhtar, 2013). Die SA-Biosynthese wird durch die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) und Pathogen-Effektoren ausgelöst. Die in der Folge entstehenden höheren Ca^{2+} -Level sind dafür ein wichtiges Signal. Das regulatorische Protein *None-Expressor of PR genes 1* (NPR1) ist das wichtigste Element in der SA-Signalkaskade und fungiert als transkriptioneller Co-Aktivator für die Expression Pflanzenabwehr-relevanter Gene (Wu et al., 2012). Wenn in der Zelle kein SA vorhanden ist, befindet sich NPR1, über intermolekulare Disulfidbrücken oligomerisiert, im Cytoplasma. In der Folge der SA-Produktion verändert sich der Redox-Status der Zelle und die dadurch aktiven Thioreduxine TRX-H3 und TRX-H5 bewirken eine Monomerisierung von NPR1. Monomeres NPR1 gelangt über nukleäre Kernporen in den Nukleus und interagiert dort mit Mitgliedern der TGA-Unterklasse von bZIP-Transkriptionsfaktoren. In der Folge wird die Expression von SA-Zielgenen induziert. NPR1 wird während dieses Prozesses phosphoryliert, ubiquitiniert und degradiert (Pieterse et al., 2012) (Caarls et al., 2015).

Jasmonsäure (JA) wurde sehr schnell mit Abwehrmechanismen gegen Herbivoren und nekrotrophe Pathogene in Verbindung gebracht, spielt aber auch eine Rolle bei der Interaktion mit Mikroorganismen die förderlich für das Pflanzenwachstum sind (Wasternack and Hause, 2013). Während der durch JA ausgelösten Pflanzenimmunität werden eine Vielzahl von Sekundär-Metabolite gebildet, darunter Alkaloide, Phenylpropanoide, Terpenoide und antimikrobielle Proteine (Campos et al., 2014). Aufgrund seiner Aktivität in abwehrspezifischen Mechanismen ist JA auch an Seneszenzprozessen in der Pflanze beteiligt und fördert diese in Blättern. Bei JA-Komponenten handelt es sich um oxygenierte zyklische Fettsäuren. Der Ausgangsstoff für die JA-Biosynthese ist α -Linolensäure (α -LeA). Dieses wird durch Phospholipasen von Galactolipiden der Chloroplasten-Membran abgespalten und durch 13-Lipoxygenasen (13-LOX) zu 3-Hydroperoxy-9,11,15-Octadecatrienoic-Säure (13-HPOT) oxygeniert. Die Allen-Oxid-Synthase (AOS) oxidiert dieses zu einer

Einleitung

instabilen Epoxy-Komponente, welche wiederum durch die Allen Oxid Synthase (AOS) in cis-(+)-12-Oxophytodienoic-Säure (12-OPDA) umgewandelt wird. Dieser Teil der Synthese findet in Chloroplasten statt. Das entstandene 12-OPDA wird im Peroxisom durch eine Reduktase reduziert und durch 3 Zyklen β -Oxidation in JA umgewandelt. JA kann durch Methylierung in MeJA umgewandelt oder durch Konjugation an Aminosäuren (wie zum Beispiel Leucin und Isoleucin) modifiziert werden (Ghasemi Pirbalouti et al., 2014). Erst durch die Konjugation an Isoleucin wird JA bioaktiv. Dieser Schritt wird durch das GH3-Enzym JAR1 vermittelt. Neben JAR1 existieren in Reis wahrscheinlich noch weitere JA-konjugierende Enzyme, da in JAR1-*knockout*-Pflanzen unter Salzstress noch JA-Ile gebildet wird (Hazman et al., 2019). Das entstandene (+)-7-iso-JA-Ile (JA-Ile) ist der Ligand für den COI1-JAZ Co-Rezeptor Komplex. In Abwesenheit von JA-Ile inhibiert das Jasmonat Zinkfinger Infloreszenzmeristem (ZIM)-Domänen (JAZ) Protein die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren und fungiert damit als negativer Regulator der JA-Antwort (Ruan et al., 2019). Über die ZIM-Domäne kann es mit MYC2 und MYB-Transkriptionsfaktoren interagieren und zusammen mit den Co-Repressoren NINJA und TOPLESS via Histon-Deacetylasen (HDA6 und HDA19) die Expression von JA-Zielgenen verhindern. Unter Stressbedingungen gelangt JA-Ile über das Transportprotein JAT1 in den Nukleus. Dort bildet das F-Box-Protein COI1 zusammen mit SKP1 und Cullin eine Ubiquitin-Ligase des SCF-TYPs (SCF^{COI1}). Bindet dieser Komplex an JAZ entsteht ein hoch-affiner Rezeptor für JA-Ile. In der Folge wird JAZ ubiquitiniert und im 26S-Proteasom degradiert. Die Transkriptionsfaktoren werden aus ihrer Inhibierung befreit und induzieren die Expression von JA-Zielgenen (Wasternack and Hause, 2013). Da es sich bei JA-Ile um ein Stresshormon handelt und daher Wachstumsprozesse inhibiert, ist ein effizienter JA-Katabolismus erforderlich. Für diesen Prozess existieren 2 mögliche Wege: (1) CYP94-Enzyme können JA-Ile zu 12COOH-JA-Ile oxidieren und (2) Amidohydrolasen können die konjugierte Aminosäure abspalten (Heitz et al., 2016). Neben Verwundung kann auch abiotischer Stress die Biosynthese von JA auslösen. Da durch Salz- und Trockenstress auch die Synthese von ABA ausgelöst wird, ist hier ein Cross-Talk der Phytohormone JA und ABA sehr wahrscheinlich. Als Knotenpunkt liegt hierbei insbesondere MYC2 im Fokus, da dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls durch ABA positiv reguliert wird (Riemann et al., 2015). Eine Veranschaulichung dieses möglichen *Cross-Talks* ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Da **ABA** ein Hauptbestandteil dieser Arbeit ist, wird es im folgenden Kapitel ausführlich behandelt.

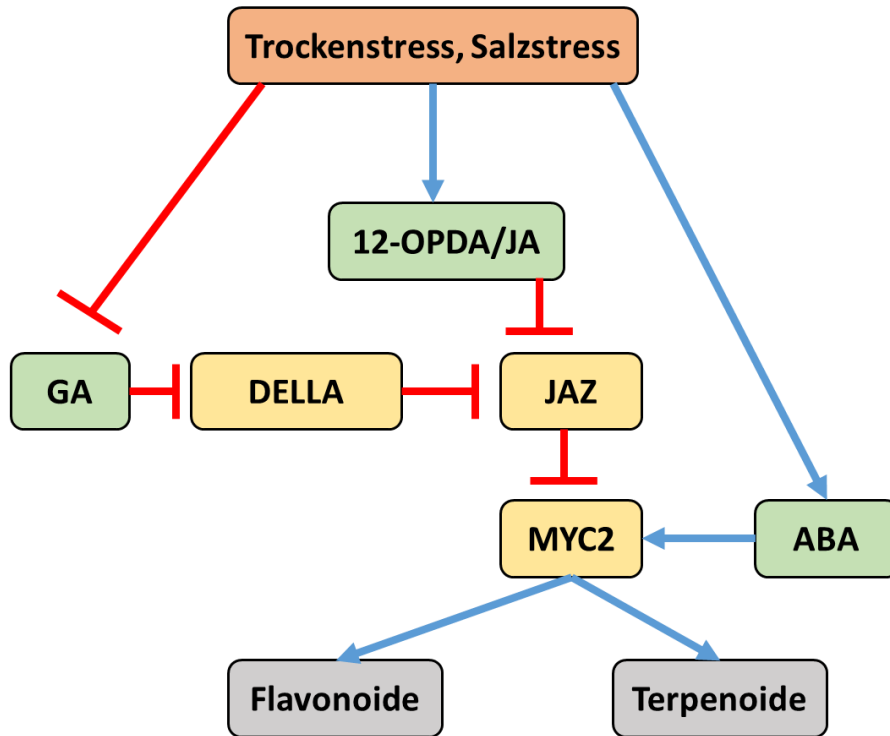


Abb. 1. 3: Vereinfachtes Model des JA/ABA-Netzwerk unter abiotischen Stress.

Abiotischer Stress beeinflusst die Biosynthese von Phytohormonen. Durch die Anwesenheit von Jasmonsäure (JA) wird der Repressor JAZ abgebaut und kann den Transkriptionsfaktor MYC2 nicht mehr reprimieren. JAZ wird zusätzlich durch DELLA verstärkt inhibiert, da dessen Reprimierung Gibberelinsäure (GA)-abhängig erfolgt, dessen Biosynthese aber in Gegenwart von Salz- und Trockenstress gehemmt wird. Auch über Abscisinsäure (ABA) wird MYC2 positiv reguliert. MYC2 selbst ist nun in der Lage die Bildung von sekundären Metaboliten auszulösen, welche für die pflanzliche Anpassung unter abiotischen Stress-Bedingungen benötigt werden. Die Abbildung basiert auf (Riemann et al., 2015).

1.3 Abscisinsäure

Abscisinsäure (ABA) zählt zu den monozyklischen Sesquiterpenen, besitzt eine nicht-planare Konfiguration und kontrolliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Samenentwicklung, vegetatives Wachstum und Regulationen unter abiotischen Stress (Xiong and Zhu, 2003). Als Teil solcher Regulationen beeinflusst ABA die Produktion von Enzymen, welche Zellen vor Dehydrierung und thermalen Stress schützen. Auch der Wassertransfer, der Keimungsprozess und die Stomata-Bewegung wird ABA-abhängig reguliert (Parent et al., 2009) (Assmann, 2003). Unter Wasser- und Salzstress wird ABA als Kandidat für die Kommunikation zwischen Wurzel und Spross diskutiert.

1.3.1 Abscisinsäure – Biosynthese

Die Biosynthese von ABA beginnt mit der Produktion des Carotinoide Zeaxanthin über die Zyklisierung und Hydroxylierung von all-trans-Lycopen. Die Zeaxanthin Epoxidase (ZEP/ABA1) konvertiert Zeaxanthin über ein Intermediat zu Violaxanthin (Nambara and Marion-Poll, 2005). Die weitere Synthese kann über zwei verschiedene Enzyme vermittelt werden: Entweder (1) die Bildung von Neoxanthin über die Neoxanthin-Synthase (NSY/ABA4) und die anschließende Isomerisierung zu 9'-cis-Neoxanthin oder (2) die Bildung von 9'-cis-Violaxanthin über eine Isomerase. 9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase (NCED) spaltet diese C₄₀-Carotinoide zum C₁₅-Produkt Xanthoxin (Schwartz et al., 2003). Xanthoxin wird aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert und dort durch ABA2 in Abscisin Aldehyd umgewandelt. ABA2 gehört zur Klasse der kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase (SDR)-Gene. Da nur eine Kopie des ABA2-Gens im Arabidopsis-Genom existiert, führt eine Mutation zu ABA-defizienten Pflanzen (González-Guzmán et al., 2002). In einem letzten Schritt wird Abscisin Aldehyd durch eine Abscisin-Aldehydoxidase (AAO3/ABA3) zu ABA oxidiert. AAO3 besitzt einen Molybdän-(MO) Cofaktor (MoCo), der durch eine MoCo-Sulfurase aktiviert werden muss. Da ABA3-Mutanten einen vergleichsweise milden Phänotyp zeigen, sind wahrscheinlich redundante AAO-Proteine ebenfalls an der ABA-Biosynthese beteiligt (Seo et al., 2000). Abbildung 1.4 zeigt den hier beschriebenen ABA-Biosyntheseweg in Arabidopsis.

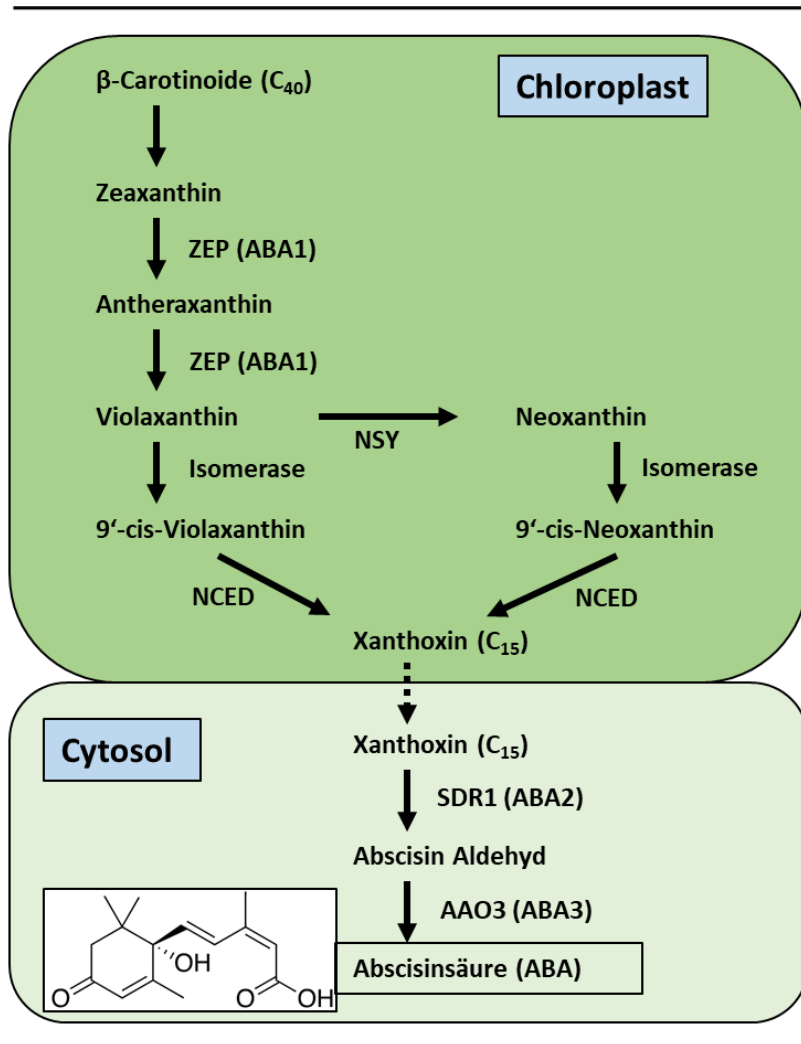


Abb. 1. 4: Ablauf der ABA-Biosynthese in Arabidopsis.

Die Biosynthese von ABA beginnt mit der Produktion des Carotinoids Zeaxanthin aus all-trans-Lycopon. Zeaxanthin wird über eine Epoxidase (ZEP/ABA1) zu Violaxanthin konvertiert. Die weitere Synthese erfolgt entweder (1) über die Bildung von Neoxanthin (vermittelt durch die Neoxanthin-Synthase (NSY/ABA4)) und die anschließende Isomerisierung zu 9'-cis-Neoxanthin, oder (2) über die Bildung von 9'-cis-Violaxanthin durch eine Isomerase. 9'-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase (NCED) spaltet diese zu Xanthoxin. Xanthoxin wird durch ABA2 in das Abscisin Aldehyd umgewandelt. In einem letzten Schritt wird Abscisin Aldehyd durch eine Abscisin-Aldehydoxidase (AAO3/ABA3) zu ABA oxidiert. Die Abbildung basiert auf (Vishwakarma et al., 2017).

Um das ABA-Signal bei Bedarf abschalten zu können, gibt es in Pflanzen zwei Katabolismus-Wege: (1) 8'-Hydroxylierung über ABA-8'-Hydroxylasen der CYP707A-Klasse und (2) Konjugation von Glucose an Carboxyl- und Hydroxylgruppen von ABA via ABA-Glycosyltransferasen (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Einleitung

1.3.2 Abscisinsäure – Signaltransduktion

Nach Synthese bindet ABA an den ABA Rezeptor *Regulatory Components of ABA Receptor* (PYR/PYL/RCAR) (Ma et al., 2009) (Park et al., 2009). RCARs gehören zur *START*-Domänen Superfamilie und lokalisieren sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus. *START*-Domain Proteine werden durch eine „Helix-Griff“-Falte charakterisiert, die eine zentrale Liganden-Binde-Tasche ausformt. Die ABA-Bindestelle wird von zwei Schleifen flankiert. In Reaktion auf die ABA-Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung. Die „gate“ und „latch“ genannten Schleifen schließen sich und bilden eine Interaktionsfläche (Cutler et al., 2010). Dadurch wird die Bindung an Typ 2C Proteinphosphatasen (PP2Cs) ermöglicht. Alle 14 RCARs sind in der Lage ABA und PP2Cs zu binden und bis auf RCAR7 sind alle als positive Regulatoren des ABA-Signalwegs beschrieben (Tischer et al., 2017). Hingegen sind 6 der 9 Cluster A PP2Cs negative Regulatoren des ABA Signalweges: ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, AHG1 und AHG3 (Nishimura et al., 2009). PP2Cs und RCARs fungieren gemeinsam als ABA Co-Rezeptoren (Raghavendra et al., 2010). In Abwesenheit von ABA reprimieren PP2Cs *Sucrose nonfermenting* Kinase-1-verwandte Proteinkinase 2 (SnRK2s). Die Familie der SnRK2 Proteinkinasen umfasst 10 Mitglieder, die in 3 Untergruppen aufgeteilt sind. SnRK2.6/OST1, SnRK2.2 und SnRK2.3 gehören der durch ABA-induzierbaren Untergruppe III an und gelten als positive Regulatoren des ABA-Signalwegs. In Anwesenheit von ABA binden RCARs an PP2Cs und bewirken die Aufhebung der PP2C-abhängigen SNRK2-Reprimierung. Durch nun folgende Autophosphorylierung (SnRK2.6) oder Transphosphorylierung (SnRK2.2 und SnRK2.3) werden diese aktiviert und aktivieren ihrerseits ABF Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung (Ruschhaupt et al., 2019) (Fujita et al., 2013b). *ABA-responsive element binding factors* (AREBs/ABFs) sind Transkriptionsfaktoren, die die ABA-abhängige Genregulation kontrollieren. Die schematische Darstellung der ABA-abhängigen Signaltransduktion ist in Abbildung 1.5 dargestellt (Fernando and Schroeder, 2016).

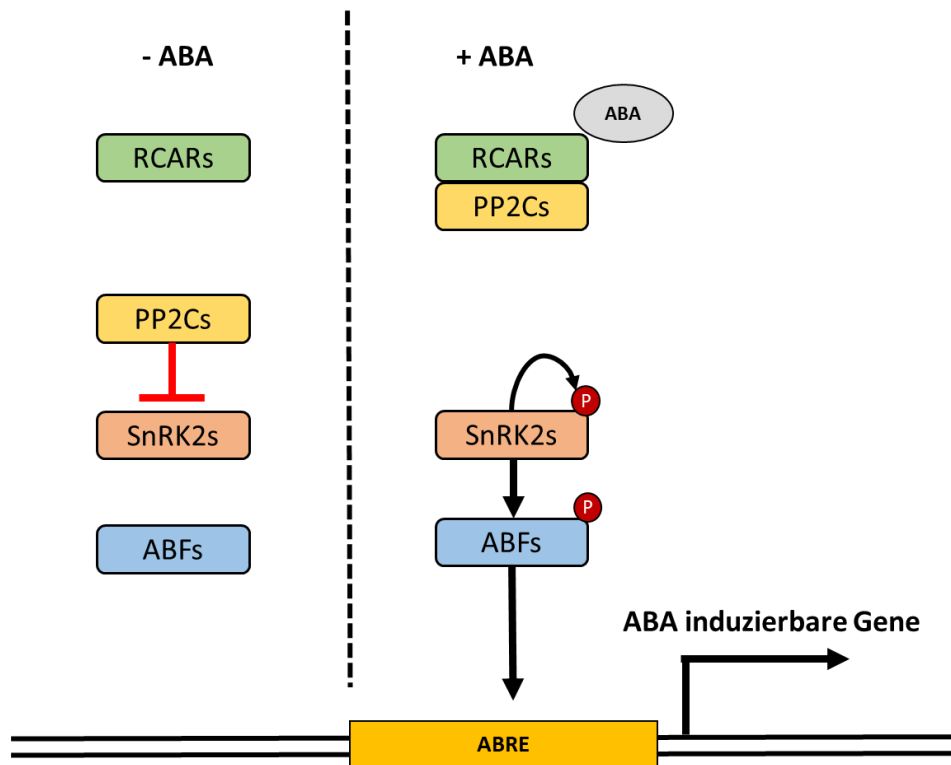


Abb. 1. 5: Die Hauptkomponenten der ABA-Signaltransduktion.

In Abwesenheit von ABA halten Proteinphosphatasen (PP2Cs) positive Regulatoren (SnRK2s) des ABA-Signalweges in einem inaktiven Zustand. Erst bei Anwesenheit von ABA werden PP2Cs durch den ABA-Rezeptor RCAR gebunden und inaktiviert. In der Folge kann der positive Regulator SnRK2 aktiviert werden und Transkriptionsfaktoren des Signalweges (ABFs) durch Phosphorylierung aktivieren. Diese wiederum können nun die Expression von ABA-induzierbaren Genen regulieren. Die Abbildung basiert auf (Fernando and Schroeder, 2016).

Viele solcher ABF-regulierter Gene weisen in ihrer Promotor-Region ein konserviertes, 8 bp langes, regulatorisches *cis*-Element ABRE (PyACGTGG/TC) mit der Kern-Sequenz ACTG auf (Nakashima et al., 2009b). Da ein einziges ABRE-Element nicht für die Genexpression ausreicht, müssen entweder mehrere dieser Elemente hintereinandergeschaltet im Promotor vorkommen, oder das ABRE-Element muss in der Nähe anderer *cis*-regulatorischer Elemente, sogenannter *coupling* Elemente, liegen. Zu diesen gehören CE1 (*coupling element 1*), CE3 (*coupling element 3*) und DRE (Dehydrations-responsives Element)/CRT (*C-repeat*). Der Promotor des ABA-induzierbaren Gens RD29B verfügt über zwei ABRE-Motive. Das durch Salz, Kälte, Trockenheit und ABA-induzierbare Gen RD29A verfügt hingegen über ein ABRE- und zwei DRE-Elemente und kann sowohl von ABFs, als auch von DREB1s und DREB2s-Transkriptionsfaktoren induziert werden (Narusaka et al., 2003). ABFs gehören zur *basic Leucin Zipper* (bZIP) Familie der Transkriptionsfaktoren und besitzen, einschließlich der bZIP-Domäne, 4 konservierte

Einleitung

Domänen (Fujita et al., 2011). ABF1, ABF2, ABF3 und ABF4 werden in vegetativen Pflanzengeweben als Reaktion auf abiotischen Stress gebildet. Während die ABF1-Expression hauptsächlich durch Kälte induziert wird, werden ABF2/3 und 4 stärker durch ABA und osmotischen Stress (Dehydration und hoher Salzgehalt) induziert (Uno et al., 2000). Trotzdem scheint auch ABF1 unter Trockenstress eine wichtige Rolle zu spielen, da die ABF-Quadrupel-Mutante im Vergleich zur ABF-Trippel-Mutante unter Trockenstress sensitiver reagiert und Dehydrations-induzierbare Gene eine noch stärker reduzierte Expression zeigen. ABF2/3/4 zeigen überlappende Funktionen, benötigen ABA für ihre volle Aktivität und können Homo- und Heterodimere bilden (Yoshida et al., 2010). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen ABFs hat ABI5 hauptsächlich eine Funktion in der Samen-Reifung und –Entwicklung und wird daher zum Großteil im Samen exprimiert (Fujita et al., 2013a) (Singh and Laxmi, 2015).

1.3.3 Abscisinsäure- Einfluss in Keimungsprozesse

Das Keimen von Pflanzen repräsentiert ein ökologisches und agronomisches Schlüsselmerkmal und bestimmt, wann eine Pflanze ihre Ontogenese in einem Ökosystem beginnt. Daher wird die Keimung streng durch interne und externe Faktoren, die Dormanz und Keimungspotential bestimmen, reguliert. Dormanz wird hierbei als die Nichtbefähigung eines gesunden Samens unter guten Umweltbedingungen auszukeimen und Keimung als das Ausbrechen der Radikel aus den umgebenden Strukturen definiert (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Die Samen-Dormanz von Arabidopsis gilt physiologisch als „nicht-tief“ und bezeichnet die Befähigung des Embryos nach dem Austritt aus umliegenden Strukturen normal zu wachsen, sowie den Verlust der Dormanz durch Stratifizierung und Nachreifung (Baskin and Baskin, 2004).

In Induzierung und Aufrechterhaltung der Dormanz ist ABA involviert. Ist der ABA-Gehalt durch Überexpression von ABA-Biosynthesegenen erhöht, wird die Samendormanz erhöht und die Keimung verzögert (Finkelstein et al., 2002). In keimenden Samen und jungen Keimlingen ist ABI5 ein wichtiger Bestandteil der ABA-Signaltransduktion. Es wird in Samen als Reaktion auf Salz und Trockenstress exprimiert (48 – 60 h nach Stratifizierung). Nach SnRK2-abhängiger Aktivierung durch Phosphorylierung der Serine (S) an Position 42, 145 und des Threonins (T) an Position 201 inhibiert ABI5 Keimungsprozesse (Skubacz et al., 2016) (Wang et al., 2013). Positive Regulatoren sind neben ABI5 selbst, auch ABI3 und ABI4, sowie *DELAY OF GERMINATION 1* (DOG1) (Dekkers et al., 2016). Die Stabilität von ABI5 wird durch Protein-Interaktionen bestimmt. Dabei kann es Homo- und Heterodimere mit ABI3, ABF3 und ABF1 bilden und gemeinsam mit diesen die Expression Stress-induzierbarer Gene steuern (Finkelstein et al., 2005). Ein positiver Regulator der Keimung ist GA. Unter abiotischen Stressbedingungen sinkt das GA-Level und das Level an DELLA-Proteinen steigt an (Tyler

Einleitung

et al., 2004). Um die ABI5-Expression zu fördern kann RGL2, welches über eine DELLA-Domäne verfügt, bei hohem ABA:GA Verhältnis mit den *NUCLEAR FACTORY C* (NF-YC) Proteinen NF-YC3, NF-YC4 und NF-YC9 einen Komplex bilden und an CCAAT-Elemente im ABI5-Promotor binden (Liu et al., 2016).

Entscheidende Faktoren für die Keimung von Arabidopsis sind (1) Licht, (2) Kälte, (3) Nachreifung und (4) Stickstoff-Verbindungen (Holdsworth et al., 2008a). Diese Faktoren nehmen Einfluß auf das ABA:GA-Verhältnis und können bei geeigneten Umweltbedingungen die Grundlagen für das Brechen der Dormanz und den Beginn der Keimung liefern. Die GA-Konzentration in dormanten Samen wird durch die Wirkung der bHLH-Transkriptionsfaktoren SPATULA und *PIF3-like 5* (PIL5) geringgehalten, indem diese negativ auf die Expression von GA-Biosynthesegenen wirken. Die Keimung kann daher gefördert werden, indem diese beiden Transkriptionsfaktoren (1) Temperatur- und (2) Licht-abhängig inaktiviert werden. (1) Bei Kälte wird SPATULA inaktiviert. Dadurch steigt die Konzentration an GA3ox1 und das GA-Level wird erhöht (Holdsworth et al., 2008a) (Penfield et al., 2005). (2) PIL5 bindet an die Dunkelrot-absorbierende (Pfr)-Formen von PhyA und PhyB. Bei Rotlicht-Exposition wird PIL5 im Proteasom degradiert. Da es zusätzlich die Expression von ABA-Biosynthesegenen fördert, erklärt dieser Mechanismus das sinkende ABA-Level unter Lichtbedingungen (Oh et al., 2007) (Oh, 2004). Auch Nitrat kann den ABA-Katabolismus fördern und die Expression von ABA-Biosynthesegenen inhibieren (Ali-Rachedi et al., 2004). Insbesondere NO ein wichtiger endogener Regulator und fungiert als Dormanzbrecher (Bethke et al., 2004). Für die Generierung von NO wird Nitrat durch die Nitrat-Reduktasen NIA1 und NIA2 reduziert (Bright et al., 2006). Bei sauren pH wird das entstandene Nitrit dann nicht-enzymatisch zu NO reduziert (Bethke et al., 2004). NO bindet an einen NO-Sensor aus Gruppe 7 der ERFs und initiiert dessen Abbau. Da ABI5 ein Zielgen der ERF-Transkriptionsfaktoren ist, wird die ABI5-Expression inhibiert (Daniel et al., 2014). Zusätzlich wird NO für die Expression von GA3-Oxidase benötigt (Bethke et al., 2007) (Osuna et al., 2015). Viele Faktoren können in keimungsrelevante Mechanismen involviert sein und über die Verschiebung des Phytohormon-Gleichgewichts positiven oder negativen Einfluss auf die Dormanz der Pflanze nehmen. Eine wichtige Rolle in solchen Vorgängen spielen auch Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen (CPKs), die sowohl positiv, als auch negativ in die ABA-Signaltransduktion eingreifen können (Zhao et al., 2011).

1.4 Calcium-abhängige Proteinkinasen (CPKs)

Calcium ist ein überall vorkommender *second messenger* in eukaryotischen Signalkaskaden und Pflanzen speichern es in Apoplast, Vakuole, Kernmembran, Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Mitochondrien (Bush, 1995). Je nach Signal, zu denen Phytohormone, Licht, abiotischer Stress und Pathogene gehören, kann das intrazelluläre Calcium-Level durch Änderung in der Aktivität von unterschiedlich lokalisierten Ca^{2+} -Kanälen, $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ Antiportern oder Ca^{2+} - und H^+ -ATPasen moduliert und charakteristische Calcium-Wellen erzeugt werden (Sanders, 1999) (Thuleau et al., 1998). Verschiedene Calcium-Sensoren können spezifische Calcium-Signaturen erkennen, diese über Signalkaskaden an *downstream*-Elemente weiterleiten und dadurch Einfluss auf Protein-Phosphorylierungen und Genexpression nehmen (Rudd and Franklin-Tong, 2001). In Pflanzen gibt es 4 Klassen solcher Calcium-dechiffrierender Enzyme: (1) die eukaryotisch hoch-konservierten Calmoduline (CaM) und die pflanzliche CaM-*like* Protein-Familie (CMLs), (2) die Calcineurin B-*like* (CBL)-Sensoren, die CBL-interagierende Proteinkinasen (CIPKs und SnRK3s) regulieren, (3) die Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CPKs) und ihre Verwandten, die CDPK-*related* Kinasen (CRKs), sowie (4) die in Arabidopsis nicht vorhandenen Calcium- und Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CCaMKs) (Dodd et al., 2010). Von diesen vereinen nur CPKs eine Sensor-Domäne und eine Kinase-Domäne in einem Protein. Entstanden sind CPKs daher wahrscheinlich durch die Fusion eines CaM-Gens mit einer CaM-abhängigen Proteinkinase (Zhang and Choi, 2001). Im Gegensatz zur analogen CaMKII aus Säugetieren fungieren CPKs dabei als Monomere (Roberts and Harmon, 1992). In Arabidopsis gibt es 34 Gene für CPKs, welche allesamt hohe Homologien zueinander aufweisen (39 – 95 % Identität) und in 4 Untergruppen gegliedert werden können. Hierbei weist Untergruppe 2 mit 13 Mitgliedern die höchste Komplexität auf. Interessanterweise sind 5 CPKs von Untergruppe 2 (CPK21, 22, 23, 27 und 31) tandemartig in einem Cluster in Chromosom IV angeordnet. Da sie zueinander zusätzlich zu einer 61 – 82 prozentigen Identität auf Aminosäure-Ebene, auch eine 21 – 78 prozentige Identität in ihrer N-terminalen Domäne aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass sie erst kürzlich durch Genduplikation entstanden sind und möglicherweise ähnliche überlappende Funktionen haben (Cheng et al., 2002). Ein phylogenetischer Stammbaum, der die Verwandtschaft der 34 CPKs und der 8 CRKs in Arabidopsis zueinander zeigt, ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

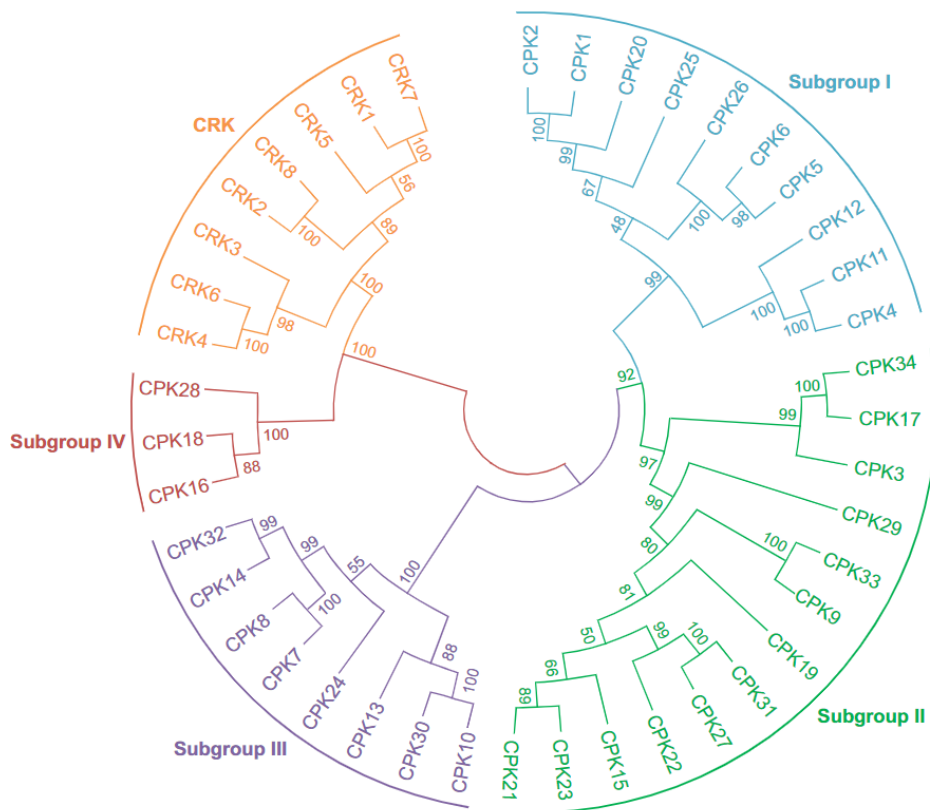


Abb. 1. 6: Dendrogramm der CPKs/CRKs aus Arabidopsis.

Die 34 CPKs können in 4 Untergruppen organisiert werden. Die Abbildung wurde (Yip Delormel and Boudsocq, 2019) entnommen. Eine Genehmigung für die Benutzung der Abbildung wurde von John Wiley and Sons am 25.1.2024 ausgestellt (501877616).

1.4.1 CPKs – Aufbau und Regulation

CPKs bestehen aus einer variablen N-terminalen Domäne (VNTD), einer Ser/Thr-Proteinkinase-Domäne und einer auto-inhibitorischen *junction*-Domäne (JD), die mit einer C-terminalen CaM-like regulatorischen Domäne (CaMLD) verknüpft ist. Die Junction-Domäne stellt hierbei ein Pseudo-Substrat dar, welches das aktive Zentrum des Proteins über intramolekulare Interaktion autoinhibiert und die Bindung des eigentlichen Substrats verhindert (Harmon et al., 1994). Bindet Calcium an die Calmodulin-Domäne, kommt es zu einer Konformationsänderung. Die Calmodulin-Domäne besteht aus 4 EF ((E)-Helix-loop-(F)-Helix) Hand-Calcium-Bindemotiven, die in zwei Einheiten (*lobes*) gruppiert werden: der *N-Lobe* und der *C-Lobe*. Da der *C-Lobe* eine höhere Affinität zu Calcium besitzt, ist der *C-Lobe* auch bei geringen Calcium-Konzentrationen mit Calcium bestückt und kann durch Interaktion mit der JD die inhibierende Konformation stabilisieren (Christodoulou et al., 2004a). Steigt das Calcium-Level an, bindet auch der *N-Lobe* Calcium und initiiert die Konformationsänderung durch die sich die JD aus dem aktiven Zentrum löst (Weljie et al., 2000). Die Calcium-Bindeschleufe der 4 EF-Hände

Einleitung

besteht aus 12 Aminosäuren, von denen 6 mit negativer Ladung an der Koordination der Calcium-Ionen beteiligt sind (Jessica et al., 2007). Die resultierende Konsensus-Sequenz des EF-Hand-Motives ist jedoch nicht in allen CPK-Isoformen auffindbar und Abweichungen führen zu nicht-funktionalen degenerierten EF-Händen. So findet sich beispielsweise in CPK23 an Position 12 des EF-Hand Konsensus-Motivs der ersten EF-Hand ein Glutamin (Q) statt einer Asparaginsäure (D) oder Glutaminsäure (E) (Geiger et al., 2010) (Liese and Romeis, 2013). Sieben CPKs weisen eine Mutation in der Calmodulin-Domäne auf. Bei fünf von diesen befindet sich diese Mutation ebenfalls in EF-Hand 1. Die betroffene Aminosäure wird hierbei immer für die Koordination der Calcium-Ionen benötigt. Trotzdem sind diese CPKs katalytisch aktiv und können Calcium binden, besitzen aber keine oder zumindest nur eine abgeschwächte Calcium-Abhängigkeit (Kanchiswamy et al., 2010). Bemerkenswert ist besonders CPK25, da in diesem der gesamte *C-lobe* abgeschnitten zu sein scheint. In der Folge ist CPK25 nicht in der Lage Calcium zu binden und zeigt eine konstitutive Aktivität. Dies kommt möglicherweise dadurch zustande, dass zusätzlich zu dem Verlust des für die Inhibierung notwendigen *C-lobes*, Modifikationen im *N-lobe* zu einer strukturellen Umorganisation führen, die die aktive Form stabilisieren. CPK25 ist sozusagen in der aktiven Form erstarrt (Liese and Romeis, 2013). Diese Erkenntnisse zeigen, dass (1) nicht alle CPKs calciumabhängig sind und es neben Calcium noch andere molekulare Mechanismen für die Aktivierung geben kann und dass (2) CPKs durch ein Abschneiden der Calmodulin-Domäne konstitutiv aktiv und Calcium-unabhängig werden können. Letzteres trifft jedoch nicht auf alle CPKs zu: CDPK1 aus *Toxoplasma gondii* (Tg) und CPK17 aus *Oryza sativa* (Os) werden durch Abschneiden der Calmodulin-Domäne inaktiviert (Ingram et al., 2015). Der Grund hierfür liegt wohl in einer allosterischen Stabilisierung, die durch die Interaktion des N-Terminus mit der Calmodulin-Domäne zustande kommt.

Die variable N-terminale Domäne bestimmt die subzelluläre Lokalisation der CPKs (Dammann, 2003). Die meisten CPKs sind dabei entweder komplett membranständig (CPK2, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 17, 21, 23, 25, 28, 30, und 34) oder cytosolisch und membran-assoziiert (CPK3, 5, 6, 16, 19, 20 und 24). In einigen seltenen Fällen sind CPKs auch rein cytosolisch (CPK4, 11, 12, and 29) (Simeunovic et al., 2016). Die Membranassoziiierung wird durch N-terminale Acylierung vermittelt. CPKs besitzen für diesen Vorgang häufig eine N-Myristoylierungsstelle (Glycin (G) in Position 2), sowie in manchen Fällen ein darauf folgendes Cystein (C), welches eine zusätzliche Palmitoylierung ermöglichen kann (Cheng et al., 2002). Für CPK5 konnte gezeigt werden, dass dieses an Position G2 myristoyliert wird und dass eine G2A-Mutation die Membran-Assoziierung aufhebt (Lu and Hrabak, 2013). N-Myristoyl ist eine 14C-gesättigte Fettsäure (Myristat). Die kovalente Anbindung dieser Fettsäure an Proteine (N-Myristoylierung) geschieht kotranslational und ist vermutlich irreversibel, vermittelt aber nur eine schwache Membran-Assoziierung (Resh, 2006). Etwa 0,5 % aller Proteine sind auf diese Art modifizierbar und weisen häufig neben G2 auch ein Serin oder Threonin an Position 5 auf, wie es beispielsweise bei CPK23 der Fall ist.

Einleitung

Bereits während der Proteinsynthese wird das Anfangs-Methionin durch eine Methionin-Aminopeptidase abgespalten und Myristat über eine N-Myristoyltransferase (NMT) mittels einer Amid-Bindung angehängt. Vertebraten besitzen zwei Gene für NMTs und NMT1 NMT3-Doppelmutanten sind steril (Chen et al., 2018) (Resh, 2006). Auch wenn die Myristoylierung irreversibel ist, kann der Myristat-Rest in zwei verschiedenen Konformationen auftreten: (1) einer exponierten Konformation, die Membranbindung zulässt oder (2) sequestriert in einer hydrophoben Bindetasche des myristoylierten Proteins. Der Übergang zwischen diesen beiden Zuständen kann über einen „Myristoyl-switch“ gesteuert werden. Dieser *switch* kann ein Ligand sein, der durch Bindung an das myristoylierte Protein eine Konformationsänderung auslöst. Durch diese klappt der Myristat-Rest in das Protein hinein und das Protein löst sich von der Membran. Ebenfalls möglich ist ein elektrostatischer *switch* (McLaughlin and Aderem, 1995). In diesem Fall bewirkt eine Phosphorylierung des polybasischen Bereichs, der für die Assoziierung an die negativ-geladene Membran sorgt, das Einbringen negativer Ladungen und unterbindet damit die elektrostatische Komponente der Interaktion zwischen Membran und Protein (Ames, 1996). Für das humane Protein Recoverin ist ein *Calcium-Myristoyl-Switch* beschrieben, bei dem im nicht Calcium-gebundenen Zustand der Myristoyl-Rest in einer hydrophoben Tasche eingeklappt ist. Wird Calcium an die EF-Hände der Calmodulin-Domäne gebunden, klappt das Myristat heraus und kann an die Phospholipid-Membran binden (Senin, 2002). Auch das shuttling des *myristoylated alanine-rich C kinase substrate* (MARCKS) zwischen Aktin-Cytoskellet im Cytosol und Plasmamembran ist von einem Myristoyl-switch abhängig. In diesem Fall erfolgt die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC). Wird MARCKS von PKC phosphoryliert löst es sich von der Membran und erst eine Dephosphorylierung ermöglicht ein erneutes Anheften (Thelen et al., 1991). Für CPK1 aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Mc), welches nur über eine Myristoylierungsstelle, aber keine Palmitoylierung verfügt, konnte unter Feuchtigkeitsreduktion ebenfalls ein Ablösen von der Membran beobachtet werden. In diesem Fall ist der zugrunde liegende Mechanismus jedoch nicht geklärt (Chehab et al., 2004).

Obwohl die N-Myristoylierung bereits für eine erste Membran-Assoziation ausreicht, wird eine zusätzliche Palmitoylierung für eine feste Membranverankerung benötigt. Unter Palmitoylierung versteht man das kovalente Anheften der 16C-Fettsäure Palmitat an Cysteinreste von Proteinen mittels einer Thioester-Bindung. Da an palmitoylierte Proteine zusätzlich noch weitere Fettsäuren angehängt werden können, spricht man häufig auch von einer S-Acylierung. Daher tragen Palmitoyl-Transferasen (PATs) die diesen Schritt vermitteln auch die allgemeinere Bezeichnung „Protein S-Acyl-Transferasen“. PATs der DHHC-Familie haben als gemeinsames Merkmal ein Aspartat-Histidin-Histidin-Cystein (DHHC)-Motiv in einer cytosolischen Loop-Domäne und verfügen über 4-6 Transmembrandomänen (Conibear and Davis, 2010) (Zeidman et al., 2009). In Arabidopsis gibt es 24 für PATs kodierende Gene (AtPAT1 – AtPAT24) und einige dieser sind an der Zell-Membran lokalisiert

Einleitung

(PAT4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 19 und 22) (Batistic, 2012). Im Gegensatz zur Myristoylierung ist die Palmitoylierung reversibel. Es ist daher möglich, dass auch CPKs über eine Aufhebung des Palmitoylierungsvorganges ihre Lokalisation innerhalb der Zelle anpassen können. Die De-S-Acylierung erfolgt durch zwei Serin-Hydrolase-Familien: (1) cytoplasmatische Acyl Protein Thioesterasen (APT), die in tierischen Systemen die De-S-Acylierung regulieren und damit Protein-Aktivität und -Bewegung beeinflussen, und (2) Palmitoyl Protein Thioesterasen (PPT) die im Protein-Katabolismus im Lysosom und in Pflanzen in den Vakuolen für das Recycling von Acylgruppen verantwortlich sind. In Pflanzen existieren aktuell jedoch keine genauen Informationen über die Anzahl vorhandener Gene, auch wenn es potenzielle Homologe im Genom gibt (Hurst and Hemsley, 2015) (Hemsley, 2015) (Yalovsky, 1999).

Neben der hier beschriebenen Funktion in der Lokalisation von CPKs ist die variable N-terminale Domäne auch für die Spezifität bei Interaktionen mit Zielproteinen wichtig. Dies wurde bereits hinreichend mit Domänen-Swaps unter Beweis gestellt. Beispielsweise kann AtCPK9, im Gegensatz zu CPK1 aus *Nicotiana tabacum* (Nt), den bZIP-Transkriptionsfaktor RSG weder binden noch phosphorylieren. Eine Variante, bei welcher der N-Terminus aus NtCPK1 vor die Kinasedomäne aus AtCPK9 fusioniert wurde, ist dazu jedoch in der Lage (Ito et al., 2010). Umgekehrt vermag das membrangebundene CPK5 aus *Solanum tuberosum* (St) sein Zielprotein, die NADPH-Oxidase StRBOHB, nicht mehr zu binden, wenn seine N-terminale Domäne mit der von CPK2 aus *Solanum lycopersicum* (Sl) ausgetauscht wurde. Der gegenteilige Effekt ist entsprechend bei einer umgedrehten Variante zu beobachten (Asai et al., 2013). Der Aufbau eines prototypischen CPK-Proteins wird in Abbildung 1.7 gezeigt.

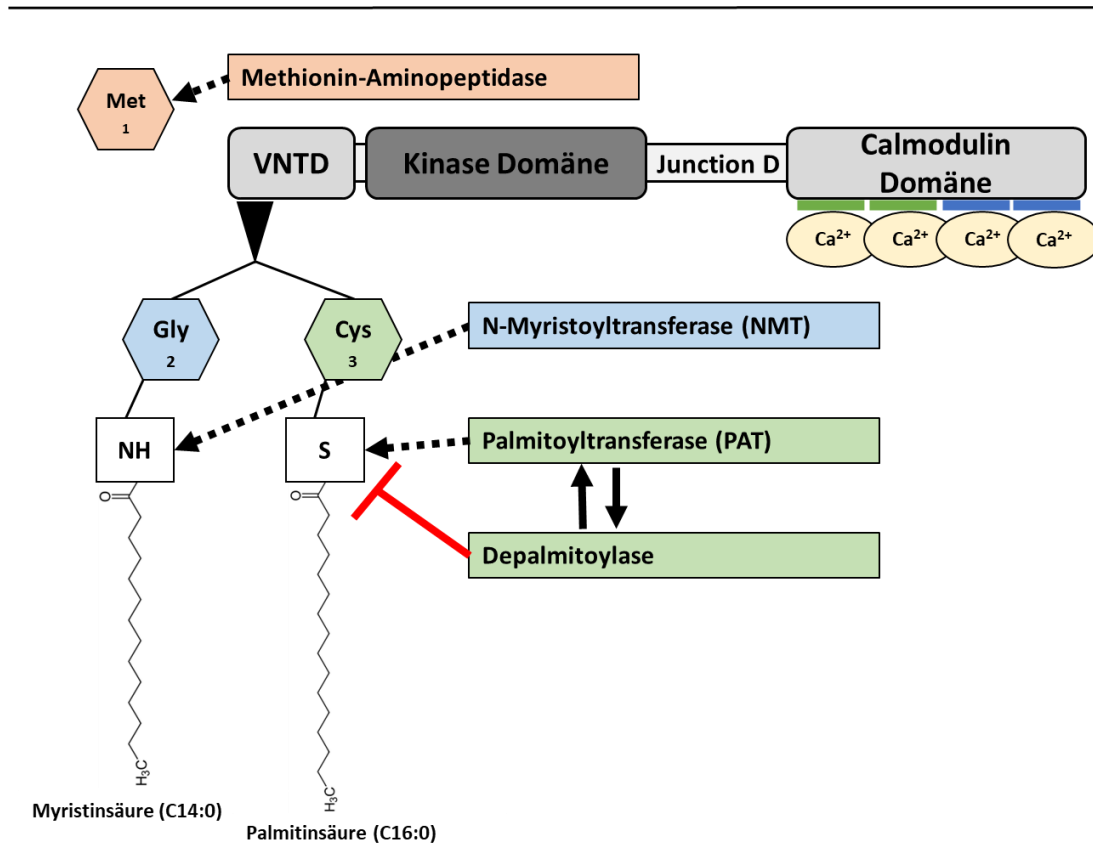


Abb. 1. 7: Aufbau einer prototypischen Calcium-abhängigen Proteinkinase (CPK).

CPKs bestehen aus einer variablen N-terminalen Domäne (VNTD), einer Kinase Domäne und einer Calmodulin Domäne. Die Calmodulin Domäne enthält einen N-terminalen und einen C-terminalen Bereich mit jeweils 2 EF-Händen. Bindet Calcium an diese, findet eine Konformationsänderung statt, durch welche die inhibierende Domäne (*junction domain*) von der Kinase Domäne gelöst wird. Während der Translation wird das zu Beginn stehende Methionin durch eine Peptidase abgespalten. Folgt an zweiter Position ein Glycin wird eine Myristinsäure durch eine Transferase (NMT) über eine Amid-Bindung angehängt. Daraufhin erfolgt der Transport an die Membran. Folgt an dritter oder vierter Position ein Cystein, kann zusätzlich eine Palmitinsäure mittels Thioester-Bindung angehängt werden. Dieser Schritt wird durch eine weitere Transferase (PAT) vermittelt und ist reversibel. Die Abbildung basiert auf (Hamel et al., 2014).

Einleitung

1.4.2 CPKs – Einfluss auf ABA-abhängige abiotische Stress-Reaktionen

Viele abiotische Stress-Signale wie Kälte, hoher Salzgehalt und Trockenheit führen zu einer Fluktuation im Calcium-Level und nehmen Einfluss auf Protein-Phosphorylierungen (Bush, 1995). Da eine Vielzahl von CPKs auf Transkriptions- und Proteinebene ebenfalls durch abiotischen Stress reguliert werden, ist eine Involvierung in abiotischen Stress-Signalwegen anzunehmen (Urao et al., 1994) (Cheng et al., 2002). In Reis wurde beispielsweise ein membrangebundenes CPK beschrieben, dass 12 – 18 h nach Kältestress post-transkriptionell aktiviert wird und möglicherweise durch eine Konformationsänderung auto-phosphoryliert (Martín and Busconi, 2001).

Einige CPKs regulieren Ionen-Kanäle und beeinflussen darüber den ABA-induzierten Stomataschluss. CPK3, 6, 21 und 23 aktivieren gemeinsam mit SnRK2.6 den S-Typ Anionenkanal SLAC1 und dessen Homolog SLAH3 (Mori et al., 2006) (Geiger et al., 2010). Eine dCPK5/6/11/23-Mutante ist entsprechend nicht mehr in der Lage die Stomata ABA- und Calcium-abhängig zu schließen (Edel and Kudla, 2016). Als Gegenspieler der CPK- und SnRK-abhängigen Aktivierung von SLAC1 fungieren hier PP2Cs, die als Masterregulatoren SLAC1 dephosphorylieren und inaktivieren: (1) ABI1 nach Phosphorylierung durch CPK21 und SnRK2.6, (2) PP2Ca nach Phosphorylierung durch CPK6 und CPK23 (Maierhofer et al., 2014) (Brandt et al., 2015). Unter Salzstress phosphorylieren CPK3, 4, 5, 11 und 29 den zweiporigen K⁺-Kanal TPK1 im N-Terminus. Dies ermöglicht die Bindung des 14-3-3-Proteins GRF6 (GF14-λ), welches wiederum die eigentliche Aktivierung auslöst (Latz et al., 2013). In Schließzellen exprimiertes CPK13 phosphoryliert die zwei inneren Kalium-Kanäle KAT1 und KAT2 Calcium- und ABA-Unabhängig. Durch die resultierende Reduzierung der Aktivität wird die Befähigung zur Stomata-Öffnung negativ beeinflusst (Ronzier et al., 2014). Auch der nach außen gerichtete Kaliumkanal GORK wird durch CPKs beeinflusst (negativ durch CPK3, 7 und 13, positiv durch CPK33, 6 und 21) (Chérel and Gaillard, 2019).

Zusätzlich nehmen CPKs über die Aktivierung von ABFs direkten Einfluss auf die Signaltransduktion. CPK32 interagiert *in-vitro* mit ABF4 und phosphoryliert ein konserviertes Serin an Position 110. CPK32-Überexpression führt entsprechend zu ABA-hypersensitiven Phänotypen. CPK10 und 30 interagieren in *Yeast-two-hybrid* (Y2H)-Assays ebenfalls mit ABF4 (Choi et al., 2005). Da diese jedoch membranständig sind, ist eine Regulation in *in-vivo* fraglich (Xu and Huang, 2017). CPK4, 11 und 12 phosphorylieren *in-vitro* ABF4 und ABF1. Entsprechende *Knockout*-Pflanzenlinien zeigen ABA- und Salzstress-insensitive Phänotypen in Keimungsprozessen und Keimlingswachstum, sowie eine Veränderung hinsichtlich der Expression ABA-regulierter Gene. Da CPK4 und CPK11 nukleäre Lokalisation zeigen, handelt es sich bei ihnen wahrscheinlich um echte *upstream*-Regulatoren der ABFs (Zhu et al., 2007). Interessanterweise kann CPK12 zusätzlich zu ABF1 und ABF4 auch das PP2C ABI2 phosphorylieren und beeinflusst die ABA-Signaltransduktion damit sowohl positiv als auch negativ

Einleitung

(Zhao et al., 2011). CPK4, 7, 10 und 30 interagieren *in-vitro* ebenfalls mit ABF2. Da die untersuchten CPKs mit Ausnahme von CPK4 an der Membran assoziiert sind, ist ein entsprechender Befund in *in-vivo* Experimenten jedoch fraglich (Xu and Huang, 2017). Ebenfalls waren sie in einem pRD29B-LUC Reporter Assay in Protoplasten in der Lage den ABA-Signalweg über ABF2 zu aktivieren. Obwohl CPK11 große Homologien zu CPK4 aufweist, konnte es in diesem Experiment ABF2 nur schwach aktivieren. CPK28 zeigte gar eine negative ABF2-Regulation und könnte damit einen Hinweis auf eine differentielle Rolle der CPK Untergruppe IV hinweisen (Lu et al., 2013). CPK6 interagiert in *in-vitro* Experimenten mit ABI5 und ABF3 und phosphoryliert diese (Zhang et al., 2019). Die hier beschriebenen Zusammenhänge werden in Abbildung 1.8 dargestellt (Xu and Huang, 2017) (Chérel and Gaillard, 2019).

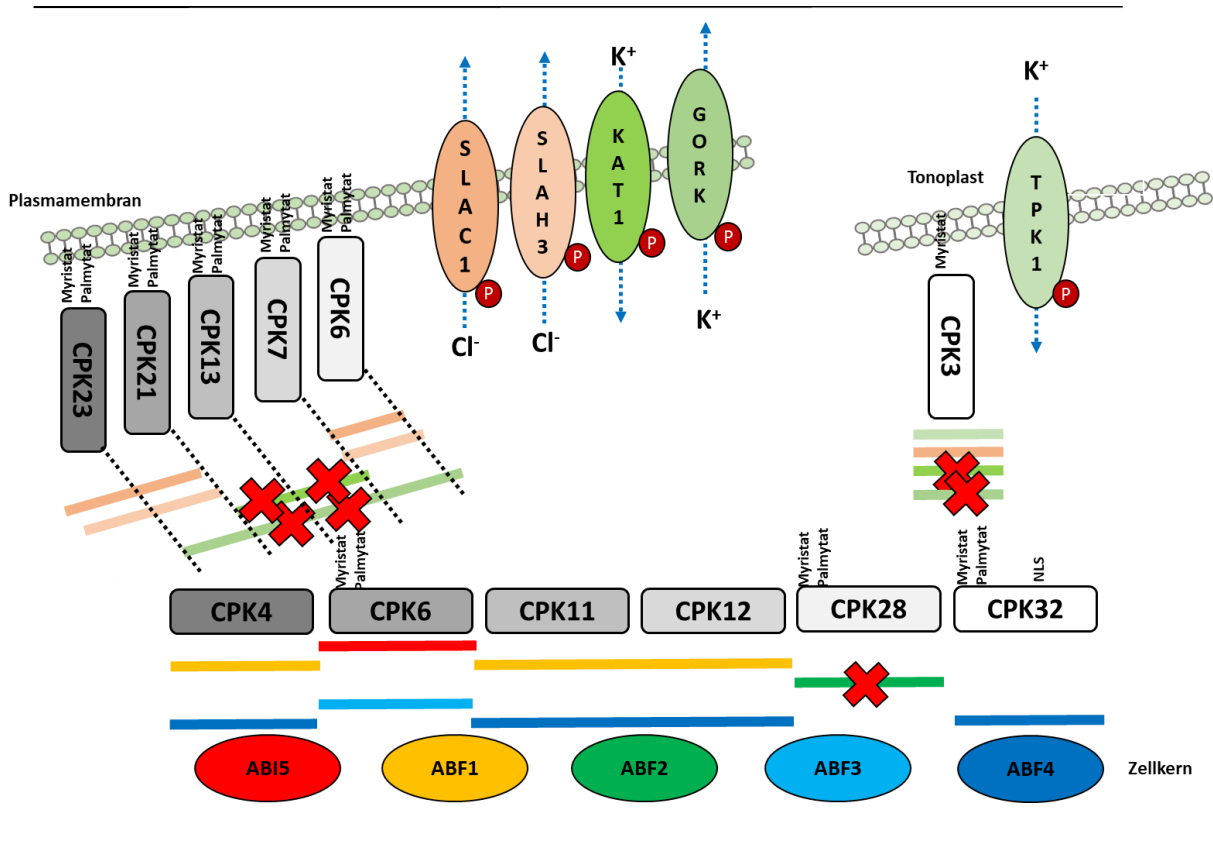


Abb. 1. 8: Der Einfluss verschiedener CPKs auf Elemente des ABA-Signalweges.

Membranständige CPKs regulieren Anionenkanäle in der Plasmamembran und beeinflussen über diese den Stomaschluss. CPK23, CPK21 und CPK6 regulieren SLAC1 und SLAH1 positiv, während der nach innen gerichtete Kaliumkanal KAT1 negativ durch CPK13, CPK7 und CPK3 beeinflusst wird. Der nach außen gerichtete Kaliumkanal GORK wird durch CPK13, CPK7 und CPK3 negativ, durch CPK21 und 6 positiv, reguliert. Auf den Kaliumkanal TPK1 in der Tonoplastenmembran nimmt nur CPK3 Einfluss. Auch Transkriptionsfaktoren des ABA-Signalweges werden durch CPKs reguliert. CPK6 kann *in-vitro* neben ABI5 auch mit ABF3 interagieren und diese phosphorylieren. ABF1 und ABF4 werden durch CPK4, CPK11 und CPK12 reguliert. Während CPK23 ABF2 aktiviert, kann CPK28 dieses inhibieren. Die Abbildung basiert auf (Xu and Huang, 2017) und (Chérel and Gaillard, 2019).

Einleitung

1.4.3 CPK23

CPK23 ist ein Calcium-insensitiver Regulator des Anionenkanals SLAC1 und wird durch Myristoylierung und Palmitoylierung in der Membran verankert (Geiger et al., 2010). Die Calcium-Unabhängigkeit von CPK23 kommt durch eine von der Konsensus-Sequenz abweichenden Mutation in der Calcium-Bindeschleife von EF-Hand 1 in der Calmodulin-Domäne zustande. Eine Variante mit Q393E-Mutation zeigt folglich eine im Vergleich zur Wildtyp-Version erhöhte Calcium-Abhängigkeit (Liese, 2013). Da in derselben Arbeit eine erhöhte Expression abiotischer Stress- und ABA-abhängiger Markergene in CPK23-T-DNA Expressionslinien (SALK_007958) festgestellt werden konnte, wurde hier CPK23 als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion beschrieben. In einer weiteren Arbeit zeigten *cpk23*-Pflanzen unter NaCl- und osmotischen- Stress eine erhöhte Toleranz (Ma and Wu, 2007). Da dies nicht für Lithium-Chlorid (LiCl), welches nur die ionische Komponente von Salzstress abbildet, gezeigt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass nur die osmotische Komponente für diesen Befund verantwortlich ist. Auch in Keimungsassays auf verschiedenen Stressmedien verhalten sich diese Pflanzen nach 3-tägigem Wachstum ähnlich wie der Col-0 WT. Zu früheren Zeitpunkten ist die Keimungsrate im Vergleich zum WT jedoch deutlich reduziert. Damit konsistent erhöht sich die CPK23-Expression unter hyperosmotischen Stressbedingungen und bei exogener ABA-Applikation (Franz, 2008). CPK23-Transkript kann in jungen Keimlingen (8 Tage) hauptsächlich in Blättern und in älteren Pflanzen (16 Tage) zusätzlich in Wurzeln beobachtet werden (Ma and Wu, 2007). In GUS-Färbungs-Experimenten kann ein CPK23-Signal in Schließzellen bei Verwendung eines 8000 bp langen Abschnitts des endogenen Promotors detektiert werden. Da dies bei einem nur 1500 bp langen Promotor-Abschnitt nicht der Fall ist, scheinen in diesem Promotorbereich wichtige regulatorische Elemente zu liegen. (Franz, 2008). Laut dem Internet-Tool eplant (<http://bar.utoronto.ca/eplant/> April 2020) wird CPK23 hauptsächlich in Samen, Rosettenblättern und im Spross exprimiert, vergleichsweise stark jedoch in Stengelblättern, in reifen und seneszenten Blättern, sowie in keimenden Samen. Da CPK23 auch mit PP2Cs (ABI1 und PP2CA) interagiert, ist es trotz Membranlokalisation wahrscheinlich an Prozessen in der ABA-abhängigen Signaltransduktion beteiligt (Geiger et al., 2010). Unter Normalbedingungen ist CPK23 über Myristoylierung an G2 und Acylierung an C3 an die Membran gebunden und reguliert dort Anionenkanäle. Die für eine direkte Regulation des ABA-Signalweges benötigte Lokalisationsänderung kann folglich über die Aufhebung der Membran-Assoziation erfolgen. In Arabidopsis sind mittlerweile depalmitoylierende Enzyme beschrieben: Die zu ABHD17-Proteinen aus Vertebraten homologen ABAPTs regulieren über diesen Mechanismus die Membran-Ablösung von Proteinen der Pathogenabwehr (Liu et al., 2021). Auch für CPK23 ist eine solche Regulation denkbar und verschiedene artifizielle Modifikationen des N-Terminus können dies simulieren. Die Fettsäure-Bindestellen können dabei durch Generierung einer G2AC3A-Mutante, der artifiziellen Verkürzung des

Einleitung

N-Terminus und über das N-terminale Anbringen künstlicher Aminosäure-Linker verschiedener Größen (9AS oder 12AS) aufgehoben werden (Ruschhaupt, 2018). Verkürzungen des CPK23 N-Terminus um 19 und 39 Aminosäuren konnten CPK23 in einem Hefe-basierten Assay aktivieren, während in derselben Arbeit in Protoplasten Reporter-Assays erst Deletionen ab 50 Aminosäuren denselben Effekt zeigten. In diesem heterologen Hefesystem, in welchem die ABF2 abhängige Regulation eines künstlichen ABRE-Promotors analysiert wird, konnte auch die N-terminale Fusion von GFP an CPK23 zu dessen Aktivierung führen. Voraussetzung für Experimente in transienten Systemen (Hefe und Protoplasten) ist neben einer Modifikation des N-Terminus stets auch die Deletion des C-Terminus. Durch das Fehlen der Calmodulin-Domäne sind die die entsprechenden verkürzten Konstrukte (VK) von der Notwendigkeit einer Calcium-abhängigen Aktivierung entbunden (Ruschhaupt, 2018). Besonders wichtig für die CPK23-abhängige Phosphorylierung von ABF2 ist insbesondere ein Serin an Position 94 des Transkriptionsfaktors. Die entsprechende Phosphomimik-Mutante ABF2 S94A kann in Hefe Reporter-Assays nicht mehr durch CPK23 reguliert werden, jedoch nach wie vor durch SnRK2.6 (Ruschhaupt, 2018). Neben ABF2 kann CPK23 auch ABF1,3 und 4, sowie RCAR9, 10 und 11 *in-vitro* phosphorylieren (Pleißner, 2015b). Dasselbe gilt für GCA2, die CPK23-Version aus dem Arabidopsis Ökotyp Landsberg Erecta (Ler-0). GCA2 wird im folgendem stets als CPK23L bezeichnet. Die Arabidopsis Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutante *gca2-1* im Landsberg Erecta (Ler-0) *background* zeigt Störungen in der vegetativen Entwicklung. Diese äußert sich durch ein reduziertes Wachstum, verfrühte Seneszenz der Rosettenblätter, sowie eine ABA-, H₂O₂ und CO₂-insensitive Regulation des Stomataschlusses. Die Punktmutation, die diese Phänotypen bewirkt, befindet sich in der 5'-UTR von CPK23L (CPK23 aus dem Arabidopsis Ökotyp Landsberg/GCA2) und bewirkt eine Überexpression des Gens (Korte, 2009). CPK23L unterscheidet sich in seiner Sequenz deutlich von CPK23C (CPK23 aus dem Arabidopsis Ökotyp Col-0). Besonders Unterschiede in der variablen N-terminalen Domäne, in der es in CPK23C neben 6 zusätzlichen SNPs auch je eine 8bp große Insertion und eine 9 bp große Deletion gibt, führen zu einer geringen Gesamt-Sequenzhomologie von 89,6 %. Da es neben CPK23C weitere Ökotypen gibt, die diese Insertion entweder aufweisen oder denen diese fehlt, kann man die CPK23-Sequenzen einem Col-0 Typ und einem nicht-Col-0 Typ zuordnen. Die Sequenz von CPK23B aus dem irischen Ökotyp Bur-0 ähnelt der von CPK23L. Folglich zählt CPK23B zu den nicht-Col-0 Typen (Czap, 2015). Eine schematische Darstellung des Sequenz-Alignments der 3 hier benannten CPK23-Variationen findet sich in Abbildung 1.9. Die zugehörigen Sequenzen finden sich im Anhang (5.1 und 5.2).

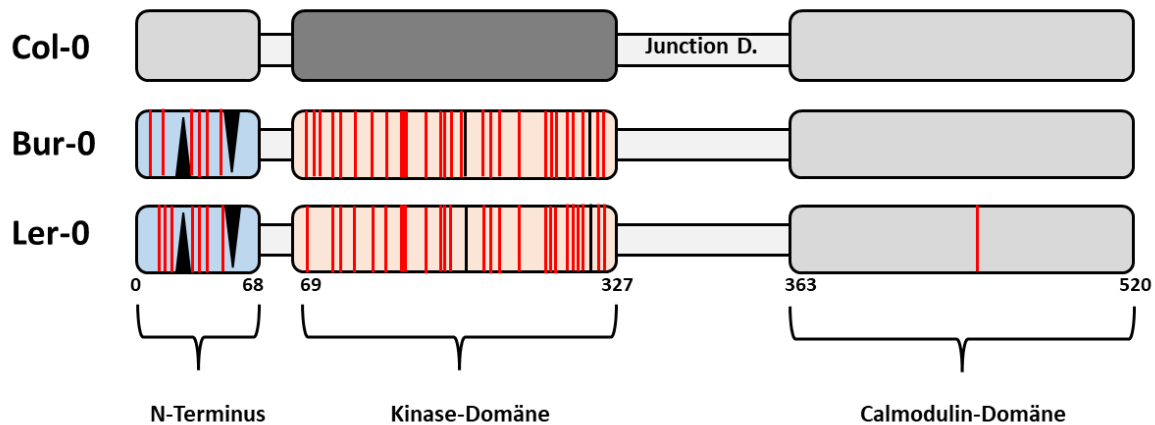


Abb. 1. 9: CPK23 Sequenz-Alignment von den 3 Ökotypen Col-0, Bur-0 und Ler-0.

CPK23 aus Bur-0 und Ler-0 weisen eine hohe Homologie (98 %) zueinander auf, unterscheiden sich jedoch deutlich von der CPK23 Variante aus Col-0 (weniger als 90 %).

Obwohl sich die CPK23-Varianten aus Landsberg und Columbia kaum hinsichtlich ihrer Aktivität in *in-vitro* Experimenten unterscheiden, gibt es *in-vivo* deutliche Unterschiede. Diese ergeben sich folglich aus der Sequenz (Czap, 2015) (Pleißner, 2015b). Unterschiede in der N-terminalen Domäne können zu unterschiedlich stark ausgeprägten Bindungen an Interaktionspartner, oder gar zu komplett unterschiedlichen Interaktionspartnern, führen. Aufgrund der geringen *in-vitro* Aktivitätsunterschiede ist es zwar unwahrscheinlich, dass Mutationen (SNPs) in der Kinasedomäne zu einer unterschiedlichen Aktivität führen, jedoch sind diese möglicherweise in der Interaktion mit N-terminalen Elementen wichtig. Durch Analyse und Vergleich der verschiedenen CPK23 Varianten untereinander ist es möglich, die entscheidenden Elemente in Bezug auf ihren Einfluss in die ABA-Signaltransduktion besser zu verstehen und eine genaue Einordnung in diese Zusammenhänge zu ermöglichen.

1.4.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Unterschiede zwischen drei verschiedenen Ökotypen, die Verifizierung der CPK23-Funktion auf den ABA-Signalweg in transienten Reporter-Assays und transgenen Linien, sowie die Untersuchung möglicher, eine Lokalisationsänderung auslösenden, Mechanismen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

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

2.2 Geräte

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Binokular	Stemi SV 6	Zeiss
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
	GM2010	Promega
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek

Material und Methoden

Mikroskope	HBO 50 Axioskop	Zeiss
	FV 1000	Olympus
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
Nanodrop-Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
	UV-6300 PC	VWR
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
UV-Gerät	Reprostar 3	Camag
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Avanti JXN-26	Beckmann Coulter
	Universal 16	Hettich
	3-16 PK	Sigma
	Typ 5242	Eppendorf

2.3 Software und Datenbanken

Tabelle 2: Die für diese Arbeit verwendeten Programme und Datenbanken.

Name	Beschreibung	Adresse
Araport	Zentrale Arabidopsis Datenbank	http://www.arabidopsis.org
TAIR	Zentrale Arabidopsis Datenbank	https://www.araport.org
NCBI BLAST	Protein und DNA-Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Uniprot	Protein Datenbank	http://www.uniprot.org
GENTle	In silico Tool für Molekularbiologie	http://gentle.magnusmanske.de/
Microsoft Office 2016	Programm für Text, Tabellen und Grafikbearbeitung	www.microsoft.com/DE/Office
Citavi	Literaturverwaltung	https://www.citavi.com/de
ImageJ	Bildbearbeitung und Auswertung	https://imagej.net
Omero	Online-tool zur Absicherung und Bearbeitung von Mikroskopie-Bildern	https://omero.wzw.tum.de/
IGV	Analyse von genomischen Daten	https://software.broadinstitute.org/software/igv/download
EMBL-EBI Clustal Omega	Programm für multiple Sequenz Alignments	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

Material und Methoden

Arabidopsis 1001 genomes	Datenbank für Sequenzvergleich	http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php
maps	Programm zur Erstellung von Karten	https://maps.co/gis/
eplant	Datenbank für Proteinexpression und Lokalisation in Arabidopsis	https://bar.utoronto.ca/eplant/
nlsdb	Analyse von Sequenzen auf NLS	https://rostlab.org/services/nlsdb/
Alphafold	Strukturanalyse von Proteinen	https://alphafold.ebi.ac.uk/
iupred2	Algorithmus zur Vorhersage von ungeordneten Regionen und Bindestellen	https://iupred2a.elte.hu/
Pepinfo	Vorhersage von geladenen Bereichen in Proteinen	https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo/
DDmut	Analyse des Einflusses von Mutationen auf Proteinstabilität	https://biosig.lab.uq.edu.au/ddmut
Swissmodel	Algorithmus zur Vorhersage von Proteinfaltung	https://swissmodel.expasy.org/
Boxplotmaker	Programm zur Erstellung von Boxplots	https://www.statskingdom.com/advanced-boxplot-maker.html
Atozmath	Programm zur statistischen Analyse	https://atozmath.com/CONM/NonParaTest.aspx?q=mmt

2.4 Verwendete Mikroorganismen und Pflanzen-Linien

Tabelle 3: Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen.

Stamm	Organismus	Genotyp	Resistenz	Referenz
C58 pGV3101	<i>A. tumefaciens</i>	Ti-plasmid pMP90	Rifampicin Gentamycin	Csaba Koncz (MPI Cologne)
XL1-blue	<i>E. coli</i>	endA1 gyrA96(nalR) thi- 1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)	Tetracyclin	Stratagene
Top10	<i>E. coli</i>	F- mcrA Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Streptomycin	Thermo Fischer Scientific
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
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)

Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien.

Organismus	Ecotyp	Genotyp	Germplasm/Seed Stock
<i>A. thaliana</i>	Col-0	WT pUBI10:CPK23C:tNos pUBI10:9aa_CPK23C:tNos pUBI10:CPK23C_S5D:tNos pUBI10:CPK23C_G2A_C3A:tNos pUBI10:CPK23C_TK:tNos p35S:CPK23C_meGFP:tNos pCPK23C:CPK23C:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23C:tCPK23C pCPK23C:CPK23B:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23B:tCPK23C pCPK23C:CPK23L:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23L:tCPK23C pCPK23C:LV:tCPK23C	
		<i>cpk23</i>	Salk_007958
		dCPK5/6/11/23 pCPK23C:LV:tCPK23C pCPK23C:CPK23C:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23C:tCPK23C	Kreuzung aus sail_657C06/salk_025460/salk_054495 und salk_007958, (Brandt et al. 2015), zur Verfügung gestellt von J. Schröder
		dCPK3/4/6/11	Zur Verfügung gestellt von J. Schröder
		dABF1 pCPK23C:LV:tCPK23C pCPK23C:CPK23_TK:tCPK23C pCPK23C:CPK23C:tCPK23C pCPK23C:CPK23_nterC_kinB:tCPK23C	Salk_132819
		dABF2/3/4 pCPK23C:LV:tCPK23C pCPK23C:CPK23_TK:tCPK23C pCPK23C:CPK23C:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23C:tCPK23C	Kreuzung aus SALK_132819/SALK_069523 und SALK_096965, zur Verfügung gestellt von Kazuko Yamaguchi-Shinozaki (Yoshida et al., 2010)
	Ler-0	WT	
		<i>gca2-2</i> pCPK23C:CPK23C:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23C:tCPK23C pCPK23C:CPK23B:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23B:tCPK23C pCPK23C:CPK23L:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPK23L:tCPK23C pCPK23C:LV:tCPK23C	GT21748

Material und Methoden

		<i>gca2-1</i>	EMS-screen (Iten 1992)
		<i>gca2-1 x gca2-2</i> pCPK23C:CPK23B:tCPK23C pCPK23C:CPK23L:tCPK23C pCPK23C:9aa_CPk23L:tCPK23C	Kreuzung aus <i>gca2-1</i> und <i>gca2-2</i> , in dieser Arbeit generiert

2.5 Kultivierung von Mikroorganismen

2.5.1 Kultivierung von Bakterien

A. tumefaciens und *E. coli* wurden in DYT-Medium bei 30 °C bzw. 37 °C und 200 rpm angezogen. Um auf vorhandene Resistenzmarker zu selektieren wurden Antibiotika in entsprechender Konzentration verwendet.

DYT-Medium	
Pepton	16 g/l
Hefextrakt	10 g/l
NaCl	5 g/l
pH	7
Agar	15 g/l

Antibiotika	
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/l
Spectinomycin	50 µg/l
Gentamycin	25 µg/ml

Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen verwendet. Diese wurden auf Eis aufgetaut und je 50 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 ng DNA gemischt. Nach 10 min auf Eis wurden die Zellen bei 42 °C für 30 s einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend für 15 min auf Eis gelagert. Danach wurden 250 µl vorgewärmtes (37 °C) dYT-Medium hinzugegeben und die Zellen schüttelnd für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach auf dYT Fest- oder Flüssigmedium mit entsprechender Selektion gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation von *A. tumefaciens*

Für die Transformation von *A. tumefaciens* wurden chemisch kompetente Zellen aufgetaut und mit 100 ng DNA versetzt. Nach 15 min auf Eis wurden die Zellen bei 37 °C für 5 min einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend erneut für 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 600 µl dYT Flüssigmedium hinzugefügt und 2 h bei 28 °C inkubiert. Nach Ausplattierung auf dYT-Platten mit entsprechender Selektion wurden die Platten für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.5.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefekulturen wurden auf SD-Platten 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend Einzelkolonien in Flüssigkultur (250 ml in Erlenmeyerkolben für Transformation oder 5 ml in Reagenzglas als Vorkultur für *in-vivo* Reporter Assays in Hefe) überführt. Wurde im *in-vivo* Reporter Assay Konstrukte unter der Kontrolle des pGAL-Promotors verwendet, wurde Galactose anstelle von Glucose verwendet.

SD-Medium	
10x Makrosalze	100 ml/l
1000x Mikrosalze	1 ml/l
pH	5,8
Agar	15 g/l
Nach dem Autoklavieren steril hinzufügen:	
Glucose oder Galactose (200 g/l)	100 ml/l
10x Dropout-Lösung	100 ml/l
100x AS-supplements (Selektion)	10 ml/l

AS Supplements	
100x L-Histidin	2000 mg/l
100x L-Leucin	10000 mg/l
100x L-Uracil	2000 mg/l
100x L-Tryptophan	2000 mg/l
10x Makrosalze	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	10,24 g/l
KH ₂ PO ₄	10 g/l
NaCl	1 g/l
CaCl ₂	1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g/l

Material und Methoden

10x AS Dropout Lösung (-Ura-Leu-His-Trp)		1000x Mikrosalze	
L-Adenin Hemisulfatsalz	200 mg/l	Biotin	2 mg/l
L-Arginin HCl	200 mg/l	Ca ²⁺ -Pantothensäure	400 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l	Folsäure	20 mg/l
L-Lysin HCl	300 mg/l	Myo-Inositol	2 g/l
L-Methionin	200 mg/l	Nicotinsäure	400 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l	P-Aminobenzoessäure	200 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l	Pyridoxin-HCl	400 mg/l
L-Tyrosin	200 mg/l	Riboflavin	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l	Thiamin-HCl	400 mg/l
		Borsäure	500 mg/l
		Kupfersulfat	40 mg/l
		Kaliumiodid	100 mg/l
		Eisen-II-Chlorid	200 mg/l
		Mangansulfat	400 mg/l
		Natriummolybdäm	200 mg/l
		Zinksulfat	400 mg/l

2.6 Arbeiten mit DNA

2.6.1 Klonierung mit dem Golden-Gate System

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Plasmide wurden mithilfe des Golden-Gate-Systems erstellt (Binder et al., 2014). Bei diesem System ist es möglich verschiedene Module (LI) flexibel zu einem funktionellen Konstrukt (LII) zu kombinieren. Ermöglicht wird dies durch speziell designte Primer. Nach Amplifikation des PCR-Produkts mit diesen Primern und dem anschließenden Verdau durch S2-Endonukleasen, welche außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden und spezifische „klebrige“-DNA-Enden erzeugen, entstehen Konstrukte, die mit den umgebenden Modulen kompatibel sind und mit diesen ligiert werden können. Auf diese Weise werden mehrere Module zu einem intakten Plasmid kombiniert. Durch Verwendung von verschiedenen Vektor-*backbones* können Plasmide für die Arbeit in Hefe, Protoplasten und für die Generierung von transgenen Pflanzenlinien erzeugt werden. Das System wurde unter anderem von David Chiasson etabliert und in Binder et al. (2014) publiziert und beschrieben.

		LI-Module					
		Promoter	N-ter Tag	cDNA	C-ter Tag	Terminator	
		A-B	B-C	C-D	D-E	E-F	F-G
LII-backbone für Arbeiten in Pflanzen	LIIc_F3-4	p35S/S+1 pUBI10 pCPK23C	dy 9aa	cDNA	dy meGFP FLAG/HIS FLUC	tNOS tCPK23C	dy
LII-backbone für Arbeiten in Hefe	LIIy_Trp	pGAL	dy	cDNA	dy	tTDH	dy
	LIIy_Leu	pCYC1	9aa		GAL4BD		
	LIIy_His	pADH			GAL4AD		

LII-Module

LIII-backbone für stabile Pflanzenlinien

	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6
LIIIbeta_fin	pNOS:BastaR:tNos	dy	pUBI10:cDNA:tNos pCPK23C:cDNA:tCPK23C	dy	pOLE1:OLE1_RFP:tOLE1

In den folgenden Tabellen befinden sich die für die Arbeit klonierten LI-Konstrukte, sowie die für die Klonierung verwendeten und bereits vorhandenen LI-Konstrukte und Vektor-Backbones. Alle neu erstellten LI-Konstrukte wurden vor Verwendung mit Bsal zum Test verdaut und sequenziert, die übergeordneten Plasmide wurden durch einen Verdau mit Bpil auf Richtigkeit kontrolliert und im Zweifelsfall zusätzlich sequenziert.

Tabelle 5: Die vom Autor für diese Arbeit erstellten Plasmide.

Strain-Nummer	Name Konstrukt	Antibiotika Resistenz
10132	C-D CPK23_tsu_vk	Gent
10133	C-D CPK23_bur_vk	Gent
10134	C-D CPK23_ler_vk	Gent
10135	C-D CPK23_nterL_kinB	Gent
10136	C-D CPK23_nterB_kinL	Gent
10137	C-D CPK23_bur_R290S	Gent
10138	C-D CPK23_ler_S290R	Gent
10139	C-D CPK23_nterL_kinB_R290S	Gent
10140	C-D CPK23_nterB_kinL_S290R	Gent
10141	C-D CPK23_col_R290S	Gent
10142	C-D CPK23C_d68	Gent
10143	C-D CPK23C_d58	Gent
10144	C-D CPK23C_d50	Gent
10145	C-D CPK23C_d38	Gent
10146	C-D CPK23C_d19	Gent
10147	C-D DREB2a	Gent
10148	C-D DREB1A	Gent
10149	C-D DREB1B	Gent
10150	C-D DREB1C	Gent
10151	C-D ICE1	Gent
10152	C-D SLAC1	Gent
10153	D-E GAL4AD	Gent
10154	D-E GAL4BD	Gent
10155	C-D 14-3-3u	Gent
10156	C-D ABI5	Gent

Material und Methoden

10157	C-D CPK5	Gent
10158	C-D CPK6	Gent
10159	A-B pCYC1	Gent
10160	C-D CPK3	Gent
10161	C-D CPK15	Gent
10162	C-D CPK32	Gent
10163	C-D CPK28	Gent
10164	C-D CPK10	Gent
10165	C-D CPK31	Gent
10166	C-D CPK1	Gent
10167	C-D CPK23C_del_35-42	Gent
10168	C-D CPK23C_del_35-39	Gent
10169	C-D CPK23B_ins_d35_42_from_CPK23C	Gent
10170	D-E_GS_link_FLUC_C	Gent
10171	D-E_GS_link_FLUC_N	Gent
10172	C-D CPK23_ nterB_T38I_kinC	Gent
10173	C-D CPK23_ nterB_Y44D_kinC	Gent
10174	C-D CPK23_ nterB_T38I_Y44D_kinC	Gent
10175	C-D CPK23_ nterB_ins_from_CPK23C_T38I_kinC	Gent
10176	C-D CPK23_ nterB_ins_from_CPK23C_Y44D_kinC	Gent
10177	C-D CPK23_ nterB_ins_from_CPK23C_T38I_Y44D_kinC	Gent
10178	C-D CPK23C_I47T	Gent
10179	C-D CPK23C_D53Y	Gent
10180	C-D CPK23C_I47T_D53Y	Gent
10181	C-D CPK23C_del_35-42_I47T	Gent
10182	C-D CPK23C_del_35-42_D53Y	Gent
10183	C-D CPK23C_del_35-42_I47T_D53Y	Gent
10184	C-D CPK23C_G2A	Gent
10185	C-D CPK23C_C3A	Gent
10186	C-D CPK23B_G2A	Gent
10187	C-D CPK23B_C3A	Gent
10188	C-D CPK23B_G2A_C3A	Gent
10189	C-D ABAPT1	Gent
10190	C-D ABAPT2	Gent
10191	C-D ABAPT3	Gent
10192	C-D ABAPT4	Gent
10193	C-D ABAPT5	Gent
10194	C-D ABAPT6	Gent
10195	C-D ABAPT7	Gent
10196	C-D ABAPT8	Gent
10197	C-D ABAPT9	Gent
10198	C-D ABAPT10	Gent
10199	C-D ABAPT11	Gent
10200	C-D PBS1	Gent
10201	C-D PBS1_CPK23C_d19	Gent
10202	C-D BIK1	Gent
10203	C-D BIK1_CPK23C_d19	Gent
10204	C-D RIN4	Gent
10205	C-D RIN4_CPK23C_d19	Gent

10206	C-D CPk23 nterB_kinC	Gent
10207	C-D CPK23 nterL_kinC	Gent
10208	C-D CPK23 nterC_kinB	Gent
10209	C-D CPK23 nterC_kinL	Gent
10210	A-B pCPK23C	Gent
10211	E-F tCPK23C	Gent
10212	C-D nterL_kinC_G2A	Gent
10213	C-D nterL_kinC_C3A	Gent
10214	C-D nterB_kinC_G2A	Gent
10215	C-D nterB_kinC_C3A	Gent
10216	C-D CPK23_nterB_kinC_insertion_d35-42_from CPK23C	Gent

Tabelle 6. Die vom Autor für diese Arbeit verwendeten, bereits vorhandenen Plasmide.

Strain- Nummer	Name Konstrukt	Antibiotika Resistenz
8603	pSEVA641 Bpil backbone (new standard LI)	Gent
7901	LIIc_F3-4	AMP
7913	LII F1-2 LEU	Spec
8625	LII F2-3 HIS	Spec
7914	LII F3-4 TRP	Spec
7911	LIII β _fin	Kan
9051	LI_SEVA641_ABF1	Gent
8202	LI_C-D_ABF2	Gent
9048	LI_SEVA641_ABF3	Gent
9052	LI_SEVA641_ABF4	Gent
8215	LI_C-D_RCAR1	Gent
8000	LI_C-D_OST1-FL	Gent
8282	LI_C-D_SnRK2.4	Gent
7925	LI_dy_C-D	Gent
8011	LI_C-D_ABI1	Gent
8323	LI_C-D_ABI2	Gent
8324	LI_C-D_HAB1	Gent
8325	LI_C-D_HAB2	Gent
8326	LI_C-D_HAI1	Gent
8327	LI_C-D_HAI2	Gent
8328	LI_C-D_HAI3	Gent
8329	LI_C-D_PP2CA	Gent
8330	LI_C-D_AHG1	Gent
7928	LI_A-B_p35S	Gent
8616	A-B ScADH1 Trunc	Gent
7924	LI_dy_B-C	Gent
8110	LI_B-C_9aapSK-Linker	Gent
7991	LI_E-F_tNos	Gent
7995	LI_E-F_tTDH1	Gent

Material und Methoden

8399	LI_D-E_meGFP	Gent
7980	LI_D-E_mCherry	Gent
7926	LI_dy_D-E	Gent
7988	LI_D-E_3C_3xFLAG-8xHIS	Gent
8411	LIIc_Amp_F1-2_pNOS:BASTA:tNos	Amp
8295	LII dy 2-3	Amp
8296	LII dy 4-5	Amp
8996	LII_5-6_pFAST	Spec
7931	LI_A-B_pGAL1	Gent
7937	LI_A-B_pRPL18B	Gent
7938	LI_A-B_pSAC6	Gent
7939	LI_A-B_pUBQ10	Kan
7927	LI_dy_F-G	Gent
8008	LI_C-D_OST1_Δ320	Gent

Quick-cut Ligation

Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente simultan per Restriktionsenzym geschnitten und ligiert (Binder et al., 2014). In einem Ansatz werden je 100 ng aufgereinigtes DNA-Fragment oder 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt und in Gegenwart des Ziel-Vektors mit einer entsprechenden S2-Endonuklease (Eco31I/BsaI oder BpiI/BbsI, Thermo-Fischer Scientific) und T4-Ligase gemischt. Die Cut-Ligation erfolgte im Thermocycler.

Cut-Ligation Cycle		
37 °C	5 min	10 – 20 Zyklen
16 °C	5 min	
65 °C	20 min	

Material und Methoden

Cut-Ligation Ansatz	
Zielvektor [100 ng/ μ l]	1 μ l
LI-Ligation DNA-Fragment aus PCR	100 ng
LII-Ligation Plasmid-Elemente [100 ng/ μ l]	6 x 1 μ l
Buffer G	1,5 μ l
ATP [10 mM]	1,5 μ l
LI-Ligation Bpl [10 U/ μ l]	0,75 μ l
LII-Ligation Bsal [10 U/ μ l]	
T4-DNA Ligase [5 U/ μ l]	0,75 μ l
H ₂ O	Auf 15 μ l auffüllen

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Flachbett-Gel-Elektrophorese. Hierfür wurden je nach Größe der DNA-Fragmente 1 -2 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und mit *Midori Green Advance* (nippongenetics) eingefärbt (1 μ l/100 ml Agarose). Als DNA-Ladepuffer wurde der *FastDigest Green Buffer* (10X) (Thermofisher) verwendet, die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 6 V/cm Elektrodenabstand in 1x TAE-Puffer. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte mittels UV-Licht (322 nm) durch Anregung des Midori Green-DNA Komplexes.

2.6.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die als korrekt-befundene DNA-Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels *NucleoSpin PCR and Gel-Clean-up-Kit* (Machery-Nagel) aufgereinigt.

Material und Methoden

2.6.4 Aufreinigung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Um transgene *Arabidopsis*-Linien zu genotypisieren, wurde je ein Blatt einer Einzelpflanze abgeschnitten und zusammen mit Glasperlen in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Proben wurden anschließend in einem *Tissue Lyser* (Quiagen, Hilden) homogenisiert und mit 800 µl eines vorgewärmten Extraktionspuffers (65 °C) versetzt. Nach invertieren wurden die Proben 15 min bei 65 °C inkubiert.

DNA-Extraktionspuffer	
Tris-Base, pH 8	100 mM
NaCl	700 mM
EDTA, pH 8	50 mM
Vor Verwendung wurden 7 µl β-Mercaptoethanol pro 10 ml Lösung zugefügt	

Für die Chlorom-Extraktion wurde anschließend 520 µl einer 24:1 Chloroform:Isoamylalkohol-Lösung auf das Homogenat gegeben und die Lösung nach erneuter Invertierung für 2 min bei 14.000 g abzentrifugiert. Etwa 700 µl des wässrigen Überstandes wurden in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, mit 30 µg RNase versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Fällung wurde anschließend 700 µl Isopropanol hinzugefügt und bei 14.000 g für 15 min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70-prozentigem eiskalten Ethanol gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde das Pellet getrocknet und in 40 bis 100 µl Wasser resuspendiert.

2.6.5 Polymerase-Kettenreaktion

Um DNA-Abschnitte selektiv zu vervielfältigen, wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet. Mittels eines Start-Moleküls und einem DNA-Oligonukleotid (Primer) kann eine DNA-Polymerase einen neuen DNA-Doppelstrang synthetisieren. Für die DNA-Amplifikation wurde die *Phusion-Proofreading-Polymerase* (Thermo-Fischer Scientific) verwendet. Der Reaktionsansatz erfolgte nach Herstellerangaben.

Material und Methoden

2.6.6 Zielgerichtete Mutagenese mittels *Golden-Gate*

Um einzelne Aminosäuren in bestimmten Genen auszutauschen, wurden diese mit einem genspezifischen Mutagenese-Primer amplifiziert. Dafür wurde die Substitution der entsprechenden kodierenden Nukleinsäuren in den Bereich vor der Bpl Schnittstelle integriert. Nach Amplifikation der Gensequenz mittels PCR wird ein mutiertes DNA-Fragment gebildet, welches durch eine LI Cut-Ligation in einen entsprechenden Zielvektor transformiert werden kann. Der Aufbau der äußeren Primer ist dabei spezifisch für das jeweilige Gen (Binder et al., 2014), die inneren Mutagenese-Primer sind dargestellt. Die zu **mutierende Base** und die Bpl Erkennungssequenz sind hervorgehoben.

5'-Primer TAGAAGACAANNNN + 20-25 bp genspezifische Sequenz

3' Primer TAGAAGACAANNNN + 20-25 bp genspezifische Sequenz

Die vom Autor für diese Arbeit erstellten Primer werden im Anhang (5.9) in Tabelle 7 aufgelistet.

2.6.7 Plasmid-Präparation aus *E. Coli*

Die Plasmid-Präparation aus *E. coli* erfolgte mittels des *NucleoSpin Plasmid Kit* und wurde nach Hersteller-Angabe durchgeführt.

2.6.8 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau mittels Endonukleasen erfolgte im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. Inkubationsdauer und Temperatur wurden ebenfalls nach Herstellerangabe ausgewählt. Um den Erfolg des Verdaus zu überprüfen, wurde die Probe auf ein Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Bei einem präparativen Ansatz wurde die Bande im Anschluss aus dem Gel ausgeschnitten.

Material und Methoden

2.7 Arbeiten mit Hefe

2.7.1 Hefe-Transformation

Für die Transformation von Hefe-Zellen wurden 50 ml selektives SD-Minimalmedium mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,3 angeimpft und bis auf eine OD_{600} von 0,5 – 1 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (1500 g, 5 min, RT), in H_2O gewaschen und in 100 mM Lithium-Acetat (LiAc) aufgenommen. Jeweils 50 μ l wurden pro Transformations-Ansatz aliquotiert und pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde der Transformations-Ansatz zugegeben und durchmischt. Die Zusammensetzung des Transformations-Ansatzes wird in einer Tabelle angegeben. Die Inkubation erfolgte für 40 min bei 42 °C im Wasserbad. Im Anschluss wurden die transformierten Zellen durch Zentrifugation (1500 g, 30 s) geerntet, in Wasser resuspendiert, auf selektiven SD-Platten ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Transformations-Ansatz	
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-DNA (100 ng/ μ l)	3 μ l
H_2O	auf 360 μ l auffüllen

2.7.2 Transaktivierungs-Luciferase-Assay in pSAR-Hefen

Über diesen *in-vivo* Assay ist es möglich die Induktion eines Reporters durch verschiedene Effektoren zu untersuchen (Leskinen et al., 2003). Der verwendete Reporter produziert dabei nach Induktion durch den zu untersuchenden Effektor ein messbares und quantifizierbares Luciferase-Signal. Für jeden Messpunkt wurden dabei drei separate Einzelkolonien einer erfolgreichen Hefetransformation in 0,5 ml selektives SD-Medium gegeben und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Kultur wurde am nächsten Tag auf 5 ml erhöht und für weitere 4 – 5 h inkubiert. Von jeder Kultur wurde je 1 ml für die Bestimmung der OD_{600} und 1 ml für die weitere Durchführung des Assays geerntet. Letztere wurde

Material und Methoden

nach Abzentrifugation (3000 g, 30 s) und Entnahme des Überstandes mit H₂O auf eine OD₆₀₀ von 10 eingestellt. Anschließend wurde eine 96-*deep well* Platte mit 490 µl Selektionsmedium vorbereitet. Als Zuckerquelle diente bei Effektoren unter Kontrolle des GAL1-Promotors Galactose, sonst wurde Glucose verwendet. Für jedes der drei Replikate wurden je zwei Wells mit 10 µl der Hefekulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Die Messplatte wurde anschließend mit einer sterilen und atmungsaktiven Schicht (Breathe-EASIER, DIVBIO, Dedham, USA) verschlossen und für 16 – 20 h (250 rpm, 30 °C) inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 100 µl der Kultur in eine Luminiszenz-Mikrotiterplatte (96-Well, PS, *flat-bottom*, Weis, *non-Binding*, Greiner) und eine durchsichtige Mikrotiterplatte (96-Well Multiwell Platte ohne Deckel, Flat-Bottom, CytoOne) gegeben und der Inhalt gemessen. In letzterer wurde die Zelldichte ermittelt, in der ersten die Luciferase-Aktivität. Für die Messung der Luciferase-Aktivität im Platten-Luminometer (Hidex) wurden 5 s nach dem Start der Messung je 100 µl einer frisch präparierten Luciferin-Lösung zugesetzt. Die Umsetzung des Luciferin-Substrats durch die in den Hefe-Kulturen gebildete Luciferase wurde 5 s lang *als counts per second* (cps) ermittelt. Die verwendete Luciferin-Lösung bestand dabei aus einem Luciferin-Stock (25 mM D-Luciferin Kaliumsalz (Promega) in Phosphat-Puffer (10 mM pH 7,2)), welcher in einem sauren Luciferin-Messpuffer (100 mM Citrat, pH 3) gelöst wurde. Bei der Auswertung wurden die ermittelten Luciferase-Werte auf die OD₆₀₀ der jeweiligen Kultur normalisiert, der Mittelwert aus den 3 Replikaten und den jeweils 2 Wiederholungen gebildet und die Standardabweichung errechnet.

2.7.3 Interaktionsstudien in Hefe (Y2H)

Um die Interaktion von Proteinen in Hefe zu ermitteln, wurde der Histidin Autotrophie Wachstums-Test (Y2H) verwendet. Dafür wurden die Gene der auf Interaktion zu testenden Proteine in LIY_Trp, beziehungsweise LIY_Leu Vektoren vor eine C-terminale GAL4-Binde-, beziehungsweise GAL4-Aktivierungsdomäne kloniert. Nach der Transformation in AH109-Hefezellen wurden je 3 Einzelkolonien gepickt und in 1 ml selektivem –L/-W SD Medium über Nacht inkubiert (James et al., 1996). Die Kulturen wurden am nächsten Tag auf 5 ml erhöht und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 1 wachsen gelassen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Kulturen erstellt und Tropfen der Verdünnungen die einer Konzentration von 1000-, 100- und 10- Zellen entsprechen auf Platten mit unterschiedlichen Selektionsmedien gegeben. Als Kontrolle dienten dabei –L/-W Platten, für Interaktionsstudien wurde das Wachstum auf –L/-W/-H Platten analysiert.

2.8 Arbeiten mit Protoplasten

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Präparation und Transfektion von Protoplasten aus Arabidopsis-Blättern gründen auf der Arbeit von Abel (Abel and Theologis, 1994) und Yoo (Yoo et al., 2007) und wurde nach Tischer (Tischer, 2016) modifiziert.

2.8.1 Herstellung der Enzymlösung für die Isolation von Protoplasten

Für die Enzymlösung wurde Cellulase und Mazerozyme in MES/KOH Puffer gelöst und der Proteaseinhibitor AEBSF hinzugegeben. Die Lösung wurde in Dialyseschläuche (28 mm) gefüllt und 30 min gegen 5 l 10 mM MES/KOH (pH 5.6) dialysiert. Nach Zugabe von Mannitol, BSA und CaCl₂ wurde das Volumen mit H₂O auf 1 l erhöht und der pH auf 5,6 eingestellt. Die fertige Enzymlösung wurde steril filtriert und bei – 20 °C gelagert.

Enzymlösung	
MES/KOH pH 5,7	5 mM
Cellulase (Yakult, Japan)	1 %
Macerozym (Yakult, Japan)	0,25 %
CaCl ₂	8 mM
BSA	0,6 %
AEBSF	2,5 nM

2.8.2 Protoplastenpräparation

Von Arabidopsis-Pflanzen wurden circa 1,5 g Rosettenblätter abgeschnitten und 3-4 h leicht schwenkend bei 25 °C in 20 ml Enzymlösung verdaut. Der Ansatz mit den nun vorhandenen Protoplasten (PP) wurde durch ein Nylonnetz (200 µm) gefiltert und in ein 50 ml Falcon überführt. Verbliebenes Blattmaterial wurde mit 10 ml W5-Lösung gewaschen und ebenfalls durch das Nylonnetz filtriert. Bei minimaler Beschleunigung und 60 g wurde die PP-Lösung pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml W5-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das PP-

Material und Methoden

Pellet in 10 ml MM-Lösung aufgenommen und die Zahl lebender Zellen anhand eines mit 1 μ l Fluorezein Diacetat (FDA, 5 mg/ml in Aceton) versetzten 100 μ l Aliquots mittels Thoma-Zählkammer ermittelt. Die Lösung wurde mit MM-Lösung auf eine Konzentration von 1×10^6 PP/ml eingestellt und anschließend für mindestens 1 h auf Eis gelagert.

W5-Lösung	
MES/KOH pH 5,7	2 mM
NaCl	154 mM
CaCl ₂	125 mM
KCl	5 mM

MM-Lösung	
MES/KOH pH 5,7	5 mM
Mannitol	400 mM
MgCl ₂	15 mM

2.8.3 Protoplasten Transfektion

Jeder Messpunkt des Protoplasten *in-vivo* Reporter Assays besteht aus drei individuellen Protoplasten Transfektionen. Für jeden Ansatz wurden 110 μ l gekühlte PP zu 30 μ l Transfektionsansatz gegeben und nach Zugabe von 145 μ l vorgewärmter PEG-Lösung (37 °C) durch sanftes invertieren gemischt. Die Transfektion wurde nach 10 min durch das Hinzufügen von 1 ml W5-Lösung gestoppt und der Ansatz 2 min bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das PP-Pellet in 220 μ l WIMK gelöst und je 110 μ l auf eine 96-Well Mikrotiterplatte transfiziert. Der Ansatz wurde anschließend 16- 20 h bei 25 °C im Licht inkubiert.

Material und Methoden

PEG-Lösung	
PEG 4000	40 %
Mannitol	200 mM
CaCl ₂	100 mM

WIMK-Lösung	
MES/KOH pH 5,7	4 mM
Mannitol	500 mM
KCl	20 mM

PP-Transfektionsansatz	
LUC-Reporter (1 µg/µl) pRD29B pRD29A p8xABRE	5 µl
GUS-Standard (1 µg/µl) p35S/S+1	3 µl
Effektor-DNA (1 µg/µl)	0 – 10 µl
0,8 M Mannitol	15 µl
H ₂ O	Auffüllen auf 30 µl

ABA-Behandlung:

Wurde in dem Experiment der Einfluss von ABA auf die Reporter-Induktion ermittelt, wurden 110 µl transfizierte Protoplasten in der Mikrotiter-Platte auf 10 µl vorgelegtes WIMK pipettiert (0 µM ABA Kontrolle) und 110 µl auf 10 µl vorgelegtes WIMK mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen. Die Gesamt-Konzentration in diesem Ansatz entsprach je nach Aufbau des Experiments zwischen 0,1 µM und 30 µM ABA.

Kälte-Behandlung:

Wurde in dem Experiment der Einfluss von Kälte auf die Reporter-Induktion ermittelt, wurden je 110 µl transfizierte Protoplasten auf unterschiedliche Mikrotiter-Platten gegeben und nach 4 h Inkubation bei 25 °C im Licht auf unterschiedliche Temperaturen aufgeteilt: die Kontrollplatte verblieb im 25 °C

Material und Methoden

Inkubator, die restlichen Platten wurden je nach gewünschter Temperatur bei 4 °C, 8 °C oder 12 °C inkubiert. Die Gesamt-Inkubationsdauer betrug dabei stets zwischen 16 und 20 h.

Messung der Reporter-Aktivität:

Nach Ablauf der Inkubation wurden je 50 µl in schwarze (96-Well, PS, *flat-bottom*, schwarz, Greiner) und weisse (96-Well, PS, *flat-Bottom*, weis, *non-binding*, Greiner) Mikrotiterplatten überführt und gemessen. In den schwarzen Platten wurde nach Zugabe von 100 µl GUS-Substrat die GUS-Aktivität über den Umsatz des hier vorhandenen 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) kinetisch bei 37 °C bestimmt. Auf diesen Wert wurde bei der Auswertung der Luciferase-Wert normalisiert. Die Luciferase-Messung erfolgte in den weissen Mikrotiter-Platten im Platten-Luminometer durch Zugabe von je 100 µl LUC-Substrat im Anschluss an eine Hintergrundmessung (je 5 s). Die Diagramme zeigen je den Unterschied des Mittelwertes dreier separater Transfektionen zu einer LV-Probe mit niedrigster Konzentration und die entsprechende Standard-Abweichung.

GUS-Substrat	
Phosphat-Puffer pH 7,0	50 mM
EDTA	10 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,1 %
4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG)	0,5 mM

Luciferase-Substrat	
Tricin/NaOH pH 7,8	20 mM
MgSO ₄	2,7 mM
EDTA	0,5 mM
DTT	33,3 mM
ATP	0,53 mM
Magnesiumcarbonat	520 mg/l
Coenzym A	200 mg/l
D-Luciferin	150 mg/l
Triton X-100	0,1 %

2.8.4 Interaktionsstudien in Protoplasten (*split*-Luciferase Assay)

Um die Interaktion von Proteinen in Pflanzen-Zellen quantitativ bestimmen zu können, wurde *ein split Firefly Luciferase* Komplementations-Assay verwendet (Li et al., 2011). Um diesen in dieser Arbeit anwenden zu können, wurden die beiden Hälften des Luciferase-Gens als C-terminale *golden-gate* Fragmente kloniert und an die auf Interaktion zu testenden Gene fusioniert. Anschließend wurden die Konstrukte in Protoplasten transfiziert. Interagieren zwei Proteine miteinander, wird das funktionale Luciferase-Protein wiederhergestellt. Dies kann anhand des nun erfolgenden Luciferase-Signals quantifiziert werden. Da die höchste Luciferase-Intensität bei der Interaktion zwischen den unfusionierten Luciferase-Teilen erfolgt und zusätzliche Komponenten die Interaktion abschwächen, wurde neben der Normalisierung auf den p35S/S+1:GUS-Standard zusätzlich auf die Interaktion einer der Komponenten (fusioniert mit Luciferase-Teil A) mit dem LV (fusioniert mit Luciferase-Teil B) normalisiert. Der Unterschied zwischen zwei auf Interaktion zu untersuchenden Proteinen und einem dieser mit der entsprechenden Referenz, innerhalb drei separater Transfektionen, wird in den Diagrammen zusammen mit der Standardabweichung angegeben.

Material und Methoden

2.9 Arbeiten mit Pflanzen

2.9.1 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Transgene *Arabidopsis*-Linien wurden mittels der *floral dip* Methode (Clough and Bent, 1998) hergestellt. Dafür wurden etwa 3-Wochen alte Pflanzen, die kurz vor der Blütenbildung standen, verwendet. Mit *Golden-Gate*-Plasmiden transformierte *A. tumefaciens* wurden in 3 ml selektivem dYT-Medium herangezogen. Mit der Vorkultur wurden am nächsten Tag 200 ml eines selektiven dYT-Flüssigmediums angeimpft und diese über Nacht schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Die Kultur wurde bei 4000 g für 15 min abzentrifugiert und das Pellet in 300 ml Infiltrationsmedium aufgenommen.

Arabidopsis-Infiltrationsmedium	
Saccharose	70 g/l
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	0,5 g/l
Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA)	500 µl/l
pH 5,8	

Die Infloreszenzen der zu transformierenden Pflanzen wurden für 1 bis 10 min in die Bakteriensuspension getaucht. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurde der Vorgang nach 5 Tagen wiederholt. Nach Abreifung der Samen in Phytokammern oder im Gewächshaus wurden die Samen geerntet und anschließend auf positive Transformanten gescreent.

Basta-Screen

Um auf die Basta-Resistenz der positiven Transformanten zu screenen, wurden Samen auf Erde ausgebracht und mit BASTA (BayerCropScience AG; 200 mg/l Glufosinat-Ammonium Endkonzentration) begossen (250 ml/Schale). Dieser Vorgang wurde im Abstand von 2-3 Tagen etwa 3-mal wiederholt. Pflanzen die trotz dieser Behandlung wuchsen, wurden in neue Töpfe mit Erde umgesetzt und bis zur Abreifung der Samen angezogen.

pFAST-Screen

Zusätzlich zu der Basta-Resistenz verfügten die hier generierten transgenen Linien über das pFAST-Element (*fluorescence associated seed technology*). In diesem ist RFP an das Oleosin1 (OLE1)-Protein fusioniert (Shimada et al., 2010). Das OLE1-Protein wird, bedingt durch den entsprechenden endogenen Promotor, nur in der Samenschale exprimiert. Transgene Samen konnten daher ebenfalls über die RFP-Fluoreszenz transgener Samen selektiert werden. Die Fluoreszenz wurde durch Analyse mit einem Fluoreszenz-Mikroskop identifiziert und die entsprechenden Samen mittels einer Pinzette entnommen.

2.9.2 Anzuchtbedingungen

Die Pflanzen wurden unter Landtagbedingungen von 16 h Licht (180 μ E, 22 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit) und 8 h Dunkelheit (17 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit) in feingesiebter Einheitserde (Typ 7) auf Perlit-Schicht in Phytokammern (Nema oder Conviron, Kanada) oder im Gewächshaus angezogen. Auf Agar-Platten erfolgte die Anzucht bei Dauerlicht (60 μ E, 22 °C).

2.9.3 Samensterilisation

Die Arabidopsis-Samen wurden für 20 min in 80 % Ethanol mit 0,1 % Triton X-100 sterilisiert und anschließend in 3 % Natriumhypochlorit geschüttelt. Anschließend wurden die Samen 5-mal mit H₂O gewaschen und 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
Agar	9 g/l

MS-Makrosalze	
KNO ₃	19 g/l
CaCl ₂	3,32 g/l
KH ₂ PO ₄	1,7 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,7 g/l
NH ₄ NO ₃	16,5 g/l

MS-Mikrosalze	
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g/l
Na ₂ EDTA	14,6 g/l
H ₃ BO ₃	1,2 g/l
KI	0,3 g/l
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	4 g/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g/l
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,8 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	11,2 g/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,01 g/l

2.9.4 Keimungsversuche

Um den Einfluss von abiotischem Stress und ABA auf das Keimungsverhalten transgener Linien zu ermitteln, wurden die entsprechenden Samen auf ½-MS-Platten mit unterschiedlicher Konzentration an NaCl, Sorbit und ABA ausgebracht. Die Samen wurden für 2 Tage stratifiziert und die Keimungsrate nach 1 – 5 Tagen im Dauerlicht bestimmt. Die Versuche wurden jeweils 3 mal mit je 50 Samen durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Keimungsrate wurden in ein Diagramm eingetragen. Für die Experimente in Abwesenheit von Stickstoff wurde jeweils die Nitrat-, bzw Ammonium-Komponente des ½-MS-Mediums reduziert oder diese komplett weggelassen. Um einen

Material und Methoden

Effekt bedingt durch Kalium-Mangel auszugleichen, wurde KNO_3 durch KCl ersetzt. Zusätzlich wurde hier auf die Zugabe von Mikrosalzen verzichtet.

2.9.5 Messung des Wurzelwachstum

Um den Einfluss von ABA auf das Wurzelwachstum transgener Linien zu analysieren, wurden 5 – 7 Tage alte, vertikal gekeimte Keimlinge auf $\frac{1}{2}$ -MS-Platten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen umgesetzt und die Position der Wurzelspitze markiert. Nach weiteren 3 Tagen bei Dauerlicht wurden die Platten gescannt und das Wurzel-Wachstum in diesem Zeitraum mittels ImageJ ermittelt.

2.9.6 Messung der Blattoberflächentemperatur

Um Rückschlüsse auf veränderte Stomata-Prozesse in transgenen Linien ziehen zu können, wurden Keimlinge dieser Linien in Töpfe mit Erde überführt und anschließend für 62 Tage, randomisiert in einem Tray angeordnet, in Phytokammern angezogen. Die Oberflächentemperatur wurde mittels einem InfraTec Instrument (IR-TCM 384, InfraTec, Dresden) über das gesamte Tray hin ermittelt, wobei die Blatt-Temperatur einer Linie dem Durchschnitt aller Blätter entspricht (Roeder et al., 2022) (Yang et al., 2016). Zusätzlich wurde die Oberflächentemperatur unter sich ändernden CO_2 -Konzentration (400 ppm – 2000 ppm) und Licht-Intensitäten (0 μE – 150 μE) ermittelt. Die entsprechenden Experimente wurden von Dr. Zhenyu Yang durchgeführt.

2.10 Konfokale Mikroskopie

Um die Lokalisation verschiedener Proteine in Pflanzen zu bewerten, wurden diese C-terminal mit mGFP oder mcherry getaggt und in Protoplasten transfiziert. Unter dem FluoView™ 1000 (FV1000) mit angeschlossenem inversem IX81-Mikroskop von Olympus wurden die Proben analysiert und die Lokalisation des Fluorophor-Signals bestimmt. Dafür wurden die Fluorophore mit Laserlicht verschiedener Wellenlängen angeregt (GFP = 488 nm, mcherry/RFP = 561 nm). Diese emittieren als Reaktion auf diese Anregung Licht in einer anderen, detektierbaren Wellenlänge (GFP = 480 – 520 nm, mcherry/RFP = 570 – 630 nm).

3 Ergebnisse

3.1 Funktionsanalyse von CPK23

Calcium-abhängige Proteinkinasen (CPKs) gehören in Pflanzen zu den 4 Hauptgruppen der Calcium Konverter (Harper et al., 2004). Für diese Funktion verfügen CPKs neben ihrer variablen N-terminalen Domäne (VNTD) und Ser/Thr-Kinase Domäne zusätzlich über eine C-terminale Calmodulin-ähnliche Domäne (CaMLD). Im Ruhezustand sind CPKs durch ein Pseudosubstrat auto-inhibiert. Erst die Bindung von Calcium an die Calmodulin-Domäne führt zu einer aktivierenden Konformationsänderung (Harmon et al., 1994). Varianten ohne C-terminale Calmodulin-Domäne sind entsprechend nicht mehr auf eine Calcium-abhängige Aktivierung angewiesen und konstitutiv aktiv. Diese Modifikation wurde in dieser Arbeit auch für das ohnehin Calcium-unabhängige CPK23 (Liese et al., 2023) gewählt um dessen Funktion unabhängig von zusätzlichen Calcium-Signalen analysieren zu können. Für eine solche Analyse sind Reporter-Assays in Protoplasten ein geeignetes Werkzeug: Die zu untersuchenden Proteine werden zusammen mit einem pRD29B:LUC-Reporter in Arabidopsis transfiziert. Ist der eingebrachte Effektor ein Aktivator des ABA-Signalweges, wird der RD29B-Promotor durch nun aktivierte Elemente der ABA-Signaltransduktion angesteuert und das nachgeschaltete Gen transkribiert. Das entstehende Luciferase-Signal kann quantifiziert und auf eine zusätzlich konstitutiv exprimierte Glucuronidase (p35S:GLUC) normalisiert werden. Der beschriebene Aufbau eines CPKs wird in Abb. 3.1-A gezeigt. Um Lipid-Modifikationen zu verhindern, kann die für Membranbindung und Protein-Interaktion verantwortliche N-terminale Domäne ebenfalls artifiziell modifiziert werden. Mögliche Modifikationen werden in Abbildung 3.1-B schematisch dargestellt.

3.1.1 CPK23 als Regulator der ABA-Antwort

Volllängen CPK23 aus dem Ökotyp Col-0 (CPK23C) mit intakter Calmodulin-Domäne (CPK23C_FL) war nicht in der Lage den ABA-Signalweg in einem Reporter-Assay in Protoplasten zu aktivieren (Abb. 3.1-C). Dasselbe galt jedoch auch für eine konstitutiv aktive CPK23-Variante ohne Calmodulin-Domäne (Abb. 3.1-C). Da in dieser Arbeit hauptsächlich mit derart verkürzten Varianten (vk) gearbeitet wurde, werden diese im Folgenden als „CPK23“ bezeichnet. Voll-Längen Varianten mit Calmodulin-Domäne werden als „CPK23_FL“ bezeichnet. Sowohl CPK23C_FL, als auch das verkürzte CPK23C sind über Fettsäuren mit der Membran assoziiert. Wird der N-Terminus modifiziert, ist es möglich die Lokalisation des CPKs zu verändern. Es ist bekannt, dass Phosphorylierungen die Assoziation mit Membranen abschwächen können (Ito et al., 2017). Auch für CPK23 führt die Mimik einer

Ergebnisse

Phosphorylierung im N-Terminus (S5D) zu einer theoretisch reduzierten Membran-Assoziation, welche sich in einer im Vergleich zum Leervektor (LV) 20-fach gesteigerten Aktivität auf den ABA-Signalweg in Protoplasten-Reporter Assays zeigte (Abb. 3.1-C). Neben Phosphorylierung gibt es noch weitere denkbare Mechanismen und Modifikationen, die Einfluss auf die Lokalisation von CPKs nehmen können. Durch Mutation von Glycin (G) 2 und Cystein (C) 3 zu Alanin (A) wird eine de-myristoylierte und de-palmitoylierte CPK23-Variante nachgeahmt (CPK23C_G2A_C3A). Das Anheften von Aminosäuren (in dieser Arbeit stets 9) vor den N-Terminus (9aa_CPK23C) ahmt die Interaktion mit einem Zielprotein nach. Zusätzlich wird die Myristoylierung verhindert, da nun auf das initiale Methionin kein Glycin mehr folgt. Da die Anheftung der Myristeinsäure über eine Amidbindung erfolgt, muss sich das derart modifizierte Glycin am N-terminalen Ende des Proteins befinden. Ist dies nicht der Fall, unterbleibt die Myristoylierungs-Reaktion durch die Transferase und das Protein wird nicht an die Zellmembran assoziiert. Zusätzlich ist es möglich den N-Terminus artifiziell zu verkürzen, um die Lipid-Modifikationen von G2 und C3 zu verhindern. All diese Mutationen und Modifikationen werden in Abb. 3.1-B gezeigt und hatten eine signifikant gesteigerte Induktion (etwa 20-fache Steigerung im Vergleich zum LV) des ABA-Signalweges in Protoplasten *in-vivo* Reporter-Assays (Abb. 3.1-C), als auch eine Änderung der Lokalisation (Abb. 3.1-D) zur Folge. Die statistische Analyse zwischen zwei Einzelproben erfolgte hierbei stets über die einfaktorielle Varianzanalyse (Bezeichnung in dieser Arbeit: one-way ANOVA) und wurde in Microsoft Excel durchgeführt. Angegeben wird stets der ermittelte P-Wert. Die CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges scheint dabei unabhängig von ABA zu sein, da die exogene Zugabe ansteigender Konzentrationen von ABA im Vergleich zum LV nicht zu einer weiteren Induktion führte und sich die entsprechenden ABA-Titrationskurven signifikant voneinander unterschieden (Abb. 3.1-E). Die statistische Analyse bei Konzentrations- und Titrationskurven, sowie über einen zeitlichen Verlauf, erfolgte in dieser Arbeit stets über die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (Bezeichnung in dieser Arbeit: two-way ANOVA) in Microsoft Excel. Angegeben wird stets der P-Wert der Stichprobe. Während die S5D-, die 9aa- und die G2A_C3A-Modifikationen von CPK23 jeweils dessen Befähigung den ABA-Signalweg zu induzieren in vergleichbarem Umfang erhöhten, war dies bei einer artifiziellen Reduktion des N-Terminus durch Abschneiden nicht der Fall. Hier war die Länge des abgeschnittenen Fragmentes für die Protein-Aktivität ausschlaggebend. Umso größer die Deletionen ausfielen, umso geringer war die folgende Induktion des ABA-Signalweges und sank von einer 20-fachen Induktion (die ersten 19 Aminosäuren deletiert) auf eine 2-fache Induktion ab (mehr als die ersten 58 Aminosäuren deletiert) (Abb. 3.1-F). Im Unterschied zu CPK23 (ohne Calmodulin-Domäne) hatte das Anheften von 9 Aminosäuren an den N-Terminus des Voll-Längen CPK23 (9aa_CPK23C-FL) keinen Effekt auf dessen Aktivität (Abb. 3.1-C). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass für CPK23 zwei getrennte Aktivierungsmechanismen benötigt werden: Eine C-terminale Aktivierung über Calcium-Bindung an die Calmodulin-Domäne und

Ergebnisse

eine zusätzliche N-terminale Aktivierung, um die Membran-Assoziation aufzuheben oder abzuschwächen.

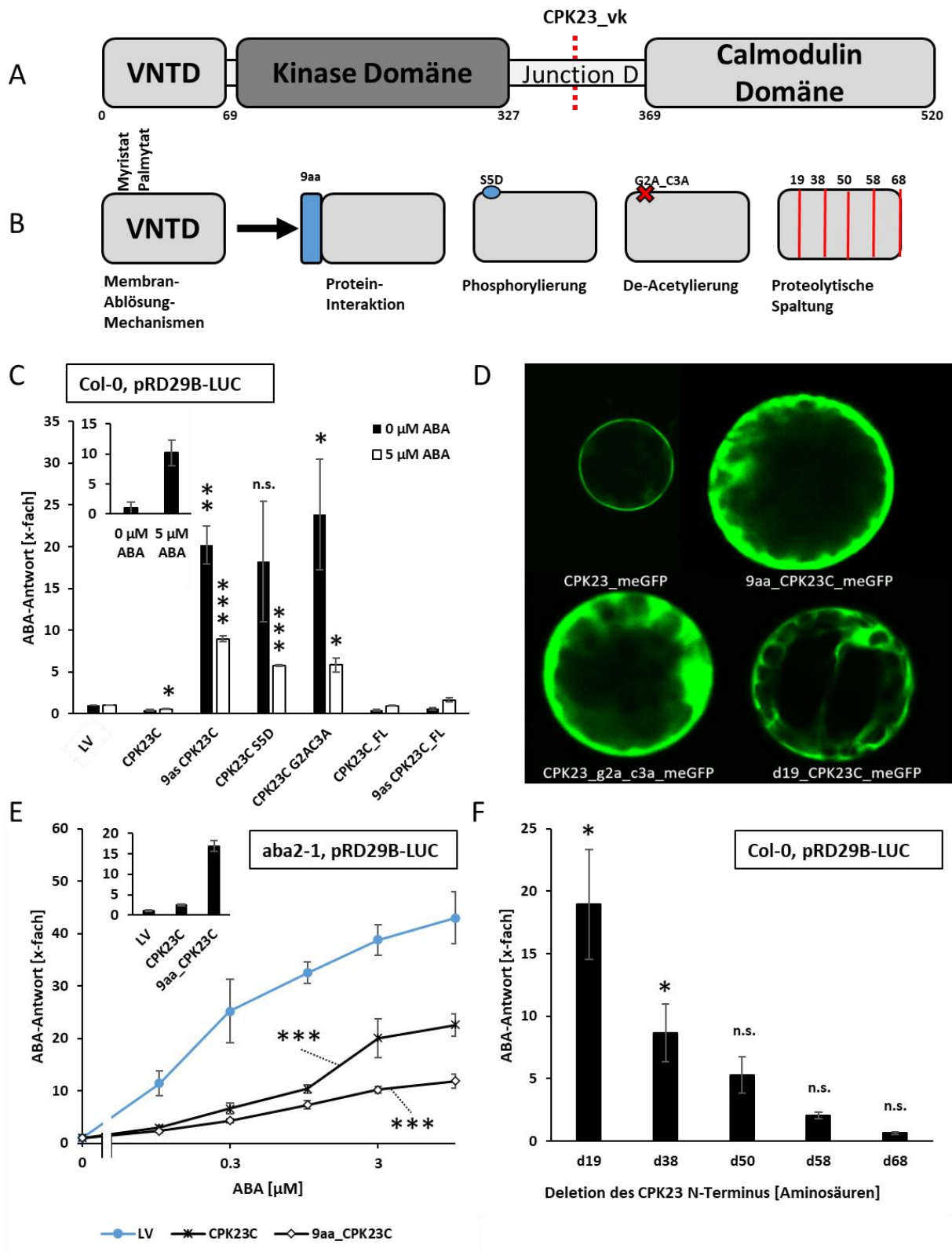


Abb. 3. 1: CPK23 als positiver Regulator des ABA-Signalweges.

Ergebnisse

In (A) ist der schematische Aufbau einer prototypischen CPK dargestellt. Diese besteht aus einer variablen N-terminalen Domäne (VNTD), einer Kinase-Domäne und einer Calmodulin-Domäne. Varianten ohne Calmodulin-Domäne benötigen keine zusätzliche Aktivierung über Calcium und sind konstitutiv aktiv. Für eine Rolle in kernlokalisierten Signaltransduktionswegen muss zusätzlich die Membran-Assoziation aufgehoben werden. (B) Mögliche N-terminale Aktivierungsmechanismen sind hierbei: die Interaktion mit einem Protein (9aa_CPK23C: N-terminale Fusion von Aminosäuren), Phosphorylierungen (CPK23C_S5D: S5D-Phosphomimik), De-Acylierung (CPK23C_G2A_C3A: G2A-C3A Mutation) oder Abspaltung des N-Terminus (CPK23C_d19 – CPK23C_d68: Deletion verschieden großer Abschnitte des N-Terminus). (C/E/F) Um den Effekt verschiedener N-terminaler Modifikationen von CPK23 auf die ABA-Signaltransduktion (pRD29B:LUC-Reporter) zu analysieren, wurden je 3 µg Effektoren unter dem p35S/S+1-Promotor in Col-0 oder *aba2-1* Protoplasten transfiziert. ABA wurde nach der Transfektion in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die nach 16 h ermittelten Luciferase-Werte wurden auf die entsprechenden GUS-Werte normalisiert. Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung auf den Leervektor (LV). Die Diagramme zeigen Mittelwert und Standardabweichung (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zur jeweiligen LV-Kontrolle (C/F) und (two-way ANOVA) im Vergleich mit den Werten der LV-Kontrolle (E). (D) Um die Lokalisation der verschiedenen N-terminal modifizierten CPK23-Varianten zu analysieren, wurden diese an meGFP fusioniert und in Col-0 Protoplasten transfiziert. Die Aufnahmen zeigen das nach 16 h unter einem Fluoreszenz-Mikroskop detektierte meGFP-Signal in Protoplasten.

3.1.2 Physiologische Untersuchung von transgenen Linien

Um zu überprüfen, ob der in Reporter-Assays in Protoplasten ermittelte Einfluss von CPK23 auf den ABA-Signalweg auch *in-planta* beobachtet werden kann, wurden Col-0 Arabidopsis Pflanzen mit CPK23 unter Kontrolle des UBQ10-Promotors (pUBI10) transformiert (Abb. 11-A). Zur Selektion wurde zusätzlich zu einem Basta-Resistenz Gen auch das pFAST Element in die Pflanzen transformiert. In diesem befindet sich ein Fluoreszenz-Marker (RFP) unter Kontrolle eines Samen-spezifischen Promotors des Ölkörperchens (Shimada et al., 2010). Mit Hilfe dieses Selektionsmarkers können transgene Samen anhand ihrer Fluoreszenz erkannt und in homozygot und heterozygot unterschieden werden (Abb. 3.2-A). Obwohl das CPK23-Gen im Col-0 Wildtyp bereits endogen vorliegt, ist dessen Aktivität durch die reprimierende Calmodulin-Domäne stark reguliert und limitiert. Dies wird in den hier generierten Überexpressionslinien durch die Verwendung C-terminal verkürzter CPK23 Varianten verhindert. Da der CPK23-Einfluss auf ABA-Signaltransduktionswege untersucht werden sollte, wurden auch N-terminal modifizierte CPK23-Varianten eingebracht (CPK23_S5D und 9aa_CPK23). Bedingt durch die fehlende Membran-Assoziation konnten diese den ABA-Signalweg bereits in *in-vivo* Reporter Assays effektiv induzieren (Abb. 3.1-C). Für diese Pflanzenlinien wurde der Wachstumsphänotyp ermittelt. Weder eine Kontroll-Linie mit nicht-funktionalem CPK23 (CPK23-TK: inaktiv durch Mutation im aktiven Zentrum), noch eine dCPK5/6/11/23 KO-Linie zeigten dabei einen eindeutigen Wachstums-Phänotyp und entsprachen dem Col-0 WT. Überexpressionslinien mit N-terminal unmodifizierten CPK23 (CPK23C) und N-terminal modifiziertem CPK23 (9aa_CPK23C) zeigten in 62 Tage alten Pflanzen

Ergebnisse

hingegen einen geringeren Wuchs (Abb. 3.2-B). Dieser war in 9aa-CPK23 Überexpressionslinien besonders stark ausgeprägt und ist daher möglicherweise auf die fehlende Membran-Assoziation zurückzuführen. Die in dieser Linie verstärkte Induktion des ABA-Signalweges könnte das Wachstum negativ beeinträchtigen. Zusätzlich wurde die Keimungsrate transgener Linien unter steigenden Konzentrationen an NaCl, Sorbitol und ABA ermittelt. N-terminal modifizierte Linien (CPK23_S5D) zeigten unter diesen Bedingungen eine im Vergleich zu Kontroll-Linien (LV) stark reduzierte Keimungsrate (Abb. 3.2-C/D/E). Bereits bei 30 mM NaCl (Abb. 3.2-C), - 0,4 MPa Sorbitol (Abb. 3.2-D) und 0,1 μ M ABA (Abb. 3.2-E) sank die Keimungsrate in diesen Linien auf unter 50 %. In den Kontroll-Linien trat dieser Effekt erst bei deutlich höheren Konzentrationen auf (Abb. 3.2-C/D/E). Die Experimente mit transgenen CPK23-Überexpressions-Linien zeigen eine Beeinträchtigung von Wuchs und Keimungsprozessen und weisen damit ebenfalls auf eine verstärkte Induktion des ABA-Signalweges hin.

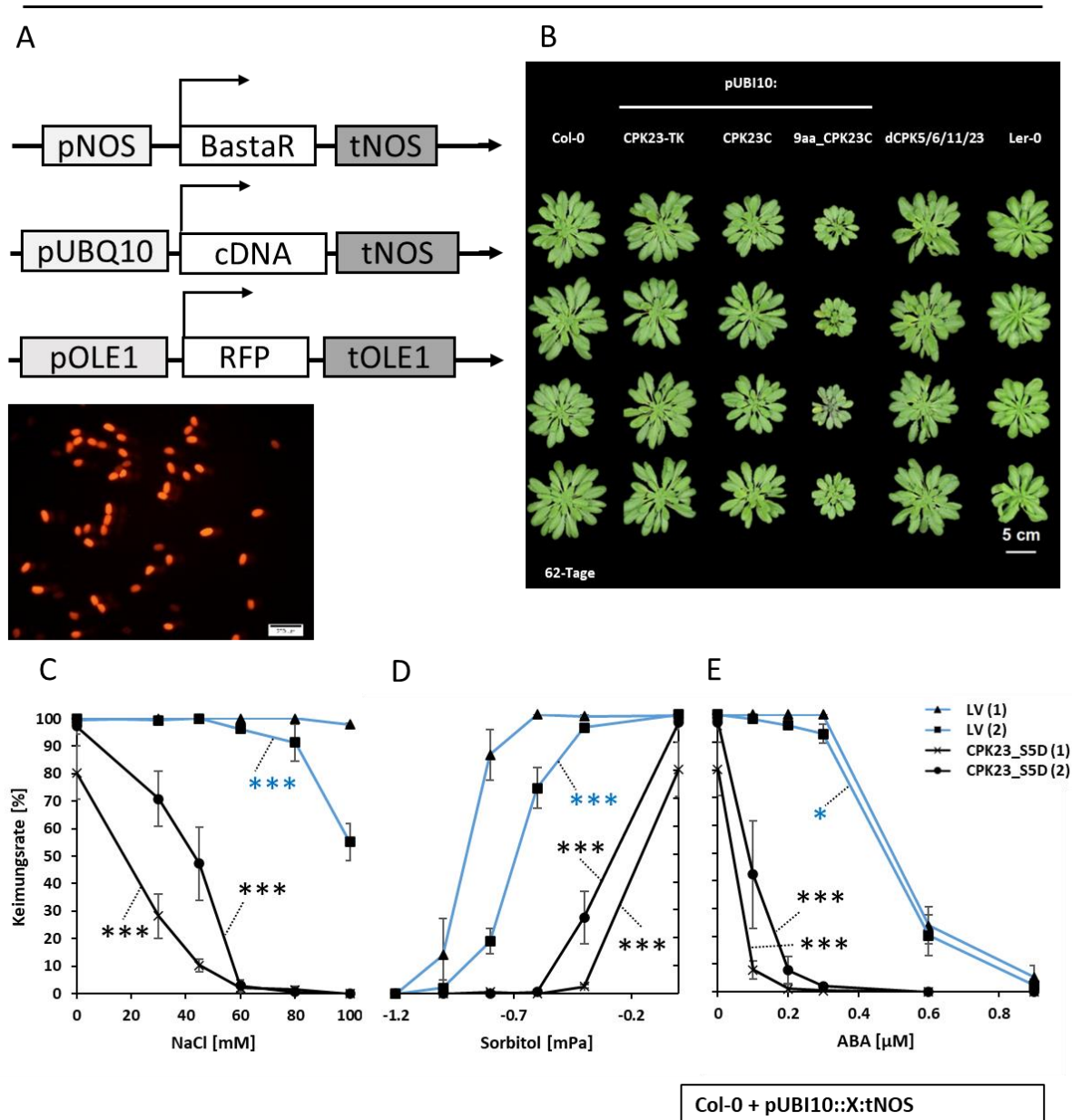


Abb. 3. 2: Phänotypen und Keimungsverhalten von transgenen Linien.

Um den Einfluss von CPK23 in Pflanzen zu analysieren, wurden Überexpressionslinien mit CPK23 unter Kontrolle des UBQ10-Promotors im Col-0 *background* generiert. Diese wurden hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Keimungsrate unter abiotischen Stress-Bedingungen analysiert. (A) Zur Selektion wurden eine Basta-Resistenz, sowie das pFAST-Element integriert. Letzteres ermöglicht die Selektion durch RFP-fluoreszierende Samen, wobei jeder fluoreszierende Samen einem transgenen Samen entspricht. (B) Für die Bestimmung des Wachstums-Phänotyps wurden Samen auf ½ MS-Platten ausgebracht. Nach 2 Wochen wurden die Keimlinge in Töpfe mit Erde umgesetzt und das Gesamtwachstum nach 62-Tagen dokumentiert (n=4). (C/D/E) Um die Keimungsrate transgener Linien unter abiotischem Stress zu ermitteln, wurden je 50 Samen auf ½ MS-Platten mit ansteigenden Konzentrationen von Salz (C), Sorbitol (D) und ABA (E) ausgebracht. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten unter Dauerlicht platziert. Nach 5 Tagen im Licht wurde die Keimungsrate ermittelt. Die Diagramme zeigen den Mittelwert von 3 Experimenten mit je 50 Samen und die Standardabweichung (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich zur Kontroll-Linie LV (1).

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob in CPK23-Überexpressionslinien neben Keimung und Wuchs noch weitere Prozesse beeinträchtigt sind, wurde die Blatttemperatur transgener Linien unter alternierenden CO₂-Konzentrationen und Licht-Intensitäten ermittelt. Die Messung der Blatt-Temperatur ist dabei ein guter Indikator, um den Grad der Stomata-Öffnung zu beurteilen. Die Stomata-Regulation beeinflusst die Transpiration und damit die Temperatur der Blätter. Je weiter die Stomata geöffnet sind, desto mehr Wasser verdunstet und desto kälter wird die Blattoberfläche. Die Überexpression von CPK23 hatte dabei deutliche Effekte auf die Blatttemperatur. Während sich eine Kontroll-Linie mit Mutation im aktiven Zentrum der Kinase-Domäne (CPK23_TK) nicht vom Col-0 WT unterschied (Abb. 3.3-A/D), war die Blatt-Temperatur von CPK23-überexprimierenden Pflanzen (CPK23, 9aa_CPK23) stets um etwa 0,5 °C erhöht (Abb. 3.3-B/C/E/F). Auch der Licht- und CO₂-abhängige Stomataschluss war in diesen Linien beeinträchtigt. Beide transgenen Linien öffneten ihre Stomata unter sinkenden CO₂-Konzentrationen verzögert. Wurde die CO₂-Konzentration von 2000 ppm (Teile pro Millionen) auf 400 ppm reduziert, benötigten beide Linien die doppelte Zeit, bis die Blatt-Temperatur absank. Auch das Eintreten der maximal-niedrigsten Temperatur erfolgte hier verzögert (Abb. 3.3-B/C). Die lichtabhängige Regulation der Stomata war hier ebenfalls gestört. Wurde die Lichtintensität von 0 μE/(m²+s) (Einstein) auf 150 μE/(m²+s) erhöht, sank die Blatt-Temperatur im Vergleich zum Col-0 WT nur schwach ab (Abb. 3.3-E/F). Der Unterschied zwischen der membran-assoziierten CPK23 Variante und der N-terminal modifizierten, war in diesen Experimenten nur marginal. Insgesamt zeigt das Experiment einen deutlichen Einfluss von CPK23 auf die Blatt-Temperatur. Da diese im Vergleich zu einer Kontroll-Pflanze erhöht ist, haben die entsprechenden transgenen Linien möglicherweise Schwierigkeiten ihre Stomata zu schließen.

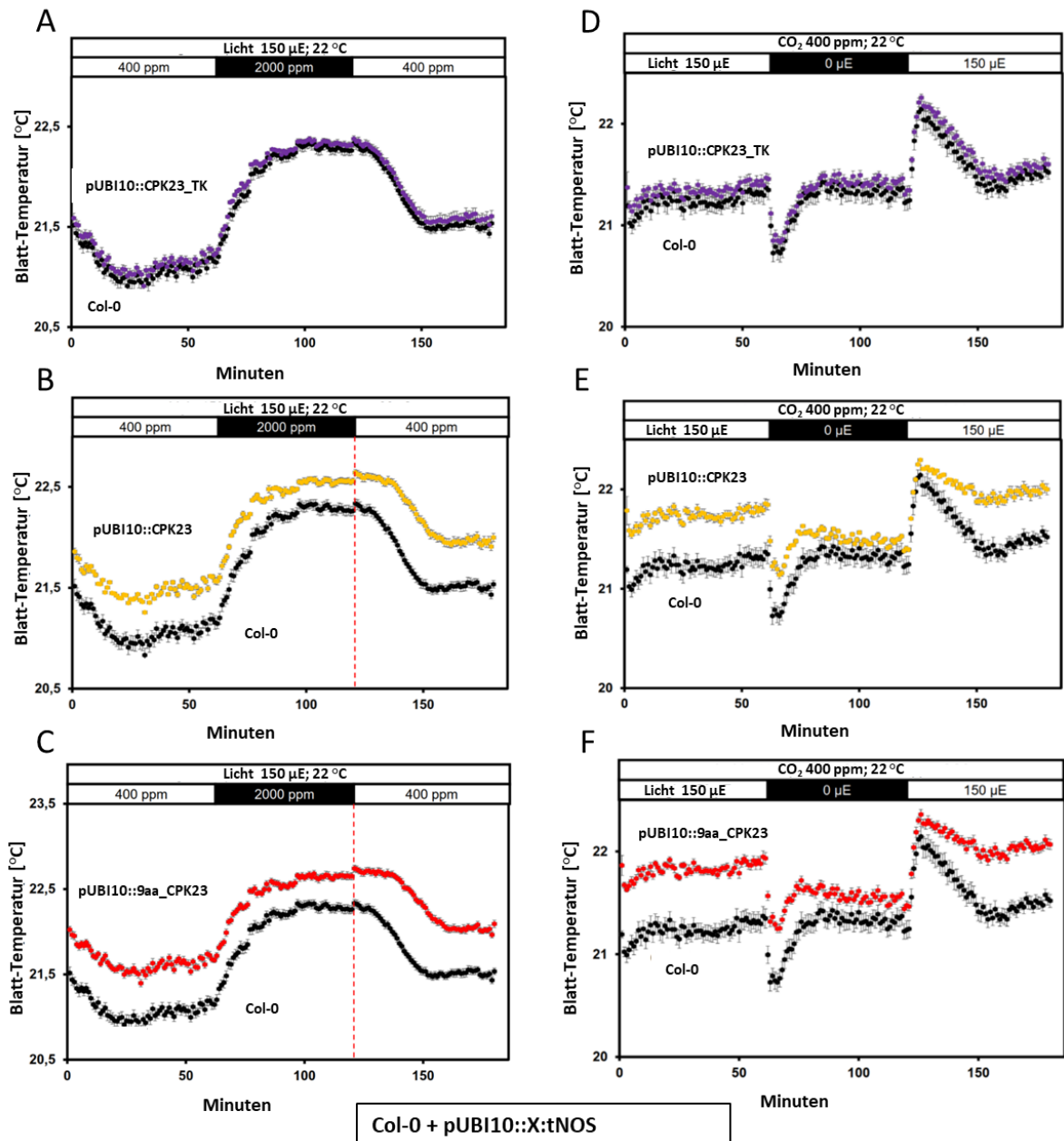


Abb. 3. 3: Blatt-Oberflächentemperatur von transgenen Linien.

Die Blatt-Temperatur der drei CPK23 Überexpressionslinien CPK23_TK (A/D), CPK23 (B/E) und 9aa_CPK23 (C/F) wurden ermittelt und im Vergleich mit Col-0 in den Diagrammen aufgetragen. Zusätzlich wurden unterschiedliche CO₂-Bedingungen (alternierend zwischen 400 ppm und 2000 ppm, (A/B und C)), sowie verschiedene Lichtintensitäten (alternierend zwischen 150 μE/(m²+s) und 0 μE/(m²+s), (D/E und F)) angelegt. Für das Experiment wurden Pflanzen 62-Tage lang in Töpfen mit Erde angezogen. Anschließend wurde die Blatt-Temperatur von je 4 randomisiert angeordneten Pflanzen zu verschiedenen Messpunkten (0 - 200 min) analysiert (n=4).

Ergebnisse

Nitrat hat in Pflanzen eine Doppelfunktion und ist sowohl Nährstoff als auch Signal-Molekül. In Arabidopsis ist es in niedrigen Konzentrationen ein wichtiger Induktor der Keimung. Es dient als direktes Signal in Keimungsprozessen und schwächt zusätzlich die Primär-Dormanz der Samen. Eine Aktivierung des Nitrat-Signalweges induziert die Expression von ABA-Katabolismus-Genen. Als Reaktion auf diesen Vorgang wird der ABA-Signalweg abgeschwächt und ein Keimen der Pflanze ermöglicht (Duermeyer et al., 2018). Da folglich der ABA-Signalweg ebenfalls Bestandteil Nitrat-abhängiger Keimungsprozesse ist, wurde auch hier eine mögliche Involvierung von CPK23 überprüft. Das häufig verwendete $\frac{1}{2}$ MS-Medium hat folgende Nitrat-Konzentrationen: 10 mM NH_4NO_3 , 10 mM KNO_3 . Daher wurde die Keimungsrate verschiedener transgener Linien auf Medien mit reduzierter Ammonium- und Nitrat-Konzentration, sowie auf Medien ohne Stickstoffquellen ermittelt (Abb. 3.4-A/B/C). Anders als für einen positiven Regulator des ABA-Signalweges zu erwarten, stieg die Keimungsrate in den transgenen CPK23-Überexprimierenden Linien unter Stickstoff-Mangelbedingungen jedoch an. Auf Medien ohne Stickstoff-Quelle konnte im Vergleich zu einem Standard $\frac{1}{2}$ -MS-Medium eine verdoppelte Keimungsrate für 9aa_CP23 Linien ermittelt werden (Abb. 3.4-B/C). Eine dCPK5/6/11/23 Linie zeigte den gegenteiligen Effekt und war unter diesen Bedingungen in der Keimungsrate reduziert, wohingegen eine dCPK3/4/6/11 Linie ohne *cpk23* hier dem Col-0 WT entsprach (Abb. 3.4-B/C). Diese Befunde waren insbesondere bei kurzen Zeiträumen erkennbar (2-3 Tage). Auch dABF2/3/4 Pflanzen zeigten im Vergleich zum WT keine Beeinträchtigung in der Keimung unter Stickstoff-Mangel (Abb. 3.4-B/C). Um zu analysieren, ob der Effekt auf die Reduktion des Nitrat- oder des Ammonium-Anteiles zurückzuführen ist, wurden Samen von CPK23C_S5D Linien auf Medien mit verschiedenen Konzentrationen an Ammonium (1 mM und 10 mM) und Nitrat (3 mM und 30 mM) ausgebracht (Abb. 3.4-A). Nur eine Reduktion in der Nitrat-, nicht aber der Ammonium-Konzentration, hatte dabei einen CPK23-abhängigen Einfluss auf die Keimungsrate. Die Reduktion der Nitrat-Konzentration um Faktor 10 verdoppelte dabei die Keimungsrate. Eine Reduktion in der Ammonium-Konzentration hatte in diesem Experiment hingegen keinen Einfluss. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass nicht die Abwesenheit von Nitrat einen positiven CPK23-abhängigen Effekt auf die Keimung hat, sondern vielmehr die Anwesenheit von Nitrat in Abhängigkeit von CPK23 die Keimung negativ beeinflusst. Es ist zwar möglich, dass die starke Involvierung von CPK23 in der ABA-Signaltransduktion den positiven Effekt von Nitrat auf die Keimung negiert, trotzdem ist der beobachtete Effekt erstaunlich und nicht eindeutig durch diese Annahme erklärbar. Wahrscheinlicher ist in diesem Fall eine direkte Regulation über Komponenten des Nitrat-Signalweges.

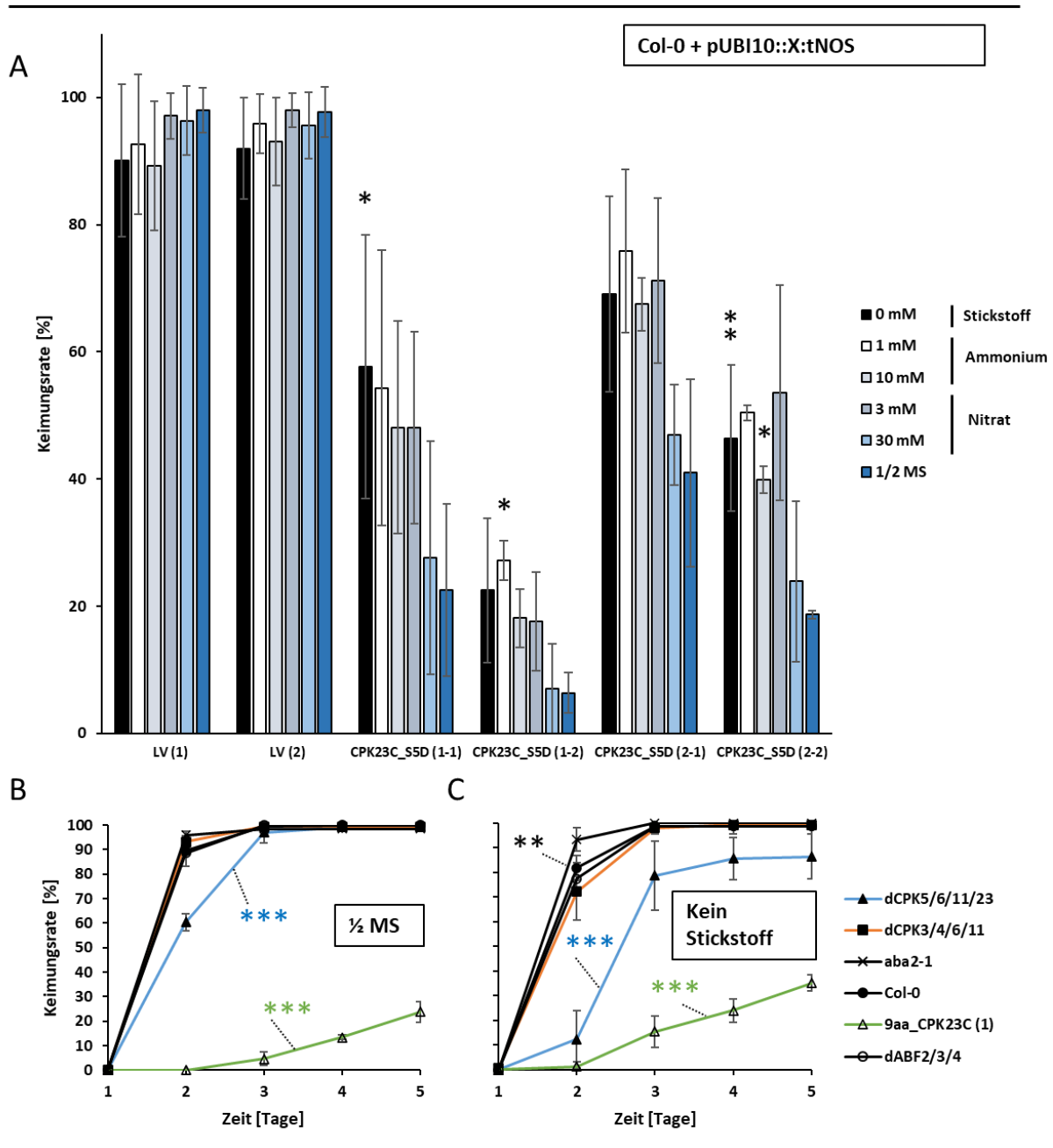


Abb. 3. 4: Keimungsrate von transgenen Linien unter Stickstoffmangel.

Um den Einfluss von Stickstoff auf die Keimungsrate in transgenen Samen zu ermitteln, wurde der Ammonium- und Nitrat-Anteil reduziert oder die Stickstoffkomponente komplett entfernt. (A) Für die Experimente wurden in 2- (CPK23C_S5D (1-2), CPK23C_S5D (2-1) und CPK23C_S5D (2-2)) oder 4- (LV (1), LV (2) und CPK23C_S5D (1-1)) Wiederholungen je 50 Samen pro Messpunkt verschiedener transgener Linien auf 1/2-MS-Platten mit den angegebenen Konzentrationen an Stickstoffverbindungen ausgebracht und nach 3 Tagen die Keimungsraten ermittelt (n=2-4). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zur entsprechenden Keimungsrate auf 1/2-MS-Medium. (B/C) Zusätzlich wurde die Keimungsrate in An- oder Abwesenheit von Stickstoff über einen Zeitraum von 5 Tagen ermittelt. Je 50 Samen der angegebenen Linien wurden auf die entsprechenden 1/2-MS-Platten ausgebracht. Die Diagramme zeigen jeweils die gemittelte Keimungsrate der Samen und deren Standardabweichung (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich zu den Keimungsraten für Col-0.

Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob auch membranständiges CPK23 unter Kontrolle des endogenen CPK23-Promotors einen mit Überexpressionslinien vergleichbaren Effekt hat, wurden dCPK5/6/11/23 - Pflanzen mit entsprechenden Konstrukten transformiert (Abb. 3.5). Wie im vorangegangenen Experiment sank die Keimungsrate der Ausgangslinie (dCPK5/6/11/23) in Abwesenheit einer Stickstoffquelle ab. Der Effekt war jedoch nicht konzentrationsabhängig, sondern trat nur beim kompletten Ausbleiben von Stickstoff auf. Die Keimungsrate reduzierte sich in diesem Fall von 90 % auf 75 %. Ähnliches konnte für den Einzel-*Knockout* *cpk23* beobachtet werden. Hier sank die Keimungsrate von 70 % auf 50 %. Eine dCPK5/6/11/23-rescue Linie (komplementiert mit pCPK23C:CPK23C) zeigte unter diesen Bedingungen hingegen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Keimungsrate von 50 % auf 90 %. Weder Col-0 noch dCPK3/4/6/11 oder Kontroll-Linien (pCPK23C:LV) zeigten Beeinträchtigungen bei sinkenden Nitrat-Konzentrationen. In diesen Linien wurde stets eine Keimungsrate von etwa 100 % erreicht. Durch die Verwendung C-terminal deletierter CPK23-Varianten, können die in Pflanzen ablaufenden Mechanismen in diesem Experiment jedoch nicht komplett abgebildet werden.

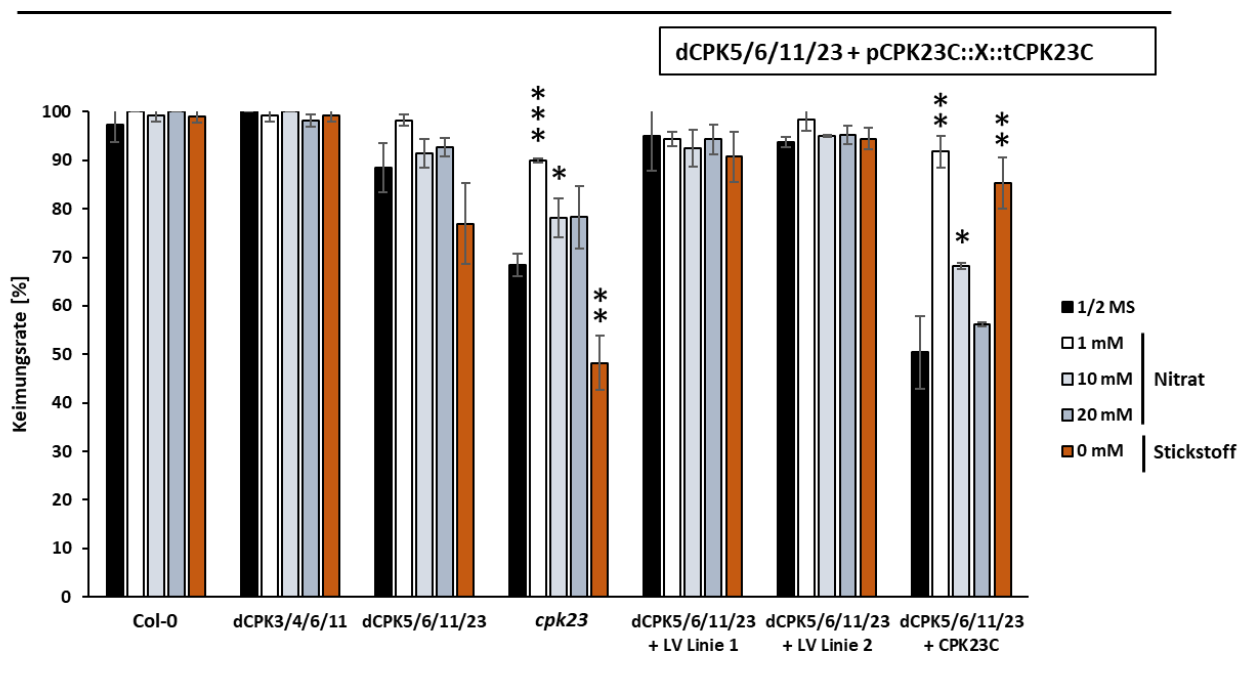


Abb. 3. 5: Keimungsrate von *cpk23*-rescue Linien unter Stickstoffmangel.

Um die Keimungsrate von dCPK5/6/11/23-rescue Linien unter Stickstoffmangel zu ermitteln, wurden je 50 Samen transgener Linien auf ½-MS-Platten mit den angegebenen Nitrat-Konzentrationen ausgebracht. Die Keimungsrate wurde nach 3 Tagen Wachstum in Dauerlicht ermittelt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zur entsprechenden Keimungsrate auf ½-MS-Medium.

3.1.3 Der Einfluss von CPK23 auf den Keimungsregulator ABI5

Ein Schlüssel-Regulator des ABA-abhängigen Keimungsstopps ist der bZIP-Transkriptionsfaktor ABI5. Die Akkumulierung und Aktivität von ABI5 wird durch ABA gesteuert und die Entfernung von ABA führt zu einer schnellen Degradation von ABI5. ABI5-überexprimierende Pflanzen zeigen daher hypersensitives Verhalten bei ABA-Behandlung in Bezug auf Keimung (Lopez-Molina et al., 2001). Da in ABI5-*Knockout*-Pflanzen zusätzlich die Nitrat-Akkumulierung reduziert ist und die Pflanzen besser unter hohen Salz- und Nitrat-Stress wachsen (Le et al., 2023), wurde der Einfluss von CPK23 auf die ABI5-Aktivität untersucht. Wird ABI5 durch CPK23 reguliert, könnte dies den CPK23-abhängigen Einfluss auf das Keimungsverhalten erklären. Überprüft wurde diese These in Reporter-Assays in Protoplasten und Hefezellen. In einem Protoplasten Reporter-Assay wurden dabei steigende Konzentrationen von ABI5 (0 – 10 µg) zu je 3 µg der untersuchten Effektoren titriert. Bei Abwesenheit von exogenem ABA konnte nur 9aa_CPK23C den ABA-Signalweg über ABI5 aktivieren (Abb. 3.6-A). In diesem Fall stieg die Induktionsrate konzentrationsabhängig auf bis zu 40-fach an. Wurde statt 9aa_CPK23C ein LV-Kontrollkonstrukt koexprimiert, konnte ABI5 den Signalweg maximal 10-fach induzieren. Dasselbe traf auf die Koexpression von CPK23C (membrangebunden) und SnRK2.6 zu. Auch in Anwesenheit von exogenem ABA konnte eine vergleichbare 9aa_CPK23C-abhängige Aktivierung von ABI5 beobachtet werden. Unter dieser Bedingung konnte ABI5 auch durch SnRK2.6 reguliert werden (Abb. 3.6-B). Eine entsprechende ABA-Abhängigkeit der SnRK2.6-Funktion wurde bereits in früheren Publikationen gezeigt (Nakashima et al., 2009a). SnRK2s benötigen eine zusätzliche ABA-abhängige Aktivierung. Die hier für CPK23C gewählten Modifikationen machen diese womöglich obsolet. Alternativ ist eine CPK23 Aktivierung nicht direkt von ABA abhängig. Dies würde einen Unterschied in SnRK2- und CPK23-abhängigen Regulationsprozessen von ABI5 darstellen. Auch die Überprüfung dieses Befunds in einem Transaktivierungs-Assay in pSAR-Hefen zeigte ein ähnliches Ergebnis. In diesem Testsystem wird die Induktion eines ABRE-LUC Reporters in Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren des ABA-Signalweges analysiert. Da diese einer vorherigen Aktivierung bedürfen, die entsprechenden Elemente aber nicht endogen in Hefe vorhanden sind, kann direkt eine Effektor-abhängige Regulation der Transkriptionsfaktoren analysiert werden. Nur CPK23 konnte über ABI5 in diesem Experiment die Induktion des Reporters auslösen (25- fache Induktion). SnRK2.6 zeigte hier auch in Anwesenheit von exogenem ABA keine Regulation von ABI5. Dies zeigt, dass SnRK2.6 in diesem Testsystem nicht allein durch ABA reguliert wird, sondern vielmehr durch Komponenten, die selbst ABA reguliert und nicht endogen in Hefezellen vorhanden sind (Abb. 3.6-C). Die Ergebnisse bestätigen, dass der wichtige Keimungsregulator ABI5 durch CPK23 in einer ABA-unabhängigen Weise reguliert wird. Diese ABA-Unabhängigkeit könnte auch den unter Kontrollbedingungen bereits verminderten Wuchs von CPK23-überexprimierende Pflanzenlinien erklären.

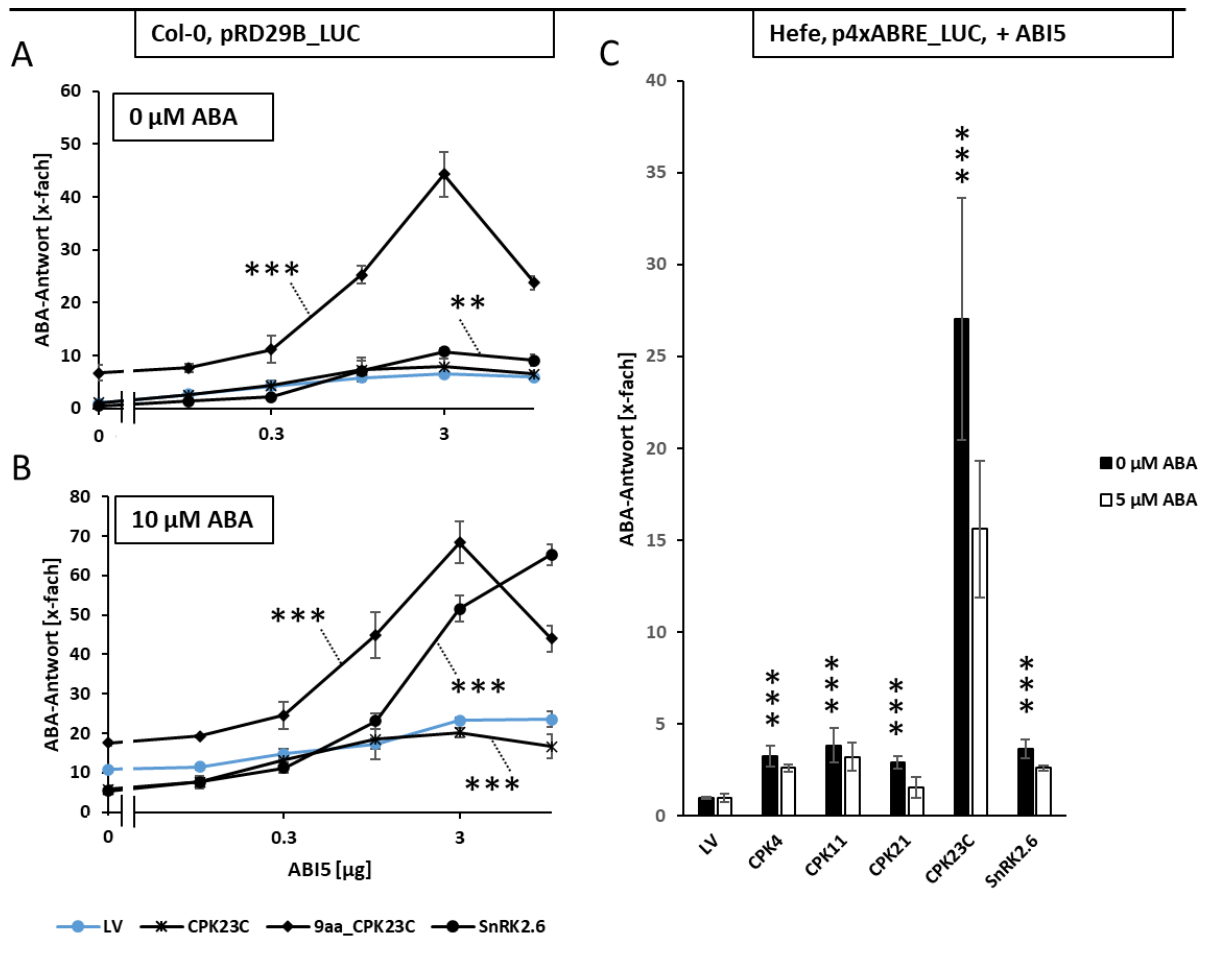


Abb. 3. 6: CPK23-abhängige Regulation des ABI5-Transkriptionsfaktors.

(A/B) Steigende Konzentrationen von ABI5 wurde in Col-0 Protoplasten mit LV, CPK23C, 9aa_CPK23C oder Snrk2.6 unter dem p35S/S+1-Promotor koexprimiert. Das Experiment wurde in Ab (A)- und Anwesenheit (B) von ABA durchgeführt. Nach 16 h wurde die Induktion des pRD29B:LUC-Reporters gemessen. Die ermittelten Luciferase-Werte wurden auf die korrespondierenden Glucuronidase-Werte normalisiert. Der LV-Wert bei einer Konzentration von 0 μg ABI5 wurde als Referenzwert angenommen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich mit den Werten der entsprechenden LV-Kontrolle. (C) Die verschiedenen Effektoren (GAL1-Promotor) wurden gemeinsam mit ABI5 (ADH3-Promotor) in pSAR-Reporterhefen transformiert. Die Effektoren-Expression wurde durch Zugabe von Galactose gestartet und die Induktion des Reporters nach 16 h Inkubation anhand der Luciferase-Aktivität bestimmt. Die ermittelten Werte wurden auf die OD₆₀₀ der Hefezellen normalisiert. Der Leervektor (LV)-Wert wurde als Referenz genommen. Die Diagramme zeigen Mittelwert und Standardabweichung (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) der Proben bei 0 μM ABA im Vergleich zum LV-Wert bei 0 μM ABA. Die Proben bei 5 μM ABA zeigten bis auf CPK21 (n.s.) identische Signifikanz-Level.

3.1.4 Einfluss der Kinase-Domäne verschiedener CPK23-Ökotypen

CPK23 zeigt hinsichtlich der Aminosäuren-Sequenz eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Ökotypen. Ler-0 und Bur-0 Versionen von CPK23 unterscheiden sich nur geringfügig (**N-Terminus**: 3 Aminosäuren, **Kinase-Domäne**: 6 Aminosäuren, **Calmodulin-Domäne**: 1 Aminosäure), während die Sequenz-Homologie zwischen Ler-0 und Col-0 Version gerade einmal 89,6 % beträgt (Czap, 2015) (Anhang 5.2). Zusätzlich zu den hier vorhandenen nicht-synonymen SNPs (unterschiedliche einzelne Nukleotide, die zu einem Aminosäuren Austausch führen), besitzen Ler-0 und Bur-0 Version im Vergleich zu CPK23 aus Col-0 noch eine 8 Aminosäure lange Deletion, sowie eine 9 Aminosäure lange Insertion (Abb. 3.7-A). Um zu überprüfen, ob diese zahlreichen Unterschiede zwischen CPK23C (aus Col-0) auf der einen-, und CPK23B (aus Bur-0) und CPK23L (aus Ler-0) auf der anderen Seite, zu einer unterschiedlichen Regulation des ABA-Signalweges führen, wurden diese in Protoplasten exprimiert und die Induktion des pRD29B:LUC Reporters analysiert (Abb. 3.7-B). Alle drei Varianten wurden dabei je in einer nativen (CPK23B/C/L) und einer N-terminal modifizierten Version (9aa_CPK23B/C/L) getestet. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Fällen nur membran-ungebundenes CPK23 den ABA-Signalweg aktivieren konnte (9aa_CPK23B: 10-fach, 9aa_CPK23C: 25-fach). Dies erfolgte in einer konzentrations-abhängigen Weise und war unabhängig von einer exogenen ABA-Zugabe (Abb. 3.7-B/C). Erstaunlicherweise waren nur die sehr unterschiedlichen Varianten CPK23B und CPK23C aktiv. CPK23L zeigte trotz großer Sequenzhomologie zum aktiven CPK23B keine Induktion des ABA-Signalweges. (Abb. 3.7-B/C). Auch in pSAR-Reporterhefen konnten Varianten aus Bur-0 und Col-0 den ABA-Reporter in Gegenwart von ABF2 deutlich stärker induzieren als CPK23L. Im Gegensatz zu Experimenten in Protoplasten, zeigten hier bereits auch Membran-gebundene native Varianten eine Aktivierung des ABA-Signalweges, jedoch deutlich schwächer als modifizierte Varianten (Abb. 3.7-D). CPK23B und CPK23C induzierten hier den ABA-Signalweg 50-fach, während Varianten mit einer S5D Mutation diesen um Faktor 300 induzierten. CPK23L konnte in diesem Hefe-Assay den Reporter über ABF2 ebenfalls induzieren, jedoch in deutlich geringerem Umfang als die aktiveren Varianten. CPK23L induzierte den ABA-Signalweg dabei um Faktor 10, CPK23L_S5D sogar um Faktor 100.

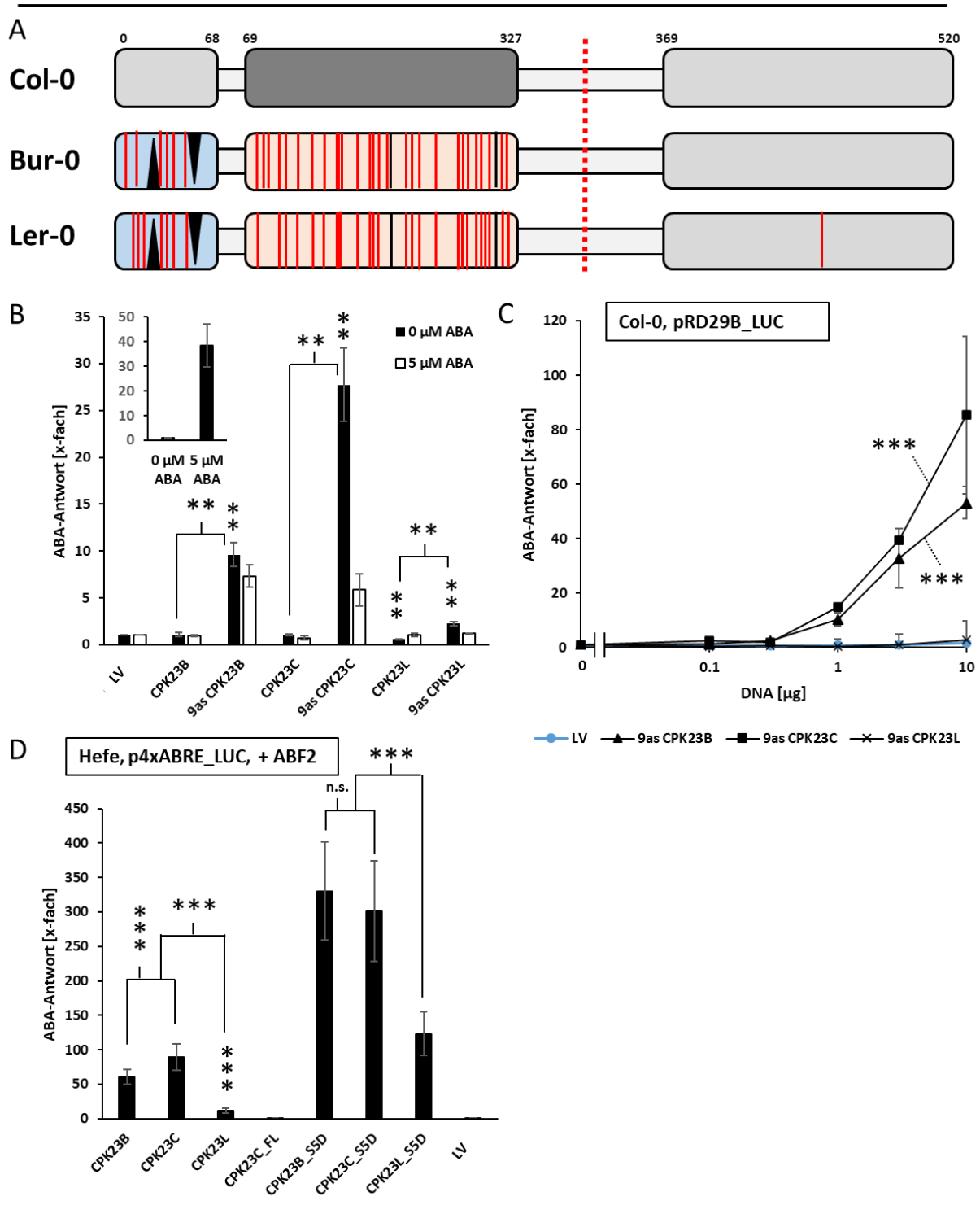


Abb. 3. 7: Einfluss von CPK23 aus verschiedenen Arabidopsis Ökotypen auf den ABA-Signalweg.

Die Proteinsequenzen für CPK23 aus drei verschiedenen Ökotypen werden in (A) schematisch dargestellt. Die entsprechenden Sequenzen befinden sich im Anhang (5.1). CPK23 aus Bur-0 und Ler-0 sind einander sehr ähnlich und unterscheiden sich nur durch einzelne SNPs in N-Terminus (3 SNPs) und Kinase Domäne (6 SNPs) voneinander. Ein Alignment der Proteinsequenz der Aminosäuren wird im Anhang gezeigt (Anhang 5.2). Sie sind sehr distinkt zur Variante aus Col-0 und verfügen im Vergleich zu dieser nur über eine Sequenz-Homologie von etwa 90 %. Neben vielen SNPs in Kinase- und N-terminaler Domäne gibt es im N-Terminus darüber hinaus noch zusätzliche Insertionen und

Ergebnisse

Deletionen. (B/C) Für die Experimente in Protoplasten wurden die Gene für CPK23 aus den drei Ökotypen in Col-0 Protoplasten entweder in An- und Abwesenheit von ABA (B) oder in steigender Konzentration (C) transfiziert. Die Induktion des ABA-Signalweges wurde durch die pRD29B:LUC-Reporter-abhängige Luciferase-Bildung quantifiziert und im Anschluss auf die entsprechende Glucuronidase-Bildung normalisiert. Der LV-Wert (B), beziehungsweise der jeweilige 0 µg DNA-Wert (C), diene als Referenz. In den Diagrammen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen eingetragen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zum LV-Wert ohne ABA und zusätzlich zwischen nativen- und 9aa-Versionen (B), beziehungsweise (two-way ANOVA) im Vergleich zu den Werten der LV-Kontrolle (C). (D) Für das Experiment in pSAR-Reporterhefen wurden die Hefezellen zusätzlich zum bereits vorhandenen ABF2 mit den angegebenen Effektoren transformiert. Die Expression der Effektoren wurde durch Galactosezugabe gestartet. Nach 16 h Inkubation wurde die durch den p4xABRE:LUC-Reporter gebildete Luciferase gemessen und auf die OD₆₀₀ der Hefen normalisiert. Der LV-Wert diene als Referenz. Im Diagramm wurden Mittelwerte und Standardabweichungen eingetragen (n=12). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen LV und CPK23L, zwischen CPK23L und CPK23B/C, sowie zusätzlich zwischen CPK23B und CPK23C.

Da CPK23B und CPK23L trotz großer Homologie zueinander und weniger Unterschiede auf Sequenz-Ebene (Abb. 3.8-A) (Sequenzen und Alignment im Anhang (5.1 und 5.2)), eine stark unterschiedliche Aktivierung des ABA-Signalweges zeigten, wurde dieser Zusammenhang näher analysiert. Um zu überprüfen, ob die Unterschiede durch die Kinase-Domäne oder den N-Terminus verursacht werden, wurden *domain-swaps* generiert (Abb. 3.8-B). Dazu wurde der N-Terminus von CPK23B vor die Kinase-Domäne aus CPK23L kloniert und umgekehrt. Bei Reporter-Assays in Protoplasten und pSAR-Hefezellen konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Domäne und nicht der N-Terminus für den Unterschied verantwortlich ist (Abb. 3.8-C/D): Beinhaltete CPK23B den N-Terminus der CPK23L-Variante, induzierte dieser *domain-swap* den ABA-Signalweg auf Niveau der nativen CPK23B-Variante (7-fache Induktion in Protoplasten (Abb. 3.8-C), 40 – 50-fache Induktion in pSAR-Hefezellen (Abb. 3.8-D)). Der *domain-swap* von CPK23L mit dem N-Terminus aus CPK23B induzierte die verwendeten Reporter hingegen nur auf Niveau des nativen CPK23L (1-fache Induktion in Protoplasten (Abb. 3.8-C), 10-fache Induktion in pSAR-Hefezellen (Abb. 3.8-D)). Zusätzlich wurde der nicht-synonyme Nukleotid-Austausch (SNP) an Position 290 analysiert. Dieser ist für die beiden aktiven CPK23-Formen aus Bur-0 und Col-0 identisch (Arginin (R)), unterscheidet sich aber im inaktiven CPK23L (Serin (S)) (Abb. 3.8-A). Zusätzlich befindet sich die entsprechende Aminosäure an exponierter Stelle distal des aktiven Zentrums und stellt damit möglicherweise ein Andock-Motiv dar (Czap, 2015). Da eine kooperative Wirkung zwischen N-Terminus und der Aminosäure an Position 290 möglich ist, wurde der SNP ebenfalls in die *domain-swap* Varianten integriert. Das Einbringen von S290 in CPK23B und den *domain-swap* mit der Bur-0 Kinase führte in Protoplasten Reporter-Assays zu einem starken Rückgang in der Signal-Induktion auf annähernd CPK23L Niveau (Induktion nahm von 7-fach auf 3-fach ab) (Abb. 3.8-C)). In pSAR-Reporter-Hefen konnte dies hingegen nur für den *domain-swap* (Induktion nahm von

Ergebnisse

50-fach auf 20-fach ab) (Abb. 3.8-D), nicht jedoch für das native CPK23B beobachtet werden (Abb. 3.8-D). Das umgekehrte Einbringen von R290 in CPK23L und den *domain-swap* mit der Kinase aus Ler-0 hatte in Protoplasten Reporter-Assays wiederum nur einen leicht positiven Einfluss (Abb. 3.8-C). In Hefe-Reporter-Assays war für die beiden Versionen hingegen eine deutliche Steigerung der Signal-Induktion zu beobachten. Diese stieg im Vergleich zur nativen CPK23L-Variante um das 2-3-fache an (Abb. 3.8-D). Auch in CPK23C führte eine R290S Mutation in Protoplasten-Reporter-Assays zu einer im Vergleich mit der nativen CPK23C-Variante 2-3-fach reduzierten Aktivität (Abb. 3.8-C). Die gezeigten Daten deuten darauf hin, dass Arginin an Position 290 die aktiven CPK23-Varianten und Serin an Position 290 die inaktiveren kennzeichnet. Um zu überprüfen, ob das Auftreten dieses SNPs mit bestimmten geographischen Gegebenheiten korreliert, wurde die geographische Verbreitung des SNPs analysiert (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>). Dabei konnte festgestellt werden, dass die aktive R290 Variante hauptsächlich in nördlichen Breiten auftritt, in Mitteleuropa jedoch keine eindeutige Tendenz in Bezug auf die Verbreitung mehr auszumachen war. In Schweden (Durchschnittstemperatur: 4,5 °C – 9 °C), hatten 100 % der analysierten CPK23-Ökotypen (n = 152) ein Arginin an dieser Stelle, während in Italien (Durchschnittstemperatur: 15,1 °C – 18,8 °C) dies nur für 30 % der analysierten Ökotypen der Fall war (n = 20). Länder mit Durchschnittstemperaturen zwischen diesen beiden Ländern, zeigten eine intermediäre Verteilung des SNPs. Ausnahmen bildeten hierbei die Verteilung im kalten Bulgarien (Durchschnittstemperatur: 4,6 °C – 12,9 °C, 23 % haben ein Arginin, n = 13) und im warmen Portugal (Durchschnittstemperatur: 13,9 °C – 18,3 °C, 57 % haben ein Arginin, n = 7). In diesen Fällen stand jedoch nur für einige wenige Ökotypen eine auswertbare Sequenz zur Verfügung und die Relevanz dieser ist somit fraglich. Eine Auflistung der Verteilung befindet sich in Anhang 5.3.1. Die hier dargestellten Temperaturdaten wurden der Internet-Seite <https://www.wetter.de/klima/europa/Land> entnommen. Für eine nähere Analyse der Verteilung wurde Spanien ausgewählt, da hier viele Sequenzen vorlagen (n = 85) und das Land ein diverses Klima aufweist: **Atlantisches Klima** mit sehr mildem Sommer/Winter im Norden, **ozeanisch-kontinentales Klima** mit sehr kaltem Winter und heißem Sommer im Zentrum, **kontinentales Mittelmeerklima** mit heißem Sommer, kaltem Winter und hohen Temperaturschwankungen im Nordosten, **Mittelmeerklima** mit mildem Winter und heißem Sommer an der Ostküste, sowie **Gebirgsklima** mit langem, kaltem Winter in den Pyrenäen (Norden), im Kantabrischen Gebirge (Norden), im Iberischen Gebirge (nördliches Zentrum), im Kastilischen Scheidegebirge (nördliches Zentrum) und in der Betischen Kordillere (Süden) (<https://de.wikipedia.org/wiki/Spanien#Klima>) (García-León, 2015). In den Pyrenäen fand sich hauptsächlich der S290 SNP. Der R290 SNP war vorwiegend im Kantabrischen Gebirge und im Kastilischen Scheidegebirge anzutreffen. Die restliche Verteilung der SNPs in Spanien war mehr oder weniger unspezifisch: der S290 SNP fand sich in der flachen Region um Valladolid in Kastilien (nördliches Zentrum) (Paredes Gómez et al., 2020), der R290 SNP in der Region um Toledo

Ergebnisse

(Zentrum). Zusätzlich wurden die Höhenmeter, an denen die jeweiligen Ökotypen anzutreffen waren, ermittelt (<https://earth.google.com/web/>). Hierbei zeigte sich, dass Ökotypen mit R290-SNP in Höhen bis zu 2609 m anzutreffen waren, Ökotypen mit S290-SNP hingegen nur bis zu einer Höhe von 1869 m. Trotzdem unterschieden sich der Standort der jeweiligen Ökotypen kaum in ihren Mittelwerten (Ökotypen mit R290-SNP: 824 m, Ökotypen mit S290-SNP: 816 m, keine Signifikanz laut T-Test) und nur leicht in ihren Medianen (Ökotypen mit R290-SNP: 867 m, Ökotypen mit S290-SNP: 749 m, keine Signifikanz laut Mood's Median Test). Der hier geschilderte Zusammenhang wird im Anhang (5.3.2) erklärt und in Form eines Boxplottes veranschaulicht. Auch wenn anhand der Höhenmeter keine Aussagen über einen evolutionären Druck auf die Verteilung des Arginin/Serin-SNPs getroffen werden kann, so geben diese Zahlen doch keinen Hinweis auf die mit Höhenmetern assoziierten Durchschnittstemperaturen. Da die jeweiligen Ökotypen über ganz Spanien verteilt sind, ist es möglich, dass trotz geringer Höhenunterschiede, eine unterschiedliche Temperatur an den jeweiligen Standorten vorherrscht. Dies legt zumindest die Verteilung der Ökotypen in Ländern mit extremen Temperaturen (Schweden und Portugal) nahe (Anhang 5.3.1). Auch ist es denkbar, dass nicht allein der SNP an Position 290 entscheidend für die CPK23-Aktivität ist, sondern Kombinationen mit anderen Aminosäure-Resten ebenfalls eine Rolle spielen. Im N-Terminus befinden sich zwei weitere Aminosäuren, die für CPK23L spezifisch sind (Threonin statt Serin an Position 19, Leucin statt Valin an Position 25). Da ein Experiment mit *domain-swaps* jedoch bereits gezeigt hat, dass der N-Terminus keinen Einfluss auf den beobachteten Unterschied zwischen den Ökotypen hat (Abb. 3.8-C/D), ist eine Beteiligung hier lokalisierter SNPs unwahrscheinlich. Auch in der Kinase-Domäne befinden sich zwei weitere für CPK23L spezifische SNPs (Lysin statt Asparagin/Methionin an Position 187, Glutamat statt Glycin/Aspartat an Position 298). Da in diesen Fällen auch in den aktiven Varianten bereits eine Varianz besteht, ist ein bedeutender Einfluss auf die CPK23-Kinasefunktion ebenfalls fraglich. Eine kooperative Wirkung kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Zusammenfassend kann an dieser Stelle geschlussfolgert werden, dass der SNP an Position 290 trotz Einfluss auf die Proteinaktivität von CPK23 nicht eindeutig mit klimatischen Bedingungen in Verbindung gebracht werden kann. Es gibt jedoch zumindest Hinweise auf eine mögliche Involvierung niedriger Temperaturen.

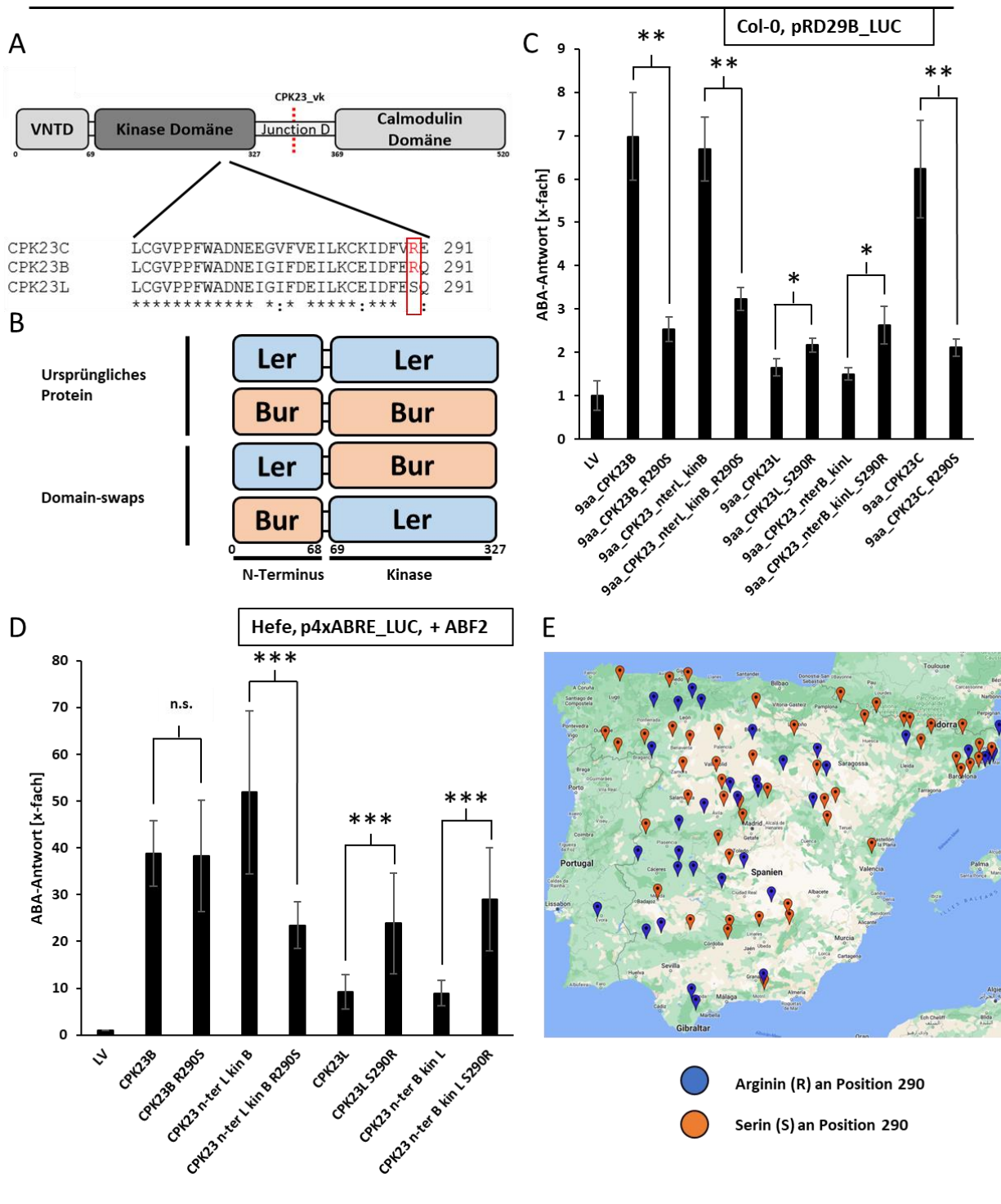


Abb. 3. 8: Einfluss der Aminosäure an Position 290 auf die Aktivität von CPK23.

(A) Zwischen CPK23 aus Bur-0 und Ler-0 gibt es nur wenige nicht-synonyme SNPs die zu einem Aminosäure-Austausch führen. Eine Aminosäure die sich zwischen der aktiven Bur-0 (Arginin (R)) und der inaktiven Ler-0 (Serin (S)) Variante unterscheidet, ist an Position 290 zu finden. Da die Aminosäure hier für Bur-0 und Col-0, also den beiden aktiven CPK23 Ökotypen, identisch ist, wurde analysiert ob diese ein entscheidender Faktor für die unterschiedliche Aktivität von CPK23B und CPK23L darstellt. (B) Kombiniert wurde dies mit einem *domain-swap* zwischen Bur-0 und Ler-0, wobei jeweils der N-Terminus des einen vor die Kinase-Domäne des anderen und umgekehrt gesetzt wurden. (C) Col-0 Protoplasten wurden mit den verschiedenen Varianten von CPK23B und CPK23L, sowie deren *domain-*

Ergebnisse

swaps transfiziert. Anschließend wurde die durch die Aktivierung des pRD29B:LUC-Reporters generierte Luciferase gemessen und auf den entsprechenden Glucuronidase-Wert normalisiert. Der LV diente als Referenzwert. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) zwischen Ausgangsvarianten und Varianten mit zusätzlichem SNP. (D) Im heterologen Hefesystem wurde analog vorgegangen und die entsprechenden Konstrukte unter Kontrolle eines pGAL-Promotors in pSAR-Reporterhefen transformiert. Die Induktion des Reporters durch Effektor-abhängig aktiviertes ABF2 wurde anhand der gebildeten Luciferase-Werte quantifiziert. Die ermittelten Luciferase-Werte wurden auf die OD₆₀₀ der Hefezellen normalisiert. Der LV-Wert diente als Referenz. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=12). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen Ausgangsvarianten und Varianten mit zusätzlichem SNP. (E) Um zu analysieren, wie die lokale Verteilung der Punktmutation in Spanien aussieht, wurden die Aminosäuren an Position 290 für spanische CPK23 Ökotypen ermittelt (<http://signal.salk.edu/~atg1001/3.0/gebrowser.php>). Anschließend wurden die Koordinaten der jeweiligen Mutation in eine Karte eingefügt (blau = R290, rot = S290) (<https://maps.co/gis/>).

3.2 CPK23 in Kältestress-Signalwegen

Von Kälte-Stress (*chilling*-Stress) spricht man bei Pflanzen, wenn Temperaturen zwischen 0 °C und 20 °C erreicht werden. Temperaturen unter 0 °C bezeichnet man als Frost-Stress. Pflanzen nehmen diese Art des Stresses über die Membran wahr. Fluktuationen der Temperatur verändern die Fluidität der Membran, das Cytoskelett wird umorganisiert und es kommt zu einem Calcium-Influx, welcher *downstream* Elemente der Kälte-Signalwege beeinflusst (Sangwan et al., 2001). Es verwundert daher nicht, dass auch CPKs in diese Vorgänge involviert sind und eine Rolle als Ca²⁺- Sensor in Kälte-Stress Antworten spielen (Knight et al., 1996). Auch die Expression von CPK23 wird Kälte-abhängig reguliert, jedoch negativ. Innerhalb von 24 h nach Einsetzen des Kälte-Stresses wird diese um Faktor 10 reduziert (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>). Da zusätzlich auch der mit einer aktiven CPK23-Funktion in Zusammenhang stehende R290 SNP hauptsächlich in kälteren Gebieten angetroffen werden kann, wurde der Einfluss von CPK23 auf den ABA-Signalweg unter Kälte-Bedingungen untersucht

3.2.1 Der Einfluss von Kälte auf Lokalisation und enzymatische Aktivität von CPK23

Unter Kältestress gab es Hinweise auf eine veränderte CPK23-Lokalisation in Col-0 Protoplasten. Während CPK23 unter Normalbedingungen (25 °C) komplett membran-gebunden vorlag, war bei 4 °C eine verringerte Membran-Assoziation zu beobachten. Dieses lag nun sowohl membrangebunden als auch cytosolisch vor (Abb. 3.9-A). Kältestress hat einen direkten Einfluss auf Lipide in der Membran:

Ergebnisse

der Anteil ungesättigter Lipide steigt, die Lipid-Zusammensetzung ändert sich, die Kettenlänge nimmt ab und das Verhältnis zu Proteinen wird angepasst (Takahashi et al., 2013) (Barrero-Sicilia et al., 2017)). Daher ist es möglich, dass eine Kälte-abhängige Ablösung von CPK23 auf diese Änderungen in der Membran-Zusammensetzung zurückzuführen ist. Trotz Hinweisen auf eine mögliche Lokalisations-Änderung konnte keine gesteigerte CPK23-Aktivität beobachtet werden. Unter Kälte reduzierte sich die 9aa_CPK23-Aktivität in Protoplasten *in-vivo* Reporter-Assays um mehr als die Hälfte. Die Induktion des pRD29B:LUC-Reporters sank bei 10 °C von 9-fach auf 2-fach (9aa_CPK23B), beziehungsweise von 6-fach auf 2-fach (9aa_CPK23C) (Abb. 3.9-B)). Auch in Hefe war dies zu beobachten: alle getesteten CPK23-Varianten verloren um Faktor 3-4 an Aktivität. Eine hyperaktive SnRK2.6 Variante zeigte hier hingegen keine Beeinträchtigung (Abb. 3.9-C). Dies lässt darauf schließen, dass die verringerte Aktivität von CPK23 möglicherweise nicht auf eine allgemein schlechtere Induktion des verwendeten Reporters zurückzuführen ist. Der Temperatur Koeffizient (Q_{10}) besagt, dass sich die Reaktionsrate von Enzymen bei einer Änderung der Temperatur von 10 °C um den Faktor 2-3 verändert (Reyes et al., 2008). Tatsächlich sank durch die verringerte Temperatur in Protoplasten (Abb. 3.9-B) in der Kontrollprobe (empty) sowohl der GUS-Wert (Faktor 4), als auch der Luciferase-Wert (Faktor 6). Dies bedeutet, dass die Normalisierung auf den GUS-Wert die Kälte-abhängige Reprimierung der Enzymaktivitäten bereits teilweise ausgleichen kann. Trotzdem ist auch nach Normalisierung auf den GUS-Wert die Gesamt-Induktion des Reporters noch um das 2-fache reduziert. (Abb. 3.9-B). Bei Proben mit CPK23 sank der GUS-Wert in vergleichbarer Höhe ab. Der Luciferase-Wert wurde unter diesen Bedingungen jedoch deutlich negativer beeinflusst (Faktor 12- 16) (Anhang 5.4.1). Auch in Protoplasten zeigte ein weiterer Regulator des ABA-Signalweges (RCAR1) unter Kälte keine erkennbare Beeinträchtigung (Abb. 3.9-B/D/E). Entsprechend war für RCAR1 die Kälte-abhängige Reduktion des Luciferase-Signals im Vergleich zu den Kontrollen bereits weniger stark reprimiert (Faktor 4) (Anhang 5.4.1). Obwohl die beobachtete Ablösung auf eine geschwächte Membran-Assoziation unter Kälte hinweist (Abb. 3.9-A), war auch bei steigender Konzentration an nativen CPK23C keine Aktivitätserhöhung erkennbar (Abb. 3.9-D/E). Um zu testen unter welchen Bedingungen die beobachtete Inhibierung der CPK23-Aktivität eintritt, wurde modifiziertes CPK23 (d38_CPK23B (Abb. 3.9-F) und 9aa_CPK23B (Abb. 3.9-G)) in steigender Konzentration in Protoplasten transfiziert und diese bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. 12 °C reichten hierbei aus, um die CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges deutlich zu reduzieren. Ein weiteres Absenken der Temperatur verstärkte den beobachteten Effekt nicht.

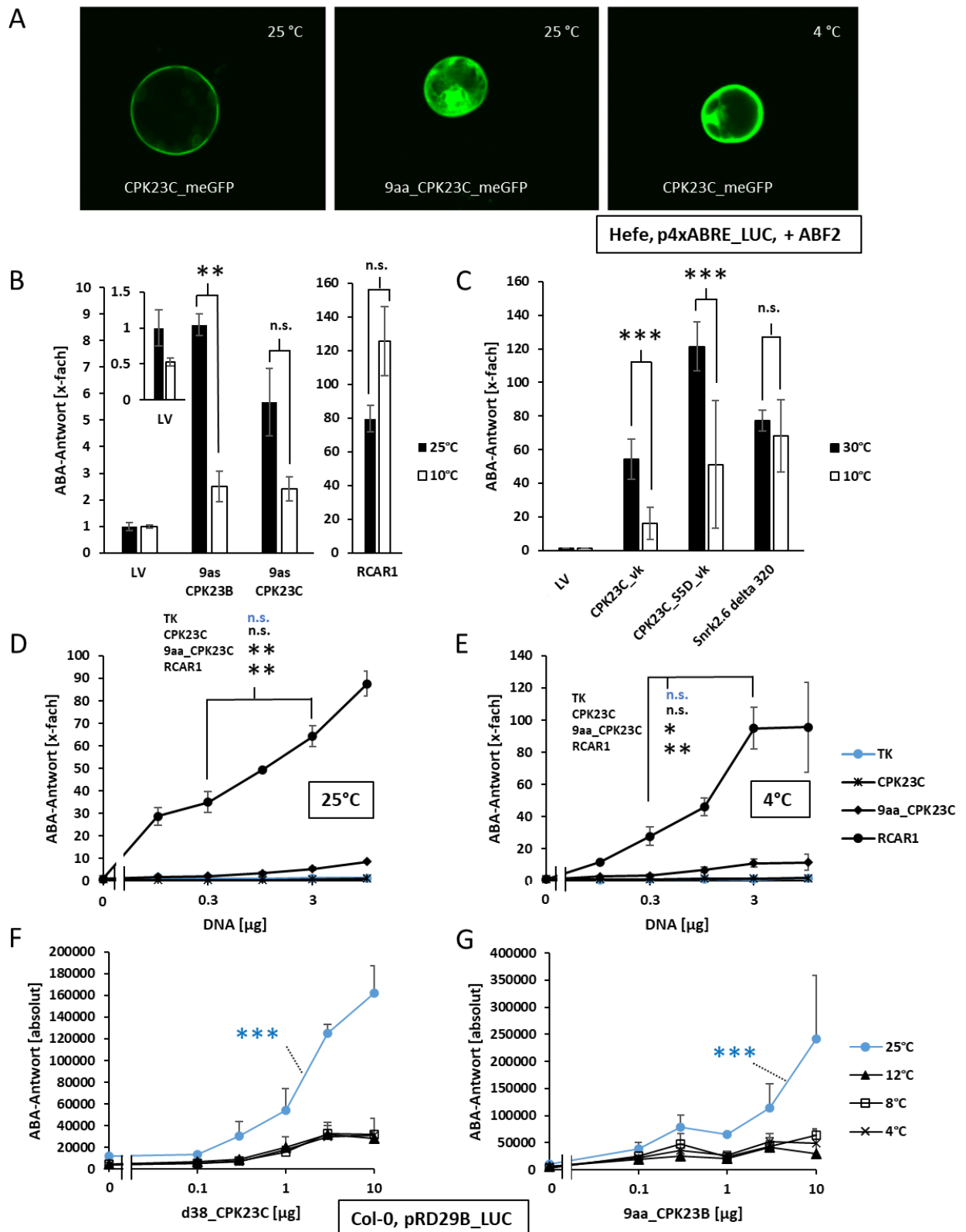


Abb. 3. 9: Einfluss von Kälte auf Lokalisation und Aktivität von CPK23.

(A) Um den Einfluss von Kältestress auf die CPK23-Lokalisation zu untersuchen, wurde CPK23 mit meGFP fusioniert und über den 35S/S+1-Promotor in Protoplasten exprimiert. Im Anschluss wurden die Protoplasten mindestens 4 h bei 25 °C inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte entweder bei 4 °C oder bei 25 °C. Die Proben wurden nach 16 h Gesamtinkubation unter einem Fluoreszenzmikroskop

Ergebnisse

analysiert und die Lokalisation dokumentiert. (B/D/E/F/G) Für pRD29B:LUC-Reporter-Assays in Protoplasten wurden Col-0 Protoplasten mit Effektor-DNA in den angegebenen Konzentrationen transfiziert. Nach 4 h bei 25 °C wurden die 96-well Platten auf die angegebenen Temperaturen aufgeteilt und für mindestens weitere 12 h inkubiert. Die bei der Messung ermittelten Luciferase-Werte wurden auf die entsprechenden Glucuronidase-Werte normalisiert. Der LV-Wert mit niedrigster Konzentration wurde als Referenz verwendet. Da es bei den in F und G gezeigten Experimenten darum ging, den Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Aktivität von CPK23 zu analysieren, wurden hier nur die absoluten LUC/GUS-Werte eingetragen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und deren Standardabweichung (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) zwischen Kontroll- und Kältebehandlung (B), zwischen den Konzentrationen 0,3 µg und 3 µg für verschiedene Effektoren (D/E) und (two-way ANOVA) zwischen Kältebehandelten- und Kontrollproben (F/G). (C) Bei Experimenten in pSAR-Reporterhefen wurden die Hefezellen mit Effektor-DNA (pGAL-Promotor) transformiert. Die Expression wurde durch Zugabe von Galactose gestartet und die Platten nach 4 h bei Normaltemperatur auf 10 °C und Normaltemperatur aufgeteilt. Die Messung erfolgte nach 18h Gesamt-Inkubation. Aktivieren die eingebrachten Effektoren das in den verwendeten pSAR-Hefen bereits vorliegende ABF2, kommt es zu einer Induktion des p4xABRE:LUC Reporters. Die gebildete Luciferase wurde auf die OD₆₀₀ der Hefe-Zellen normalisiert. Als Referenz diente jeweils der LV-Wert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=8). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen Kontroll- und Kältebehandlung.

Um zu überprüfen, ob die unter Kälte verminderte CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalwegs einen allgemeinen Kälte-Effekt darstellt (beispielsweise durch Beeinflussung der Proteinexpression oder des verwendeten pRD29B-LUC-Reporters), wurde zusätzlich die Regulation eines künstlichen Auxin-Reporters analysiert. Bei dem hier verwendeten DR5-Reporter handelt es sich um einen künstlichen Auxin-Reporter, der ein hoch-affines Auxin-*response* Element mit 7-Tandem-Repeats der ARF-Bindestelle (TGTCTC) beinhaltet (Xiao et al., 2020). Dieser Reporter wurde gewählt, da Kälte-Stress zwar Auxin-Transporter beeinflusst, die Auxin Signaltransduktion selbst jedoch kaum (Shibasaki et al., 2009). Die Verwendung des DR5:LUC-Reporters eignet sich daher als zusätzlicher Normalisierungsschritt um eine spezifische Kälte-induzierte CPK23-abhängige Regulation des ABA-Signalweges von einer CPK23-unabhängigen unspezifischen Kältereaktion trennen zu können. Für 9aa_CPK23C konnte unter Normalbedingungen eine konzentrationsabhängige positive Regulierung der ABA-Antwort über die Induktion des pRD29B:LUC-Reporter beobachtet werden. Die Induktion stieg mit steigender Konzentration von 5- auf 25-fach an (Abb. 3.10-A). Bereits ab 12 °C war jedoch ein starker Rückgang zu erkennen. Bei allen gewählten Konzentrationen (1 µg, 3 µg und 10 µg) erfolgte nur noch eine 5-fache Induktion. Die RCAR1-abhängige Regulierung des pRD29B:LUC-Reporters war unter Kälte zwar verringert, jedoch sehr viel schwächer als die CPK23-abhängige. Während bei 10 µg RCAR1 ein Absenken der Temperatur von 25 °C auf 12 °C oder niedriger die Induktionsrate um 25 % drückte, sank die Induktionsrate in Gegenwart von 9aa_CPK23C um 80 %. Zusätzlich blieb unter Kälte die Konzentrations-Abhängigkeit von RCAR1 bestehen (Abb. 3.10-A). Der Auxin-Reporter pDR5:LUC konnte nicht durch die verwendeten Effektoren induziert werden. Durch diesen Umstand kann der

Ergebnisse

allgemeine Kälteeinfluss auf die verwendeten Effektoren untersucht werden. Bei Kälte (12 ° und 4 °C) sank, dem Q_{10} -Effekt entsprechend, die Induktion in allen Proben gleichmäßig um den Faktor 2 – 3 ab (Anhang 5.4.2). Wird nun die Induktion des pRD29B:LUC-Reporters zusätzlich auf die Induktion des pDR5:LUC-Reporters normalisiert, werden unspezifische Kälte-abhängige Beeinflussungen der Effektoren abgemildert. Nach dieser zusätzlichen Normalisierung konnte für RCAR1 unter Kälte eine im Vergleich zu Kontroll-Bedingungen 2-fache Induktion des ABA-Signalweges ermittelt werden (Abb. 3.10-B)). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass hierfür eine RCAR1-abhängige negative Regulation des Auxin-Signalweges verantwortlich ist. Für modifiziertes CPK23 blieb die Kälte-abhängig reduzierte Regulation des ABA-Signalweges jedoch erhalten, auch wenn diese nun leicht abgeschwächt wurde. Zusätzlich konnte die Konzentrations-Abhängigkeit in geringem Umfang wieder hergestellt werden. Unter Kälte konnte nun ebenfalls eine leichte Steigerung in der Regulation des ABA-Signalweges beobachtet werden, wenn die Konzentration von 1 μg 9aa_CPK23 auf 3 μg angehoben wurde. Im Gegensatz zur Normalbedingung gab es jedoch keinen Unterschied bei einem weiteren Konzentrations-Anstieg (Abb. 3.10-B). Dies bedeutet, dass CPK23 auch nach zusätzlicher Normalisierung unter Kälte weiterhin einen direkten negativen Einfluss auf den ABA-Signalweg zu haben scheint.

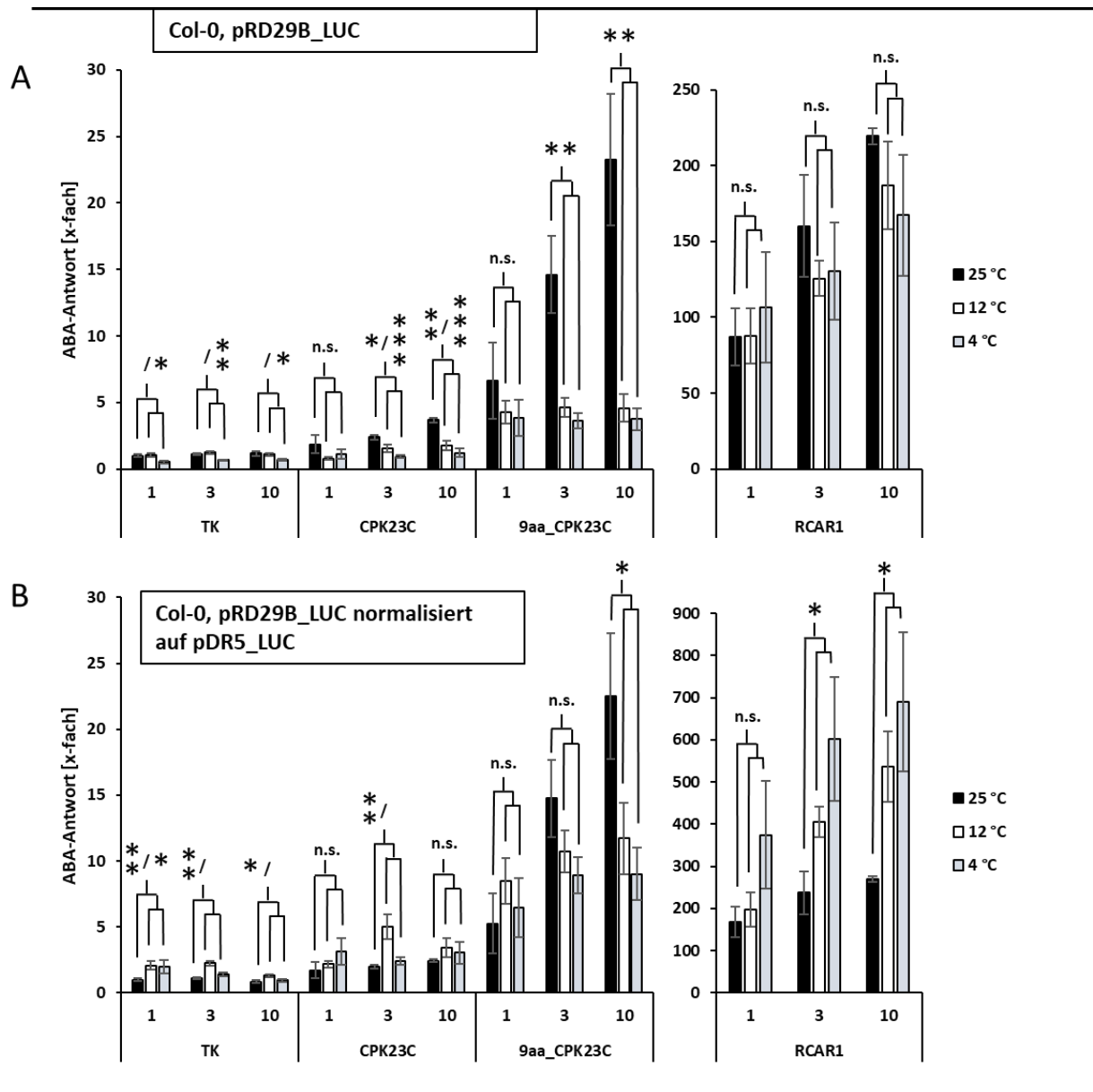


Abb. 3. 10: Einfluss von Kälte auf die CPK23-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Reporter.

Um zu überprüfen, ob die unter Kälte verringerte CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges ein genereller Kälte-Effekt ist, der beispielsweise auf verringerte Protein-Expression zurückzuführen ist, wurde zusätzlich zum ABA-abhängigen pRD29B:LUC-Reporter ein Auxin-Reporter verwendet (pDR5:LUC), welcher nicht durch Regulatoren des ABA-Signalweges beeinflusst werden kann. (A/B) Col-0 Protoplasten wurden, neben Effektoren in der angegebenen Konzentration, mit zwei verschiedenen Reportern (pRD29B:LUC und pDR5:LUC) transfiziert. (A) Die durch den pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase wurde auf die entsprechenden Glucuronidase-Werte normalisiert. Der LV diente als Referenz. (B) Zusätzlich wurden alle für den pRD29B:LUC-Reporter ermittelten Werte auf die für den pDR5:LUC-Reporter ermittelten Werte normalisiert. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen Kontroll (25 °C) - und Kälte-Bedingungen (12 °C und 4 °C). Unterschieden sich die ermittelte Signifikanz zwischen den 12 °C und 4 °C-Proben im Vergleich zur Kontrollbedingung, werden die beiden unterschiedlichen Signifikanzen durch einen Schrägstrich (/) getrennt.

3.2.2 CPK23-abhängige Regulation von CRT/DRE Bindeproteinen (DREBs)

Da CPK23 bei Kältebehandlung scheinbar die Lokalisation ändert und eine reduzierte Gen-Expression aufweist, gleichzeitig aber die Induktion des ABA-Signalweges reduziert ist, wurde überprüft, ob CPK23 unter Kälte andere Signalwege reguliert. Unter Normalbedingungen erfolgte eine CPK23-abhängige Regulation des ABA-Signalweges nach artifizierlicher Aufhebung der Membran-Assoziation. Bei Kältestress konnte dies jedoch nicht beobachtet werden. Da unter diesen Bedingungen der pflanzliche Metabolismus langsamer abläuft, ist auch die Synthese von ABA reduziert. Der ABA-Signalweg wird daher durch Kältestress nur wenig beeinflusst (Roychoudhury et al., 2013). Neben dem durch ABFs regulierten ABA-Signalweg existieren auch ABA-unabhängige Kälte-Signalwege. In diesen steuern Kälte-abhängig induzierte DREB1-Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen mit DRE-Elementen im Promotor (Wang et al., 2008). Der Promotor des RD29A-Gens beinhaltet dieses cis-regulatorische Element. Um zu überprüfen, ob CPK23 auch über DREB1s den ABA-Signalweg (pRD29B:LUC-Reporter) oder aber den ABA-unabhängigen Signalweg (pRD29A:LUC-Reporter) regulieren kann, wurde 9aa_CPK23C mit steigenden Konzentrationen an DREB1-Transkriptionsfaktoren kotransformiert und die Induktion der jeweiligen Signalwege analysiert (Abb. E11-A-I). Um zu vermeiden, dass vorhandene ABFs einen Einfluss auf die DREB1-abhängige Regulation der Reporter nehmen, wurde das Experiment in dABF1/2/3/4-Pflanzen durchgeführt. Durch das Fehlen der ABFs war die Induktion des ABF-abhängig regulierten pRD29B:LUC-Reporters im Vergleich zum pRD29A:LUC-Reporter stark reduziert (Abb. 3.11-C/F/I). Um zusätzlich zu überprüfen, ob CPK23 nach Kälte-Behandlung den zu regulierenden Signalweg wechselt, wurde das Experiment bei Normaltemperatur (25 °C (Abb. 3.11-A/D/G)) und Kälte (4 °C (Abb. 3.11-B/E/H)), durchgeführt. CPK23 konnte über DREB1A sowohl den ABA-abhängigen- (5-fache Induktion), als auch den ABA-unabhängigen-Signalweg (3-fache Induktion) positiv regulieren (Abb. 3.11-A). Unter Kälte erfolgte nur noch eine CPK23-abhängige Regulierung des ABA-unabhängigen Signalweges (Abb. 3.11-B). DREB1B induzierte den ABA-unabhängigen Signalweg bereits stark (12-fache Induktion (Abb. 3.11-D)), jedoch war dies nur unter Kälte auch CPK23-abhängig. In Gegenwart von 9aa_CPK23C verdoppelte sich hier die Induktion (Abb. 3.11-E)). Der ABA-abhängige Signalweg wurde hingegen in jedem Fall negativ durch DREB1B reguliert (Abb. 3.11-D/E). Damit ist DREB1B möglicherweise ein Faktor, der den beobachteten negativen CPK23-Effekt auf den ABA-Signalweg unter Kälte erklären könnte: DREB1B wird unter Kälte exprimiert, reprimiert den ABA-Signalweg (möglicherweise CPK23-abhängig) und induziert gleichzeitig den ABA-unabhängigen Signalweg unter Kälte CPK23-abhängig. Ein Wechsel der regulierten Signalwege erscheint damit für CPK23 über DREB1B möglich zu sein. CPK23 hatte einen negativen Effekt auf die Regulierung des ABA-unabhängigen Signalweges über DREB1C (Abb. 3.11-G). Dieser Effekt war bei Normalbedingungen deutlich stärker als unter Kälte ausgeprägt (Abb. 3.11-H). Ein

Ergebnisse

CPK23-abhängiger Einfluss der DREB1C-abhängigen Regulation des ABA-abhängigen Signalweges war unter Normalbedingungen nicht zu beobachten (Abb. 3.11-G). Unter Kälte wurde dieser jedoch ebenfalls reprimiert (Abb. 3.11-H).

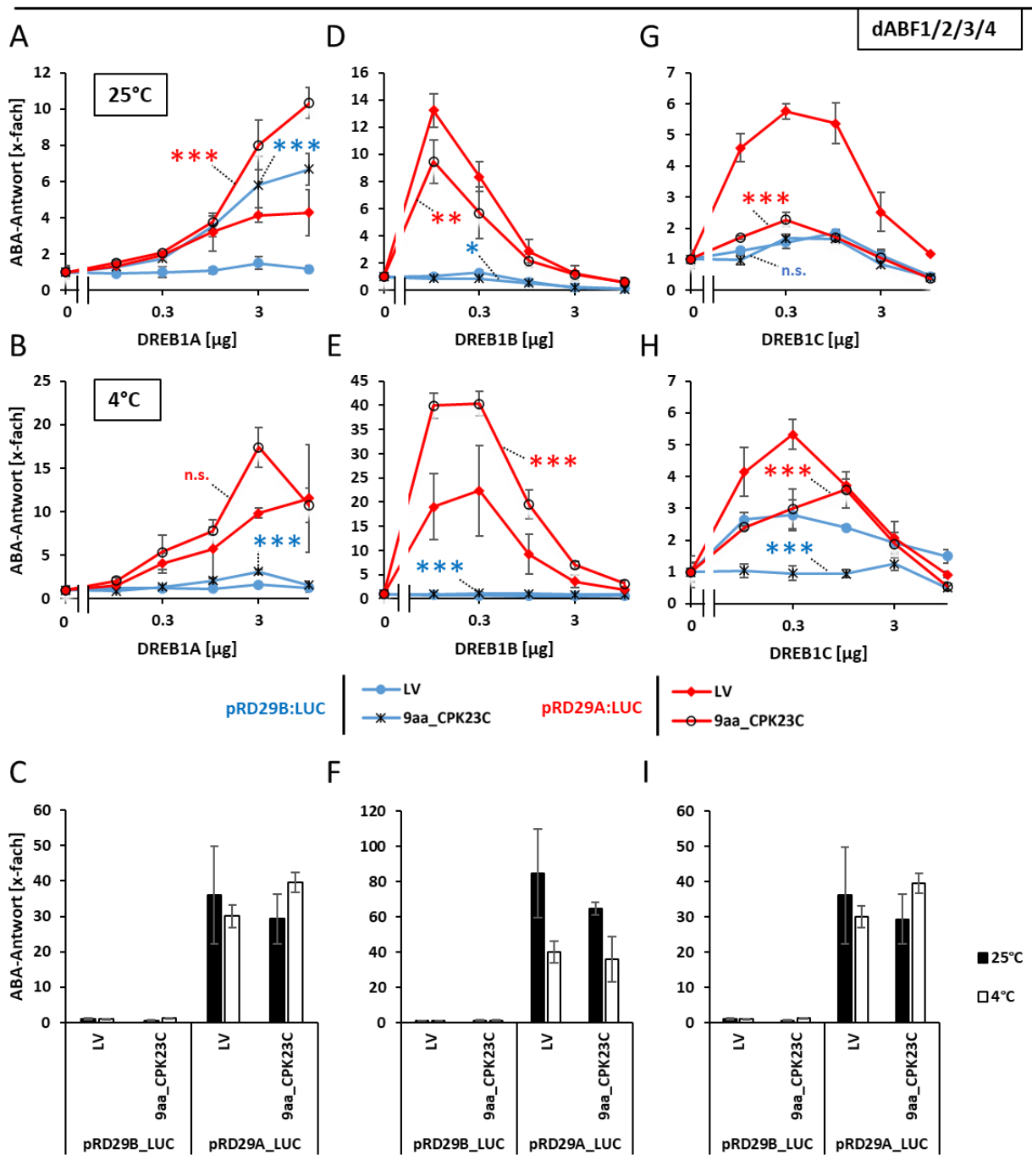


Abb. 3. 11: CPK23-abhängige Regulation von DREB1-Transkriptionsfaktoren.

(A-I) Um zu überprüfen ob CPK23 neben dem ABA-Signalweg, auch kälte-abhängige Signalwege reguliert, wurden dABF1/2/3/4-Protoplasten neben dem ABA-abhängigen Reporter pRD29B:LUC, auch mit dem ABA-unabhängigen Reporter pRD29A:LUC transfiziert. Verschiedene DREBs (DREB1A (A, B und C), DREB1B (D, E und F), DREB1C (G, H und I)) wurden in den angegebenen Konzentrationen mit je 3 μg 9aa_CP23C oder einer LV-Kontrolle kotransformiert. Für das Experiment wurden Protoplasten

Ergebnisse

nach der Transfektion für 4h bei Normaltemperatur inkubiert und anschließend auf die angegebenen Temperaturen aufgeteilt (25 °C = A, D und G) (4 °C = B, E und H). Die Messung erfolgte nach frühestens 16 h Gesamtinkubation. Die ermittelten Luciferase-Werte wurden auf die Glucuronidase-Werte normalisiert. Die 0 µg DREB1-Werte dienten als Referenz. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich zwischen LV- und 9aa_CPK23C-Werten für den jeweils verwendeten Reporter. In (C/F/I) wird die initiale Induktion der verwendeten Reporter in Relation zueinander dargestellt (0 µg DREB1s). Die Normalisierung erfolgte jeweils auf den LV-Wert des pRD29B:LUC-Reporters bei 0 µg DREB1s. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

Da DREB1B den pRD29B:LUC-Reporter negativ zu inhibieren scheint, wurde untersucht ob dieser Effekt durch CPK23 verstärkt wird und ob cis-regulatorische ABRE Elemente im Promotor verantwortlich sind. Um dies zu untersuchen wurden steigende DREB1B-Konzentrationen mit CPK23_C3A in dABF1/2/3/4-Protoplasten kotransformiert. Zusätzlich zum natürlichen pRD29B:LUC-Reporter wurde ein künstlicher p8xABRE:LUC-Reporter verwendet. Dieser verfügt über keine weiteren cis-regulatorischen Elemente, ist über das ABRE-Motiv aber nach wie vor durch ABFs induzierbar. Kommt die reprimierende Wirkung von DREB1B durch eine direkte negative Regulation der ABFs zu Stande oder aber durch die direkte Bindung an dieses Motiv, sollte folglich auch in diesen Proben eine mit pRD29B:LUC-vergleichbare Reprimierung erfolgen. Da in den verwendeten dABF1/2/3/4-Protoplasten keine endogenen ABFs vorhanden sind, kann der ABA-Signalweg über diese auch nicht induziert werden. Daher wurde das Kälte-induzierbare ABF1 (Kim, 2005) ebenfalls koexprimiert. Zusätzlich wurde das Experiment in An- und Abwesenheit von exogenem ABA durchgeführt. In An- und Abwesenheit von ABA konnte eine deutliche Abhängigkeit von CPK23_C3A auf die Regulation des pRD29B:LUC Reporters beobachtet werden (Abb. 3.12-A/C). Mit steigender Konzentration an DREB1B sank die ABF1-abhängige Induktion des ABA-Signalwegs stark ab. Bei einer DREB1B-Konzentration von 3 µg wurde die Induktion des pRD29B:LUC-Reporters in Gegenwart der Leervektor-Kontrolle (LV) um 50 % reduziert. Wurde hingegen CPK23_C3A koexprimiert sank die Induktion sogar um bis zu 80 %. Daher kann bis zu einem gewissen Grad davon ausgegangen werden, dass DREB1B den ABA-Signalweg in Abhängigkeit von CPK23 negativ reguliert. Eine direkte Interaktion zwischen DREB1B und ABF1 kann hier jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Eine solche Interaktion konnte bereits für DREB1A, DREB2A und DREB2C mit ABF2, sowie DREB2C mit ABF3 und ABF4, gezeigt werden (Lee et al., 2010). Auf den künstlichen p8xABRE:LUC-Reporter wirkte DREB1B hingegen kaum (Abb. 3.12-B/D). Erst bei deutlich erhöhten DREB1B-Konzentrationen (10 µg DNA) trat eine inhibierende Wirkung auf. Ein negativer Effekt durch hohe DNA-Mengen ist hier folglich wahrscheinlicher als ein direkter Einfluss auf den Signalweg. Da die ABRE-Elemente im Promotor scheinbar nicht ausschlaggebend für die negative DREB1B-Wirkung sind, wird diese möglicherweise durch andere regulatorische Elemente in den Promotoren der Zielgene vermittelt.

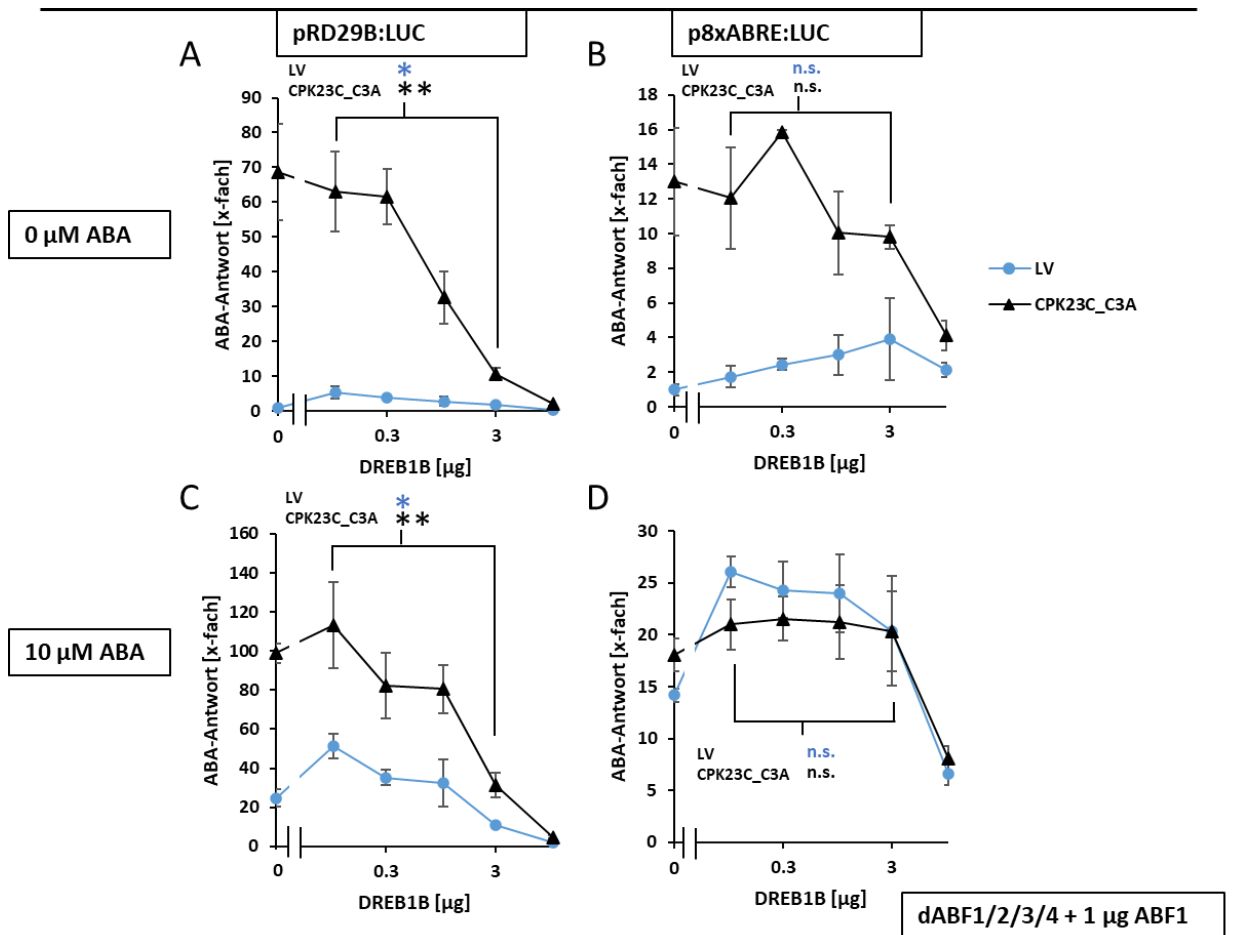


Abb. 3. 12: Einfluss von DREB1B auf den ABA-Signalweg.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Repression des ABA-Signalweges durch DREB1B von der ABRE-Bindestelle im natürlichen RD29B-Promotor abhängt, wurde zusätzlich die DREB1B-abhängige Regulation eines künstlichen p8xABRE:LUC-Reporters analysiert. Das Experiment wurde in Ab- (A/B) und Anwesenheit von exogenem ABA (C/D) durchgeführt. Für das Experiment wurden dABF1/2/3/4 Protoplasten entweder mit einem pRD29B:LUC- (A/C) oder einem p8xABRE:LUC-Reporter (B/D) transformiert. Koexprimiert wurden ein Kontrollvektor (LV) oder CPK23_C3A jeweils mit steigenden Konzentrationen an DREB1B. Nach 18 h Inkubation wurde der Luciferase-Wert ermittelt und auf die entsprechende Glucuronidase-Aktivität normalisiert. Der LV bei 0 µg DREB1B und 0 µM ABA diente jeweils als Referenz. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen 0,1 und 3 µg DREB1B für die jeweiligen Effektoren.

Für CPK23-überexprimierende Pflanzen wurde unter Salzstress eine gesunkene Keimungsrate festgestellt (Abb. 3.2-C). Da DREB-Transkriptionsfaktoren ABA-unabhängig durch Salz induziert werden können, wurde analysiert, ob diese in *in-vivo* Reporter-Assays ebenfalls durch CPK23 reguliert werden. DREB2A ist Salz-reguliert und für seine Aktivierung werden post-translationale Modifikationen benötigt, die von ABA-regulierten Elementen abhängen (Merlot et al., 2001). Zu diesen Elementen können auch CPKs gehören (Roychoudhury et al., 2013). Das Experiment wurde erneut in

Ergebnisse

dABF1/2/3/4-Pflanzen durchgeführt. Damit sollte die Analyse einer möglichen CPK23-abhängigen Aktivierung von DREB2A erleichtert und von, in diesem Prozess möglicherweise interferierenden, ABFs entbunden werden. Um eine Involvierung von Salzstress in diese Vorgänge zu erkennen, wurde das Experiment unter Normal- (Abb. 3.13-A) und Salzstress-Bedingungen (Abb. 3.13-B) durchgeführt. Unter allen Bedingungen war die Induktion des pRD29B:LUC-Reporters im Vergleich mit dem pRD29A:LUC-Reporter erneut deutlich reduziert (Abb. 3.13-C). In dem Experiment konnte eine Salz-unabhängige CPK23-abhängige Aktivierung von DREB2A beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 3 µg DREB2A wurde der pRD29B:LUC-Reporter in Gegenwart von 9aa_CPK23C 3-fach stärker als die Kontrollprobe induziert. Unter denselben Bedingungen wurde der ABA-unabhängige pRD29A:LUC-Reporter 2-fach induziert. (Abb. 3.13-A). Bei 100 mM Salzstress wurde der ABA-abhängige Signalweg nicht mehr induziert. Der pRD29A:LUC-Reporter wurde unter Salzstress zwar weiterhin positiv reguliert, jedoch erfolgte dies nicht mehr CPK23-abhängig. Zwischen LV- und 9aa_CPK23C Proben war hier kein eindeutiger Unterschied mehr auszumachen (Abb. 3.13-B).

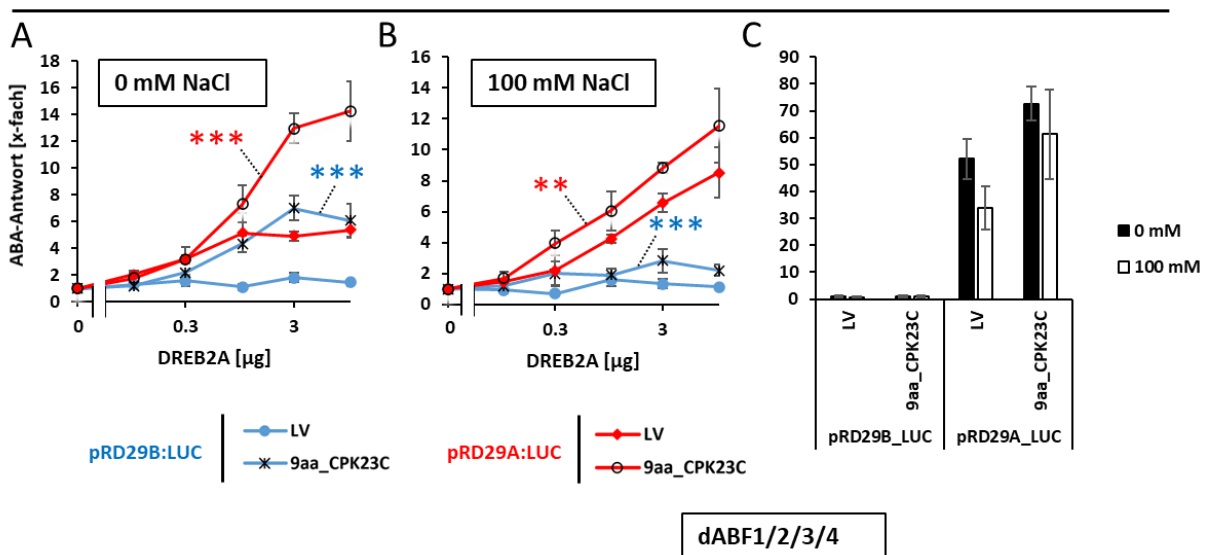


Abb. 3. 13: CPK23-abhängige Regulation des DREB2A-Transkriptionsfaktors.

Um zu überprüfen, ob CPK23 auch über das Salz-abhängig exprimierte DREB2A den ABA-abhängigen und -unabhängigen Stress-Signalweg induzieren kann, wurde DREB2A in den angegebenen Konzentrationen mit 9aa_CPK23 oder LV kotransformiert. Das Experiment wurde in Ab- (A) und Anwesenheit von 100 mM NaCl (B) durchgeführt. Für das Experiment wurden dABF1/2/3/4-Protoplasten mit 3 µg Effektor-DNA und DREB2A in den angegebenen Konzentrationen transfiziert. Anschließend wurde die durch die verwendeten Reporter-Plasmide (pRD29B:LUC oder pRD29A:LUC) gebildete Luciferase-Menge bestimmt und auf die Glucuronidase-Aktivität normalisiert. Als Referenz dienten jeweils die Werte ohne DREB2A. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich zwischen LV- und 9aa_CPK23C-Werten für den jeweiligen Reporter. In (C) wird die initiale Induktion der verwendeten Reporter in Relation zueinander dargestellt (0 µg DREB2A). Die Normalisierung erfolgte jeweils auf den LV-Wert des pRD29B:LUC-Reporters bei 0 µg DREB2A. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

3.3 Über welche Faktoren beeinflusst CPK23 den ABA-Signalweg?

Die 4 ABFs (ABF1/ABF2/ABF3/ABF4) werden in vegetativen Geweben von Pflanzen unter abiotischen Stress-Bedingungen exprimiert (Choi et al., 2000). ABF2, ABF3 und ABF4 werden dabei hauptsächlich durch osmotischen Stress und ABA induziert, ABF1 hingegen durch Kälte und ABA (Fujita et al., 2011). Da sie für die volle Funktionalität ABA benötigen, handelt es sich bei ihnen um Master-Transkriptionsfaktoren die ABA-abhängig die Expression von ABRE-regulierten Genen in kooperativer Weise steuern (Fujita et al., 2005). Da ein einzelnes ABRE-Motiv nicht ausreicht, um die ABA-abhängige Transkription des Zielgens zu starten, werden entweder mehrere Kopien oder zusätzliche *coupling*-Elemente benötigt. Zu diesen *coupling*-Elementen zählt auch das DRE-Motiv (Hobo et al., 1999). Während der Promotor des RD29A-Gens über je ein ABRE- und ein DRE- Element verfügt, weist der Promotor des RD29B-Gens zwei ABRE-Motive auf (Uno et al., 2000). Daher ist pRD29B-LUC ein geeigneter Reporter für die Analyse des ABA-Signalweges und einer möglichen CPK23-abhängigen Regulation der ABFs.

3.3.1 CPK23-abhängige Regulation von ABRE-Bindefaktoren (ABFs)

CPK23 Überexpressionslinien zeigten nach ABA-Behandlung eine reduzierte Keimungsrate (Abb. 3.2). Zusätzlich führte die Expression entsprechender Effektoren in Protoplasten Reporter-Assays zu einer Induktion eines ABA-abhängig regulierten pRD29B:LUC-Reporters (Abb. 3.1). Um zu analysieren ob diese Effekte auf eine CPK23-abhängige Regulierung der ABFs zurückzuführen sind, wurde CPK23 zusammen mit den 4 ABFs in dABF2/3/4-Protoplasten (Abb. 3.14-A) und in pSAR-Hefezellen (Abb. 3.14-B) kotransformiert. Wurde in Protoplasten-Experimenten nur die Wirkung der ABFs ohne zusätzlich transfiziertes CPK23 analysiert, so erfolgte der Hauptteil der pRD29B:LUC-Induktion durch ABF2/3 und 4. Sie induzierten den Reporter jeweils um das 30 – 60-fache. ABF1 induzierte diesen hingegen nur um das 10-fache. Während die Koexpression von N-terminal unmodifizierten CPK23C nur zu einer schwachen weiteren Steigerung der Induktion beitrug, wurde der ABA-Signalweg durch die Koexpression von 9aa_CPK23C deutlich stärker induziert. Bei Normalisierung auf die LV-Werte mit dem jeweils zugehörigen ABF, konnte 9aa_CPK23C den ABA-Signalweg über diese zusätzlich um den Faktor 10 (Koexpression von ABF2 und ABF4), beziehungsweise um den Faktor 35 (Koexpression von ABF1 und ABF3) erhöhen (Abb. 3.14-A). In Abwesenheit zusätzlich koexprimierter ABFs ist nur eine geringe Induktion des Reporters durch 9aa_CPK23C zu erkennen. Da die für das Experiment verwendete Pflanzenlinie (dABF2/3/4) nur über endogenes ABF1 verfügt, die Gene für ABF2/3 und 4 hier jedoch durch T-DNA Insertionen zerstört wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die in Col-0 WT

Ergebnisse

gezeigte CPK23-abhängige Induktion des Reporters (Abb. 3.1) hauptsächlich durch die endogen vorhandenen ABFs vermittelt wurde. Um Sicherzugehen, dass die Induktion des ABA-Signalweges über die ABFs direkt durch CPK23 ausgelöst wird und nicht zusätzlich zwischengeschaltete und unbekannte Komponenten die eigentliche Aktivierung der ABFs ermöglichen, wurde das Experiment auch in Reporter-Assays in pSAR-Hefezellen durchgeführt. In Hefezellen sind solche zwischengeschalteten Elemente theoretisch nicht vorhanden. Die ohne trans-Phosphorylierung inaktiven ABFs können den p4xABRE:LUC-Reporter hier folglich nicht ohne einen direkte Beeinflussung durch koexprimierte Effektoren regulieren. Auch in Hefe konnte eine CPK23-abhängige Aktivierung des ABA-Signalweges über die ABFs beobachtet werden. In diesem Fall erfolgte die ABF-abhängige Induktion des Reporters jedoch sowohl in Gegenwart von N-terminal unmodifiziertem CPK23C als auch von 9aa_CPK23C. Im Gegensatz zu den Experimenten in dABF2/3/4-Protoplasten, erfolgte hier die CPK23-abhängige Induktion des Reporters hauptsächlich über ABF2 und ABF4 (CPK23C: 100 – 200-fache Induktion, 9aa_CPK23C: 400 – 700-fache Induktion). Über ABF1 und ABF3 wurde der ABA-Signalweg hingegen nur 50- (Koexpression von CPK23C) beziehungsweise 150- (Koexpression von 9aa_CPK23C) -fach induziert (Abb. 3.14-B). Da die Experimente in Protoplasten in dABF2/3/4 Pflanzen durchgeführt wurden, ist eine mögliche Heterodimer-Bildung der koexprimierten ABFs mit dem hier noch vorhandenen ABF1 möglich.

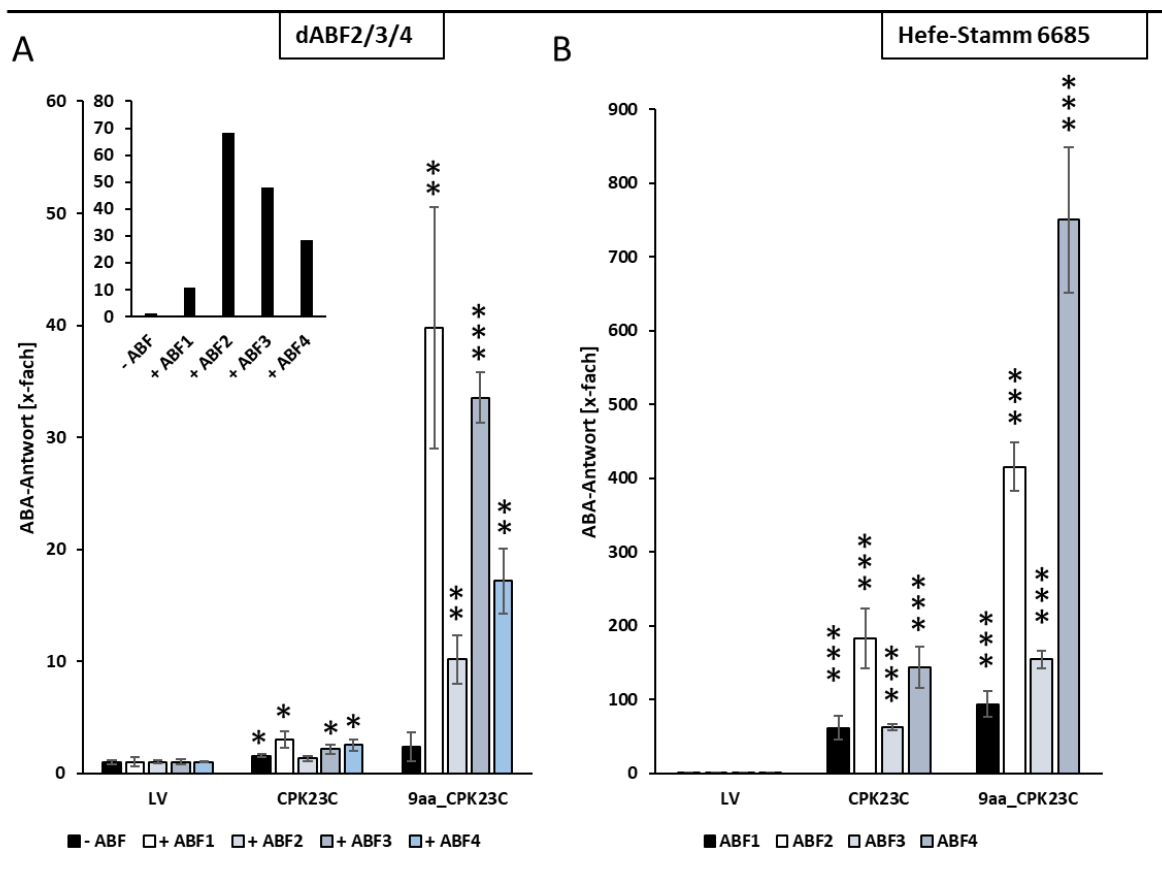


Abb. 3. 14: CPK23-abhängige Regulation von ABF-Transkriptionsfaktoren.

Ergebnisse

(A) Für das Experiment in dABF2/3/4-Protoplasten wurden je 3 µg verschiedener CPK23-Varianten mit 3 µg ABFs koexprimiert. Die nach 16 h Inkubation (25 °C) durch den pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase wurde gemessen und anschließend auf die Glucuronidase-Werte normalisiert. Jeweilige LV-Werte mit dem korrespondierenden ABF dienten als Referenz. Die CPK23-unabhängige Induktion durch die jeweiligen ABFs wird in einem gesonderten Diagramm gezeigt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen den LV-Werten und den jeweils entsprechenden CPK23C- und 9aa_CPK23C-Werten. (B) Beim Experiment in pSAR-Hefezellen wurde analog vorgegangen. Die Hefen wurden mit CPK23-Varianten (GAL1-Promotor) und entsprechenden ABFs (ADH1-Promotor) transformiert. Die Expression der Effektoren wurde durch Zugabe von Galactose gestartet. Nach 16 h Inkubation bei 30 °C wurde die durch den p4xABRE:LUC-Reporter gebildete Luciferase gemessen und auf die OD₆₀₀ der Zellen normalisiert. Die jeweiligen LV-Werte dienten als Referenz-Wert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen den LV-Werten und den jeweils entsprechenden CPK23C- und 9aa_CPK23C-Werten.

Da N-terminal unmodifiziertes CPK23 bereits einen geringen Effekt auf die ABF-abhängige Induktion des ABA-Signalweges zu haben schien, wurde ABF1 in Protoplasten-Reporter Assays zusätzlich mit diesem in steigenden Konzentrationen kotransformiert (Abb. 3.15-A). Bei geringen Konzentrationen an ABF1 war eine deutliche CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges zu erkennen. Im Vergleich zu einem entsprechenden LV-Wert wurde der pRD29B:LUC-Reporter bei Koexpression von membrangebundenen CPK23C mit 1 µg ABF1 um den Faktor 10 induziert. Volllängen CPK23C (CPK23C_FL) zeigte hier auch in einer N-terminal modifizierten Version (9aa_CPK23C_FL) keinen Effekt. Auch bei Zugabe von exogenem Calcium (CaCl₂) in verschiedenen Konzentrationen (0 – 10 mM) konnte über CPK23C_FL der ABA-Signalweg nicht ABF1-abhängig aktiviert werden (Abb. 3.15-B). Die CPK23-Calmodulin Domäne weist, bedingt durch die reduzierte Calciumbindefähigkeit der EF-Hände, nur eine geringe Calcium-Abhängigkeit auf. Dieser Umstand erklärt möglicherweise den Befund (Franz, 2008). Die in diesem System beobachtete ABF1-konzentrationsabhängige Aktivierung von ABF1 durch CPK23 scheint nicht von ABA abhängig zu sein, da ABA bei Abwesenheit von ABF1 keine CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges auslösen konnte (Abb. 3.15-C). Während ABF1 in niedriger Konzentration einen direkten CPK23-abhängigen Effekt zeigte, wurde dieser durch ansteigende ABA-Konzentrationen nur marginal verstärkt. Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass CPK23 über ABF1 den ABA-Signalweg in einer ABF1-konzentrationsabhängigen Weise induziert. Eine zusätzliche Involvierung von ABA scheint für diesen Vorgang nicht relevant zu sein.

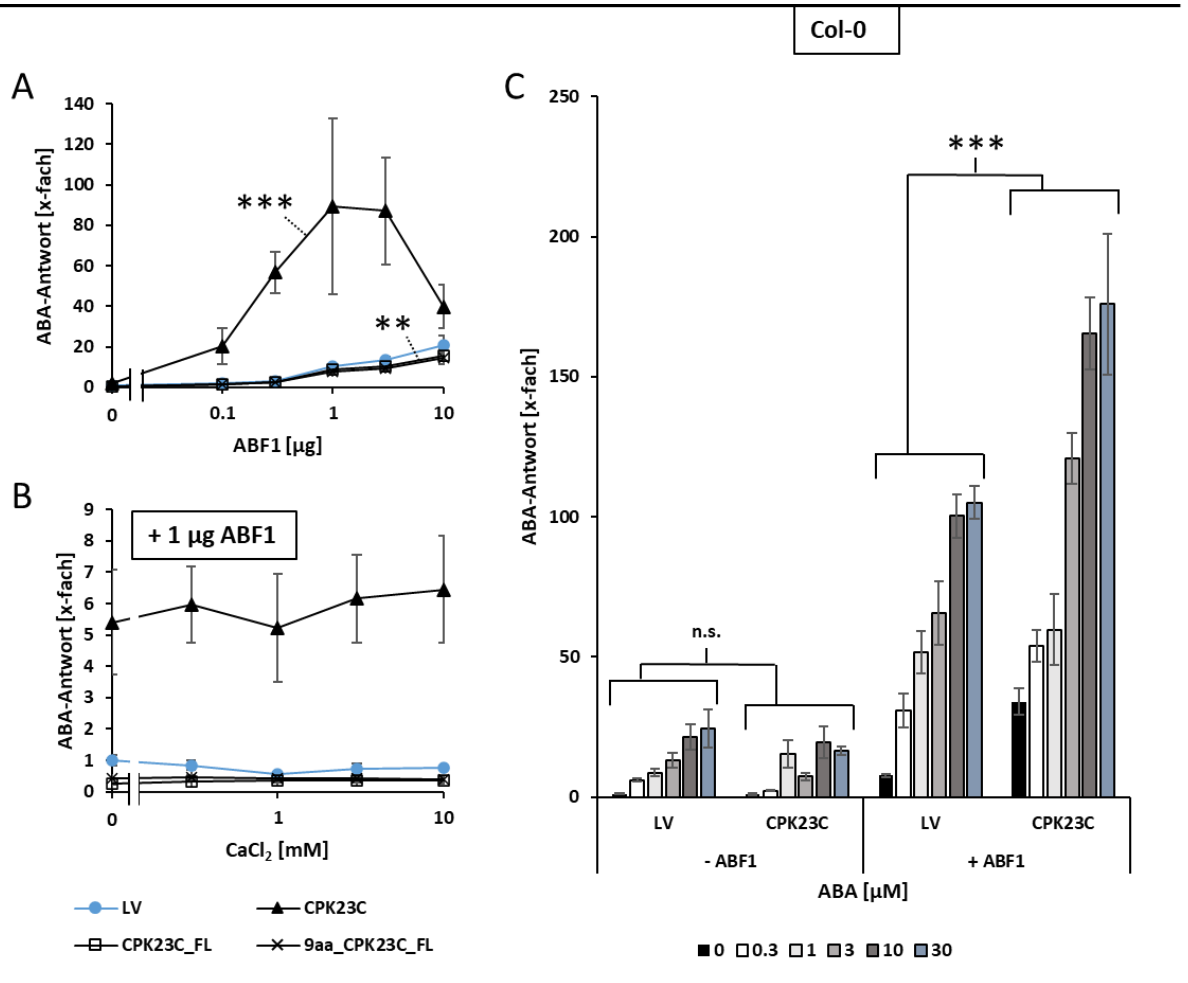


Abb. 3. 15: ABF1-Regulation durch membran-assoziiertes CPK23.

(A) Col-0 Protoplasten wurden mit 3 µg Effektor und ABF1 in den angegebenen Konzentrationen kotransfiziert. Alternativ wurden Protoplasten mit je 3 µg Effektor und 1 µg ABF1 zusätzlich mit ABA (C) oder CaCl₂ (B) in der angegebenen Menge versetzt. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Protoplasten für 16 h bei 25 °C inkubiert. Die durch den pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase wurde gemessen und auf die Glucuronidase-Aktivität normalisiert. Der LV-Wert bei niedrigster ABF1-Konzentration (A), bei niedrigster CaCl₂-Konzentration (B) und bei nicht koexprimierten ABF1 und niedrigster ABA-Konzentration (C) diente als Referenz. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich mit den LV-Werten (A) oder den entsprechenden LV-Werten in Ab- oder Anwesenheit von ABF1 (C).

Ergebnisse

3.3.2 Einfluss der aminoterminalen Domäne verschiedener CPK23-Ökotypen

Da CPK23-Proteine aus verschiedenen Ökotypen eine hohe Varianz in ihrer Aminosäure-Sequenz aufweisen, wurde untersucht, ob unterschiedliche CPK23 Ökotypen (CPK23B/CPK23C/CPK23L) ebenfalls in der Lage sind den ABA-Signalweg auch ohne N-terminale Modifikationen über ABFs zu induzieren. Dafür wurden die verschiedenen CPK23 Ökotypen in Col-0 Protoplasten mit ABF1 (Abb. 3.16-A), ABF2 (Abb. 3.16-B), ABF3 (Abb. 3.16-C) und ABF4 (Abb. 3.16-D) in verschiedenen Konzentrationen (0 μg – 10 μg) kotransformiert. Eine ABF-abhängige Induktion des ABA-Signalweges (mit Ausnahme von ABF2 (Abb. 3.16-B)) über unmodifiziertes CPK23 konnte dabei jedoch nur für CPK23C, nicht jedoch für CPK23-Varianten aus Ler-0 und Bur-0, ermittelt werden. Die ermittelten Unterschiede zwischen den CPK23-Ökotypen weisen auf einen spezifischen ABF-abhängigen Effekt hin. Denkbar wären hierbei eine unterschiedliche Affinität zu ABFs oder eine differentiell regulierte Membran-Assoziation.

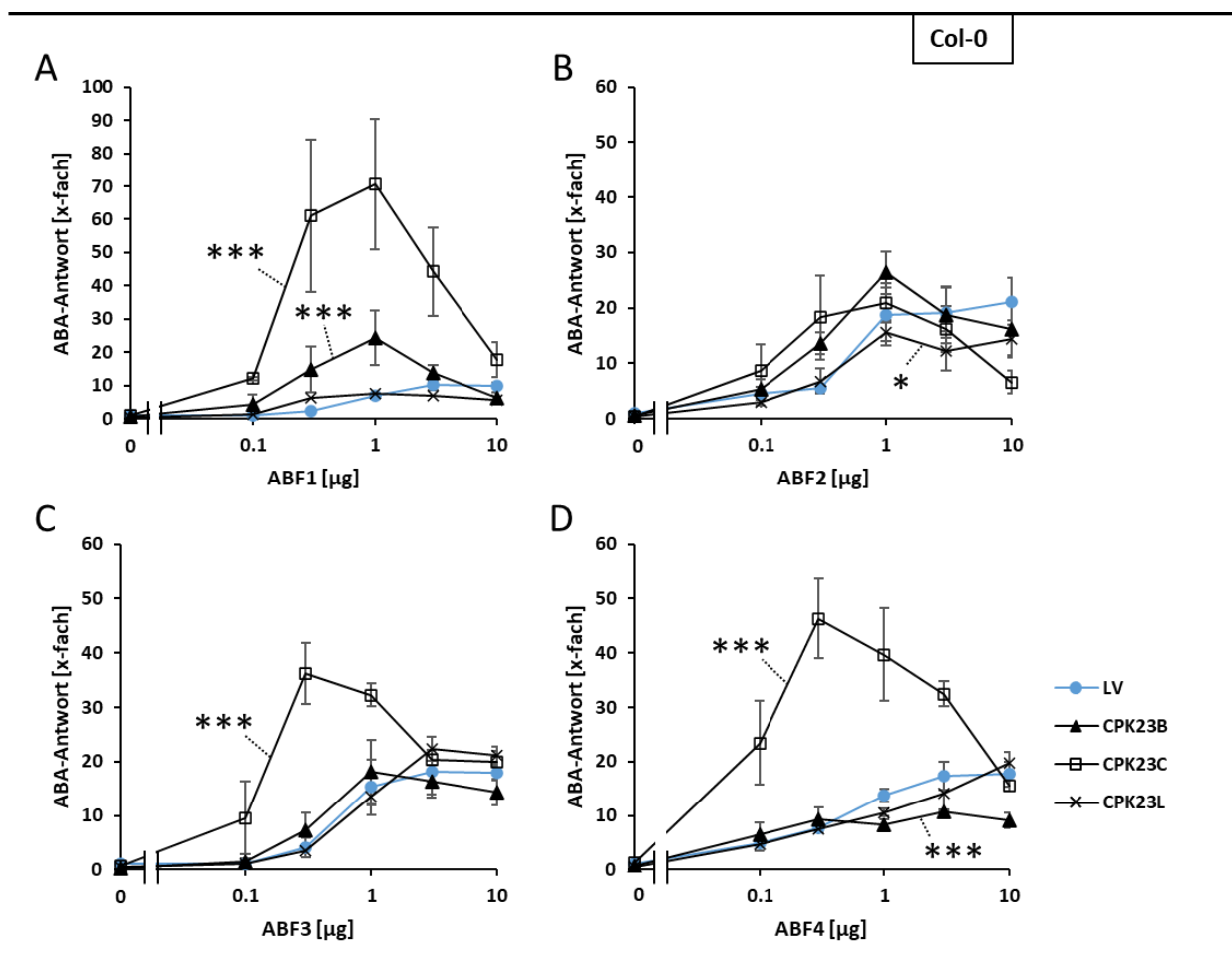


Abb. 3. 16: Einfluss verschiedener membran-assoziiertes CPK23-Ökotypen auf die ABF1-Regulation.

(A-D) Für das Experiment wurden Col-0 Protoplasten mit 3 μg Effektor und ABFs (ABF1 = A, ABF2 = B, ABF3 = C und ABF4 = D) in steigender Konzentration transfiziert. Die nach 18 h Inkubation durch den

Ergebnisse

pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase wurde auf die entsprechenden Glucuronidase-Werte normalisiert. Der LV-Wert bei der niedrigsten ABF-Konzentration (0 µg) diente jeweils als Referenz. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich mit den jeweiligen LV-Werten.

Um zu ermitteln, ob die unterschiedliche Regulation der ABFs durch N-terminal unmodifizierte CPK23-Ökotypen von der Kinase-Domäne oder dem N-Terminus abhängt, wurden *domain-swaps* zwischen CPK23B, CPK23C und CPK23L generiert (Abb. 3.17-A). Diese wurden jeweils in einer N-terminal unmodifizierten (Abb. 3.17-B/C) und einer modifizierten (9aa) Variante (Abb. 3.17-D/E) in Protoplasten transfiziert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die *domain-swaps* im Prinzip funktional sind und ein mögliches Ausbleiben des ABF1-abhängigen Effekts nicht durch ein fehlerhaftes Protein zu Stande kommt. Alle generierten 9aa_CPK23 Formen waren in der Lage den ABA-Signalweg in ähnlichem Umfang zu induzieren (400 – 800-fache Induktion in Gegenwart von 1 µg ABF1) und sind dementsprechend in vollem Umfang funktional (Abb. 3.17-D/E). Auch kann die CPK23 abhängige Regulation von ABF1 folglich nicht mit einer unterschiedlichen Affinität der CPK23-Ökotypen zu ABF1 erklärt werden. Hierfür waren die in den 9aa_Kontrollen ermittelten Differenzen zu gering. Die Kinase-Domäne von CPK23L weist aufgrund des Serins an Position 290 nur eine geringe Aktivität auf (Abb. 3.8-C/D). Daher zeigten auch entsprechende *domain-swaps* nur eine schwache Aktivität und wurden in der hier gezeigten Analyse nicht berücksichtigt. Die ABF1-abhängige Induktion des ABA-Signalweges durch membranständiges CPK23 hing vom gewählten N-Terminus ab: ein *domain-swap* mit dem N-Terminus aus CPK23C induzierte den pRD29B:LUC-Reporter 6 - 10-fach (Abb. 3.17-C)), die *domain-swaps* mit den N-Termini aus CPK23B und CPK23L hingegen nur maximal 2-fach (Abb. 3.17-B)). Folglich benötigt membranständiges CPK23 den N-Terminus aus CPK23C um den ABA-Signalweg über ABF1 zu induzieren. Welche Aminosäuren im CPK23C-N-Terminus für diesen Effekt verantwortlich sind und welcher Mechanismus zu Grunde liegt ist hingegen unbekannt.

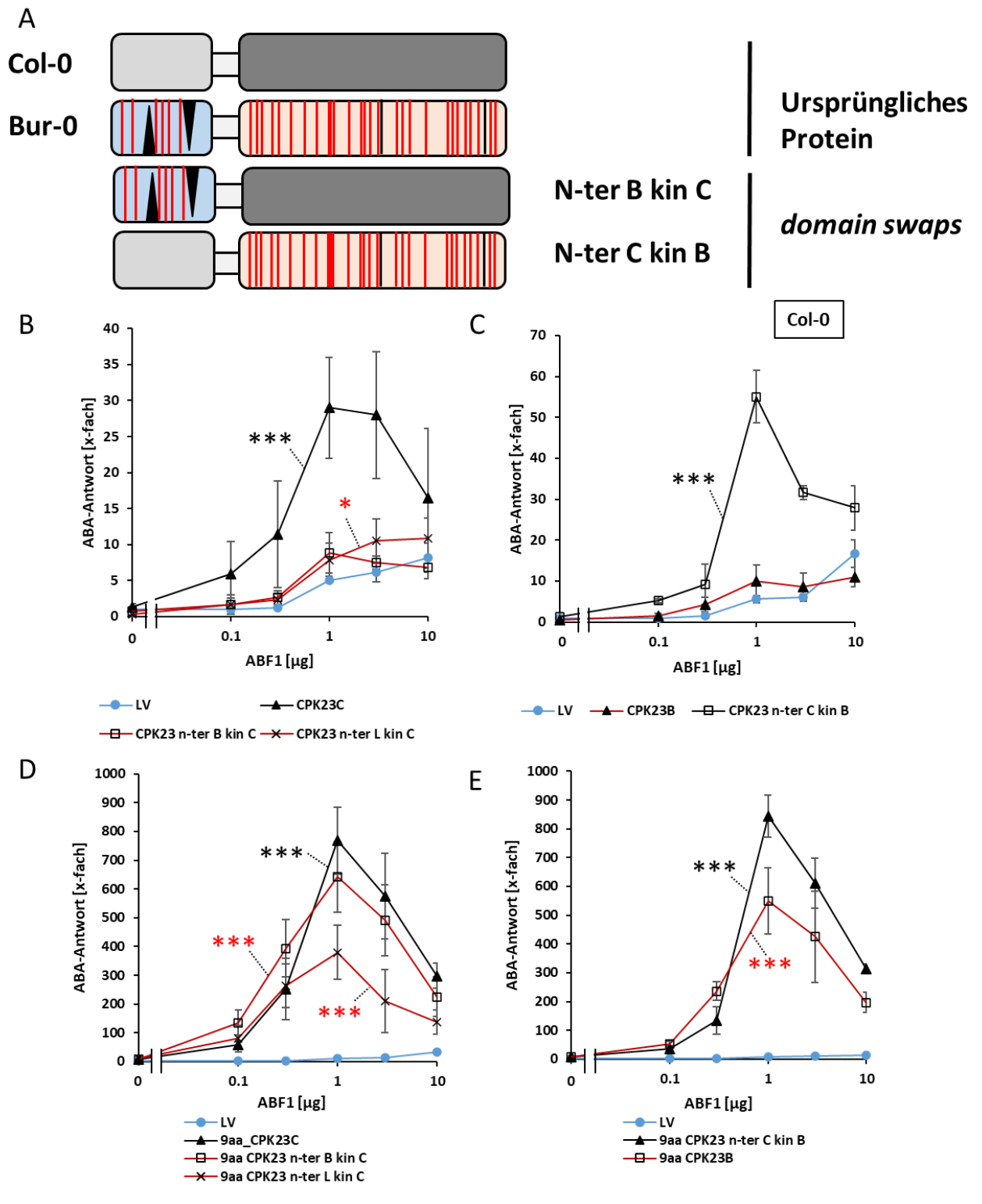


Abb. 3. 17: Einfluss des CPK23-N-Terminus aus verschiedenen Ökotypen auf die ABF1-Regulation.

(A) Um zu überprüfen, ob die Kinase- oder die N-terminale Domäne für die unterschiedliche ABF1-abhängige Regulierung des ABA-Signalwegs verantwortlich ist, wurden *domain-swaps* für CPK23B und CPK23C erzeugt. (B-E) Für das Experiment wurden Col-0 Protoplasten mit 3 µg der angegebenen Effektoren (Konstrukte mit CPK23C-Kinase = B und D) (Konstrukte mit CPK23B-Kinase = C und E) und ABF1 in steigender Konzentration transfiziert. Nach 16 h Inkubation wurde die durch den pRD29B-LUC-

Ergebnisse

Reporter gebildete Luciferase ermittelt und auf die entsprechenden Glucuronidase-Werte normalisiert. Die jeweiligen LV-Werte bei 0 µg ABF1 dienen als Referenz. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich mit den entsprechenden LV-Werten (B-E).

Ein großer Unterschied zwischen dem ABF1 nicht-regulierenden CPK23B N-Terminus einerseits und dem ABF1-regulierenden CPK23C N-Terminus andererseits befindet sich bereits zu Beginn der Aminosäure-Sequenz. Zwischen Aminosäure 36 und 43 von CPK23C befindet sich in CPK23B eine Deletion. Anhand dieser kann man die CPK23 Ökotypen in zwei Typen aufteilen: Einen Col-0 Typ ohne Deletion und einen Bur-0 Typ mit Deletion (Abb. 3.18-A). 80 % der in der *1001-genome* Datenbank gelisteten Ökotypen gehören hierbei dem Col-0 Typ an, die restlichen 20 % sind dem Bur-0 Typ zuzuordnen (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>) (Abb. 3.18-B). Um zu analysieren, ob die Deletion den Unterschied zwischen CPK23C und CPK23B hinsichtlich der ABF1-abhängigen Induktion des ABA-Signalweges erklären kann, wurde die Deletion von CPK23B in CPK23C nachgestellt. Umgekehrt wurde die Deletion in CPK23B mit den hier in CPK23C vorhandenen Aminosäuren aufgefüllt. Zusätzlich existieren auch CPK23-Ökotypen mit einem Intermediär-Typ. Diese weisen zwar die Deletion des Bur-0 Typs auf, die letzten 3 Aminosäuren der CPK23C-Aminosäuresequenz (QIP) sind jedoch nach wie vor vorhanden. Um dies ebenfalls abzubilden, wurde zusätzlich eine CPK23C-Variante mit nur unvollständiger CPK23B-Deletion und intaktem QIP-Motiv generiert. Alle generierten Varianten wurden anschließend in Col-0 Protoplasten mit ABF1 in steigenden Konzentrationen kotransformiert und die nun erfolgende Induktion des ABA-Signalweges analysiert (Abb. 3.18-C). Das Einfügen der vollständigen Bur-0 Deletion in CPK23C, nicht jedoch der unvollständigen Deletion, hatte einen 30 prozentigen Rückgang der ABF1-abhängigen pRD29B:LUC-Induktion zur Folge. Die Integration der CPK23C Aminosäuren in CPK23B hatte hingegen einen leicht positiven Effekt. Da die Verwendung unterschiedlicher Kinase-Domänen den vom N-Terminus abhängigen-Effekt verzerren kann, wurden die bisher getesteten Varianten zusätzlich mit einer einheitlichen Kinase-Domäne versehen. Die Kinase-Domäne von CPK23C wurde hierfür ausgewählt und an die jeweils modifizierten N-Termini fusioniert. Anschließend wurden die so generierten Konstrukte in Reporter-Assays in *aba2-1* Pflanzen eingesetzt. Diese Pflanzenlinie wurde verwendet, da die ABF1-abhängige Regulation des ABA-Signalweges durch CPK23 nicht von ABA abhängt, ein vorhandenes ABA-Signal den Effekt aber möglicherweise maskiert (Abb. 3.18-D). Wurde die CPK23B-Deletion in den CPK23C N-Terminus eingebracht, sank die ABF1-abhängige Induktion des pRD29B:LUC-Reporters im Vergleich zur nativen CPK23C-Variante um 50 %. Umgekehrt verdoppelte sich die ABF1-abhängige Induktion durch Varianten mit CPK23B N-Terminus, wenn die Deletion mit entsprechenden Aminosäuren aus CPK23C aufgefüllt wurde. Folglich ist davon auszugehen, dass die Deletion in CPK23B den Unterschied zu CPK23C teilweise, aber nicht vollständig erklären kann.

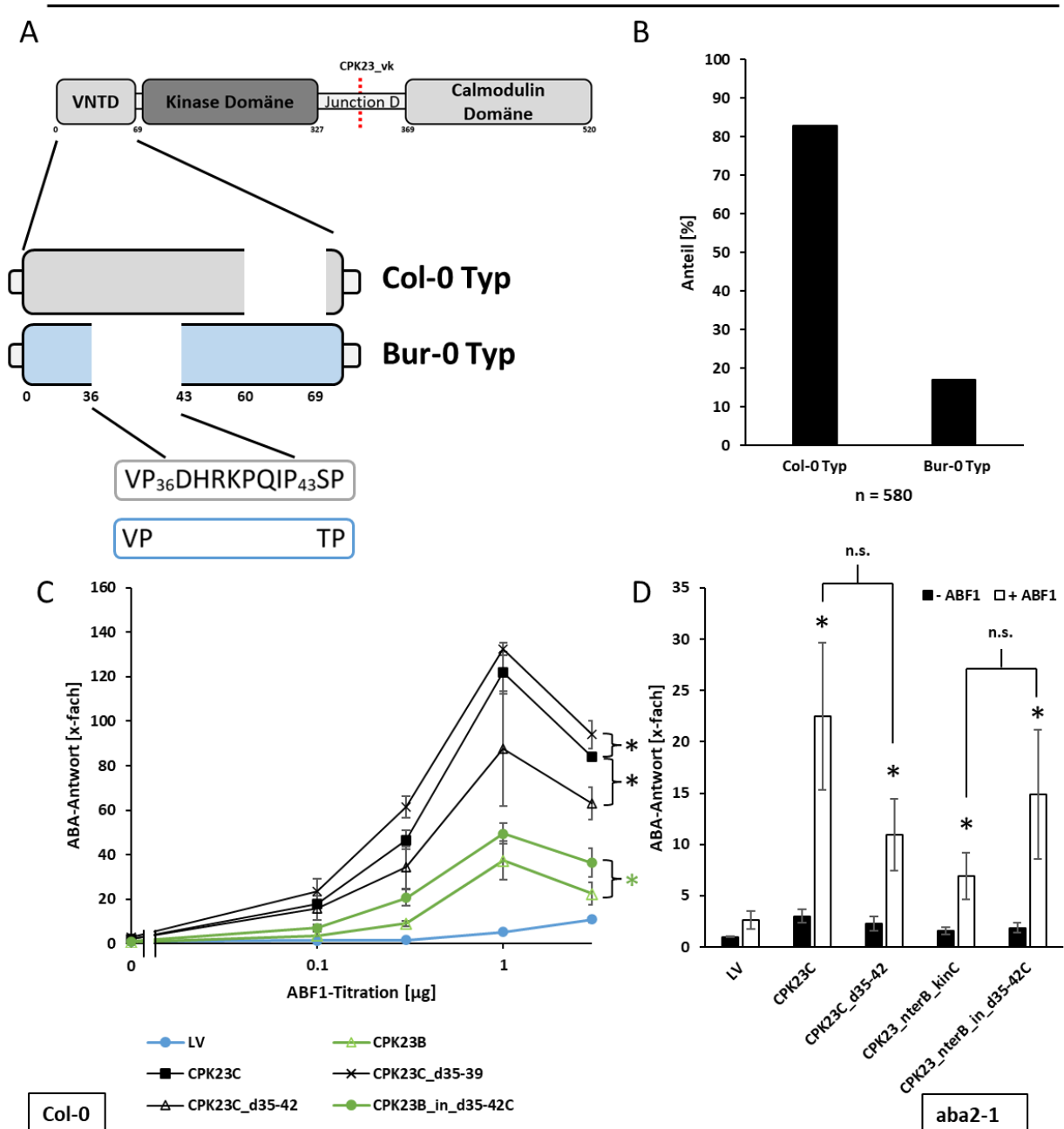


Abb. 3. 18: Einfluss einer Ökotyp-spezifischen Deletion/Insertion in CPK23 auf die Regulation von ABF1.

(A) Anhand der Deletion die in Bur-0 vorhanden ist, können CPK23 Ökotypen in einen Col-0 und einen Bur-0 Typ eingeordnet werden. (B) 80 % der CPK23 Varianten entsprechen dabei dem Col-0 Typ. Die Einteilung wurde anhand der in der *genome*-Browser Seite des 1001-*genome* Projekts (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>) hinterlegten Proteinsequenzen vorgenommen. (C) Da einige Varianten nur eine anteilige Deletion aufwiesen, wurden für CPK23C sowohl Konstrukte mit einer kompletten Deletion (Mimik des Bur-0 Typs), als auch Varianten mit intermediärer Deletion erzeugt. Zusätzlich wurden die Aminosäuren der Deletion in die CPK23B-Variante eingebracht. (D) Um einen Einfluss durch unterschiedliche Kinase-Domänen auszuschließen, wurden die N-terminalen Varianten auch mit identischen Kinase-Domänen (Col-0 Kinase) fusioniert. (C/D) Für die Experimente in Protoplasten wurden Col-0 (C) oder *aba2-1* (D) Protoplasten mit 3 µg Effektor und ABF1 (in aufsteigender Konzentration (C) oder mit einer Konzentration von 1 µg (D)) transfiziert und nach 18 h

Ergebnisse

die, durch die Induktion des pRD29B:LUC-Reporters gebildete, Luciferase gemessen. Diese wurde anschließend auf die entsprechenden Glucuronidase-Aktivitäten normalisiert. Der LV-Wert bei niedrigster ABF1-Konzentration (0 µg) diente als Referenz. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich zwischen den jeweiligen Ausgangsvarianten und den entsprechenden Insertions-/Deletions-Varianten (C), beziehungsweise (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen den jeweiligen Effektoren mit und ohne ABF1 und zusätzlich im Vergleich zwischen den Ausgangsvarianten und den Insertions-/Deletions-Varianten (D).

Mit dem Col-0 und dem Bur-0 Typ gehen zwei Aminosäuren einher, die jeweils spezifisch für einen der beiden Typen auftreten (Abb. 3.19-A). Der Col-0 Typ geht dabei mit einem Isoleucin an Position 47 und dem nicht-Vorhandensein von Tyrosin an Position 53 einher (über 90 % Übereinstimmung). Der Bur-0 Typ wird hingegen durch ein Tyrosin an Position 53 und einem Threonin an Position 47 gekennzeichnet (über 60 % Übereinstimmung) (Abb. 3.19-B). Die gewählten Positionsbezeichnungen beziehen sich hierbei auf die CPK23C Aminosäuresequenz und unterscheiden sich in CPK23B, da hier die Nummerierung durch die Deletion verändert wird. Die im vorangegangenen Abschnitt untersuchte Deletion in CPK23B konnte den Unterschied zwischen CPK23B und CPK23C N-Terminus hinsichtlich ihrer Wirkung auf die ABF1-abhängige Signalinduktion nicht komplett erklären. Daher wurde untersucht, ob es ein kooperatives Zusammenspiel zwischen der Deletion, beziehungsweise den hier in CPK23C vorhandenen Aminosäuren, und den mit diesen assoziierten nicht synonymen SNPs gibt. Dafür wurden die SNPs jeweils als Einzel- und Doppelmutation in den CPK23 N-Terminus eingebracht. Im Falle des CPK23C N-Terminus wurden diese zusätzlich mit der CPK23B-Deletion, im Falle des CPK23B N-Terminus zusätzlich mit dem Auffüllen der Deletion, kombiniert. Um Unterschiede durch die Kinase-Domäne auszuschließen, wurde in allen Fällen die Kinase-Domäne aus CPK23C verwendet (Abb. 3.19-C). Jedoch konnte in diesem Experiment kein Einfluss der SNPs auf die ABF1-abhängige Induktion des ABA-Signalweges ermittelt werden. Die Zusammensetzung des N-Terminus unterscheidet sich zwischen CPK23B und CPK23C so stark, dass hier möglicherweise einzelne Aminosäuren keine Erklärung für die beobachteten Unterschiede liefern können.

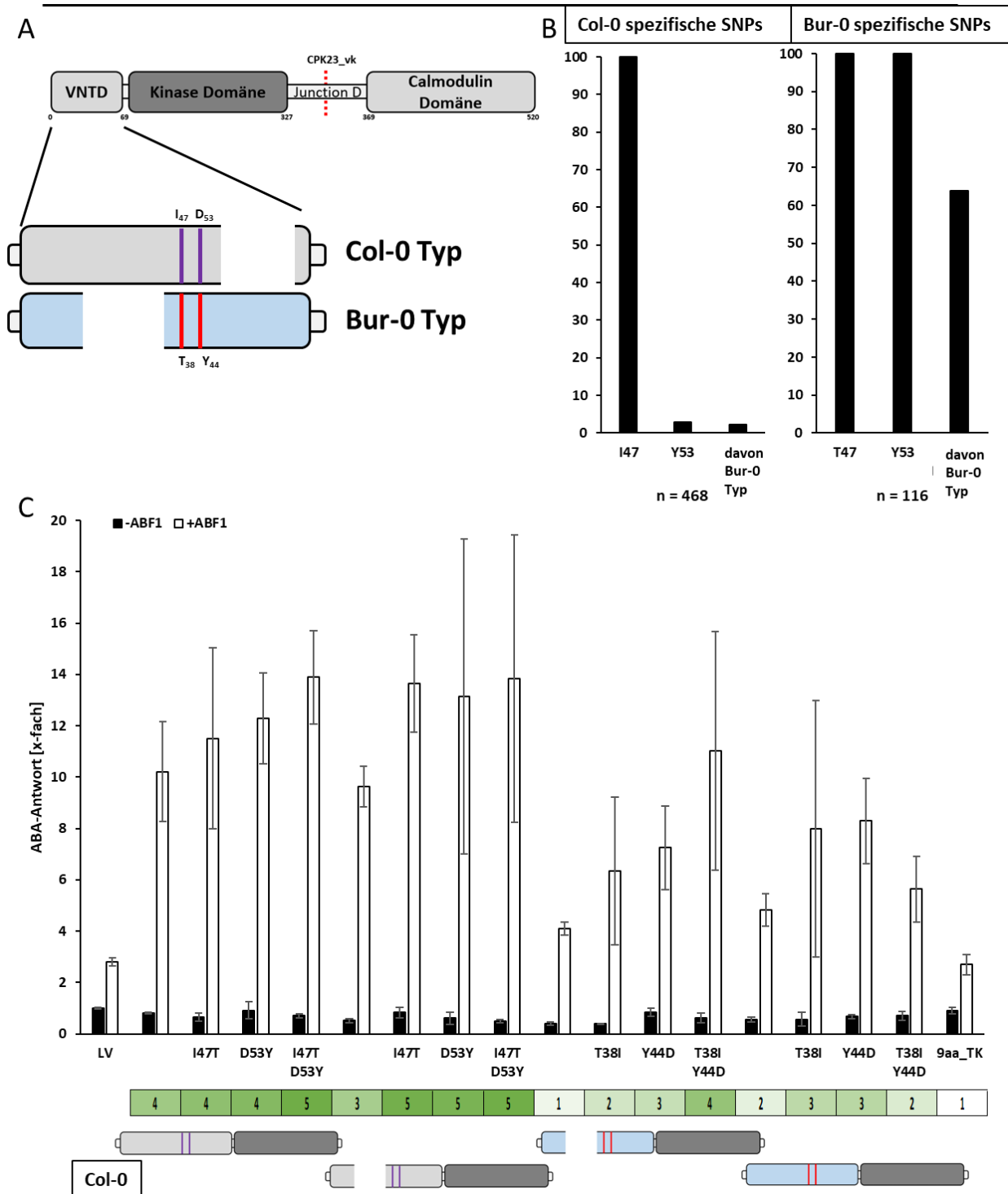


Abb. 3. 19: Einfluss Ökotyp-spezifischer SNPs in CPK23 auf die Regulation von ABF1.

(A) Abhängig davon, ob CPK23 eine Deletion aufweist (Bur-0 Typ) oder nicht (Col-0 Typ), gibt es in der umliegenden Region zwei Aminosäuren, die mit dem jeweiligen Typ korrelieren. (B) Befindet sich an Position 47 ein Isoleucin, ist an Position 53 in weniger als 5 % der Fälle ein Tyrosin zu finden. Diese Kombination entspricht dem Col-0 Typ (>95 %). Ist an Position 47 kein Isoleucin zu finden, folgt in 100 % der Fälle ein Tyrosin an Position 53. Diese Konstellation geht mit dem Bur-0 Typ (>60 %) einher. (C) Daher wurden diese Aminosäuren im Bur-0 und Col-0 N-Terminus zu dem SNP des jeweils anderen Typs mutiert. Dies wurde mit der Insertion der Deletion in den Bur-0 Typ und dem Einfügen der Deletion in den Col-0 Typ kombiniert. Bei allen generierten Konstrukten wurde die Kinase-Domäne aus

Ergebnisse

Col-0 verwendet. Die jeweils verwendete Kombination wird unter dem Diagramm schematisch angegeben. Für das Experiment wurden Col-0 Protoplasten mit 3 µg Effektor und 0 µg oder 1 µg ABF1 kotransfiziert. Nach 18 h Inkubation wurde die durch den pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase gemessen und auf die Glucuronidase-Aktivität normalisiert. Der LV-Wert bei 0 µg ABF1 diene als Referenz. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3).

3.4 Typ 2C Protein Phosphatasen (PP2Cs) in der CPK23-abhängigen ABA-Antwort

Die Gruppe A der PP2Cs (bestehend aus ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, AHG1, PP2Ca, HAI1, HAI2, und HAI3) spielt eine wichtige Rolle im ABA-Signalweg und reguliert diesen negativ. Diese negative Regulation erfolgt via der De-Phosphorylierung von Komponenten des ABA-Signalweges, insbesondere von SnRK2-Kinasen, und kann erst durch die ABA-abhängige Inhibierung der PP2Cs mittels Bindung an die ABA-Rezeptoren RCARs aufgehoben werden (Raghavendra et al., 2010) (Fuchs et al., 2014). Auch CPKs könnten negativ durch PP2Cs reguliert werden. Für CPK23 wurde in Y2H-Assays eine starke Interaktion mit PP2CA gezeigt (Czap, 2015). In Reporter-Assays in pSAR-Hefezellen konnte PP2CA die CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges über ABF2 jedoch nur leicht inhibieren (Ruschhaupt, 2018). Auch für ABFs konnte in Y2H bereits eine Interaktion mit verschiedenen PP2Cs gezeigt werden (Lynch et al., 2012). Die meisten Interaktions-Studien wurden jedoch in Hefe durchgeführt und lassen daher möglicherweise nicht direkt auf die in Pflanzen ablaufenden Interaktionen schließen: Proteine können in Pflanzen anders als in Hefe lokalisiert und zusätzlich differentiell modifiziert sein (Bassham and Raikhel, 2000).

3.4.1 Der Einfluss von PP2Cs auf CPK23

Ein Problem der bisher gezeigten Interaktionen zwischen CPKs und PP2Cs ist, dass diese zumeist über Interaktions-Studien in Y2H-Assays erbracht wurden. Y2H-Assays haben jedoch Limitierungen und sind nicht immer zwingend zielführend. Besonders bei Betrachtung der Interaktion zwischen membran-assoziierten Proteinen oder Proteinen, die in spezifischen Zell-Organellen lokalisiert sind, kann die Wirtszelle Einfluss auf diese nehmen. Die Ergebnisse solcher Studien bilden daher nicht immer die in Pflanzen ablaufenden Interaktionen wahrheitsgemäß ab (Fujikawa and Kato, 2007). Um diese Limitierung zu umgehen und mögliche Interaktionen zwischen CPK23 und PP2Cs der Gruppe A zu analysieren, wurde daher ein *Split*-Luciferase Ansatz gewählt. In diesem System werden jeweils Hälften des Firefly Luciferase-Gens (FLUC) an auf Interaktion zu testende Proteine fusioniert. Wenn die Fusions-Proteine miteinander eine Interaktion eingehen, nähern sich die beiden Hälften an und die

Ergebnisse

katalytische Aktivität der Luciferase wird wieder hergestellt. Die Stärke des wiederhergestellten Luciferase-Signals lässt dabei direkt auf die Stärke der Protein-Interaktion schließen. Damit kann die Stärke einer Interaktion direkt in Arabidopsis-Zellen quantifiziert werden (Li et al., 2011). Um die Lokalisation von CPK23 nicht zu beeinträchtigen, erfolgte die Fusion der Luciferase-Hälften jeweils C-terminal. N-terminale Fusionen hätten zur Aufhebung der Membran-Assoziation von CPK23 geführt. In den Experimenten zeigten stets die beiden LV-fusionierten Luciferase-Hälften die stärkste Interaktion. Zusätzliches Einbringen eines Partner-Proteins schwächte die Interaktion mit der korrespondierenden LV-Fusion jedoch ab. Daher wurde in den Experimenten stets ermittelt, inwieweit die geschwächte Protein-LV Interaktion wieder hergestellt werden kann, wenn statt des LVs ein möglicher Interaktions-Partner koexprimiert wird. Die so ermittelten Änderungen werden als Tabelle unter den Ergebnis-Diagrammen wieder gegeben. Das Experiment wurde in *aba2-1* Protoplasten in Ab- (Abb. 3.20-A) und Anwesenheit von ABA (Abb. 3.20-B) durchgeführt. RCAR1 zeigte in diesen Assays eine Interaktion mit den meisten PP2Cs. Bei Koexpression mit ABI1, HAI1, HAI3 und PP2CA wurde das Luciferase-Signal im Vergleich zu entsprechenden LV-Kontrollen um Faktor 3-5 (0 μ M ABA), beziehungsweise 4-8 (5 μ M ABA) wiederhergestellt. CPK23 zeigte hingegen nur eine 6 – 8-fache Interaktion mit HAB1 und 6-fache Interaktion mit HAI1. Letztere erfolgte nur in Gegenwart von exogenem ABA (Abb. 3.20-A/B). Die Interaktionen konnten dabei nur für membranständiges CPK23, nicht aber für 9aa_CPK23C, beobachtet werden. Dies könnte ein Grund sein, warum die hier beobachteten Interaktionen vorher nicht in Y2H Assays ermittelt werden konnten. Da in diesen der GAL4-TAG meist N-terminal angebracht wird, werden Assoziationen mit der Membran verhindert. Die für CPK23 in Y2H-Assays beschriebene Interaktion mit PP2CA konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden (Czap, 2015). Möglicherweise kann diese in Hefe zwar erzwungen werden, ist aber nicht natürlich und findet daher nicht in Pflanzen statt. Es muss jedoch angemerkt werden, dass das entstehende Luciferase-Signal stark gedrückt wurde, wenn eine der CPK23-FLUC Varianten koexprimiert wurde. Möglicherweise erschwert die Faltung von CPK23 die Interaktion mit der jeweils anderen Luciferase-Hälfte. Dies könnte dazu führen, dass nicht alle möglichen CPK23-Interaktionen ermittelt werden können.

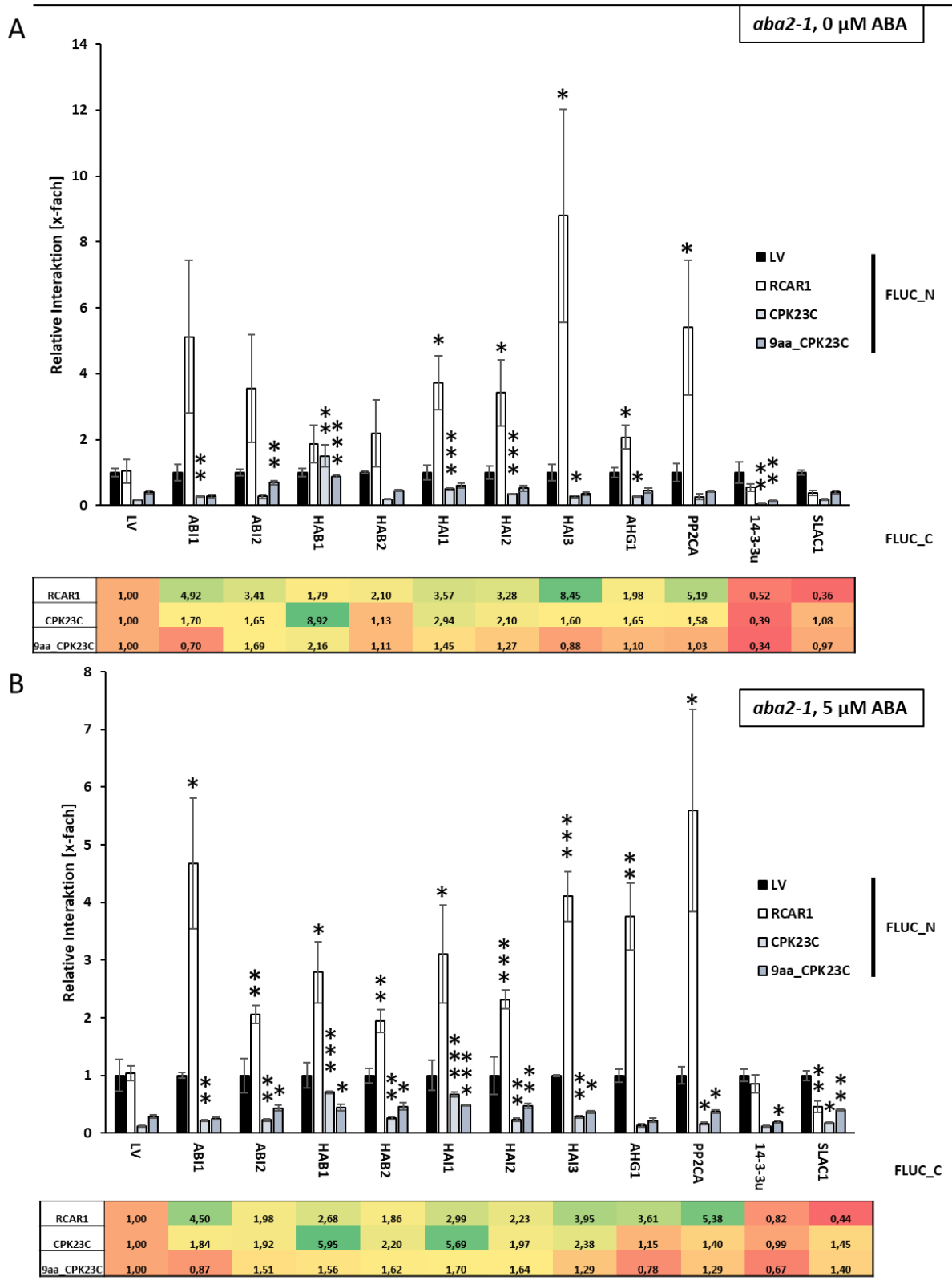


Abb. 3. 20: Interaktionen zwischen CPK23 und PP2Cs in *split*-Luciferase Assays.

Um zu testen, ob CPK23 *in-planta* mit PP2Cs interagieren kann, wurde der *split*-Luciferase Assay verwendet. (A/B) Für das Experiment wurde je eine Hälfte des Luciferase-Gens an CPK23 und die andere Hälfte an die auf Interaktion-zu-testenden PP2Cs gehängt. Bei Interaktion entsteht eine funktionale Luciferase. Die entstandene Luciferase-Aktivität wurde auf die Glucuronidase-Aktivität

Ergebnisse

normalisiert. Zusätzlich wurde auf die Interaktion mit dem LV normalisiert. Dieser Schritt wurde gewählt, da die höchste Interaktion zwischen LV und LV erfolgte, zusätzliche Komponenten anstelle des LVs jedoch die maximal mögliche Interaktions-Intensität herabsetzen. Der Unterschied der Interaktion zwischen CPK23/RCAR1 und den PP2Cs im Vergleich zu diesem Referenz-Wert wurde errechnet und in den Tabellen unterhalb der Diagramme eingetragen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich mit der jeweiligen Effektor/LV-Kombination. Das Experiment wurde zusätzlich für entsprechende CPK23-Varianten aus Bur-0 und Ler-0 mit vergleichbaren Tendenzen durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob CPK23 nicht durch PP2CA reguliert wird, obwohl vorherige Arbeiten dies suggerieren (Czap, 2015), wurde der Einfluss von PP2CA auf den CPK23-abhängig induzierten ABA-Signalweg untersucht. Dafür wurde zunächst PP2CA in steigenden Konzentrationen mit ABF2 und CPK23 in Col-0 Protoplasten koexprimiert und anschließend die PP2CA abhängige Reprimierung des pRD29B:LUC-Reporters ermittelt (Abb. 3.21-A). Dabei konnte gezeigt werden, dass PP2CA den CPK23-abhängig induzierten Signalweg effektiv inhibierte (Reduktion um Faktor 5). Dies konnte jedoch in geringerem Umfang auch bereits in Abwesenheit von CPK23 beobachtet werden (Reduktion um Faktor 2). Daher wurde im folgenden Experiment zusätzlich untersucht, ob CPK23 die PP2CA abhängige Inhibierung wieder aufheben kann. Zu einer inhibierenden PP2CA-Konzentration (1 µg) wurden dafür in Gegenwart von ABF2 die Effektoren titriert (Abb. 3.21-B). Für CPK23 konnte dabei gezeigt werden, dass dieses in hohen Konzentrationen die PP2CA-vermittelte Inhibierung des ABF2-abhängig induzierten ABA-Signalweges wieder aufhob. Bei einer Konzentration von 10 µg CPK23 wurde der ABA-Signalweg über ABF2 30-fach induziert. Für eine aktive SnRK2.6 Variante (SnRK2.6_d320) konnte dies nicht beobachtet werden. Die für CPK23 beobachtete Inhibierung durch PP2CA erfolgt dementsprechend wahrscheinlich nicht auf Stufe des CPKs, sondern des ABFs. Während membrangebundenes CPK23 den ABA-Signalweg über ABF1 nur in Abwesenheit von ABA induzierte (Abb. 3.21-C), konnte SnRK2.6_d320 dies nur in Gegenwart von exogenem ABA bewerkstelligen (Abb. 3.21-D). Um einen Effekt auf die TFs des ABA-Signalweges zu haben, muss SnRK2.6 erst zusätzlich ABA-abhängig aktiviert werden. Folglich kann auch erst in Gegenwart von ABA ein Effekt von PP2CA auf die SnRK2.6 abhängige pRD29B:LUC-Induktion ermittelt werden. Diese fiel jedoch stärker aus, als es in Abwesenheit von ABA für CPK23 der Fall war. Bereits 0,3 µg PP2CA reduzierten in Gegenwart von SnRK2.6_d320 und ABA die Induktion des ABA-Signalweges um Faktor 10. Bei gleicher PP2CA-Konzentration in Gegenwart von CPK23 und Abwesenheit von ABA erfolgte hingegen nur eine Reduktion um Faktor 3. Dies könnte auf eine direkte negative Regulation von SnRK2.6 durch PP2CA hinweisen.

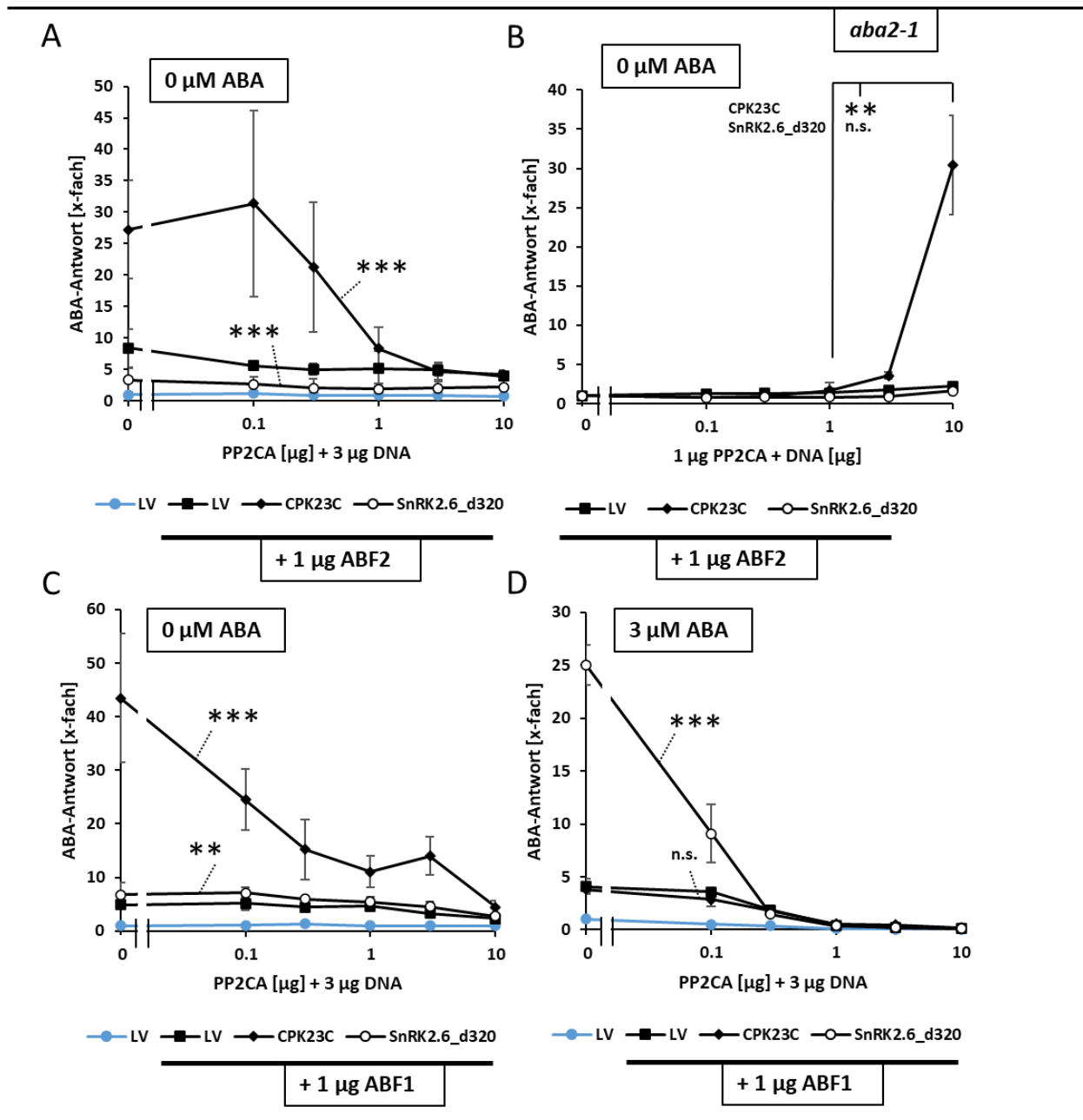


Abb. 3. 21: Einfluss von CPK23 auf die PP2CA-abhängige Reprimierung des ABA-Signalweges.

Die Experimente wurden in *aba2-1* Protoplasten durchgeführt. (A/C/D) 3 μg Effektor wurden mit den angegebenen ABFs und PP2CA in steigender Konzentration koexprimiert. (B) Alternativ wurden steigende Konzentrationen der jeweiligen Effektoren mit 1 μg PP2CA und ABF2 koexprimiert. Nach 18 h wurde jeweils die durch den pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase gemessen und auf die entsprechende Glucuronidase-Aktivität normalisiert. Der LV-Wert mit der geringsten Konzentration (B), beziehungsweise der LV-Wert bei der niedrigsten PP2CA-Konzentration in Abwesenheit von exogenen ABFs (A/C/D) wurde jeweils als Referenz genommen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen verschiedenen Effektoren bei einer Konzentration von 1 μg und 10 μg (B), beziehungsweise (two-way ANOVA) im Vergleich mit den entsprechenden LV-Werten bei ABF-Koexpression (A/C/D). Die Experimente wurden mit vergleichbarem Ergebnis für AHG1 durchgeführt.

Ergebnisse

Um zu ermitteln, ob die in *split*-Luciferase Assays gezeigten Interaktionen von CPK23 mit PP2Cs auch in Y2H beobachtet werden kann, wurde das entsprechende Interaktions-Experiment auch in AH109-Hefezellen durchgeführt. Im Gegensatz zu früheren und analog zu den gezeigten *split*-Luciferase-Experimenten, wurde die GAL4-Bindedomäne C-terminal an CPK23 fusioniert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass eine Membran-Assoziation von CPK23 bestehen bleibt. Jedoch konnte für keine der getesteten CPK23/PP2C Kombinationen eine Interaktion gezeigt werden (Abb. 3.22). Möglicherweise ist der Nachweis einer Interaktion mit membran-assoziierten CPK23 in Hefezellen schwierig. Alternativ ist es möglich, dass die Calmodulin-Domäne ebenfalls wichtig für die Interaktion mit PP2Cs ist. Diese fehlt in den gezeigten Experimenten, da in dieser Arbeit hauptsächlich mit C-terminal verkürzten Varianten gearbeitet wurde. Ebenfalls möglich ist, dass die Faltung der CPK23-Fusionsproteine eine Interaktion mit möglichen Partnern erschwert. Ähnliches wurde bereits in den vorangegangenen *split*-Luciferase-Assays gemutmaßt.

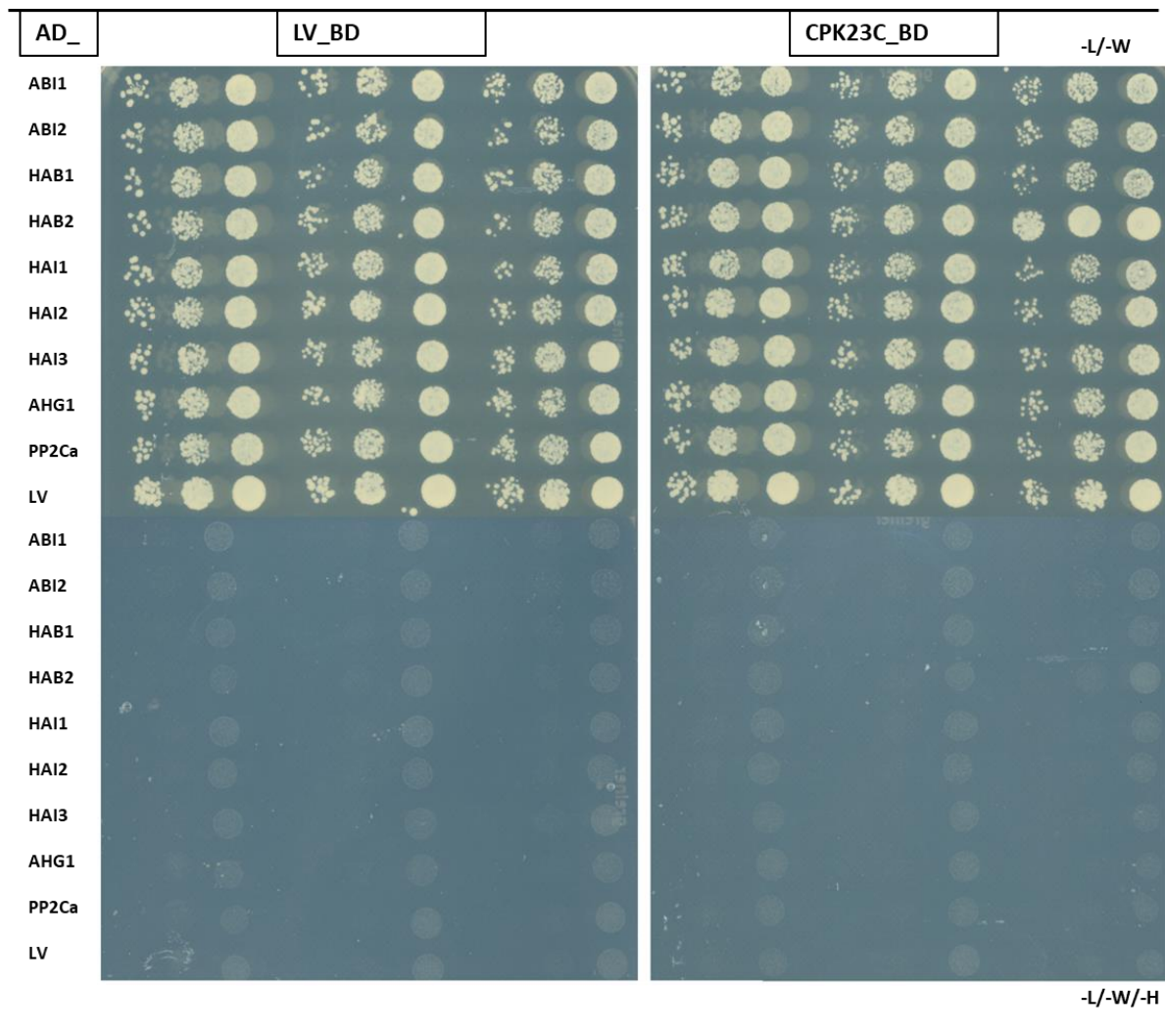


Abb. 3. 22: Interaktionen zwischen CPK23 und PP2Cs in Y2H Assays.

Ergebnisse

Für das Experiment wurde CPK23 vor eine C-terminale GAL4_Bindedomäne fusioniert und die PP2Cs mit einer N-terminalen GAL4-Aktivierungsdomäne versehen. Die Konstrukte wurden unter der Kontrolle des ADH-Promotors in AH109-Hefezellen kotransformiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungsstufen (1000-, 100-, 10-Zellen) auf SD-Platten mit selektiven Aminosäuren (-L/-W und -L/-W/-H) ausplattiert (n=3). Das Koloniewachstum wurde nach 3 Tagen dokumentiert.

3.4.2 Der Einfluss von PP2Cs auf ABF1

Die CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalwegs über ABFs konnte durch PP2CA inhibiert werden. Da aber hohe Konzentrationen an CPK23 diese Inhibierung negierten, kann geschlussfolgert werden, dass eine PP2CA abhängige Inhibierung des ABA-Signalweges auf Ebene der ABFs erfolgt. In anderen Arbeiten konnte bereits eine Interaktion der ABFs mit den PP2Cs AHG1, PP2CA und ABI1 in Y2H gezeigt werden. Aufgrund von Autoaktivierung sind die dort gezeigten Ergebnisse für ABF1 jedoch nicht eindeutig (Lynch et al., 2012). Um zu überprüfen welche PP2Cs in der Lage sind mit ABF1 zu interagieren, wurden die verschiedenen ABF1-PP2C-Kombinationen in *split*-Luciferase Assays getestet. Das Experiment wurde in Ab- (Abb. 3.23-A) und Anwesenheit von exogenem ABA (Abb. 3.23-B) durchgeführt. Die durch Interaktion der beiden Komponenten hervorgerufene Änderung des Luciferase-Signals im Vergleich mit entsprechenden Kontrollen wird als Tabelle unterhalb des Graphen angeführt. Wenn das komplementierte Luciferase-Signal der PP2C-ABF1-Kombinationen mehr als 3-fach über der entsprechenden PP2C-LV-Kontrolle lag, wurde dies als Interaktion gewertet. In diesem Experiment konnte eine Interaktion von ABF1 mit HAB1, HAI1, HAI3, AHG1 und PP2CA gezeigt werden (Abb. 3.23-A). Diese Interaktionen erfolgten ABA-unabhängig (Abb. 3.23-A/B) und bestätigen eine direkte Regulation der ABFs durch PP2Cs. Während in Y2H auch eine direkte Interaktion von ABF1 mit ABI1 gezeigt werden konnte (Lynch et al., 2012), war dies hier nicht zu beobachten. Als nächstes wurde die PP2C-abhängige Regulation des ABF1-induzierten ABA-Signalwegs untersucht (Abb. 3.23-C/D). Damit sollten die im *split*-Luciferase Assay ermittelten Interaktionen verifiziert und die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Resultate bewertet werden. Für eine nähere Analyse wurde hierfür PP2CA (zeigte Interaktion mit ABF1) und ABI1 (zeigte keine Interaktion mit ABF1) ausgewählt. Steigende Konzentration von ABI1 (Abb. 3.23-C) und PP2CA (Abb. 3.23-D) wurden mit ABF1 in Col-0 Protoplasten kotransfiziert. Um eine mögliche CPK23-Involvierung in diesen Vorgang bewerten zu können, wurde das Experiment zusätzlich in An- oder Abwesenheit von 9aa_CPK23C durchgeführt. In beiden Fällen konnte kein Unterschied zwischen Proben mit und ohne 9aa_CPK23C ermittelt werden (Abb. 3.23-C/D). Dies entspricht den Ergebnissen der durchgeführten Interaktions-Studien. Auch in diesen konnte CPK23 weder mit PP2CA, noch mit ABI1, interagieren (Abb. 3.20-A/B). Während der ABF1-abhängig induzierte ABA-Signalweg nicht durch ABI1 reprimiert wurde, war eine deutlich

Ergebnisse

negative Regulation durch PP2CA zu erkennen. Die Induktion des pRD29B_LUC-Reporters wurde bei Koexpression von PP2CA um bis zu 90 % reduziert. Auch dies entspricht dem Ergebnis der durchgeführten Interaktions-Studien, da von den beiden hier getesteten PP2Cs nur PP2CA mit ABF1 interagieren konnte (Abb. 3.23-A/B). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass PP2Cs ABFs direkt inhibieren und eine derartige Regulation *in-planta* möglicherweise sogar häufiger abläuft, als es die Y2H Ergebnisse der zitierten Arbeit nahelegen (Lynch et al., 2012). Laut Lynch et al interagieren nur AHG1 und PP2CA mit ABF1. Hier zeigten zusätzlich auch HAB1, HAI1, HAI3 eine Interaktion mit ABF1. Dieser Zusammenhang sollte bei Analysen des PP2C-abhängigen Regulation von SnRKs und CPKs in *in-vivo* Reporter-Assays beachtet werden, da die hier koexprimierten ABFs nachweislich ebenfalls direkt durch PP2Cs reguliert werden können. Für die Analyse würde sich ABI5 empfehlen, da dieses in Y2H als einziger TF des ABA-Signalweges keine Interaktion mit PP2Cs einging (Lynch et al., 2012). Voraussetzung wäre hier jedoch eine direkte Regulation von ABI5 durch die auf PP2C-Inhibierung zu testenden Kinasen.

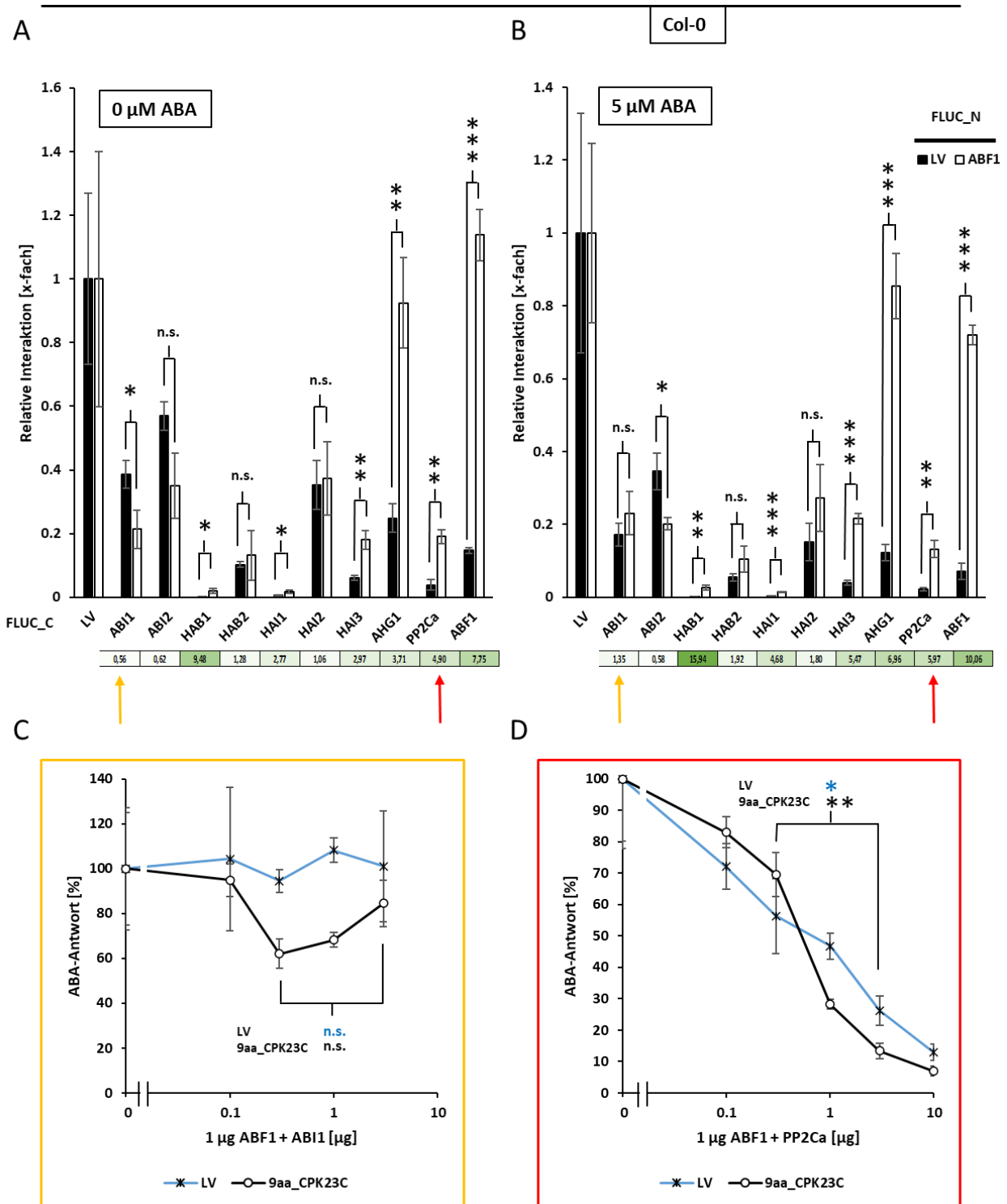


Abb. 3.23: Interaktionen zwischen ABF1 und PP2Cs in *split*-Luciferase Assays.

(A/B) Um zu zeigen, dass die Regulation des CPK23-ABF1 Komplexes durch PP2Cs bereits auf Ebene des ABF1 erfolgt, wurde im *split*-Luciferase Assay die Interaktionen zwischen PP2Cs (-FLUC_C) und ABF1 (-FLUC_N) analysiert. Die Experimente wurden in Ab- (A) und Anwesenheit von ABA (B) in Col-0 Protoplasten durchgeführt. Je 3 μg der mit den Luciferase-Hälften fusionierten Konstrukte unter dem p35S/S+1-Promotor wurden kotransformiert und die Wiederherstellung des Luciferase-Signals gemessen. Dieses wurde auf die entsprechenden Glucuronidase-Aktivitäten normalisiert. Der Unterschied zwischen den ABF1-LV- und den ABF1-PP2Cs Proben wird in den Tabellen angezeigt und

Ergebnisse

spiegelt die veränderte Affinität wider. Die Graphen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich mit der jeweiligen PP2C/LV-Kombination. (C/D) zusätzlich wurde die PP2C-abhängige Repression des durch ABF1 induzierten pRD29B:LUC-Reporters analysiert. Dafür wurden ABI1 (C) oder PP2CA (D) in steigender Konzentration gemeinsam mit 1 µg ABF1 und je 3 µg LV oder 9aa_CPK23C in Col-0 Protoplasten koexprimiert. Das durch den Reporter gebildete Luciferase-Signal wurde auf die entsprechenden Glucuronidase-Werte normalisiert. Die 0 µg PP2C-Ausgangswerte wurden jeweils auf 100 % gesetzt. Das Experiment wurde mit ABF2 mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen den Konzentrationen 0,3 µg und 3 µg PP2C für die jeweiligen Effektoren.

Um das Ergebnis des *split*-Luciferase Assays zu bestätigen, wurde das Experiment auch in Y2H wiederholt. Hierfür wurden die Gene der auf Interaktion zu untersuchenden Proteine mit einer C-terminalen GAL4-Binde- und GAL4-Aktivierungs-Domäne versehen. Dies diente zusätzlich als Kontrolle der in dieser Arbeit generierten C-terminalen GAL4-*Tags*. Viele der analysierten PP2Cs mit C-terminalen Bindedomänen-*Tag* wiesen Auto-Aktivierung auf (Abb. 3.24). Ein Wechsel der *Tags* war in dieser Zusammenstellung nicht möglich, da ABFs mit GAL4-BD-*Tag* stets ebenfalls Auto-Aktivierung zeigten. Die einzige hier ermittelte positive Interaktion fand zwischen ABF1 und AHG1 statt und entspricht in dieser dem bereits in *split*-Luciferase Assay gezeigten Ergebnis. Der generierte C-terminale *Tag* ist folglich funktional, aber nicht ideal, um PP2C-Interaktionen nachzuweisen.

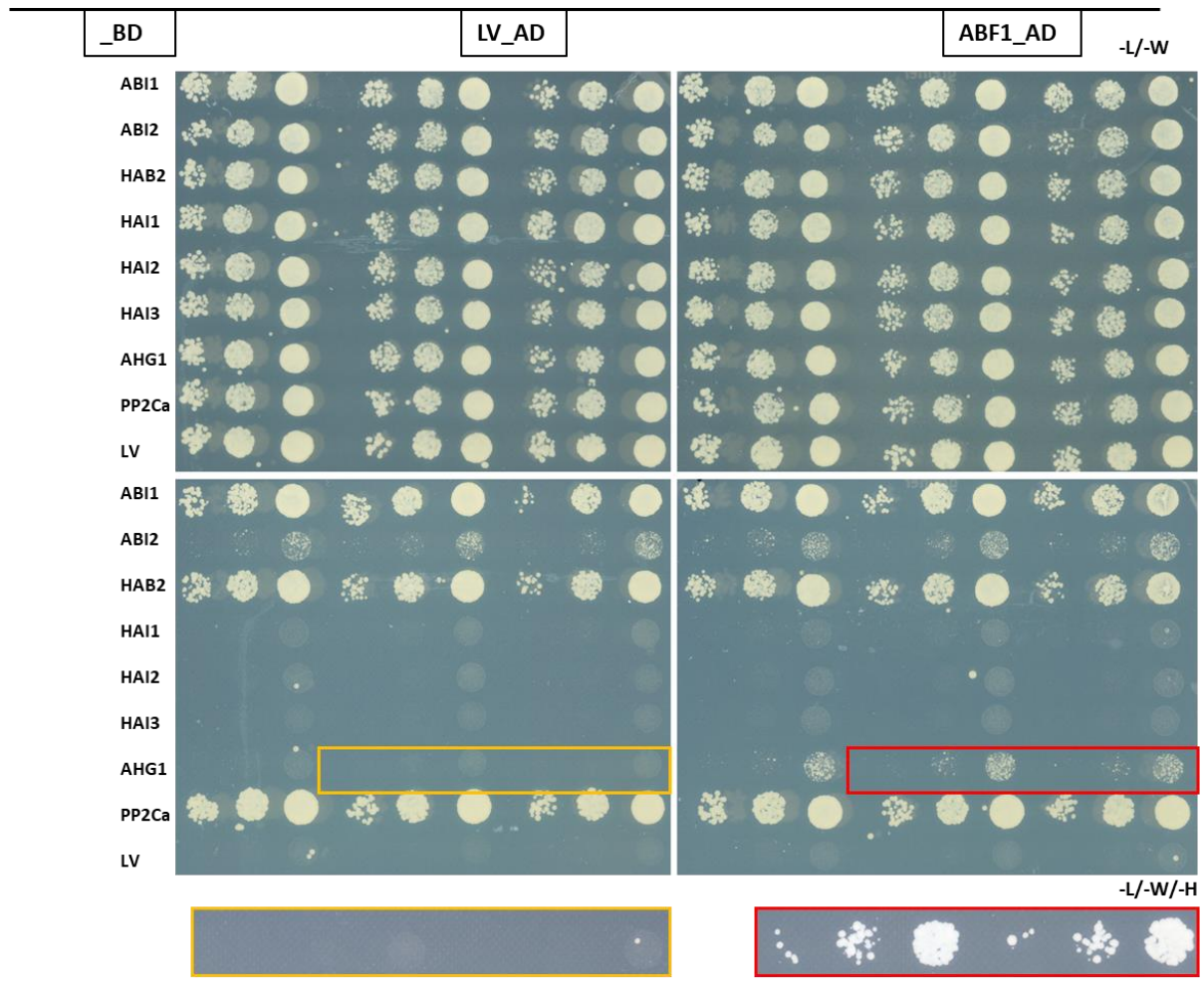


Abb. 3. 24: Interaktionen zwischen ABF1 und PP2Cs in Y2H Assays.

Um zu zeigen, dass die generierten C-terminalen GAL4-*Tags* funktional sind und die Ergebnisse des *Split*-Luciferase Assays zu bestätigen, wurde die Interaktions-Studie zwischen PP2Cs und ABF1 in Hefe wiederholt. Für das Experiment wurden PP2Cs (-GAL4-BD) mit ABF1 (- GAL4-AD) unter dem ADH-Promotor in AH109-Hefezellen koexprimiert. Die transformierten Hefezellen wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (1000-, 100-, 10-Zellen) auf SD-Platten mit selektiven Aminosäuren (-L/-W und -L/-W/-H) ausplattiert (n=3). Das Wachstum der Hefekolonien wurde nach 3 Tagen, beziehungsweise 6 Tagen (gerahmter Bildausschnitt) dokumentiert.

3.5 N-terminale Modifikationen der CPKs

Von den 34 CPKs in Arabidopsis verfügen 28 über potenzielle Myristoylierungs- und Palmitoylierungsstellen. Diese CPKs sind somit zumindest in der Theorie membranständig, können sich aber dennoch durch die umgebende Lipidschicht bewegen, um ihre jeweiligen Zielproteine zu erreichen. Auf diese Art beeinflussen CPKs membranständige Transporter und regulieren den Stomata-Schluss. Für CPK3, CPK6, CPK10, CPK21 und CPK23 ist eine solche Stomata-Regulation in Abhängigkeit von ABA und Ca^{2+} beschrieben (Mori et al., 2006). Die N-Myristoylierung durch N-Myristoyl-Transferasen (NMTs) erfolgt kotranslational, wenn ein Glycin direkt auf das Start-Methionin folgt. Eine derartige Modifikation ist irreversibel, vermittelt aber nur eine schwache Membran-Assoziation und ist für 30 der 34 CPKs aufgrund ihrer Sequenz vorhersagbar. Bis auf CPK19 konnte diese Modifikation auch in allen theoretisch myristoylierten CPKs nachgewiesen werden (Saito et al., 2018). Die Myristoylierung kann durch eine zusätzliche S-Palmitoylierung verstärkt werden, da die längere Palmitinsäure (C16) tiefer als die Myristinsäure (C14) in den Membrankern vordringt (Hemsley, 2015). Die Palmitoylierung durch Palmitoyl-S-Acyl Transferasen (PATs) erfolgt dabei, wenn eine der 6 auf das myristoylierte Glycin folgenden Aminosäuren ein Cystein ist (Castrec et al., 2018). Theoretisch existieren für 28 der CPKs aus Arabidopsis zusätzliche Palmitoylierungsstellen, konkret angenommen wird diese Modifikation jedoch nur für 22 (Yip Delormel and Boudsocq, 2019). Ein Vergleich der ersten 30 Aminosäuren der 34 CPKs aus Arabidopsis wird in Abb. 3.25 gezeigt. Bereits nachgewiesene oder konkret angenommene Modifikationen werden **rot** hervorgehoben, theoretisch zusätzlich vorhersagbare in **blau**.

3.5.1 Diverse CPKs in der ABA-Antwort

Obwohl die meisten CPKs somit theoretisch membran-assoziiert sein sollten, wurde dennoch für viele eine Funktion in der kernlokalisierten ABA-Signaltransduktion gezeigt. In den meisten Fällen handelt es sich dabei jedoch um Nachweise über *in-vitro* Kinase-Assays, bei denen die Lokalisation innerhalb der Pflanzenzelle nicht berücksichtigt wird. Da die Lokalisation der CPKs darüber entscheidet, ob eine Interaktion mit ABFs erfolgen kann, wird die Lokalisation der bisher beschriebenen ABF-regulierenden CPKs dargelegt und mit den für diese aufgrund ihrer Sequenz zu erwartenden Fettsäure-Modifikationen in Zusammenhang gebracht:

(1) **CPK4, CPK11 und CPK12** gehören aufgrund einer Deletion im N-Terminus zu nur 4 CPKs ohne mögliche Fettsäure-Modifikation. Sie phosphorylieren ABF1 und ABF4 *in-vitro*. Aufgrund der fehlenden Membran-Assoziation ist dieser Vorgang auch *in-planta* plausibel (Zhu et al., 2007).

Ergebnisse

(2) **CPK32** verfügt neben Myristoylierungs- und Palmitoylierungsstellen auch über nukleäre-Kernlokalisationssequenzen (NLS). Daher ist es sowohl an Membranen als auch im Kern lokalisiert. Es kann ABF4 *in-vitro* phosphorylieren und aufgrund seiner Lokalisation auch in Pflanzen-Zellen mit diesem interagieren (Choi et al., 2005).

(3) **CPK7, CPK10 und CPK30** sind ebenfalls über Myristoylierung und Palmitoylierung mit der Membran assoziiert. Sie ändern Nitrat-abhängig ihre Lokalisation. In einem *in-vivo* Reporter-Assay in Protoplasten konnten diese über ABF2 den ABA-Signalweg aktivieren. Zusätzlich konnte über einen Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementations (BiFC)-Assay nachgewiesen werden, dass die Interaktion im Nukleus stattfindet (Lu et al., 2013) (Liu et al., 2017a).

(4) **CPK3** gehört zu zwei myristoylierten CPKs die über kein palmitoylierbares Cystein verfügen. CPK3 kann ABF3 *in-vitro* phosphorylieren. Aufgrund der theoretisch schwachen Membranverankerung ist dieser Vorgang auch *in-planta* plausibel. Eine Lokalisation im Kern konnte hier entsprechend bereits gezeigt werden (Chang et al., 2019) (Kawamoto et al., 2015).

(5) **CPK6** verfügt über Myristoylierungs- und Palmitoylierungsstellen und sollte daher an der Membran lokalisiert sein. Laut mehreren Publikationen lokalisiert es dennoch in Nukleus und Cytoplasma. Hier erfolgt auch die Interaktion mit ABF3 und ABI5. Eine CPK6-abhängige Phosphorylierung von ABF3 und ABI5 konnte ebenfalls gezeigt werden (Zhang et al., 2019) (Kawamoto et al., 2015).

(6) **CPK16** wird ebenfalls über Myristoylierung und Palmitoylierung in der Membran verankert. Werden diese Modifikationen über Mutationen aufgehoben lokalisiert es streng in Chloroplasten. Trotzdem konnte in *in-vitro* Kinase Assays eine Phosphorylierung von ABF3 gezeigt werden (Chang et al., 2019) (Stael et al., 2011).

Die meisten der ABF-regulierenden CPKs sind damit entweder (1) nicht membran-assoziiert, (2) sowohl Membran- als auch Kern-lokalisiert oder (4) zumindest nur schwach membran-assoziiert. Einige der hier beschriebenen CPKs weichen (5) in ihrer beobachteten Lokalisation auch von der theoretisch zu erwartenden ab. Neben CPK6 zeigen auch CPK14, CPK17, CPK24, CPK27 und CPK34 trotz Myristoylierungs- und Palmitoylierungs-Stellen eine zusätzliche Kernlokalisation oder sind sogar rein cytosolisch. Diese werden, bis auf CPK6 und CPK27, jedoch in Pollen exprimiert und entsprechend erfolgte eine Lokalisationsanalyse bisher hauptsächlich in Pollenschläuchen von Tabak. Es ist folglich fraglich, inwieweit diese Lokalisationen auf Mesophyll-Zellen übertragbar sind, da CPK32 in Pollen cytosolisch vorliegt, in Pflanzenzellen aber an der Membran und aufgrund der NLS ebenfalls im Kern lokalisiert (Kawamoto et al., 2015) (Zhou et al., 2009) (Choi et al., 2005). CPK1, CPK2, CPK5, CPK19, CPK20 und CPK25 verfügen in ihrer N-terminalen Aminosequenz zwar über ein Cystein, eine zusätzliche Palmitoylierung wird für diese jedoch nicht angenommen oder konnte zumindest noch nicht gezeigt

Ergebnisse

werden (Yip Delormel and Boudsocq, 2019). Trotzdem sind CPK2, CPK19 und CPK25 an der Membran lokalisiert (Boudsocq et al., 2012). Besonders bei CPK19 ist dieser Befund erstaunlich, da es sich bei diesem um das einzige CPK handelt, für welches auch eine Myristoylierung trotz Glycin an Position 2 nicht nachweisbar war. CPK1 lokalisiert im Peroxisom, CPK5 hingegen kann im Nukleus beobachtet werden (Yip Delormel et al., 2022) (Yip Delormel and Boudsocq, 2019) (Damman et al., 2003), auch wenn vereinzelte Quellen eine reine Membranlokalisation für CPK5 nahelegen (Liu et al, 2017). Die hier geschilderten Lokalisationen werden in Abb. 3.25 den jeweiligen CPKs zu geordnet. Stimmt die Membranlokalisation mit den beschriebenen N-terminalen Modifikationen überein, wurde die entsprechende Lokalisation **rot** hervorgehoben. CPKs mit einer beschriebenen Funktion im ABA-Signalweg sind zusätzlich **grün** hinterlegt.

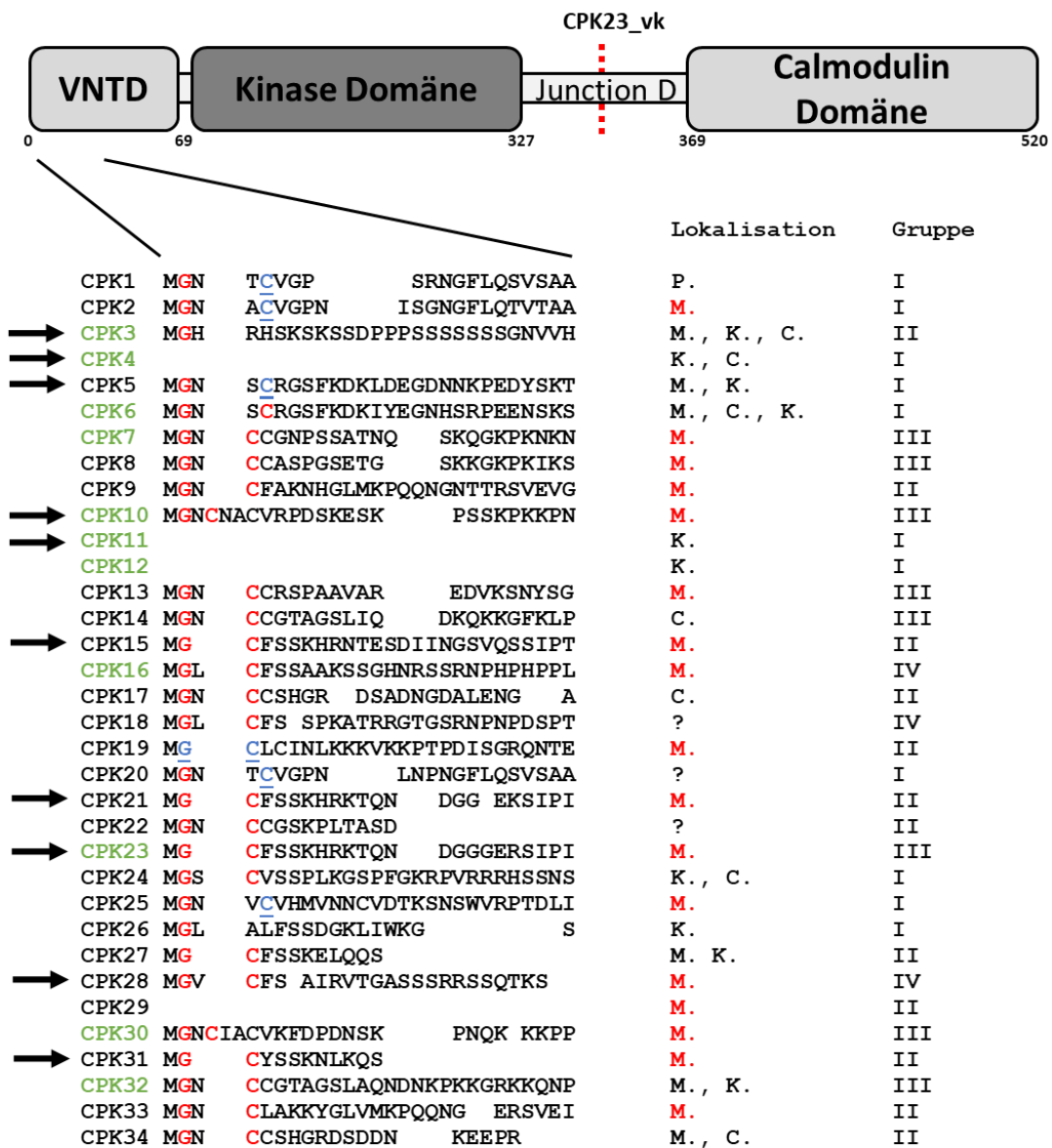


Abb. 3. 25: Natürliche N-terminale Modifikationen von CPKs.

Ergebnisse

Die Aminosäuresequenzen der 34 CPKs aus Arabidopsis wurde der NCBI-Datenbank entnommen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Die theoretisch möglichen N-terminalen Modifikationen wurden anhand (Castrec et al., 2018) ermittelt. Nachgewiesene oder vermutete Modifikationen wurden (Yip Delormel and Boudsocq, 2019) (Saito et al., 2018) und (Boudsocq et al., 2012) entnommen und in **Rot** hervorgehoben. Ist eine Modifikation aufgrund der Aminosäuresequenz theoretisch möglich, aber nicht nachgewiesen, wurde die Aminosäure **blau** eingefärbt. Die aufgelisteten Lokalisationen (P. = Peroxisom, K. = Kern, C. = Cytosol, M. = Membran) entstammen (Damman et al., 2003) (Kawamoto et al., 2015) (Boudsocq et al., 2012) (Zhou et al., 2009) (Damman et al., 2003) (Lee et al., 2021). Entsprechend der nachgewiesenen Membranlokalisation dabei den angenommenen N-terminalen Modifikationen, wurde die Lokalisation zusätzlich **rot** hervorgehoben. CPKs mit möglicher Involvement im ABA-Signalweg wurden **grün** eingefärbt. CPKs welche in dieser Arbeit näher analysiert werden, wurden mit einem **Pfeil** gekennzeichnet.

Um zu überprüfen ob weitere CPKs, trotz vorhergesagter Membran-Assoziation, den ABA-Signalweg in *in-vivo* Reporter Studien ebenfalls über ABFs regulieren können, wurden CPKs aus unterschiedlichen Untergruppen analysiert. Aus Untergruppe 1 wurde **CPK4, 5 und 11**; aus Untergruppe 2 wurde **CPK3, 31, 15, 21 und 23**; aus Untergruppe 3 wurde **CPK10**; und aus Untergruppe 4 wurde **CPK28** ausgewählt. Die gewählten CPKs wurden in Col-0 Protoplasten (Abb. 3.26-A) oder pSAR-Hefezellen (Abb. 3.26-B) exprimiert und die Induktion eines pRD29B:LUC-Reporters (Protoplasten) oder eines p4xABRE:LUC-Reporters (pSAR-Hefezellen) analysiert. Bei den Experimenten in Protoplasten wurden zusätzlich alle 4 ABFs koexprimiert. Der Versuch in Hefe wurde in Gegenwart von ABF2 durchgeführt und diente dem Nachweis einer direkten ABF-Regulation. Wie zu erwarten, induzierten die nicht-Membran-assoziierten CPKs (CPK4 und CPK11) den ABA-Signalweg in Protoplasten über alle 4 ABFs stark (bis zu 12-fache Induktion) (Abb. 3.26-A). Auch in pSAR-Hefezellen konnte der p4xABRE:LUC-Reporter über ABF2 positiv reguliert werden (20-fache Induktion) (Abb. 3.26-B). Die beobachtete Induktion war im Vergleich zu anderen CPKs jedoch schwach. Möglicherweise werden ABFs in Protoplasten zusätzlich auch indirekt über CPK4 und CPK11 aktiviert, beispielsweise indem andere Komponenten des ABA-Signalweges phosphoryliert werden. CPK5, ebenfalls aus Untergruppe 1, induzierte den Reporter im Hefe-System 5-mal stärker als diese (100-fache Induktion) (Abb. 3.26-B), zeigte im Protoplasten-System jedoch nur eine geringe Aktivierung der ABFs (3-fache Induktion) (Abb. 3.26-A). Möglicherweise ist in Protoplasten die Membranbindung durch die zwei möglichen N-terminalen Modifikationen zu stabil, während diese in Hefe durch die starke pGAL1-abhängige Expression aufgehoben werden kann. Allerdings wurde für CPK5 nur eine Myristoylierung nachgewiesen, eine Palmitoylierung wird hier hingegen nicht angenommen. Entsprechend kann CPK5 neben der Membran auch im Kern lokalisieren (Yip Delormel et al., 2022). Dass nur myristoylierte CPK3 konnte den ABA-Signalweg ebenfalls über die ABFs positiv regulieren. Die im Hefe-System beobachtete Induktion (50-

Ergebnisse

fach) (Abb. 3.26-B) war dabei deutlich stärker als die im Protoplasten-System (3-fach) (Abb. 3.26-A). Möglicherweise wird die CPK3-Funktion in Pflanzen zusätzlich negativ reguliert, während die entsprechenden Regulatoren in Hefe nicht vorhanden sind. Ein ähnlicher Vorgang ist für CPK5 denkbar. Die restlichen untersuchten CPKs aus Untergruppe 2 (CPK15, 21 und 31) waren mit Ausnahme von CPK23 komplett inaktiv. CPK10 aus Untergruppe 3 war in der Lage, trotz Myristoylierung und Palmitoylierung, den Signalweg in Hefen (100-fache Induktion) und Protoplasten (8 – 12-fache Induktion) stark zu induzieren. CPK28 aus Untergruppe 4 war hingegen inaktiv. Erstaunlicherweise konnte im Hefe-System nur die Aktivität von CPK23 durch das Einbringen einer artifiziellen N-terminalen Modifikation (9aa) gesteigert werden. Auf die anderen hier getesteten CPKs hatte diese Modifikation keinen Einfluss (Abb. 3.26-C). Alle in diesem System aktiven CPKs regulierten ABF2 ABA-unabhängig. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 6 von den 10 untersuchten CPKs den ABA-Signalweg positiv regulieren (CPK3, CPK4, CPK5, CPK10, CPK11 und CPK23). Bis auf CPK4 und CPK11 sind diese potenziell über Fettsäure-Modifikationen mit der Membran assoziiert, auch wenn die tatsächliche Lokalisation von der theoretisch zu erwartenden abweichen kann.

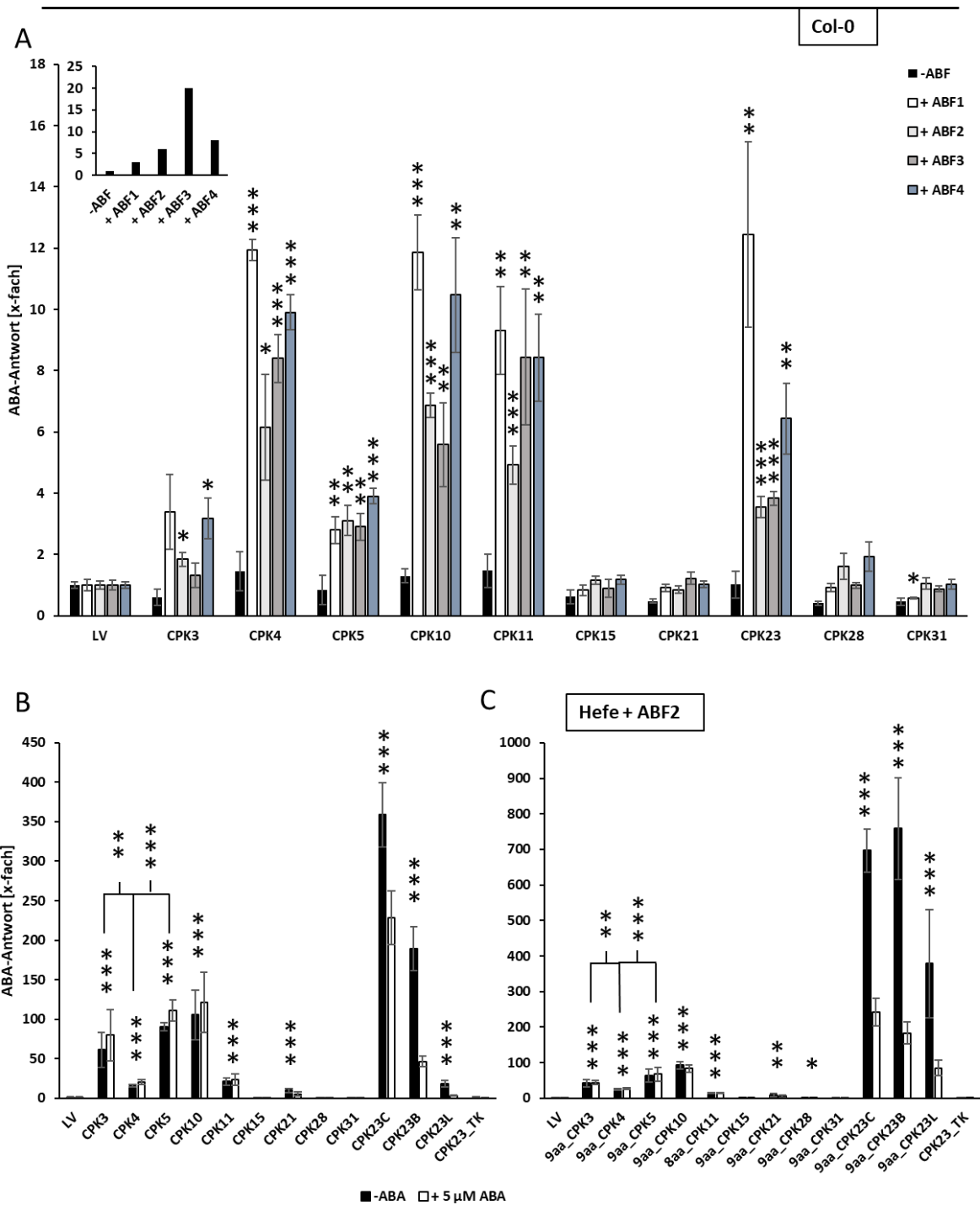


Abb. 3. 26: Regulation von ABFs durch N-terminal unmodifizierte CPKs.

(A) Col-0 Protoplasten wurden mit 3 μg Effektor und je 1 μg der unterschiedlichen ABFs (ABF1/ABF2/ABF3/ABF4) transfiziert. Die durch den pRD29B:LUC Reporter gebildete Luciferase wurde auf die entsprechende Glucuronidase-Aktivität normalisiert. Als Referenz diente jeweils der LV-Wert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen ($n=3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (one-way ANOVA) im Vergleich mit dem entsprechenden LV-Wert. Die durch die einzelnen ABFs hervorgerufene Induktion wird in einem separaten Diagramm dargestellt. (B/C) Für das Experiment in pSAR-Reporterhefen wurden Effektoren ((B) CPKs oder (C) 9aa_CPks) unter Kontrolle des pGAL-Promotors mit ABF2 kotransformiert. Die Expression wurde durch Galactose-Zugabe gestartet und die

Ergebnisse

durch den Reporter gebildete Luciferase auf die OD₆₀₀ der Hefe-Zellen normalisiert. Der jeweilige LV diente als Referenz. Das Experiment wurde in An- und Abwesenheit von exogenem ABA durchgeführt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) der Proben mit 0 µM ABA im Vergleich zum LV-Wert mit 0 µM ABA, sowie zusätzlich zwischen CPK4 und CPK3/CPK5.

3.5.2 Aminoternale Aktivierungsmechanismen für CPK23

Neben CPK23 konnten in dieser Arbeit auch weitere CPKs mit vorhergesagten N-terminalen Modifikationen den ABA-Signalweg direkt über ABFs induzieren (Abb. 3.26). Da die entsprechenden CPKs über Fettsäuren mit der Membran assoziiert sind, ist es fraglich, wie diese in räumliche Nähe zu den durch sie regulierten, kernlokalisierten, ABFs gelangen können. Bisher konnte nur für CPK10, 30 und 32 eine Membranablösung unter bestimmten Bedingungen gezeigt werden, in diesen Fällen durch exogene Nitrat-Zugabe (Liu et al., 2017a). Der zu Grunde liegende Mechanismus konnte jedoch nicht gänzlich aufgeklärt werden. Eine Möglichkeit wäre die Phosphorylierung von, mit der Membran in Kontakt stehenden, Aminosäuren. Diese zusätzliche negative Ladung würde die elektrostatische Wechselwirkung mit der Membran abschwächen (Thelen et al., 1991). Die S5D Mutation ahmt für CPK23 eine solche Regulation nach. Ein weiterer denkbarer Mechanismus ist der *Myristoyl-switch*. Dieser wurde bisher ausschließlich in Säugetieren beschrieben und bezeichnet das Ein- und Ausklappen des Myristoylrests in eine hydrophobe Tasche des Proteins (Senin, 2002). Auch wenn der Myristoyl-Rest in das Protein einklappt, würde die stabile Palmitoyl-abhängige Bindung an die Membran jedoch trotzdem bestehen bleiben. Eine Lokalisations-Änderung wäre für entsprechend regulierte CPKs folglich unwahrscheinlich. Auch ist es nicht möglich diese Regulation für CPK23 adäquat nachzustellen. An CPK23_G2A kann zwar keine Myristinsäure mehr angehängt werden, gleichzeitig unterbleibt hier aber auch die Palmitoylierung. CPK23_G2A ist folglich nicht nur demyristoyliert, sondern immer auch zusätzlich depalmitoyliert. Trotzdem wurde diese Variante generiert, um die Aktivität von nicht-myristoyliertem CPK23 mit depalmitoyliertem CPK23 vergleichen zu können. Die Depalmitoylierung stellt einen plausibleren Aktivierungsmechanismus dar und wurde bisher hauptsächlich in Säugetieren analysiert. In diesen wird die Thioester-Bindung der Palmitinsäure durch Acyl-Protein-Thioesterasen (APT1/2) oder ABHD17 Enzymen hydrolysiert (Won et al., 2018). Dieser Mechanismus ist auch für CPKs denkbar, da die verbleibende Myristoylierung wahrscheinlich nicht die Membran-Assoziation aufrechterhalten kann. Eine derartige Regulierung kann für CPK23 über eine C3A Mutation nachgeahmt werden. In diesem Fall bleibt die Myristoylierung erhalten, nur eine zusätzliche Palmitoylierung erfolgt nicht mehr. Die hier beschriebenen artifiziellen N-terminalen Modifikationen und ihre möglichen Umkehrungen werden in Abb. 3.27-A zusammengefasst. Um zu untersuchen welche dieser möglichen Modifikationen zu einer N-terminalen Aktivierung führen,

Ergebnisse

wurde CPK23_G2A (Mimik des Myristoyl-switches, beziehungsweise eines nicht-myristoylierten CPKs) und CPK23_C3A (Mimik eines depalmitoylierten CPKs) in Col-0 Protoplasten (Abb. 3.27-B) und pSAR-Hefezellen (Abb. 3.27-C) exprimiert. Sowohl CPK23_G2A, als auch CPK23_C3A Varianten, waren in Protoplasten hoch aktiv und induzierten den pRD29B:LUC-Reporter bereits ohne koexprimierte ABFs 20-fach. Wurde zusätzlich ABF1 koexprimiert stieg die Induktionsrate auf 150-fach an. Die restliche Zusammensetzung des N-Terminus hatte hierbei keinen Einfluss auf das Ergebnis. Bei Verwendung einer identischen Kinase-Domäne (Col-0) führten die eingebrachten Mutationen für alle untersuchten N-Termini (CPK23C-, CPK23B- und CPK23L- N-Terminus) zu einer ABF-abhängigen Aktivierung des ABA-Signalweges im jeweils gleichen Umfang (Abb. 3.27-B). Wenn die aktivierten N-Termini keine ökotypischen Unterschiede hinsichtlich der ABF-Induktion zeigen, ist folglich auch die Affinität der N-Termini zu den ABFs identisch. Beobachtete Unterschiede zwischen den nativen N-Termini legen vielmehr eine differentielle Regulation auf Ebene der N-Termini selbst nahe. Das analoge Experiment in pSAR-Reporter-Hefen mit koexprimiertem ABF4 zeigte ein vergleichbares Ergebnis: Bereits native Varianten konnten hier bei Verwendung der identischen Kinase-Domäne (Col-0) den p4xABRE:LUC-Reporter 150-fach induzieren. Im Unterschied zu Experimenten im Protoplasten-System konnten hierbei keine Unterschiede zwischen den verwendeten N-Termini festgestellt werden. Das Einbringen der G2A- und C3A-Mutation steigerte die Induktion des Reporters für alle analysierten CPK23-Varianten auf das 500 – 600-fache. (Abb. 3.27-C). Insgesamt kann hier geschlussfolgert werden, dass eine Depalmitoylierung CPK23 potenziell aktivieren kann. Nur durch die Myristoylierung allein kann die Membran-Assoziation nicht aufrechterhalten werden. Entsprechend werden für depalmitoyliertes CPK23 dieselben Induktionsraten wie für zusätzlich auch demyristoyliertes CPK23 erreicht. Da die Ergebnisse nahelegen, dass der Hauptteil der CPK23-Assoziation mit der Membran durch die Palmitoylierung erfolgt, ist eine Umkehrung der Myristoylierung als Aktivierungsmechanismus unrealistisch. Die Umkehrung der Palmitoylierung ist folglich bei einem möglichen N-terminalen Aktivierungs-Prozess der kritische Aspekt.

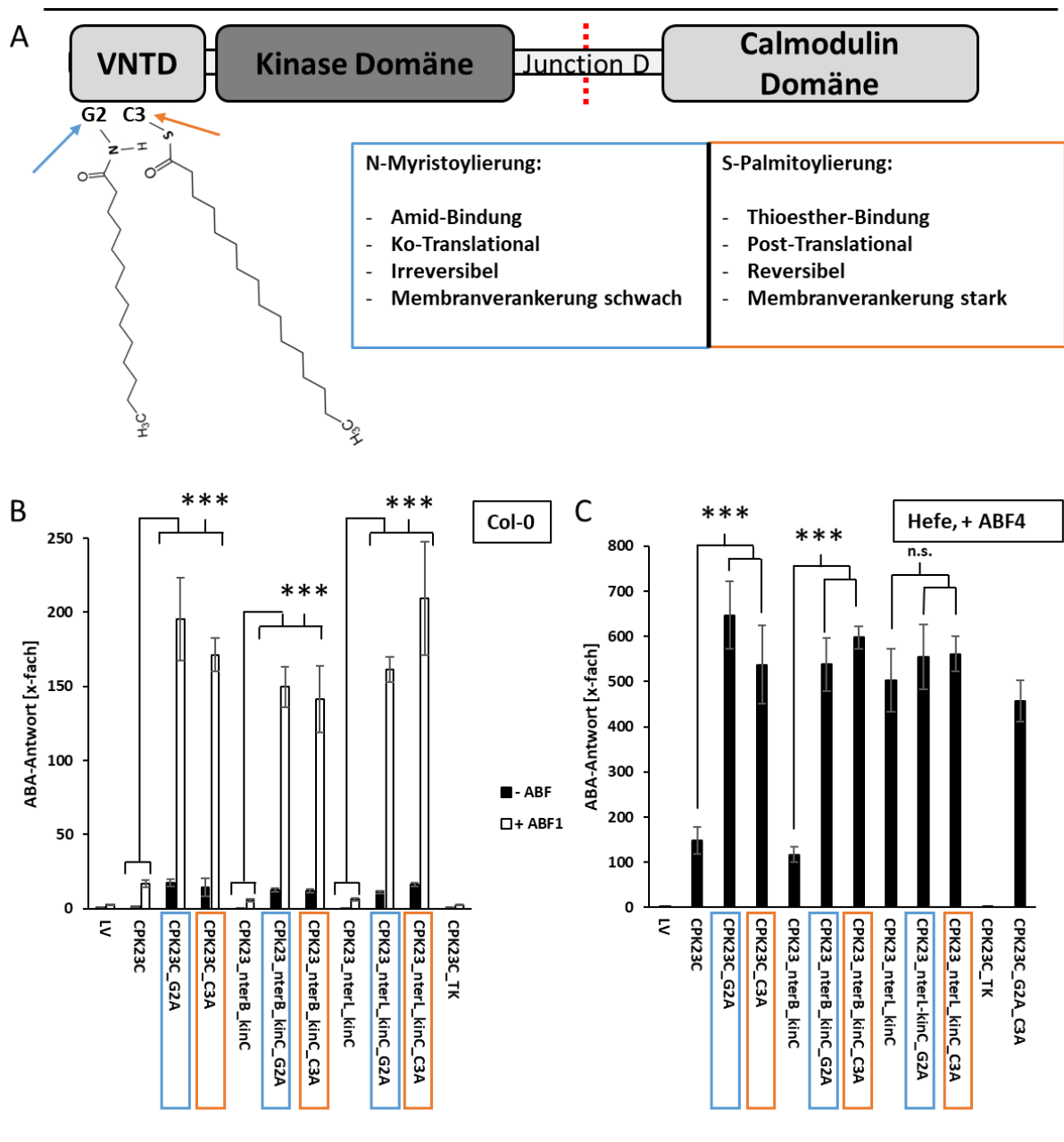


Abb. 3. 27: Einflüsse von Myristoylierung und Palmitoylierung auf die CPK23-Aktivität.

(A) CPK23 wird nach Abspaltung von M1 kotranslational über eine Amid-Bindung an G2 myristoyliert. Nachdem dadurch ausgelösten Transport an die Membran wird es zusätzlich über eine Thioester-Bindung an C3 palmitoyliert. Die durch die Myristoylierung vermittelte Membran-Assoziation ist schwach, aber irreversibel. Durch einen Myristoyl-switch ist eine Umkehrung der Bindung theoretisch möglich. Die nun folgende Palmitoylierung vermittelt eine stabile Membran-Assoziation, ist aber durch Depalmytolasen reversibel. (B/C) Für das Experiment wurden G2A und C3A Varianten der drei analysierten N-Termini (CPK23B, CPK23C, CPK23L) generiert und mit der Col-0 Kinase ligiert. Anschließend wurden die Effektoren (3 µg) mit ABF1 (1 µg) in Col-0 Protoplasten koexprimiert. Die Induktion des pRD29B:LUC-Reporters wurde nach 16 h Inkubation ermittelt und auf die entsprechenden Glucuronidase-Werte normalisiert. Der LV ohne koexprimiertes ABF1 diente als Referenzwert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen den Ausgangsvarianten und den entsprechenden Mutationen. (C) In pSAR-Hefen wurde analog die ABF4-abhängige Induktion eines

Ergebnisse

p4xABRE:LUC-Reporters nach 16 h Inkubation ermittelt und auf die entsprechende OD₆₀₀ der Zellen normalisiert. Der LV diente als Referenz. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen den Ausgangsvarianten und den entsprechenden Mutationen.

3.5.3 Der Einfluss depalmitoylierender Enzyme auf CPK23 in Protoplasten

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass eine Aufhebung der Palmitoylierung einen plausiblen N-terminalen Aktivierungsschritt für membran-assoziiertes CPK23 darstellt. Daher wurde der Einfluss von in Arabidopsis beschriebenen Depalmitoylasen auf die CPK23-Aktivität untersucht. Die zu ABHD17 homologen „Alpha/Beta Hydrolase Domain-containing Protein 17-like Acyl-Protein Thioesterasen“ (ABAPTs) beeinflussen die Lokalisation verschiedener Zielproteine über Depalmitoylierung. Zu diesen Zielproteinen gehören die in der Pathogen-Abwehr involvierten Enzyme RIN4, PBS1, PBL1, HIR2 und BIK1 (Liu et al., 2021). Da (1) der CPK23 N-Terminus in den ersten 20 Aminosäuren Ähnlichkeiten zu den beschriebenen ABAPT-Zielproteinen aufweist, (2) die Zielproteine ebenfalls zusätzlich myristoyliert werden und (3) ABAPTs in Phytohormon-Signalwegen involviert sind (Liu et al., 2023), handelt es sich bei ABAPTs um realistische CPK23-Aktivatoren (Abb. 3.28-A). Die 11 ABAPTs wurden in Col-0 Protoplasten mit ABF1 und CPK23C oder CPK23C_C3A koexprimiert. In Abwesenheit der ABAPTs konnte das native CPK23C den pRD29B:LUC-Reporter im Vergleich zu einer LV-Kontrolle 5-fach induzieren. CPK23C_C3A induzierte den Reporter unter derselben Bedingung 30-fach. Eine zusätzliche Koexpression der ABAPTs führte jedoch zu keiner darüberhinausgehenden Aktivierung des ABA-Signalweges. Eine ABAPT-abhängige Aktivierung von CPK23 konnte folglich in diesem Experiment nicht gezeigt werden (Abb. 3.28-B). Zur ergänzenden Verifizierung wurde auch die ABAPT-abhängige Lokalisation von CPK23 analysiert. Dafür wurde CPK23C-mcherry zusammen mit ABAPT-meGFP in Protoplasten exprimiert und die Lokalisation unter einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Für ABAPT2 und ABAPT5 konnte hierbei kein Fluoreszenz-Signal detektiert werden. In Abhängigkeit der restlichen ABAPTs war keine eindeutige Lokalisationsänderung von CPK23 zu beobachten (Abb. 3.28-C). Dieser Befund bestätigt damit das vorausgegangene Ergebnis.

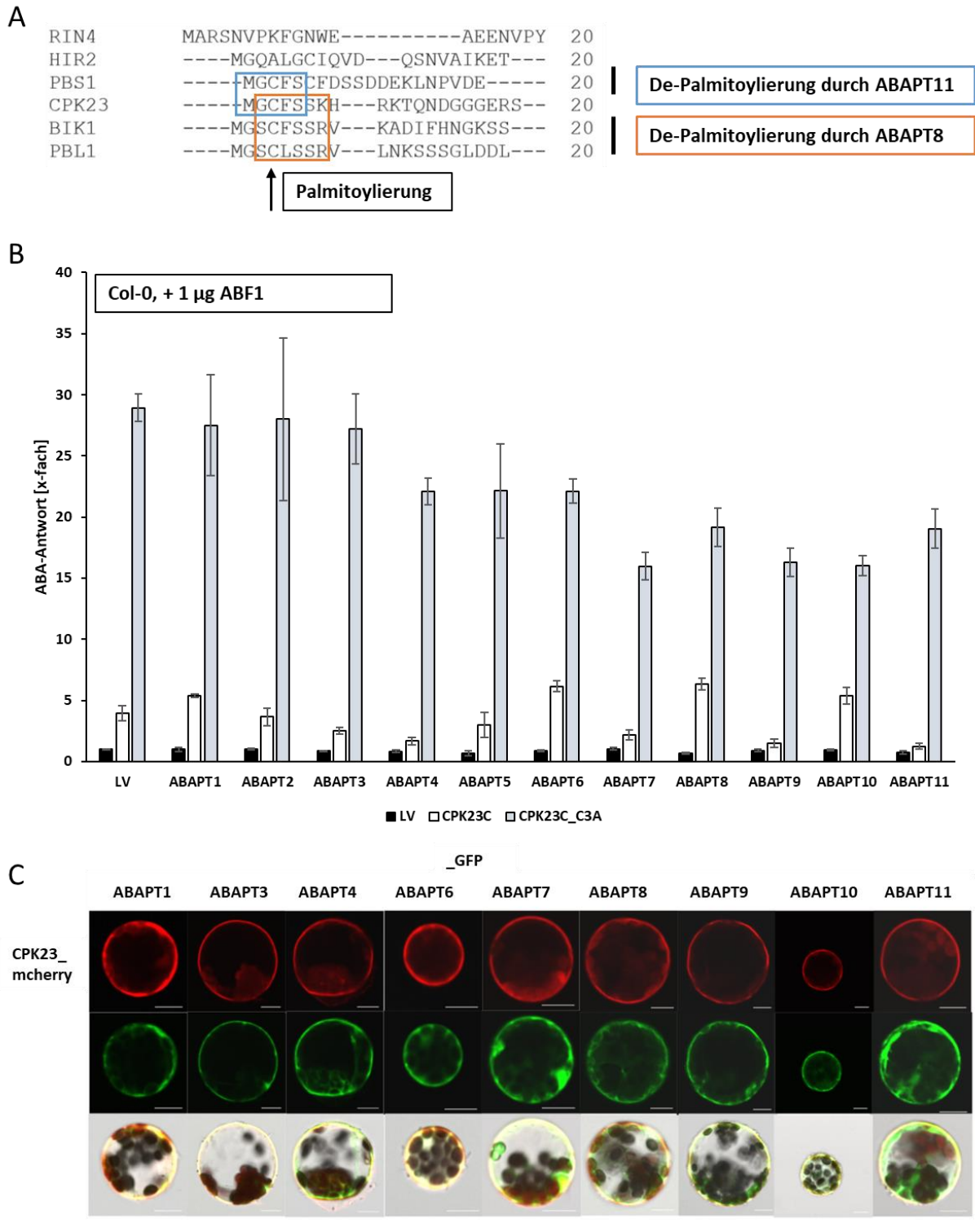


Abb. 3. 28: ABAPT-abhängige Regulation von CPK23 in Protoplasten.

(A) Proteine, die durch ABAPTs reguliert werden, ähneln in ihrer N-terminalen Aminosäure-Sequenz CPK23. Insbesondere die Ziel-Proteine für ABAPT8 und ABAPT11 zeigen Sequenz-Homologie zu CPK23. (B) In Col-0 Protoplasten wurden je 3 µg Effektor mit 1 µg ABF1 und 3 µg der zu untersuchenden ABAPTs koexprimiert. Nach 18 h Inkubation bei 25 °C wurde die durch den pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase ermittelt und auf die Glucuronidase Aktivität normalisiert. Der jeweilige LV-Wert diente als Referenz. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). (C) Das

Ergebnisse

Ergebnis wurde durch Analyse der ABAPT-abhängigen CPK23-Lokalisation verifiziert. Für das Experiment wurden CPK23C_mcherry und die diversen ABAPT_meGFP Konstrukte in Col-0 Protoplasten transfiziert. Nach 18 h Inkubation bei 25 °C wurden die Proben unter einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert und die beobachtete Lokalisation dokumentiert. Für ABAPT2 und ABAPT5 konnte dabei kein meGFP-Signal detektiert werden.

3.5.4 Die Frage der CPK23-Lokalisation in Hefe

Auch membranständiges CPK23 war in bisherigen Experimenten in pSAR-Reporterhefen in der Lage den ABA-Signalweg deutlich zu aktivieren. Während dies im Protoplasten-System ABF-abhängig zwar ebenfalls beobachtet werden konnte, hier jedoch aufgrund ökotypischer Unterschiede eine post-translationale Regulierung durch unbekannte Faktoren angenommen wird, ist der Befund in Hefezellen durch diese Annahme nicht erklärbar. Bei Experimenten in Hefezellen wurden die verwendeten Effektoren über einen Galactose-induzierbaren Promotor exprimiert. Da dieser, je nach gewählter Galactose-Konzentration, zu einer sehr starken Expression beiträgt, ist eine Überladung der Membran durch das exprimierte Protein denkbar. Dies könnte die Membran-Assoziation der analysierten Proteine negativ beeinträchtigen und eine ABF-abhängige Induktion des ABA-Signalweges durch natives CPK23 ermöglichen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde CPK23-meGFP über den pGAL-Promotor in Hefezellen exprimiert und die Lokalisation unter einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert (Abb. 3.29-A). Das CPK23-Signal konnte hauptsächlich im Cytosol beobachtet werden, eine strikte Membranständigkeit war dabei nicht erkennbar. Um auch im Hefe-System mögliche CPK23-Aktivatoren analysieren zu können, ist eine Membranständigkeit von CPK23 jedoch erforderlich. Daher wurde CPK23C, 9aa_CPK23C oder CPK23C_TK unter verschiedenen Promotoren in pSAR-Hefezellen exprimiert und die ABF4 vermittelte Induktion des p4xABRE:LUC-Reporters analysiert. Unter Kontrolle eines geeigneten Promotors sollte die Induktion des Reporters dabei nur durch 9aa_CPK23C möglich sein, die native Variante wäre hingegen aufgrund der intakten Membran-Assoziation inaktiv. Wurden die Effektoren unter Kontrolle eines CYC1-Promotors exprimiert, konnte CPK23C den ABA-Signalweg über ABF4 nur schwach positiv regulieren, während über 9aa_CPK23C eine 60-fache Induktion erfolgte. Über andere hier getestete Promotoren konnte der Reporter hingegen nicht induziert werden (Abb. 3.29-B). Die Expression von CPK23C_G2A und CPK23C_G2A_C3A über den CYC1-Promotor führte ebenfalls zu einer ABF4-abhängigen Induktion des Reporters. (Abb. 3.29-C). Die Mimik eines depalmitoylierten CPK23 (CPK23C_C3A) konnte den Signalweg hingegen nicht induzieren. Daher wurde die Lokalisation der unterschiedlichen CPK23C_meGFP Varianten in Hefezellen analysiert. Während natives CPK23C nach Expression über den CYC1-Promotor an der Membran lokalisierte, konnte das meGFP-Signal von CPK23C_G2A, CPK23C_C3A und CPK23C_G2A_C3A nur in Cytosol und

Ergebnisse

Kern beobachtet werden. (Abb. 3.29-D). Bis auf CPK23C_C3A entsprechen die ermittelten Lokalisationen dem Ergebnis der vorausgegangenen Reporter-Assays in pSAR-Hefezellen. Obwohl auch CPK23C_C3A_meGFP keine Membranständigkeit aufwies, konnte das meGFP-Signal nur in einem geringen Anteil der Hefezellen detektiert werden. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Varianten, wird CPK23C_C3A über den CYC1-Promotor folglich nicht in allen Hefezellen exprimiert. Worauf dieser Befund zurückzuführen ist, konnte nicht ermittelt werden. Gegen ein gezieltes *gene-silencing* von depalmitoyliertem CPK23 durch die Hefezellen spricht, dass auch Varianten mit zusätzlicher Demyristoylierung normal exprimiert werden. Von allen getesteten Promotoren ist der CYC1 Promotor folglich der vielversprechendste Ansatz, um die N-terminale Regulation von CPK23 durch mögliche Aktivatoren in Hefe zu untersuchen.

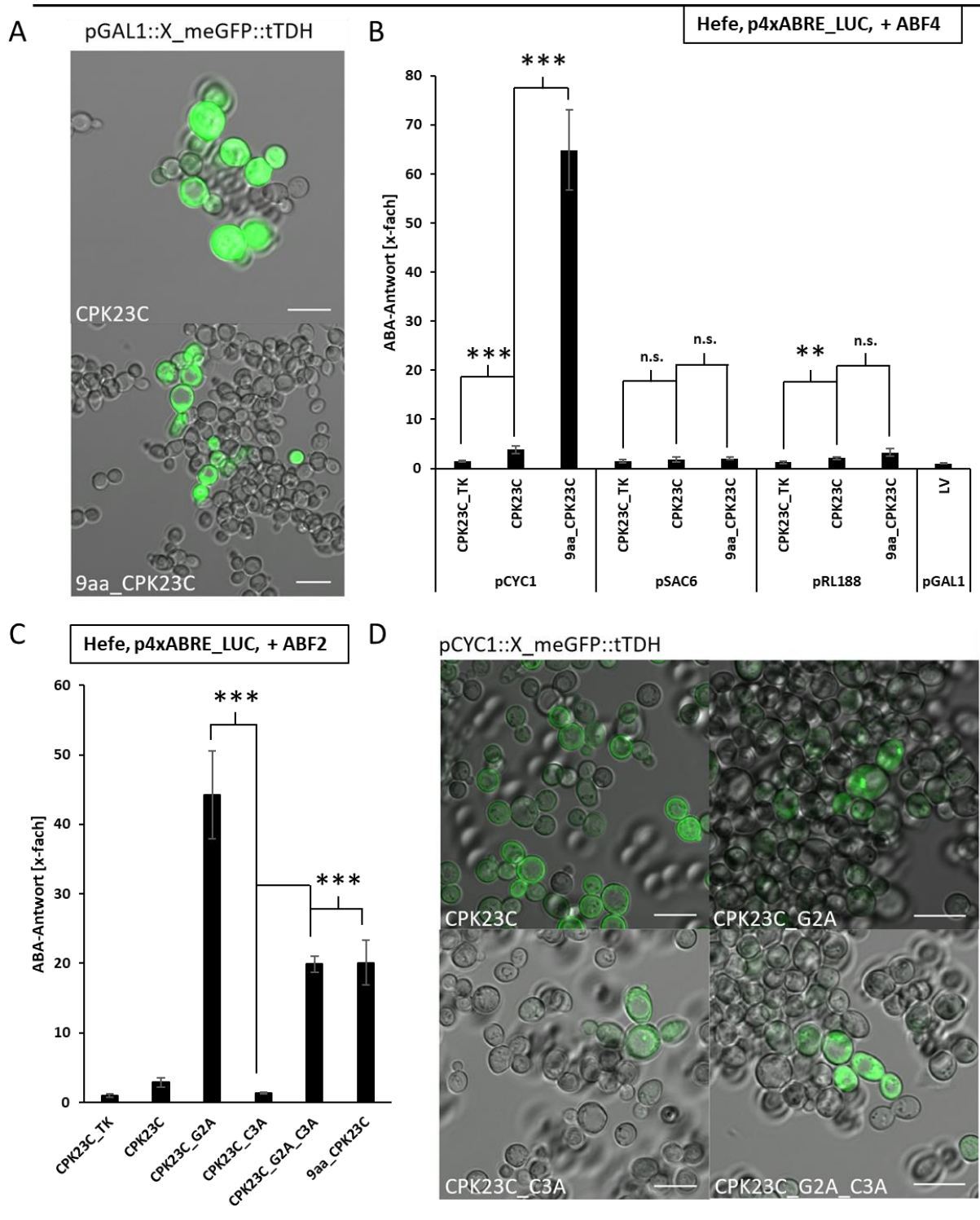


Abb. 3. 29: Einfluss des Promotors auf die CPK23-Lokalisation in Hefe.

(A/D) Die Lokalisation von CPK23_{meGFP} unter Kontrolle des GAL1-Promotors (A) und des CYC1-Promotors (D) wurde in Hefezellen analysiert. Dafür wurden die Konstrukte in Hefezellen transformiert und bei Verwendung des GAL1-Promotors die Expression durch Galactose-Zugabe gestartet. Die Lokalisation von CPK23 wurde nach 16 h Inkubation mittels eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. (B) Um einen Promotor zu finden, unter dem CPK23 noch in ausreichender Menge exprimiert wird, aber gleichzeitig die Membran-Lokalisation erhalten bleibt, wurden CPK23 und 9aa_CPK23 in Hefe unter Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert. Die Effektoren wurden dazu mit ABF4 in pSAR-

Ergebnisse

Reporterhefen kotransformiert und die Induktion des p4xABRE:LUC-Reporters nach 16 h Inkubation analysiert. Die Luciferase-Werte wurden auf die OD₆₀₀ der Zellen normalisiert. Alle Werte wurden auf die Induktion durch eine pGAL1-abhängig exprimierte LV-Kontrolle normalisiert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen den TK- und CPK23C-Werten, sowie zusätzlich zwischen den CPK23C- und 9aa_CPK23C-Werten. Der CYC1-Promotor wurde für weitere Analysen ausgewählt. (C) Verschiedene CPK23-Varianten wurden unter diesem in pSAR-Reporterhefen mit ABF2 koexprimiert und die Induktion des p4xABRE:LUC-Reporters analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf die OD₆₀₀ der Zellen. CPK23_TK diente als Referenz. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen CPK23C_C3A und CPK23C_G2A/CPK23C_G2A_C3A/9aa_CPK23C.

3.5.5 Der Einfluss depalmitoylierender Enzyme auf CPK23 in Hefe

Wird CPK23 über den CYC1-Promotor in Hefezellen exprimiert, liegt natives CPK23 membranständig vor, während gleichzeitig modifiziertes CPK23 ausreichend exprimiert wird, um den p4xABRE-Reporter ABF-abhängig zu induzieren. Folglich wurde auch bei der Analyse einer möglichen ABAPT-abhängigen Regulation von CPK23 in pSAR-Hefezellen dieser Promotor für die Expression der Effektoren verwendet. Falls CPK23 in diesem Experiment ABAPT-abhängig depalmitoyliert wird, löst es sich von der Membran und aktiviert das koexprimierte ABF2. Als Positiv-Kontrolle diente 9aa_CPK23, da die eigentlich geeignetere Kontrolle (CPK23-C3A) in Hefen nur unzureichend exprimiert wurde. Auch in diesem Experiment konnte jedoch kein positiver Einfluss der ABAPTs auf CPK23 ermittelt werden (Abb. 3.30-A). Bei keiner der analysierten ABAPT-CPK23C Kombinationen konnte der Reporter ABF2-abhängig über dem Niveau der ABAPT-CPK23_TK-Kontrollen induziert werden. Um zu überprüfen, ob es trotzdem eine Interaktion zwischen CPK23 und ABAPTs gibt, wurde zusätzlich ein Y2H-Experiment durchgeführt. Dafür wurden ABAPTs und CPK23 mit der GAL4-BD und der GAL4-AD fusioniert (Abb. 3.30-B). Es konnte jedoch für keine der getesteten CPK23-ABAPT-Kombinationen ein Koloniewachstum auf SD-Platten mit selektiven Aminosäuren beobachtet werden. Dementsprechend interagierten ABAPTs in Hefezellen nicht mit CPK23.

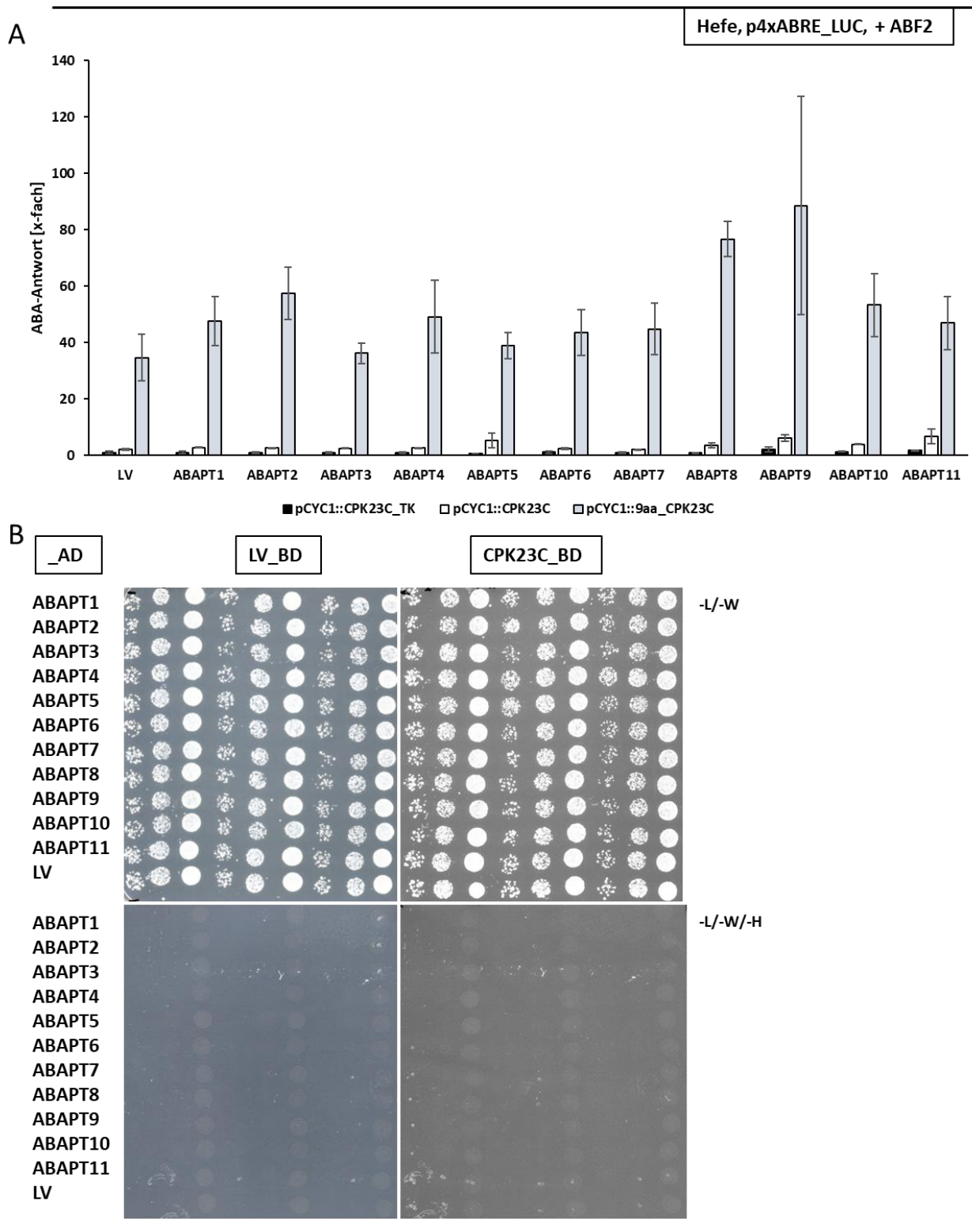


Abb. 3. 30: ABAPT-abhängige Regulation von CPK23 in Hefe.

(A) Um zu überprüfen, ob CPK23 (CYC1-Promotor) durch ABAPTs (TDH1-Promotor) reguliert wird, wurden diese gemeinsam mit ABF2 in pSAR-Hefezellen koexprimiert. Die Induktion des p4xABRE:LUC-Reporters wurde anhand der gebildeten Luciferase ermittelt. Diese wurde auf die OD₆₀₀ der entsprechenden Hefezellen normalisiert. Als Referenz diente die Induktion des Reporters durch CPK23_TK in Abwesenheit der ABAPTs. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen

Ergebnisse

(n=6). (B). Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen CPK23 und den ABAPTs bestimmt. Dafür wurden CPK23 und ABAPTs mit der GAL4-Bindedomäne, beziehungsweise der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert und unter der Kontrolle des ADH-Promotors in AH109-Hefezellen transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (1000-, 100-, 10-Zellen) auf SD-Platten mit selektiven Aminosäuren (-L/-W und -L/-W/-H) ausplattiert (n=3) und das Koloniewachstum nach 3 Tagen bewertet.

3.5.6 Die Etablierung einer geeigneten Positiv-Kontrolle für depalmitoylierende Enzyme

Um zu verifizieren, dass eine mögliche ABAPT-abhängige Aktivierung der CPKs über *in-vivo* Reporter Assays nachweisbar ist, wurde eine Positivkontrolle generiert. Dafür wurde das ABAPT11-regulierte PBS1 an CPK23 fusioniert. Das gewählte CPK23 (CPK23C_d19) kann den ABA-Signalweg induzieren, verfügt aber aufgrund einer 19 AS langen Deletion im N-Terminus über keine eigenen Myristoylierungs- und Palmitoylierungsstellen mehr und ist daher auch nicht membran-assoziiert. Die Membran-Lokalisation des generierten Fusionsproteins ist folglich von PBS1 abhängig. Um die Funktionalität des Fusionsproteins zu erhöhen, wurden beide Elemente über einen GS-Linker verbunden. Die generierte Positivkontrolle sollte damit membran-assoziiert sein, durch ABAPT11 reguliert werden und den ABA-Signalweg induzieren können (Abb. 3.31-A). In einem Experiment in pSAR-Hefezellen konnte jedoch sowohl PBS1-GS-d19_CPK23, als auch 9aa_PBS1-GS-d19_CPK23 den p4xABRE:LUC-Reporter ABF2-abhängig 60-fach induzieren. Ein Unterschied zwischen der theoretisch membran-assoziierten und der nicht-membran-assoziierten Variante konnte hier entsprechend nicht gezeigt werden (Abb. 3.31-B). Auch eine Regulation durch koexprimiertes ABAPT11 konnte nicht beobachtet werden. Zur Verifizierung dieses Befundes wurde die Lokalisation von PBS1 und PBS1-GS-d19_CPK23 in Hefezellen untersucht. PBS1-meGFP und PBS1-GS-d19_CPK23-meGFP lokalisierten beide im Cytosol und waren nicht membranständig (Abb. 3.31-C). Die Expression erfolgte über den CYC1-Promotor. Scheinbar unterscheidet sich die Lokalisation von PBS1 zwischen Hefen- und Pflanzenzellen. Möglicherweise hat die in den beiden Organismen unterschiedliche Membranzusammensetzung einen Einfluss auf die Lokalisation. Alternativ könnten NMTs oder PATs aus Hefe PBS1 nicht als Substrat erkennen. Die veränderte Lokalisation von PBS1 könnte auch die Interaktion mit den ABAPTs beeinflussen. In einem Y2H-Experiment interagierte PBS1-GS-d19_CPK23 weder mit ABAPT11 noch mit ABAPT8. PBS1 zeigte hingegen eine schwache Interaktion mit ABAPT11 (Abb. 3.31-D).

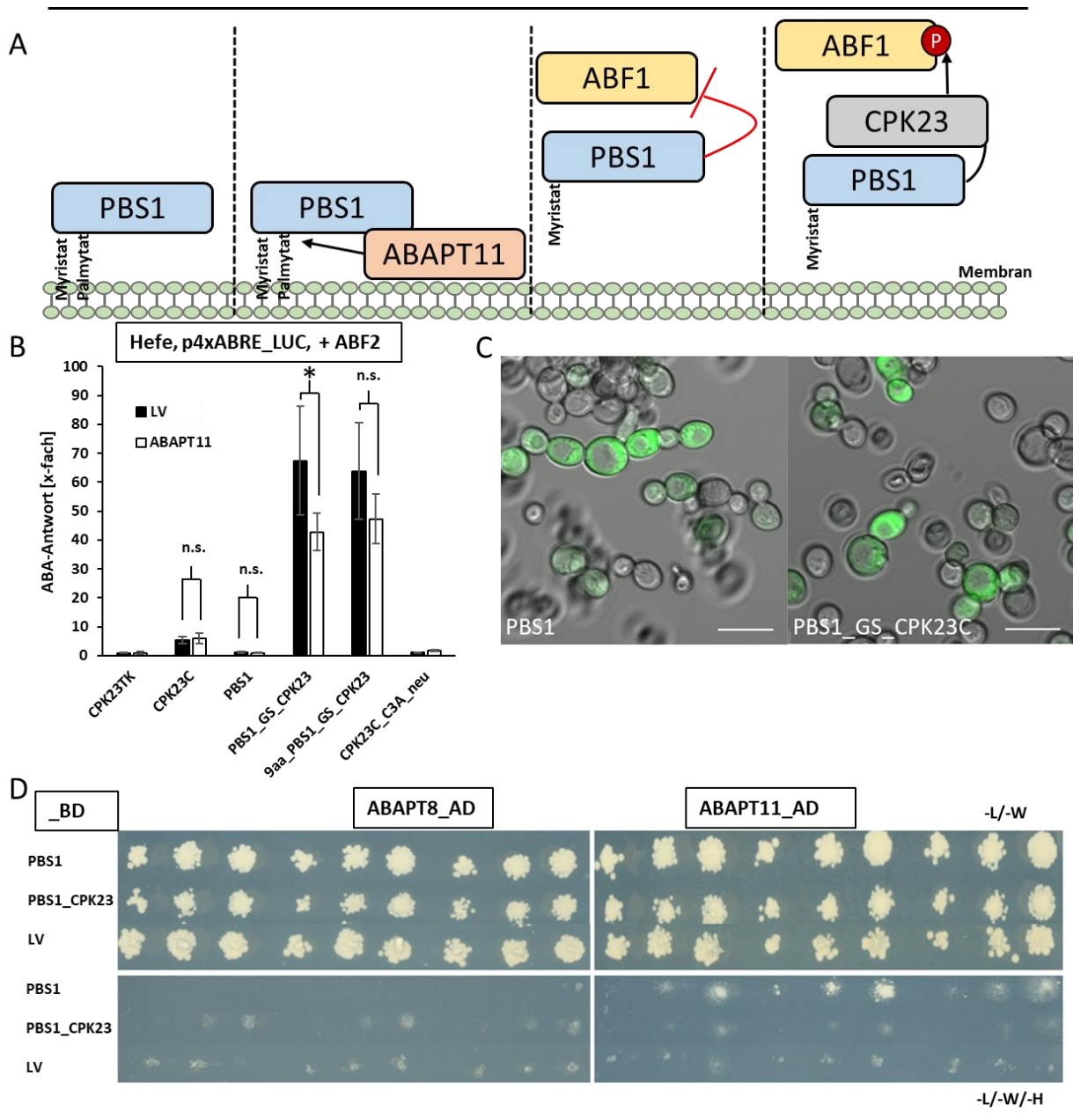


Abb. 3. 31: Aufbau einer Positiv-Kontrolle für depalmitoylierende Enzyme (Hefe).

(A) Bisher sind in Arabidopsis 5 ABAPT-Zielproteine bekannt. Diese verlieren ABAPT-abhängig ihre Membran-Assoziation, sind aber nicht im ABA-Signalweg involviert und können daher auch nicht als Positiv-Kontrolle in *in-vivo* Reporter-Assays verwendet werden. Daher wurde das ABAPT-Zielprotein PBS1 über einen GS-Linker mit CPK23 verbunden. Damit die Membranbindung nur durch PBS1 vermittelt wird, wurde CPK23_d19 verwendet. In dieser Variante sind die ersten 19 Aminosäuren einschließlich der Myristoylierungs- und Palmitoylierungsstelle deletiert. (B) Die Effektoren wurden über den CYC1-Promotor in pSAR-Hefezellen mit ABF2 und ABAPT11 oder LV koexprimiert. Nach 18 h Inkubation wurde die p4xABRE:LUC-Reporteraktivität bestimmt und auf die OD₆₀₀ der Hefezellen normalisiert. Die Induktion des Reporters durch CPK23_TK in Abwesenheit von ABAPT11 diente als Referenzwert. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung (n=6). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich mit Proben ohne kotransformiertes ABAPT11. (C) Um die Lokalisation von PBS1_meGFP und PBS1-GS-CPK23_d19 bestimmen zu können, wurden diese über den CYC1-Promotor in Hefezellen exprimiert und das GFP-Signal nach 18 h Inkubation über ein

Ergebnisse

Fluoreszenzmikroskop detektiert. (D) Um die Interaktion zwischen PBS1-Varianten und ABAPTs in Hefezellen zu analysieren, wurden diese mit GAL4-Bindedomäne, beziehungsweise GAL4-Aktivierungsdomäne versehen und unter der Kontrolle des ADH-Promotors in AH108 Hefezellen transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (1000-, 100-, 10-Zellen) auf SD-Platten mit selektiven Aminosäuren (-L/-W und -L/-W/-H) ausplattiert und das Kolonie-Wachstum nach 3 Tagen bewertet (n=3).

Während PBS1-GS-CPK23C_d19 und 9aa_PBS1-GS-CPK23_d19 in Hefezellen cytosolische Lokalisation zeigten und beide einen p4xABRE:LUC Reporter ABF2-abhängig induzieren konnten, unterschieden sich die beiden Fusionsproteine in einem analogen Experiment in Col-0 Protoplasten deutlich (Abb. 3.32-A). Das membrangebundene PBS1-GS-CPK23C_d19 zeigte dabei keine ABF1-abhängige Induktion des pRD29B:LUC-Reporters, wohingegen natives CPK23C und 9aa_PBS1-GS-CPK23C_d19 den ABA-Signalweg 10-fach und 9aa_CP23C sogar 25-fach induzierten. Somit konnten sowohl Unterschiede zwischen PBS1-GS-CPK23C_d19 und 9aa_PBS1-GS-CPK23C_d19, aber auch zwischen 9aa_PBS1-GS-CPK23C_d19 und 9aa_CP23C ermittelt werden. Möglicherweise ist der CPK23-Teil im Fusionsprotein schlechter für Substrate zugänglich. Da das Fusionsprotein zwar durch ABAPT11 aktivierbar war, jedoch nur in sehr geringem Umfang, gilt dies wahrscheinlich auch umgekehrt für den PBS1-Teil (Abb. 3.32-B). Die ABAPT11-abhängige Aktivierung ist bei geringen Fusionsprotein-Konzentrationen erkennbar. Wurden 0,3 µg PBS1-GS-CPK23C_d19 in Col-0 Protoplasten transfiziert konnte in Proben mit koexprimiertem ABAPT11 im Vergleich zu Proben ohne ABAPT11 eine 2-fache Reporter-Induktion ermittelt werden. Möglicherweise führt ABAPT11 die Reaktion nur mit geringer Effizienz aus und die Wahrscheinlichkeit einer Umsetzung ist bei niedrigen Substrat-Konzentrationen erhöht. Um zu untersuchen, ob PBS1 in Protoplasten mit ABAPT11 interagiert, wurde die Interaktion in *split*-Luciferase Assays in Col-0 Protoplasten analysiert. Die Proteine wurden dafür mit den FLUC-Hälften fusioniert und in Protoplasten koexprimiert (Abb. 3.32-C). Bei Interaktion wird das funktionale Luciferase-Protein wiederhergestellt und die Interaktionsstärke kann durch Normalisierung eines dieser Proteine auf die entsprechende LV-Kontrolle ermittelt werden. Die ermittelten Werte werden unter dem Diagramm als Tabelle angegeben. Die Expression von ABAPT8 und ABAPT11 wirkte sich jeweils negativ auf das Luciferase-Signal aus. Trotzdem konnte für beide eine im Vergleich zur LV-Kontrolle 3-5-fach erhöhte Interaktionsrate mit PBS1 ermittelt werden. Eine redundante Funktion der ABAPTs kann hier angenommen werden. Das Fusionsprotein konnte hingegen nur mit ABAPT8 interagieren, nicht jedoch mit dem angenommenen Interaktionspartner ABAPT11. CPK23C interagierte ebenfalls nur mit ABAPT8. Möglicherweise werden die Interaktionen im PBS1-GS-CPK23C_d19 Fusionsprotein nur durch den CPK23-Teil vermittelt. CPK23C_d38 und CPK23C_d68 zeigten wiederum keine Interaktion mit ABAPT8. Daher ist anzunehmen, dass die ersten 38 Aminosäuren von CPK23C entweder eine Interaktionsfläche oder Erkennungssequenz für ABAPT8 beinhalten. Da CPK23L jedoch

Ergebnisse

ebenfalls mit diesem interagieren konnte, scheint es hier keine Differenzierung zwischen verschiedenen CPK23-Ökotypen auf Ebene der N-Termini zu geben. Möglicherweise handelt es sich bei der Regulierung durch ABAPTs um einen allgemeinen Mechanismus, bei welchem palmitoylierte Proteine mehr oder weniger unspezifisch prozessiert werden können. Um den gesuchten spezifischen Aktivator von CPK23C scheint es sich bei ABAPT8 nicht zu handeln.

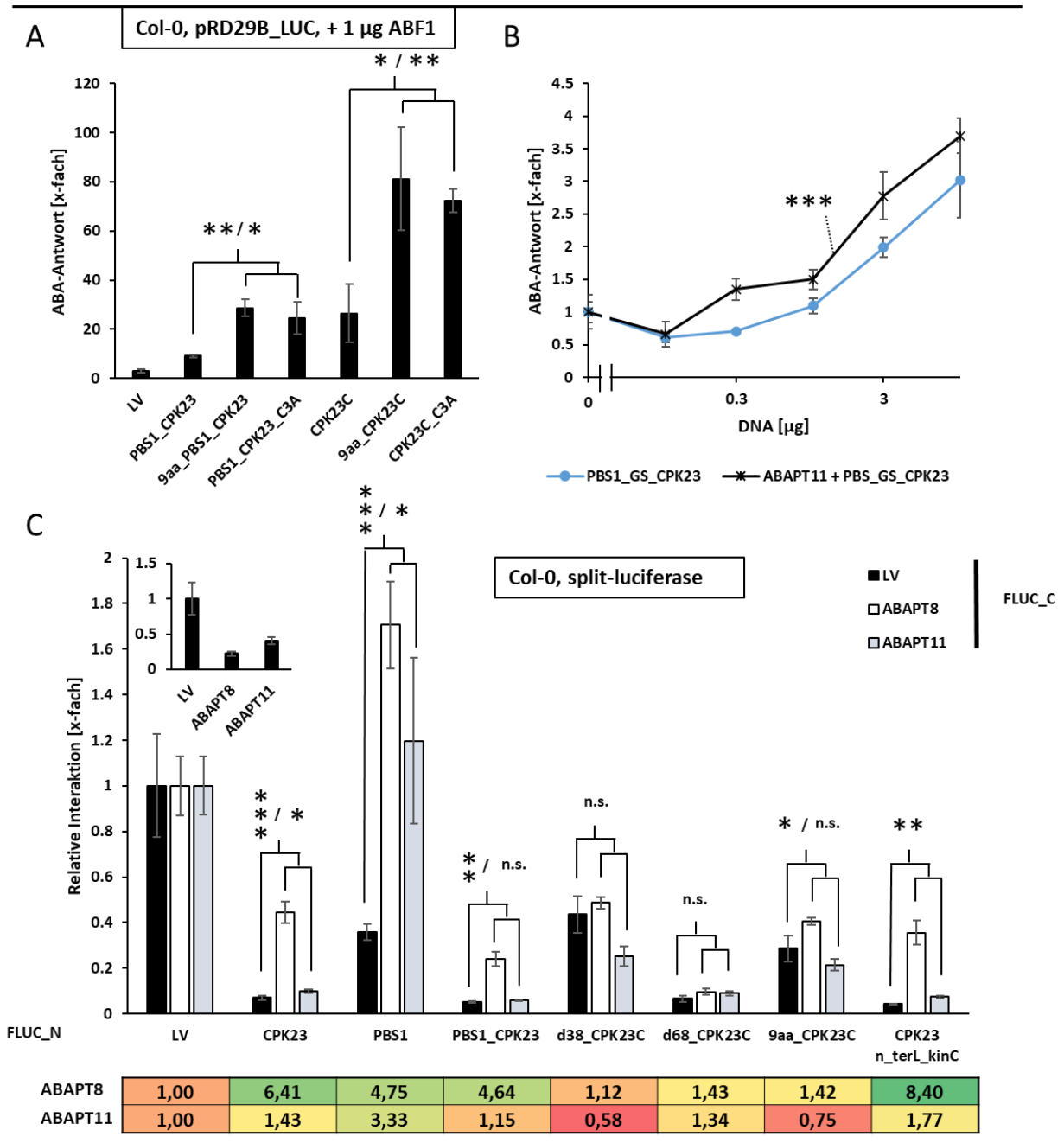


Abb. 3. 32: Aufbau einer Positiv-Kontrolle für depalmitoylierende Enzyme (Protoplasten).

(A) Die generierte Positivkontrolle PBS1_GS_CP23_d19 und entsprechende Kontrollen wurden mit ABF1 in Col-0 Protoplasten koexprimiert. Die Induktion des pRD29B_LUC-Promotors wurde anhand der gebildeten Luciferase bestimmt und auf die Glucuronidase-Werte normalisiert. Der LV diente als Referenzwert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P <

Ergebnisse

0,01, *** $P < 0,001$ (one-way ANOVA) im Vergleich zwischen Ausgangsvarianten und deren Mutationen. (B) Um den Einfluss von ABAPT11 auf das Fusionsprotein zu untersuchen, wurde PBS1_GS_CPK23C_d19 in steigender Konzentration in Col-0 Protoplasten transfiziert. Dies geschah mit und ohne ABAPT11-Koexpression. Die Luciferase-Werte wurden auf die Glucuronidase-Werte normalisiert. Nach einer zusätzlichen Normalisierung auf entsprechende Kontrollen wurden die jeweiligen 0 μg -Effektor-Werte als Referenz angenommen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen ($n=3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (two-way ANOVA) im Vergleich mit PBS1_GS_CPK23 ohne zusätzliches ABAPT11. (C) Zusätzlich wurde die Interaktion von ABAPT8 und ABAPT11 mit dem Fusionsprotein und entsprechenden Kontrollen analysiert. Für das *split*-Luciferase Experiment wurden CPKs und ABAPTs jeweils C-terminal mit einem unterschiedlichen Teil des Luciferase-Gens versehen und je 3 μg in Col-0 Protoplasten kotransfiziert. Die nach 16 h Inkubation entstandene Luciferase-Aktivität wurde gemessen und jeweils mit der Aktivität verglichen, die in Kombination mit dem LV erreicht werden konnte. Die ermittelten Unterschiede in der Interaktions-Intensität werden jeweils in der Tabelle unterhalb des Graphen angegeben. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen ($n=3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (one-way ANOVA) im Vergleich mit der entsprechenden LV/Effektor-Kombination.

3.6 Analyse von CPK23-Mutanten im Ler-0 background

Die beiden *growth control exerted by ABA*-Linien (*gca2-1* und *gca2-2*) sind beide ABA-insensitive Mutanten im Ler-0 background. Während *gca2-1* durch EMS-Mutagenese entstanden ist und eine Cytosin zu Thymin Transition in der 5'-UTR des CPK23-Gens beinhaltet, handelt es sich bei *gca2-2* um eine T-DNA Insertionslinie. Die T-DNA Insertion befindet sich dabei im ersten Exon des CPK23-Gens und führt zu einer ausbleibenden oder aber fehlerhaften Expression von CPK23. Es handelt sich folglich um eine CPK23-Knockout-Linie. Bei *gca2-1* hingegen bewirkt die Mutation eine Überexpression des CPK23-Transkripts, es handelt sich damit quasi um eine CPK23-Überexpressionslinie. Dieser Zusammenhang wird in Abb. 3.33-A schematisch dargestellt. Besonders *gca2-1* zeigte bereits in vorangegangenen Arbeiten gravierende Phänotypen: (1) ein ABA-insensitives Wachstumsverhalten, (2) verändertes Seneszenz-Verhalten in Blättern und (3) ABA-Insensitivität bei Keimung und Stomata-Schluss. Während jedoch andere ABA-insensitive Mutanten in Stomataschlussprozessen noch Reaktionen auf CO_2 ähnlich dem WT zeigen, konnte *gca2-1* auf diesen Stimulus nicht mehr reagieren. Das Seneszenz-Verhalten in Blättern war ebenfalls verändert (Korte, 2009).

3.6.1 Die Phänotypen von *gca2-1* und *gca2-2*

Auch in dieser Arbeit zeigte *gca2-1* bereits gravierendes Zwergwachstum unter kontrollierten Bedingungen (Abb. 3.33-B). Während 62-Tage in Töpfen mit Erde angezogene *gca2-2* Pflanzen dem Ler-0 und Col-0 Wildtypen entsprachen, war *gca2-1* deutlich kleiner und wies damit starke Beeinträchtigungen im Wachstum auf. Auch die Überexpression von CPK23C im Col-0 *background* führte bereits zu einem solchen Zwergwachstum (Abb. 3.2-B), jedoch wurde in diesem Fall zusätzlich zu einer starken pUBI10-abhängigen Expression, auch eine Kombination aus C-terminaler Modifikation (Calcium De-Regulation) und N-terminaler Modifikation (Membran-Bindung aufgehoben) benötigt, um diesen Phänotyp hervorzurufen. Nur eine Überexpression in Kombination mit C-terminaler Modifikation war in diesem Fall nicht ausreichend (Abb. 3.2-B). Um diese Befunde erklären zu können, wurden *gca2-1* und *gca2-2* komplett sequenziert (Abb. 3.33-C). Das CPK23-Gen liegt dabei in Ler-0 in einem Bereich, der invers zu Col-0 verläuft. Dadurch hat CPK23 in Ler-0 eine andere Orientierung als in Col-0 (Zapata et al., 2016). Während der Terminator-Bereich zwischen CPK23C und CPK23L annähernd deckungsgleich ist, finden sich im Promotor-Bereich große Unterschiede. Die Sequenzierung und Auswertung wurde von Dr. Christine Wurmser durchgeführt. Dafür wurden die Sequenzen von *gca2-1* und *gca2-2* mit einem annotierten Col-0 Genom verglichen. Mutationen welche im Vergleich zu diesem sowohl für *gca2-1* und *gca2-2* auftraten, wurden als spezifisch für Ler-0 gewertet und bei der Analyse außer Acht gelassen. Für *gca2-2* konnten dabei neben CPK23 55 weitere Mutationen ermittelt werden. Davon führte eine zu einem vorzeitigen Stopp-Codon (ROPGEF6) und 5 weitere zu *frameshifts*. In *gca2-1* wurden deutlich mehr Mutationen gefunden (178), davon führten 5 zu vorzeitigen Stop-Codons, 9 zu *frameshifts* und je 3 zu Deletionen, bzw. Insertionen. Während in *gca2-2* nur 7 *missense*-Varianten gefunden wurden (die restlichen Mutationen befinden sich in UTRs), gibt es 85 *missense* Varianten in *gca2-1* (Abb. 3.33-C). Unter anderem sind in *gca2-1* folgende Gene betroffen: vorzeitiges Stopp-Codon in **SLAH4**; frameshift in **ARF4**; 5'UTR in **MAPKKK13**; 3'UTR in **ARF19**, **PYL6**, **PYR1**; missense in **TPL**, **PIN3** und **ERF2**. Da damit Regulatoren des Auxin-, ABA- und Ethylen-Signalweges, sowie Transporterproteine und Kinasen betroffen sind, erscheint es logisch, dass diese zumindest teilweise einen Beitrag zu den gravierenden *gca2-1* Phänotypen leisten.

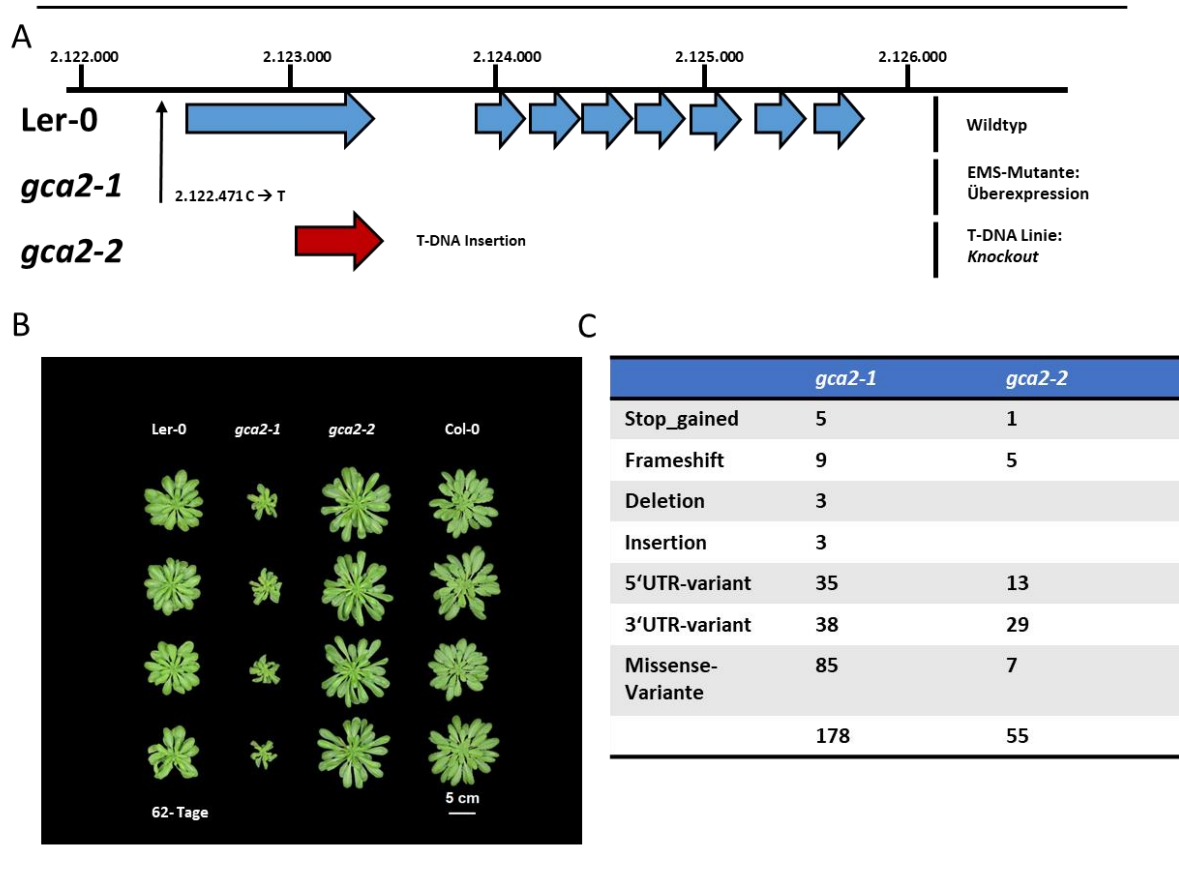


Abb. 3. 33: Mutationen und Phänotypen von *gca2-1* und *gca2-2*.

Die *gca2-1* und *gca2-2* Mutanten wurden im Ler-0 *background* erzeugt. (A) Bei *gca2-1* handelt es sich um eine EMS-Mutante, wobei die Punktmutation von C nach T in der 5'-UTR des CPK23-Gens zu finden ist. Bei *gca2-2* handelt es sich um eine T-DNA Insertionslinie, wobei hier die Insertion im ersten Exon für das CPK23 Gen erfolgt ist. Bei *gca2-1* wurde eine gesteigerte CPK23-Expression festgestellt. Dadurch handelt es sich um eine Überexpressionslinie. In der *gca2-2* Mutante ist CPK23-RNA hingegen nicht mehr detektierbar. Folglich handelt es sich hier um eine CPK23 *Knockout*-Linie. (B) Um den Wachstumsphänotyp zu analysieren, wurden Samen der verschiedenen Linien auf ½-MS-Platten ausgebracht und nach 14 Tagen in Erde umgesetzt. Nach 62 Tagen Gesamtwachstum wurde das Erscheinungsbild dokumentiert (n=4). (C) Während *gca2-2* neben der Insertion im CPK23-Gen im Vergleich zum Ler-0 WT nur über 55 Mutationen aufwies, enthielt die EMS-Mutante *gca2-1* 178 Mutationen, darunter viele die zu fehlerhaften Proteinen führen. Für diese Analyse wurde das Gesamt-Genom von *gca2-1* und *gca2-2* sequenziert, mit dem Col-0 Genom abgeglichen und Mutationen, welche beide im Vergleich zu Col-0 tragen, als Eigenschaften des Ler-0 Genoms gewertet. Diese wurden in der weiteren Analyse außer Acht gelassen. Mutationen, die jeweils nur in einem der beiden Genotypen vorkommen, wurden als spezifisch gewertet und analysiert. Die Sequenzierung und Analyse wurde durch Dr. Christine Wurmser durchgeführt.

Ergebnisse

Die ABA-Insensitivität in Keimungsprozessen konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 3.34-A/B). Die *gca2-1* und *gca2-2* Linien keimten bei 0,3 μ M exogener ABA-Zugabe deutlich früher als der Ler-0 WT. Nach 4 Tagen auf einem $\frac{1}{2}$ - MS-Medium mit 0,3 μ M ABA erreichten die beiden Linien eine Keimungsrate von 80 %, Col-0 und Ler-0 hingegen nur 40 %. Während es sich bei *gca2-2* um eine *Knockout*-Linie für CPK23 handelt und der Phänotyp damit realistisch ist (Bei CPK23-KO Linien im Col-0 *background* wurde dies jedoch nicht beobachtet) (Anhang 5.5.5), ist dieser Befund in *gca2-1* widersprüchlich. Die Analyse von CPK23L in Hefe (Abb. 3.7-D) konnte in dieser Arbeit einen ABF-abhängigen positiven Einfluss auf den ABA-Signalweg zeigen. Auch der extreme Stomata-Phänotyp von *gca2-1* konnte bestätigt werden (Abb. 3.34-C/D). Während die CPK23L-KO-Linie *gca2-2* kaum Beeinträchtigung in stomatären Prozessen zeigte (Abb. 3.34-E/F), waren diese in der *gca2-1* Linie stark gestört. Neben der fehlenden Regulierung unter niedrig-CO₂-Bedingungen (Abb. 3.34-C), war auch die Fähigkeit das Schließen und Öffnen in Abhängigkeit von Licht und Dunkelheit zu steuern verloren gegangen (Abb. 3.34-D). Begleitet wurde dies von einer allgemein niedrigeren Blatt-Temperatur und widerspricht dem, was für CPK23-überexprimierende Pflanzen im Col-0 *background* beobachtet werden konnte (Abb. 3.3-B/C/E/F): hier war zwar ebenfalls die Stomata-Öffnung gestört, jedoch hauptsächlich in der Lichtregulation (Abb. 3.3-E/F). Die Fähigkeit die Stomatas in Reaktion auf sinkende CO₂-Werte zu öffnen war in diesen jedoch erhalten geblieben und lief lediglich verzögert ab (Abb. 3.3-B/C). Auch war in diesem Fall die Blatt-Temperatur nicht verringert, sondern erhöht. Da es sich bei CPK23 um einen positiven Regulator des ABA-Signalweges handelt, erschwert die verstärkte Aktivierung des Signalweges die Stomata Öffnung und die Blatt-Temperatur steigt an.

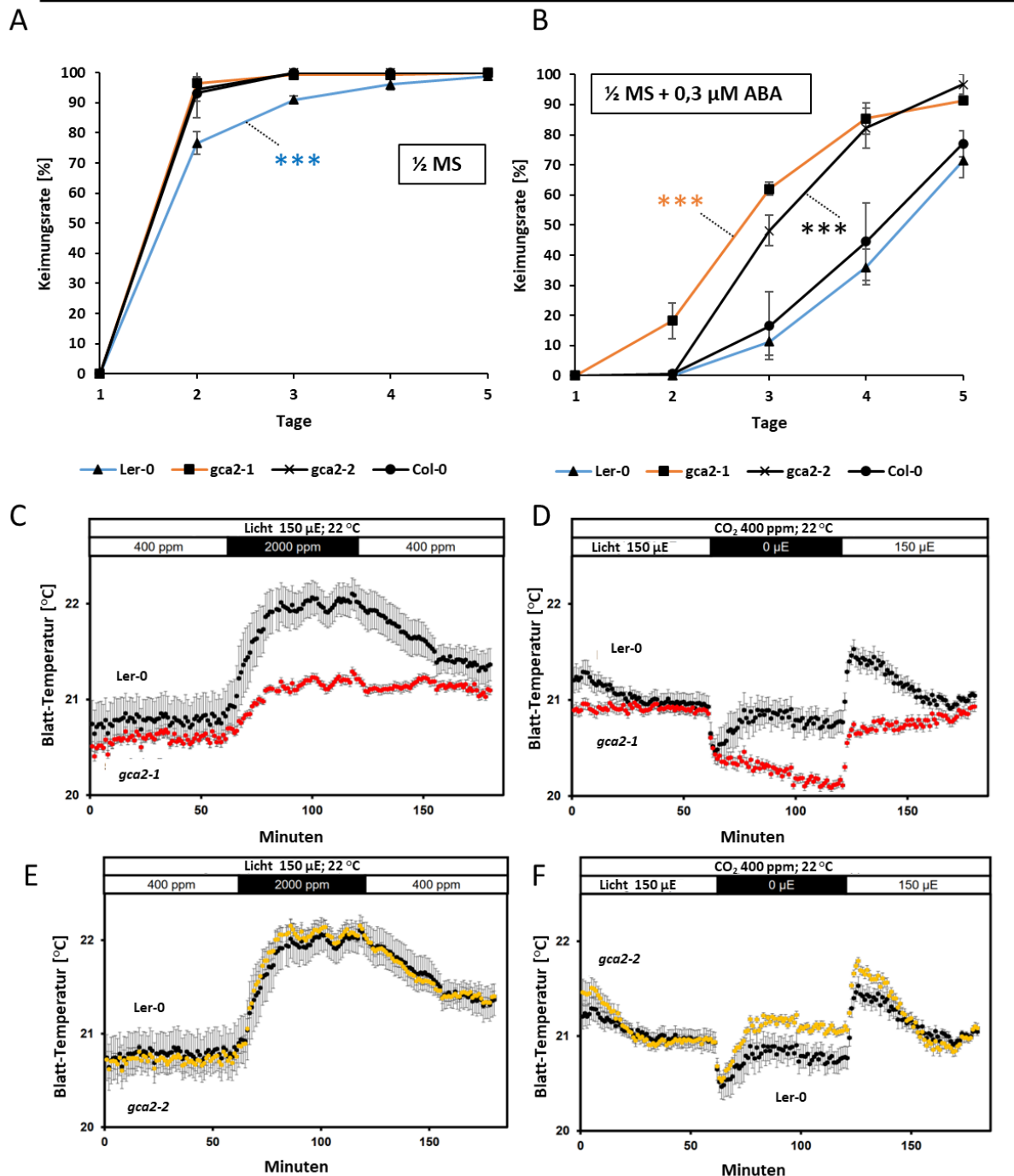


Abb. 3.34: Keimungsverhalten und Blatt-Oberflächentemperatur von *gca-1* und *gca2-2*.

(A/B). Um die Keimungsraten zu ermitteln, wurden je 50 Samen der verschiedenen Linien auf ½ MS-Medium und ½ MS-Medium mit 0,3 μM ABA ausgebracht. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten unter Dauerlicht gestellt und über 5 weitere Tage die tägliche Keimungsrate ermittelt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich mit *gca2-2* (A), beziehungsweise im Vergleich mit Ler-0 (B). (C-F) Für die Blatt-Oberflächentemperatur-Messung wurden *gca2-1* (C/D), *gca2-2* (D/E) und Ler-0 WT-Pflanzen für 62 Tage in Töpfen mit Erde angezogen. Im Anschluss wurde die Blatt-Temperatur von randomisiert angeordneten Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten (0 - 200 min) gemessen. Zusätzlich wurden unterschiedliche CO₂-Bedingungen (alternierend zwischen 400 ppm und 2000 ppm) (C/E), sowie

Ergebnisse

verschiedene Lichtintensitäten (alternierend zwischen $150 \mu\text{E}/(\text{m}^2+\text{s})$ und $0 \mu\text{E}/(\text{m}^2+\text{s})$) (D/F) angelegt (n=3) (Ler-0), (n=4) (*gca2-1*), (n=5) (*gca2-1*).

3.6.2 Komplementation von *gca2-2* und *gca2-1*

Um zu überprüfen, ob der insensitive Keimungsphänotyp von *gca2-2* durch Re-Integration von CPK23 gerettet werden kann, wurden CPK23 und 9aa_CP23 aus Col-0 (Abb. 3.35-A/B), Bur-0 (Abb. 3.35-C/D) und Ler-0 (Abb. 3.35-E/F) unter dem endogenen CPK23C Promotor in *gca2-2* Pflanzen transformiert. Sowohl *gca2-1* als auch *gca2-2* zeigten unter osmotischen Stress ein insensitive Verhalten und keimten bei $-0,8 \text{ MPa}$ Sorbit deutlich früher als der Ler-0 WT. Kontroll-Linien (9aa_TK und empty) verhielten sich hier vergleichbar mit *gca2-2* (Abb. 3.35-G/H). Bereits unter Kontroll-Bedingungen keimten die mit CPK23B/C/L transformierten Linien langsamer aus (Abb. 3.35-A/C/E). Unter Stress-Bedingungen wurde dieser Effekt verstärkt und die Keimungsrate nahm eine intermediäre Tendenz zwischen den für *gca2-2* und den für den Ler-0 WT beobachteten Keimungsraten an (Abb. 3.35-B/D/F). Unterschiede zwischen membranständigen (CPK23) und modifizierten (9aa_CP23) Varianten waren hier keine zu beobachten. Auch zwischen den verschiedenen Ökotypen konnte kein eindeutiger Unterschied in der Keimungsrate unter abiotischen Stressbedingungen ausgemacht werden. Da der Keimungs-insensitive Phänotyp von *gca2-2* durch CPK23 Re-Integration gerettet werden kann, beruht der Phänotyp im Umkehrschluss direkt auf dem Ausschalten des CPK23-Gens.

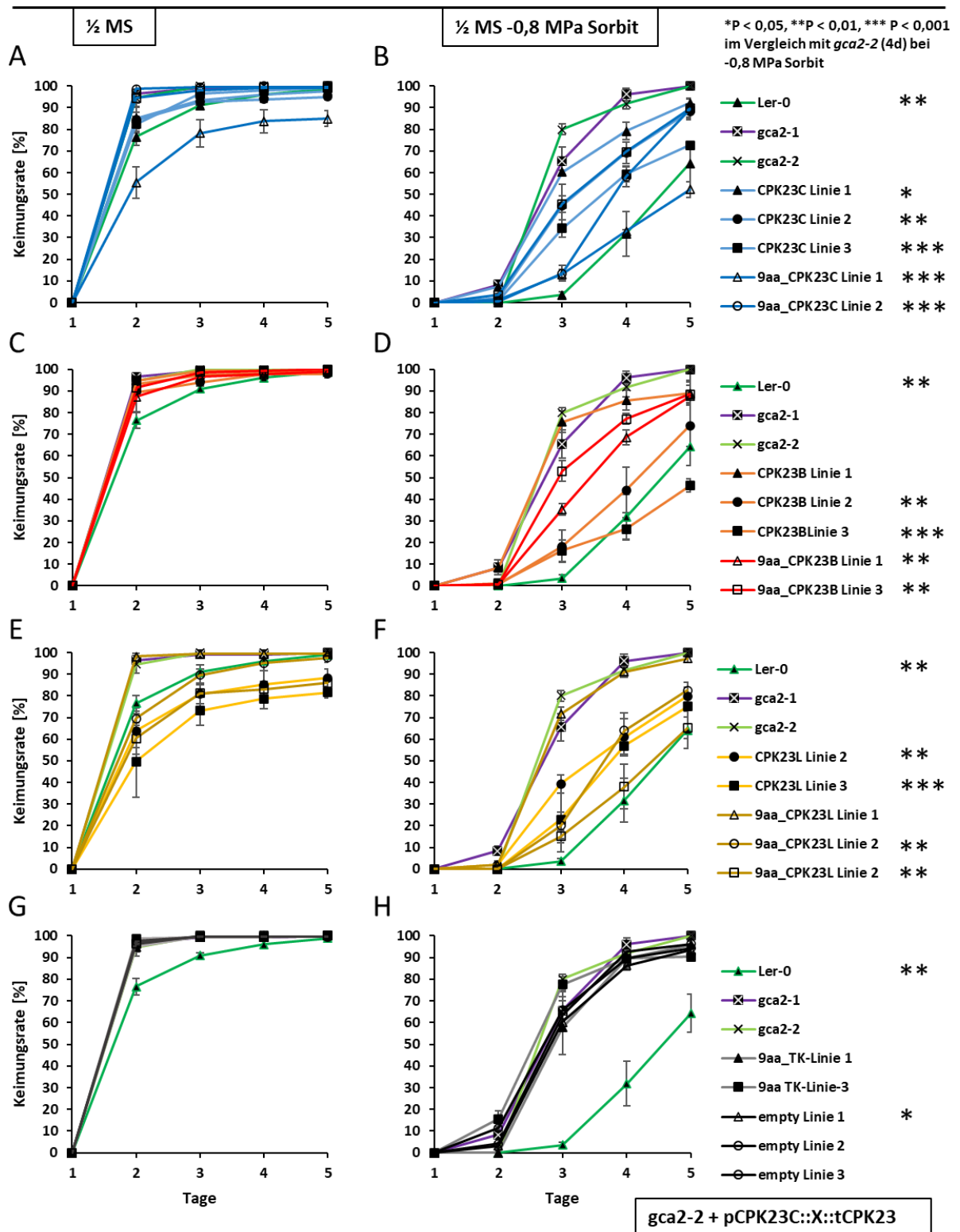


Abb. 3. 35: Keimungsverhalten von *gca2-2-rescue*-Linien.

Für das Experiment wurden *gca2-2* Linien mit pCPK23C:Effektor:tCPK23C Konstrukten (Effektor = CPK23C (A/B), CPK23B (C/D), CPK23L (E/F)) transformiert. Positive Transformanten wurden über die Basta-Resistenz und das pFAST Element selektiert und anschließend auf ½ MS- und ½ MS-Platten mit -0,8 MPa Sorbit ausgebracht (Pro Messpunkt 3 * 50 Samen). Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten in Dauerlicht umgestellt und die Keimungsrate an 5 aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt. Die

Ergebnisse

Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich mit *gca2-2* bei Tag 4 und Sorbit-Behandlung.

Im Gegensatz zu *gca2-2* ist *gca2-1* nicht transformierbar (Korte, 2009). Um trotzdem analysieren zu können, ob der keimungs-insensitive Phänotyp von *gca2-1* durch CPK23 ausgelöst wird, wurden mit pCPK23C:CPK23 transformierte *gca2-2* Linien in *gca2-1* eingekreuzt. Die Samen der generierten Linien wurden über das pFAST-Element gescreent und anschließend auf Platten mit ansteigenden ABA-Konzentrationen ausplattiert (Abb. 3.36-A). Die Messung der Keimungsraten für *gca2-1* und *gca2-2*, als auch für die Kreuzung aus beiden (*gca2-1* x *gca2-2*), zeigte für diese Linien ein im Vergleich zum Ler-0 WT ABA-insensitives Verhalten. Das Einkreuzen der bereits transformierten *gca2-2* Linien in *gca2-1* brachte für die resultierenden Linien (*gca2-1* x *gca2-2* + CPK23B, *gca2-1* x *gca2-2* + CPK23L, *gca2-1* x *gca2-2* + 9aa_CPK23C) ein den transformierten *gca2-2* Ausgangslinien entsprechendes Resultat: alle zeigten eine Reduktion in der Keimung und keimten ähnlich ABA-sensitiv wie der Ler-0 WT. Dieses konnte auch unter Salz- (100 mM) und osmotischen- (-0,8 MPa) Stress beobachtet werden (Abb. 3.36-B): Auch unter diesen Bedingungen keimten die Ausgangslinien *gca2-1*, *gca2-2*, sowie die Kreuzung aus beiden (*gca2-1* x *gca2-2*), besser als der Ler-0 WT. Die mit *gca2-2* transformierten Linien, sowie deren Kreuzung mit *gca2-1* (mit Ausnahme von *gca2-2* + CPK23L) zeigten hier indes eine mit dem Ler-0 WT vergleichbare Keimungsrate. Auch in diesem Fall kann daher geschlussfolgert werden, dass das insensitive Keimungsverhalten von *gca2-1* zumindest teilweise auf das hier enthaltene CPK23-Gen zurückzuführen ist. Durch die vielen Mutationen in *gca2-1* ist es möglich, dass einige für den ABA-Signalweg wichtige Komponenten anders als in W-Pflanzen reguliert werden. Möglicherweise ist dadurch die CPK23L-abhängige Calcium-Integration in den Signalweg gestört, kann aber durch das Einbringen von Ca²⁺-unabhängigen CPK23-Varianten gerettet werden. Das Wurzelwachstum war in den *gca2-1* x *gca2-2* Kreuzungslinien unter steigenden ABA-Konzentrationen hingegen annähernd unverändert (Abb. 3.36-C). Lediglich die *gca2-1* Kreuzung mit CPK23L-transformierten *gca2-2* zeigte hier unter hohen ABA-Konzentrationen ein leicht ABA-sensitives Verhalten.

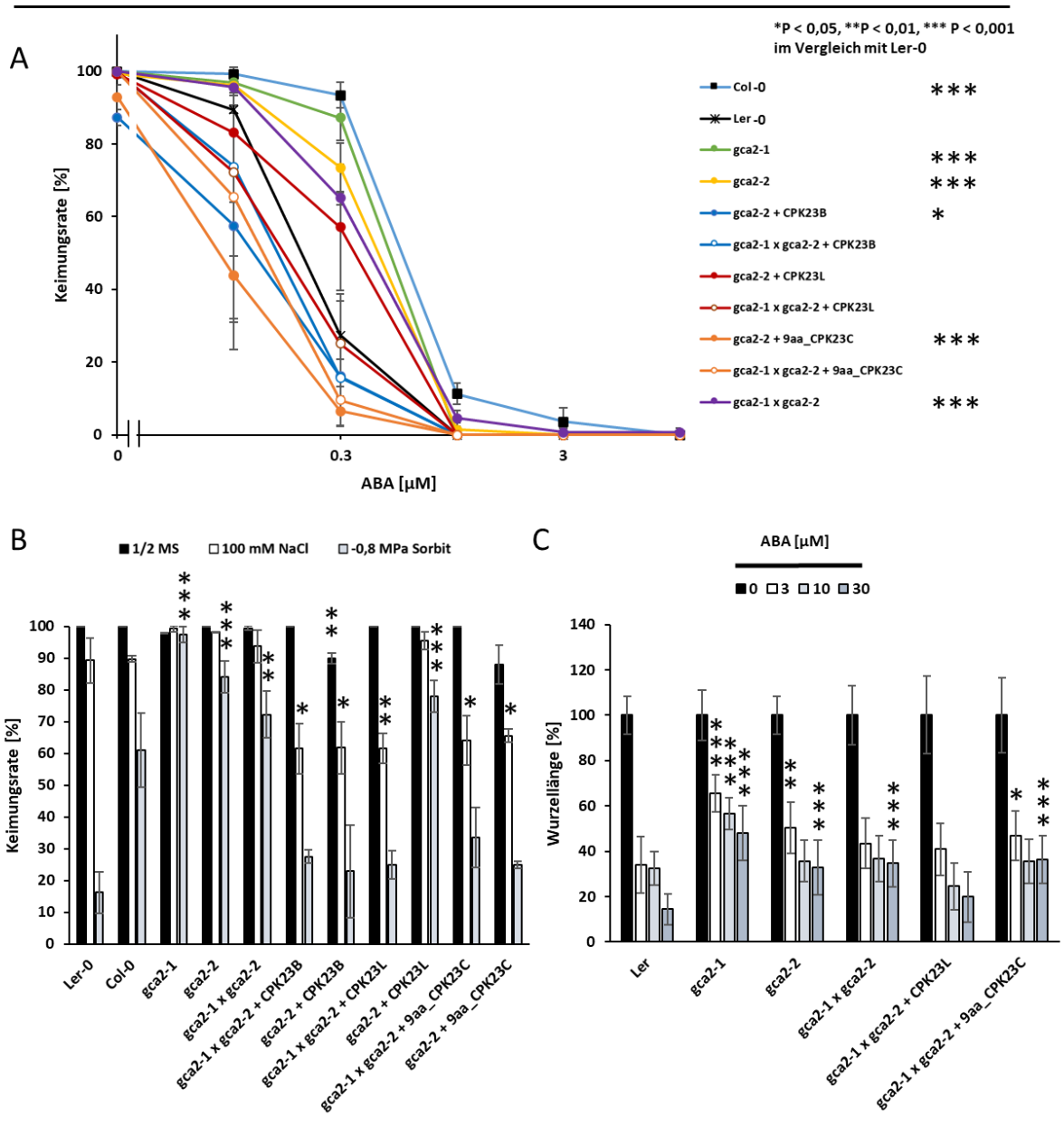


Abb. 3. 36: Keimungsverhalten von, mit *gca2-2-rescue* Linien gekreuzten, *gca2-1* Linien.

(A/B) Für die Keimungs-Assays wurden in 3 unabhängigen Experimenten je 50 Samen der verschiedenen Linien auf ½ MS-Platten, ½ MS-Platten mit aufsteigender ABA-Konzentration (A) oder ½ MS-Platten mit -0,8 MPa Sorbit oder 100 mM NaCl (B) ausgebracht. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten in Dauerlicht umgesetzt und nach 3 Tagen die absolute Keimungsraten ermittelt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (two-way ANOVA) im Vergleich mit Ler-0 (A), beziehungsweise (one-way ANOVA) im Vergleich mit Ler-0 bei entsprechenden Bedingungen (B). (C) Um das Wurzelwachstum zu analysieren, wurden verschiedene Linien auf ½ MS-Platten ausgebracht und nach 5 Tagen Wachstum auf Platten mit verschiedenen ABA-Konzentrationen umgesetzt. Nach 3 Tagen wurde die veränderte Wurzellänge ermittelt. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert von 15 Keimlingen und die entsprechende Standardabweichung. *P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich mit Ler-0 für die jeweilige ABA-Konzentration.

4 Diskussion

Im Gegensatz zu tierischen Organismen sind Pflanzen nicht in der Lage ihren Standort zu wechseln. Sie sind daher den Umweltbedingungen schutzlos ausgeliefert und müssen Salzstress, Trockenheit und extremen Temperaturen trotzen. Die molekularen Mechanismen, die der pflanzlichen Antwort auf abiotischen Stress zu Grunde liegen, umspannen ein breites Feld und beinhalten die Stress-Wahrnehmung, die Signalweiterleitung, Transkription- und Translation der regulierten Gene, sowie deren post-translationale Modifikation. Diese Änderungen der zellulären Prozesse können sowohl in Form einer nicht-adaptiven Antwort ablaufen und damit nur den durch den Stress ausgelösten Schaden repräsentieren als auch zu adaptiven Antworten führen, die wiederum eine gesteigerte Stress-Resistenz zur Folge haben. Zu ersterem zählen beispielsweise Änderungen der Membranfluidität und Proteinstrukturen in Reaktion auf Kältestress, während zu letzterem die Anpassung der zellulären Homöostase und die Anpassung des Wachstums gehören (Zhang et al., 2022). Ein wichtiges intrinsisches Element der Signal-Transduktion ist Calcium. Neben seiner Rolle als *secondary messenger*, ist es auch ein essentieller Pflanzen-Nährstoff, reguliert physiologische Prozesse wie den Stomata-Schluss, das Wachstum von Pollenschlauch und Wurzelhaaren und ist wichtig für die Stabilität von Zell-Wänden und –Membranen (Sanders et al., 2002). Calcium-Sensoren nehmen Calcium meist über ihr Elongationsfaktor-Hand (EF-hand) -Motiv wahr. Diese charakteristischen und konservierten Helix–Loop–Helix Strukturen treten dabei meist paarweise auf und kooperieren positiv miteinander. Dies minimiert die benötigte Anzahl an Calcium-Ionen um eine Strukturänderung des Sensors auszulösen (Gifford et al., 2007). Während es sich bei den meisten Calcium-Sensoren um *small-molecule* Proteine handelt und diese das Signal folglich nur durch Bindung an weitere *downstream*-Regulatoren weitergeben können (*Sensor Relays*), handelt es sich bei den nur in Pflanzen, Protisten, Oomyceten und Grünalgen vorkommenden CPKs um sogenannte Sensor-Responder. Sie sind in der Lage das Calcium-Signal direkt weiterzugeben, in dem sie durch Calcium-Bindung an die EF-Hände der Calmodulin-Domäne aktiviert werden und durch die Serin/Threonin Kinase Zielproteine direkt aktivieren und regulieren können (Poovaiah and Du, 2018). Im inaktiven Zustand bindet dabei eine Auto-Inhibierungsdomäne an die Kinase und verhindert deren Aktivität. Nach Calcium-Bindung an die EF-Hände kommt es zu einer Konformationsänderung der Calmodulindomäne und die Auto-Inhibierung der Kinase wird aufgehoben. Auch in CPKs kommen die EF-Hände der Calmodulindomäne paarweise vor und können daher in N-terminales und C-terminales EF-Hand-Paar unterschieden werden. Der C-EF-*lobe* hat dabei die größte Affinität zu Calcium und Calcium-Bindung an diesen erhöht die Calcium-Affinität der N-EF-Hand (Christodoulou et al., 2004b). Aufgrund des hohen Grades an Konservierung haben bereits kleinste Mutationen in den EF-Händen eine veränderte Affinität zu Calcium zur Folge. CPK23 besitzt eine solche Mutation im Glutamin (Q) an Position 451 der EF-Hand 1.

Diskussion

Die Folge dieser degenerierten EF-Hand ist eine nur schwache Calcium-Abhängigkeit von CPK23 (Boudsocq et al., 2012) (Shi et al., 2018). Um die Funktion von CPK23 auf Signalwege und in der Physiologie zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der möglicherweise vorhandene Einfluss von Calcium komplett außen vorgelassen. Dies wurde bewerkstelligt, indem die Calmodulin-Domäne und ein Teil der Auto-Inhibierungsdomäne abgeschnitten wurden. Die so generierten verkürzten CPK23-Versionen sind in der Theorie konstitutiv aktiv und erleichtern die Funktionsanalyse erheblich.

4.1 Die Funktion von CPK23 im ABA-Signalweg

4.1.1 Die Rolle von CPK23 in der Membran – Transporterregulation in der Literatur

Von den 34 in Arabidopsis bekannten CPKs sind 28 aufgrund ihrer Sequenz theoretisch über Myristoylierung und Palmitoylierung mit der Membran verankerbar. Zu diesen gehört auch CPK23 (Shi et al., 2018). Es verwundert daher nicht, dass CPK23 eine Vielzahl von Transportern in der Plasmamembran regulieren kann, auch wenn deren Analyse nicht Bestandteil dieser Arbeit war. Unter Eisen- (Fe-) Mangelbedingung ist der *Iron-Regulated Transporter 1* (IRT1) verantwortlich für die Eisen-Aufnahme in Wurzeln. Während *cpk21/23*-Pflanzen unter diesen Bedingungen ein geringeres Wurzelwachstum, sowie Frischgewicht aufweisen, zeigen Pflanzen mit konstitutiv-aktivem CPK23 und CPK21 eine erhöhte Toleranz. Es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine in der Lage sind mit dem IRT1-Transporter an der Membran zu interagieren, diesen an dem Ser149-Rest zu phosphorylieren und den Transporter dadurch zu aktivieren. Dies führt zu einer erhöhten Aufnahme von externen Eisen in das Cytoplasma der Zellen und kann somit durch das in Folge von Eisen-Mangelbedingung erzeugte Calcium-Signal erklärt werden (Wang et al., 2023). Da in der hier zitierten Arbeit jedoch ebenfalls mit C-terminal verkürzten CPKs (also Varianten ohne Calmodulin-Domäne und damit ohne Calcium-Bindungs-Affinität) gearbeitet wurde, und der positive Effekt der CPK-Überexpression auf die Eisentoleranz nur in diesen Varianten, nicht aber in nativen, beobachtet werden konnte, ist letzterer Schluss zumindest nicht zwingend. Ein weiterer Eisenionen-Transporter, der durch CPKs beeinflusst werden kann, ist NRAMP6. Da die Struktur von Cadmium-Ionen (Cd^{2+}), einem nicht-essenziellen Metall-Element, das in hohen Dosen toxisch für Pflanzen ist, Eisen und anderen essenziellen Elementen ähnelt, können Fe^{2+} -, Zn^{2+} -, Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Transporter häufig nicht zwischen diesen unterscheiden und dieses transportieren. Auch in diesem Fall löst Cd^{2+} ein Calcium-Signal aus, das wiederum CPKs aktiviert. Die Phosphorylierung von NRAMP6 durch CPK21 und CPK23 an Ser489/Thr505 vermindert dessen Funktionalität und damit die Anreicherung von Cadmium in der Pflanzenzelle. *cpk21/23*-Pflanzen zeigen auch hier stärker ausgeprägte Stress-Phänotypen, während die Überexpressionslinien mit konstitutiv aktiven Varianten die Cadmium-Toleranz erhöhen (Zhang et

al., 2023). Da in diesen beiden Beispielen, die durch CPK23 regulierten Transporter hauptsächlich in Wurzeln vorkommen, CPK23 jedoch hier nur sehr gering exprimiert wird, ist es folglich fraglich, ob CPK23 diese Regulation auch *in-planta* durchführt oder ob der Effekt nur auf die Überexpression, gekoppelt mit einer geringen Spezifität und einer allgemein starken Kinase-Aktivität von CPK23, zurückzuführen ist. Sehr gut untersucht ist hingegen der Effekt von CPK23 auf den ABA-abhängigen Stomataschluss.

4.1.2 Die Rolle von CPK23 in der Membran – Stomata-Regulation

Auch in dieser Arbeit sollte der Befund einer Involvierung von CPK23 im Stomataschluss untersucht werden. Bei der Analyse von entsprechenden transgenen Linien konnten Hinweise auf eine solche Funktion aufgrund einer erhöhten Blatttemperatur, welche auf eine erhöhte Rate an geschlossenen Stomata hindeuten, ermittelt werden.

Um Wasserverlust zu vermeiden, werden Stomata nur unter niedrig CO₂-Bedingung, bei hoher Feuchtigkeit und Licht geöffnet (Mott, 1988). Dementsprechend werden sie bei den gegenteiligen Bedingungen geschlossen (Hetherington and Woodward, 2003). Stomata-Bewegungen werden dabei durch den kontrollierten Transport von osmoregulativen Ionen über Ionen-Kanäle und Pumpen gesteuert. Der Anionen-Kanal SLAC1 spielt hierbei eine entscheidende Rolle und ist neben der Regulation über SnRK2.6 auch über CPKs, darunter CPK23, aktivierbar. Neben CPK23 wurde auch eine direkte, wenn auch schwache, Interaktion von CPK6 mit SLAC1 gezeigt (Geiger et al., 2010). Auch für CPK3 wird eine Funktion als positiver Regulator von Anionen-Kanälen in Stomata angenommen, da die Leitfähigkeit dieser in CPK3 und CPK6 Einzel- und Doppelmутanten bereits deutlich inhibiert wird (Mori et al., 2006). Zusätzlich ist CPK3 auch in der Lage den Kaliumkanal TPK1 zu phosphorylieren (Latz et al., 2013). Da CPKs redundante Funktionen besitzen, reicht ein Einzelknockout nicht aus, um die Stomatabewegung zu stören. Eine dCPK3/5/6/11/23 KO-Linie zeigt hier jedoch deutliche Störungen (Schulze et al., 2021). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CPK23 bereits ausreichend ist, um die Transpirationsrate zu beeinflussen (Abb. 3.3). Pflanzen, welche membrangebundenes CPK23 in einer Calcium-unabhängigen Variante (Calmodulin-Domäne ist deletiert) über den Ubiquitin10-Promotor überexprimierten, wiesen eine erhöhte Blatt-Temperatur auf. Die Blatt-Temperatur kann dabei als direkter Indikator für den Grad der Stomata-Öffnung dienen. Pflanzen, die die Stomata stärker geöffnet haben (beispielsweise durch eine Störung im Stomata-Schluss), weisen eine höhere Transpiration auf und erscheinen daher kälter, während Pflanzen die Probleme haben ihre Stomata zu öffnen durch die hier verringerte Transpirationsrate eine höhere Blatt-Temperatur aufweisen (Merlot et al., 2002). Dass CPK23-Überexpressions-Linien eine erhöhte

Temperatur zeigten (Abb. 3.3-B/E), kann daher direkt mit dem Einfluss auf SLAC1 erklärt werden. Die Phosphorylierung von SLAC1 an der Membran hält die Stomata geschlossen und verzögert zusätzlich die Öffnung unter sinkenden CO_2 -Werten. Interessanterweise zeigten auch Pflanzen-Linien, welche ein Membran-ungebundenes CPK23 (9aa) überexprimieren, denselben Effekt (Abb. 3.3-C/F), obwohl in diesem Fall eine Interaktion von CPK23 mit SLAC1 aufgrund der hier unterschiedlichen Lokalisationen erschwert sein sollte. So konnte für CPK6 gezeigt werden, dass eine Dual-Lipid Modifikation zwingend für eine CPK6-abhängige Regulation von SLAC1 benötigt wird (Saito et al., 2018). Da in den 9aa_CPK23C Überexpressionslinien neben der erhöhten Blatt-Temperatur auch deutliches Zwergwachstum zu beobachten war (Abb. 3.2-B) und Zwergwachstum im allgemeinen mit einem stark aktivierten ABA-Signalweg assoziiert wird (ABA fungiert als Wachstums-Inhibitor) (Hayat et al., 2023), ist für CPK23 folglich eine duale Funktion denkbar: (1) in membrangebundener Form als Regulator von Transportern in der Membran und (2) in membranungebundener Form als Regulator des ABA-Signalweges. Dieser Zusammenhang wird in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

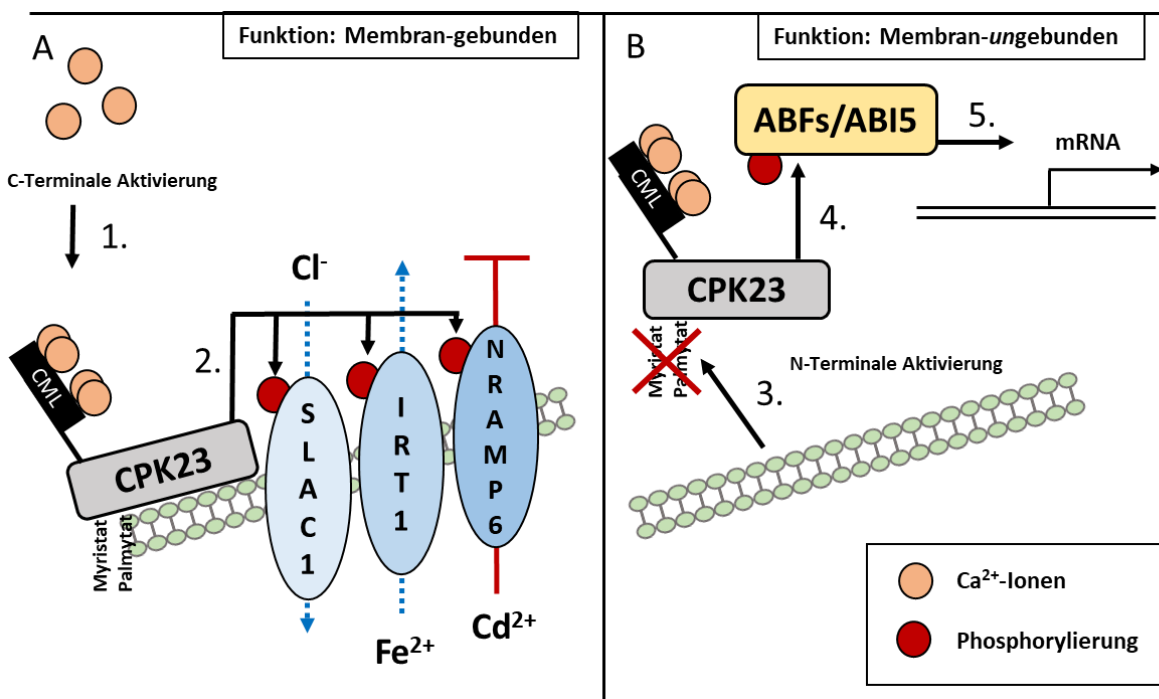


Abb. 4. 1: Duale Funktion von CPK23.

(A) An der Membran reguliert CPK23 nach einer Ca^{2+} -abhängigen C-terminalen Aktivierung über Phosphorylierung die Aktivität von Transportern. (B) Nach einer N-terminalen Aktivierung ändert CPK23 die Lokalisation und kann Elemente der ABA-Signaltransduktion regulieren.

Der ABA-Signalweg im Stomataschluss

ABA ist ein Phytohormon, das die Pflanzen-Antwort auf abiotischen Stress steuert und dementsprechend in Reaktion auf Stress-Bedingungen gebildet wird (Sah et al., 2016). Unter Nicht-Stress Bedingungen werden SnRK2 Proteine via Dephosphorylierung durch PP2Cs in einem inaktiven Zustand gehalten. Erst nach Bindung von ABA an RCARs können RCARs mit den PP2Cs einen Komplex bilden, der die PP2C-abhängige Inhibierung der SnRK2 Proteine aufheben kann. Diese können nun die Transkriptionsfaktoren des ABA-Signalweges durch Phosphorylierung aktivieren und die Signalkaskade somit in Gang setzen (Yoshida et al., 2019). Die hier involvierten Transkriptionsfaktoren sind ABA *Insensitive 5* (ABI5) und die 4 ABRE-Bindungsfaktoren/ABRE-Bindeproteine (ABFs/AREBs) aus der Familie der *basic Leucine Zipper* (bZIP) Transkriptionsfaktoren. Durch die Regulation von Zielgenen nehmen sie direkt Einfluss auf die Keimung unter Stress-Bedingungen und das vegetative Wachstum der Pflanzen. Bei letzterem sind insbesondere Photorespiration, Chlorophyll-Katabolismus und Blattseneszenz, Stomata-Schluss, sowie Blütenbildung betroffen (Collin et al., 2021). Während zwar auch niedrige Expressions-Level von ABI5 mit einer Aufrechterhaltung der Stomata-Öffnung in Verbindung gebracht wird, so ist die Hauptfunktion von ABI5 doch in Keimungsprozessen zu finden, wo es das Keimen und das danach folgende Wachstum unter schlechten Umweltbedingungen unterdrückt (Kang et al., 2018). Die ABFs sind jedoch direkt in die Stomata-Regulierung involviert und beeinflussen den Stomata-Schluss durch die Initiierung der Expression ihrer im Stomata-Schluss involvierten Zielgene: (1) Die notwendige Um-Modellierung des Aktin-Cytoskeletts erfolgt durch den Aktin-Depolymerisierenden Faktor 5 (ADF5) (Qian et al., 2018) und (2) die Expression von Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase I (TPPI) führt zur Akkumulierung der hier benötigten Disaccharid-Trehalose (Lin et al., 2020). Durch eine Regulation der ABFs ist es demnach möglich, dass auch Pflanzen mit nicht-membrangebundenem CPK23 eine reduzierte Transpirationsrate aufweisen.

4.1.3 Die Rolle von CPK23 in Keimungsprozessen

Da Elemente des ABA-Signalweges ebenfalls in Keimungsvorgängen involviert sind, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von CPK23 in transgenen Linien auf die Keimungsrate analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese in Abhängigkeit von CPK23 unter abiotischen Stress stark reduziert wird. Dieser Befund könnte auf eine erhöhte Aktivierung des ABA-Signalweges hinweisen.

Die Keimung gehört zum Lebenszyklus aller höheren Pflanzen: Samen, Keimling, vegetative Phase und reproduktive Phase. Die Keimung beginnt damit, dass ein dormanter Samen Wasser aufnimmt und gilt als abgeschlossen, wenn ein Teil des Embryos, meist das Radikel (Keimwurzel), durch die Samenschale bricht (Kucera et al., 2005). Die Samen-Dormanz und –Keimung wird dabei durch Umweltbedingungen

wie Temperatur, Licht, Wasser und Nährstoffzusammensetzung im Boden und dem endogenen Hormonstatus beeinflusst (Holdsworth et al., 2008b). ABA fungiert als positiver Regulator der Dormanz und negativer Regulator der Keimung (Kucera et al., 2005). Dementsprechend führt die Überexpression von Genen des ABA-Signalweges zu Pflanzen mit Keimungs-assoziierten Phänotypen (Ali et al., 2022). Auch in dieser Arbeit zeigten transgene Linien (Expression über pUBI10 und pCPK23C) eine verringerte Keimungsrate bei geringen Konzentrationen an abiotischen Stress (Abb. 3.2-C/D/E) (Anhang 5.5.1). Auch unter Nicht-Stress Bedingung war die Keimungsrate in den entsprechenden Linien stark reduziert. Dieser Befund erhärtet die Rolle von CPK23 als positiven Regulator des ABA-Signalweges. Für andere CPKs konnte bereits eine negative Wirkung auf die Keimung gezeigt werden. Die Überexpression von CPK32 führt zu einer Reduktion der Keimung, jedoch nur unter hohen ABA-Konzentrationen (Choi et al., 2005). Überexpressions-Linien von CPK4 und CPK11 keimen ebenfalls nach Zugabe von ABA schlechter als der Wildtyp und zeigen diesen Effekt bereits bei niedrigen Konzentrationen (Zhu et al., 2007). In diesem Fall zeigen *Knockout*-Pflanzen für die beiden Gene ein im Vergleich zum Wildtyp toleranteres Verhalten in ihrem Keimungsverhalten. Dies konnte für *cpk23* nicht in diesem Umfang beobachtet werden (Anhang 5.5.5). Möglicherweise ist die hier eingebrachte T-DNA Insertion nicht ausreichend, um die Aktivität von CPK23 komplett zu negieren, da sich die Insertion in der Calmodulin-Domäne befindet (Korte, 2009), oder für CPK23 existieren zu viele andere redundante CPKs, die den CPK23-Effekt kaschieren könnten. Ebenfalls denkbar ist, dass die untersuchten Bedingungen bei wildtypischen CPK23 nicht zu einer C-terminalen Aktivierung führen. Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass es sich sowohl bei CPK4/11 und CPK32, als auch bei CPK23 um positive Regulatoren des ABA-Signalweges in Keimungsprozessen handelt. CPK12 hingegen ist ein negativer ABA-Regulator in Keimungsprozessen. CPK12-RNAi *knockdown*-Linien zeigen ein hypersensitives Keimungsverhalten unter Stress-Bedingungen. Zwar phosphoryliert CPK12, wie CPK4 und CPK11, ABF1 und ABF4, zusätzlich interagiert CPK12 jedoch ebenfalls mit dem PP2C ABI2 und nimmt über dieses negativen Einfluss auf den ABA-Signalweg (Zhao et al., 2011). Auf diese Weise scheint CPK12 den ABA-Signalweg über positive (Phosphorylierung von ABFs) und negative Ereignisse (Stimulierung von PP2Cs) in einem Gleichgewicht zu halten. Da jedoch keine direkte Phosphorylierung von ABI2 durch CPK12 gezeigt werden konnte, und sich dieses hinsichtlich Lokalisation nicht von CPK11 und CPK4 unterscheidet, ist es fraglich, ob die unterschiedliche Wirkung auf die Keimung nur durch die Interaktion mit ABI2 zu Stande kommen kann.

Einfluss von CPK-Genexpression in Keimungsprozessen

Während CPK11 und CPK4 sowohl in trockenen als auch in bewässerten Samen hoch exprimiert wird, ist die Expression von CPK12, aber auch von CPK23, hier deutlich geringer (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>) (Abb. 4.2). Die niedrige Expression von CPK23 im Samen könnte

Diskussion

erklären, warum *cpk23* keinen keimungsrelevanten Effekt zeigt (Anhang 5.5.5): bei der niedrigen Ausgangskonzentration an CPK23-Transkript macht eine weitere Reduktion möglicherweise keinen großen Unterschied. Andererseits würde dies bedeuten, dass CPK23 keinen großen Einfluss in der Keimung hat. Da jedoch auch ein CPK23-abhängiger Effekt in transgenen Pflanzenlinien unter dem endogenen Promotor gezeigt werden konnte (Anhang 5.5.1) und die Transkriptmenge keine Rückschlüsse auf die Proteinmenge gibt, ist dieser Erklärungsansatz zumindest nicht vollständig. Wahrscheinlicher ist auch hier, dass unter den gewählten Bedingungen keine C-terminale Aktivierung des wildtypischen CPK23-Proteins erfolgt, dies aufgrund der konstitutiv aktiven Varianten in den transgenen Linien jedoch nicht erforderlich ist. Das Expressionslevel kann aber erklären, warum CPK32-Überexpression nur zu einer geringfügigen Reduktion der Keimung führt. CPK32 weist eine erheblich größere Transkriptmenge in Samen als die anderen CPKs auf (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>) (Abb. 4.2). Daher macht eine zusätzliche Expression in WT-Pflanzen (zumindest in Samen) wahrscheinlich nur einen geringen Unterschied. Eine CPK32-KO Linie hingegen könnte eindeutige Effekte zeigen, da die Expressionsrate von CPK32 in trockenen Samen eine wichtige Rolle in der Regulierung von Keimungsprozessen nahelegt.

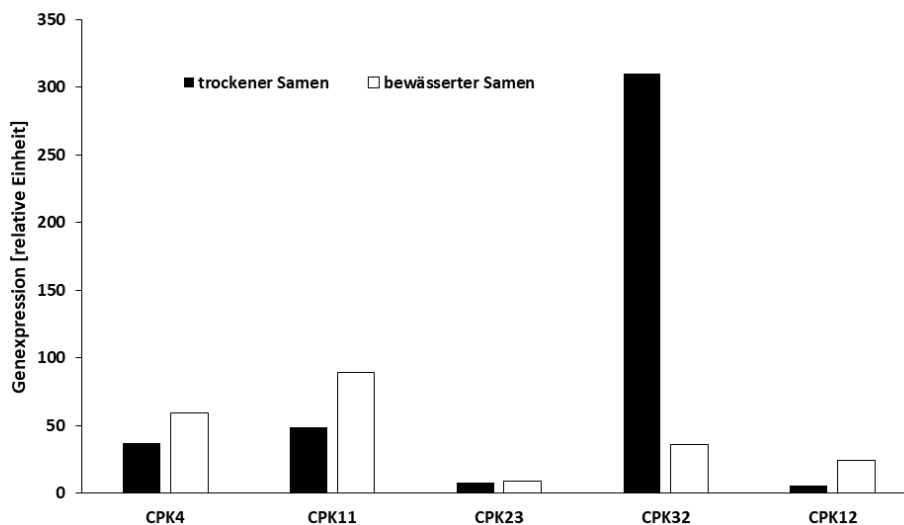


Abb. 4. 2: Genexpression von CPKs im Samen.

CPK32 wird in trockenen Samen stark exprimiert, während CPK23 und CPK12 nur schwach exprimiert werden. Die Expressionsrate von CPK4 und CPK11 liegt zwischen diesen. Im bewässerten Samen steigt die Genexpression für alle hier analysierten CPKs, mit Ausnahme von CPK32 (sinkt stark ab) und CPK23 (bleibt unverändert), an (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>).

Diskussion

Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Überexpressions-Studien, wurde in dieser Arbeit mit konstitutiv aktiven CPK23-Varianten gearbeitet (also Varianten, die keiner zusätzlichen Regulierung durch Calcium unterworfen sind, da die Calmodulin-Domäne fehlt). Da es sich folglich um konstitutiv aktive Varianten handelt, macht es Sinn, dass die Keimung bereits in Samen unter Optimal-Bedingungen inhibiert ist, da hier keine Aktivierung über Ca^{2+} mehr erforderlich ist. Stressbedingungen führen stattdessen eher durch die erhöhte Expression von möglichen CPK23 Ziel-Proteinen (beispielsweise ABFs) zu einer weiteren Keimungsinhibierung als durch die Regulation des CPK23-Proteins selbst. Während CPK32, CPK4, CPK11 und CPK12 bereits Kernlokalisierung aufweisen, ist CPK23 ausschließlich membranlokalisiert (Abb. 3.1-D). Um diese Limitierung zu umgehen, wurden die Keimungsexperimente auch mit N-terminal modifizierten CPK23 durchgeführt. Während unter abiotischen Stress alle CPK23-Linien ein hypersensitives Keimungs-Verhalten zeigten, war dieser negative Effekt auf die Keimung unter Normalbedingungen hauptsächlich in den modifizierten Varianten zu erkennen (Abb. 3.2-C/D/E). Dies spricht dafür, dass der CPK23-Einfluss auf die Keimung stark reguliert ist und eine De-Regulierung sogar unter Normalbedingungen gravierende Effekte haben kann. Da für CPK4 und CPK11 angenommen wird, dass deren negative Wirkung auf die Keimung in Anwesenheit von ABA mit ihrer Aktivität auf ABF1 und ABF4 zusammenhängt (Shi et al., 2018), ist für CPK23 eine analoge Funktion denkbar.

Involvierung der ABFs in Keimungsvorgängen

Auch wenn ABFs in der Keimung involviert sind, stellen sie hier nicht den Hauptakteur dar und ihre Involvierung in diesen Prozessen ist strittig. ABF1, ABF2 und ABF3 Single KO-Pflanzen keimen unter Optimalbedingungen schneller. Dies gilt auch für die Keimungsrate von ABF4 und ABF3 Single KO-Pflanzen nach ABA-Behandlung (Kim et al., 2004) (Sharma et al., 2011). In einer anderen Arbeit zeigten Einzel-KOs und eine dABF2/ABF3/ABF4-Linie jedoch keinerlei Beeinflussung in Keimungsvorgängen nach ABA-Behandlung (Yoshida et al., 2010). Dieselbe Pflanzen-Linie zeigte jedoch in dieser Arbeit hier durchaus ein schnelleres Keimen unter abiotischen Stress-Bedingungen (Anhang 5.5.2). Dasselbe gilt für eine ABF1-Single KO-Linie, welche ebenfalls eine zeitlich schnellere Keimung als der WT unter diesen Stressbedingung zeigen konnte (Anhang 5.5.2). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass transgene Linien die ABF3 und ABF4 überexprimieren, bereits unter Normalbedingungen langsamer keimen als der entsprechende Ler-0 WT. Bereits geringe Konzentrationen an ABA und NaCl reduzierten die Keimungsraten für beide Linien deutlich (Kang et al., 2002). Da Linien mit N-terminal modifiziertem CPK23 ein ähnliches Keimungsverhalten unter Normalbedingungen wie Linien die ABF3 und ABF4 überexprimieren zeigen (Anhang 5.5.1), kann hier zumindest angenommen werden, dass der CPK23-abhängige Effekt teilweise durch Kooperation mit ABFs zu Stande kommt. Für diesen Effekt ist unter Normalbedingung eine membranungebundene Form von CPK23 scheinbar zwingend notwendig,

wohingegen dies in Anwesenheit von abiotischem Stress nicht mehr in diesem Umfang vorausgesetzt zu sein scheint. Da im dormanten Samen ABF4 Transkript stark angereichert vorliegt, ist es möglich, dass hier bereits genug Zielprotein für CPK23 vorhanden ist (Cadman et al., 2006), um den ABA-Signalweg via CPK23 zu induzieren und den Samen in einem dormanten Zustand zu halten. Salzstress wiederum führt zur Reprimierung der ABF4 und ABF1 Expression in Samen, gleichzeitig jedoch zur Induzierung der ABF3-Expression (Fernando et al., 2018). Trotz dieser Hinweise auf eine Involvierung der ABFs in Keimungsprozessen, ist der aktuelle Konsens, dass ABFs an vegetativen Wachstumsprozessen beteiligt sind, wohingegen in Keimungsprozessen hauptsächlich ABI5 verantwortlich ist (Waadt et al., 2022).

Involvierung von ABI5 in Keimungsvorgängen

Die Cytokinin-abhängige Degradation von ABI5 löst die Samenkeimung aus (Guan et al., 2014), indem durch die Inhibierung des ABA-Signalweges das Hormon-Gleichgewicht in Richtung der keimungsfördernden Gibberiline verschoben wird (Finkelstein, 2013). Die stärkste Expression von ABI5 kann in reifen Samen und jungen Keimlingen beobachtet werden und wird durch ABI3 und ABI4, sowie ABI5 selbst, ausgelöst (Finkelstein and Lynch, 2000). ABF3 inhibiert die Expression von ABI5 hingegen (Finkelstein et al., 2005), was bedeutet, dass trotz überlappender Funktionen in gewissen Stadien eine antagonistische gegenseitige Regulation zwischen ABI5 und ABFs stattfinden kann. Um zu überprüfen, ob CPK23 über ABI5 den ABA-Signalweg induzieren kann, wurde dies in dieser Arbeit in Protoplasten und Hefe-Experimenten getestet, wobei in beiden Fällen die Induktion eines ABA-abhängigen Reporters analysiert wurde. In beiden Systemen war CPK23 in der Lage, den ABA-Signalweg über ABI5 zu induzieren (Abb. 3.6). Das ebenfalls getestete SnRK2.6 zeigte diesen Effekt in Protoplasten hingegen nur bei Anwesenheit von ABA, und in Hefe überhaupt nicht (Abb. 3.6), und benötigt dementsprechend eine weitere aktivierende Komponente, welche in Pflanzen zwar vorhanden ist, in Hefe jedoch fehlt. Folglich ist es CPK23 möglich den ABA-Signalweg über ABI5 zu regulieren und über dieses Einfluss auf die Keimung zu nehmen.

Es ist jedoch nicht möglich abschließend zu klären, ob dieser Einfluss letztendlich via ABI5 oder den ABFs vermittelt wird. Um Aussagen hierüber treffen zu können, wurden zusätzlich dABF1 und dABF2/ABF3/ABF4-Linien mit CPK23 unter dem endogenen CPK23-Promotor transformiert und die Keimungsrate dieser Linien unter verschiedenen Stress-Bedingungen analysiert. Zwar konnte in diesen transgenen Linien im Vergleich mit den Ausgangslinien nach wie vor geringere Keimungsraten beobachtet werden (was auf einen ABF-abhängigen Keimungsphänotyp schließen würde), jedoch waren gleichzeitig die Keimungsraten in entsprechenden Kontroll-Linien mit Toter Kinase (TK) und LV ebenfalls auf ein vergleichbares Niveau reduziert (Anhang 5.5.3). Dies macht eine Auswertung des Befundes unmöglich und ist gleichzeitig schwer zu erklären. Dass eine Linie mit Toter Kinase

(CPK23_TK) ebenfalls einen Keimungsphänotyp zeigt, könnte zumindest noch durch einen *complex-poisoning* erklärt werden (Yook, 2005), indem durch diese Variante ein dysfunktionaler Protein-Komplex gebildet wird, beispielsweise indem hier andere CPKs in einer Multimer-Struktur gebunden, aber nicht aktiviert werden. Schlussendlich ist es möglicherweise nicht möglich den CPK23-abhängigen Einfluss auf ABI5 und die ABFs in Keimungsvorgängen eindeutig zu trennen, da diese hier synergistische Rollen ausüben: unter abiotischen Stress hat ABF3 redundante Funktionen mit ABI5 im Samen und induziert hier zusätzlich dessen Expression unter Salzstress (Finkelstein et al., 2005) (Chang et al., 2019), unter Salz- und osmotischen Stress regulieren ABF1/ABF3 und ABF4 die Samenkeimung *downstream* von *De-Etiolated 1* (DET1), einem negativen Regulator der in Licht-Signalwegen involviert ist (Fernando et al., 2018), und ABI5 kann Heterodimere mit ABFs bilden (Lynch et al., 2012) (Collin et al., 2021).

4.1.4 Der aminoterminalen Kontrollmechanismus

Um nukleäre Elemente des ABA-Signalweges beeinflussen zu können, müssen CPKs membranungebunden vorliegen. Die strikte Membranassoziation von CPK23 kann über verschiedene Modifikationen des CPK23 N-Terminus aufgehoben werden, die für eine Aktivierung des ABA-Signalweges in Protoplasten Reporter-Assays benötigt werden. Die eingebrachten artifiziellen Anpassungen mimiken dabei mögliche post-translationale Modifikationen und liefern Hinweise auf regulatorische Elemente im N-Terminus des Proteins.

Für eine Vielzahl von CPKs wurde eine direkte Regulation des ABA-Signalweges über die ABFs bereits gezeigt: (1) CPK4 und CPK11 phosphorylieren ABF1 und ABF4 *in-vitro* (Zhu et al., 2007), (2) CPK12 kann neben ABF1 und ABF4 auch ABI2 phosphorylieren (Zhao et al., 2011), (3) CPK32 kann mit ABF4 *in-vitro* interagieren und dieses phosphorylieren (Choi et al., 2005). Da für eine direkte Regulierung der TFs *in-planta* die gleiche Lokalisation der Komponenten eine Grundvoraussetzung ist, die meisten CPKs jedoch über post-translationale Modifikationen an der Membran verankert vorliegen, macht dieser Befund zunächst nur für CPK4, CPK11 und CPK12 Sinn. Diese weisen in ihrem N-Terminus eine große Deletion auf und verfügen nicht über eine Domäne für eine Membran-Assoziierung (Abb. 3.25). CPK32 hingegen beinhaltet neben einer Myristoylierungsstelle auch gleich zwei Palmitoylierungsstellen. Trotzdem ist CPK32 auch im Kern anzutreffen und kolokalisiert dort mit ABF4. Zurückführbar ist diese Lokalisation auf 3 nukleäre Lokalisationssequenzen, von denen eine im N-Terminus und zwei in der Kinase-Domäne vorzufinden sind (Choi et al., 2005). Unter einer nukleären Lokalisations-Sequenz (NLS) versteht man ein Peptid, welches durch Carrier-Proteine gebunden werden kann und durch dieses in den Kern transportiert wird. Typischerweise bestehen diese Sequenzen aus Clustern basischer

Aminosäuren (K und R) die von Lücken unterbrochen sind (Lin and Hu, 2013). CPK32 bildet damit eine Ausnahme, da weder CPK12 noch CPK4 und CPK11 über solche Sequenzen verfügen (<https://roslab.org/services/nlsdb/>). Auch CPK23 weist keine klassischen NLS auf. Trotzdem führte die Aufhebung der Membranbindung für CPK23 zu einer deutlichen Induktion des ABA-Signalweges (Abb. 3.1).

Die artifizielle Aufhebung der Membranbindung

Die Aufhebung der Membranbindung kann über eine Vielzahl von Modifikationen erfolgen, die meist das Ziel haben die Myristoylierung und die anschließende Palmitoylierung zu unterbinden. Die Myristoylierung beschreibt dabei das kotranslationale Anbringen einer gesättigten C14-Kette an das N-terminale Glycin des Zielproteins, nachdem in einem ersten Schritt das Start-Methionin abgespalten wurde (Martin et al., 2011). Dieser Schritt ermöglicht den Transport an die Membran und die Initial-Bindung an diese. Da die auf diese Weise vermittelte Membran-Assoziation nur schwach ist, muss für eine stärkere Verankerung ein zusätzlicher Palmitat-Rest an ein sich in der Umgebung befindendes Cystein angebracht werden, die sogenannte Palmitoylierung (Castrec et al., 2018). Wird in CPK23 eine G2A Mutation eingebracht, unterbleibt die Myristoylierung. Derselbe Effekt ist zu beobachten, wenn ein kurzer Aminosäure-Rest vor das Start-Methionin kloniert wird. Auf diese Weise befindet sich das Glycin nicht mehr an der zweiten Position und wird daher nicht als Substrat für die N-Myristoyl-Transferase (NMT) erkannt (Hemsley, 2015). Die so generierten CPK23-Varianten zeigten in dieser Arbeit eine abgeschwächte Membran-Lokalisation und waren in der Lage den ABA-Signalweg in Protoplasten-Assays über den pRD29B-LUC-Reporter zu aktivieren (Abb. 3.1-C-E). Das Verkürzen des N-Terminus führte ebenfalls zu einer Membranablösung. Ob die N-terminal verkürzten Varianten noch in der Lage waren den ABA-Signalweg zu induzieren, hing jedoch von der Größe des abgeschnittenen Fragmentes ab. Während eine kurze Deletion (19aa) eine mit den 9aa- und den G2A-C3A- Varianten vergleichbare Induktion des ABA-Signalweges bewirkte, sank diese mit steigender Deletionsgröße deutlich ab. Wurde der komplette N-Terminus deletiert (68aa), fand keine Induktion mehr statt (Abb. 3.1-F). Dies deutet auf wichtige Elemente im CPK23-N-Terminus, die entweder für die Regulation des Proteins selbst oder aber die Interaktion mit Zielproteinen von Nöten sind, hin. Der N-Terminus von RccDPK1 (ein Ortholog zu AtCPK4 und AtCPK11) ist beispielsweise nötig um die Autophosphorylierung zu gewährleisten und damit entscheidend für die katalytische Aktivität des Proteins, wohingegen er nicht in die Bindung von Zielproteinen involviert ist (Ying et al., 2017). Für TgCPK1 konnten Strukturanalysen zeigen, dass der N-Terminus eine Art Dockingmotiv für die katalytisch aktive Domäne (CAD) bildet (Wernimont et al., 2010). Eine Strukturanalyse (Abb. 4.3) für CPK23 stellt den N-Terminus jedoch nur als weitgehend unstrukturierten Bereich dar (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

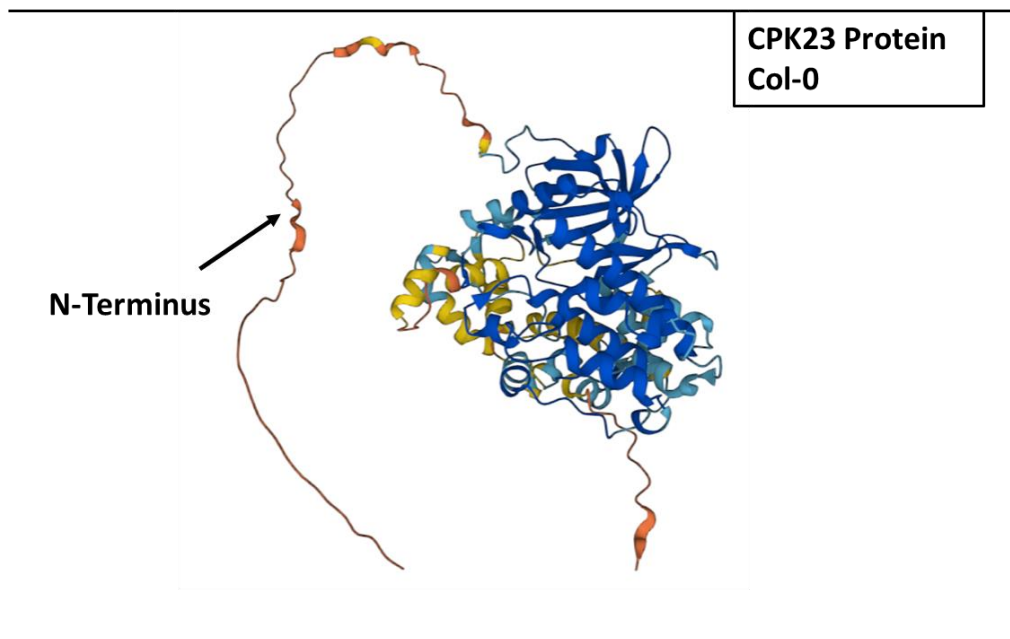


Abb. 4. 3: Die Proteinstruktur von CPK23.

Für den N-Terminus kann keine gesicherte Struktur vorhergesagt werden (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

Substrat-Bindestellen im CPK23 N-Terminus

Da CPK23 im N-Terminus über viele *intrinsic disordered regions* (IDRs) verfügt, ist eine Strukturvorhersage hier schwierig. Es wäre denkbar, dass CPK23 beispielsweise durch Autophosphorylierung die Struktur ändert und der N-Terminus nach dieser in Kooperation mit der CAD die Kinase-Aktivität stabilisiert. Auch eine Involvierung des CPK23 N-Terminus in der Substrat-Bindung ist möglich. CPK1 aus Tabak benötigt den N-Terminus um *Repressor of Shoot Growth* (RSG) zu binden und CPK5 aus Kartoffeln benötigt den N-Terminus um RBOHB zu binden (Ito et al., 2010) (Asai et al., 2013). Dies sind jedoch die bisher einzig bekannten Beispiele (Bender et al., 2018). IDRs sind dafür bekannt Binderegionen zu beinhalten, die mit spezifischen globulären Domänen Interaktionen eingehen können. In dem meisten Fällen geht der hier involvierte Teil der *disordered regions* nach der Bindung in einen geordneten Zustand über und stellt eine Partner-abhängige Transition zwischen diesen beiden Zuständen dar. Für CPK23 kann über den *ANCHOR2 prediction* Algorithmus ebenfalls eine solche mögliche Bindestelle vorhergesagt werden (Mészáros et al., 2018). Das Maximum dieser Bindestelle befindet sich der Vorhersage nach zwischen der 20.ten und der 30.ten Aminosäure und die Wahrscheinlichkeit beträgt über 80 % (<https://iupred2a.elte.hu/>) (Abb. 4.4). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Verlust der CPK23 Aktivität auf den ABA-Signalweg bei einer Deletion des N-Terminus auf die ausbleibende Bindung der Zielproteine zurückzuführen ist. Offensichtliche Zielproteine von CPK23 sind ABFs.

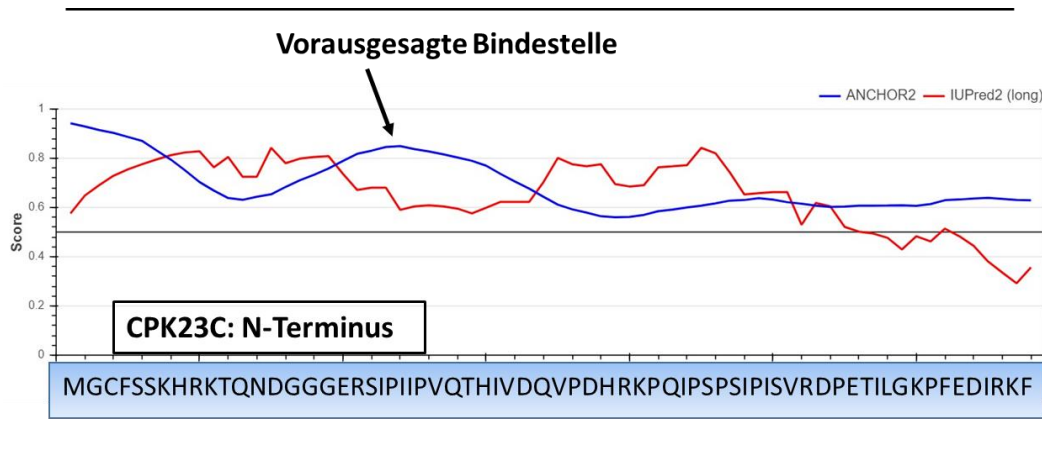


Abb. 4. 4: Ungeordnete Regionen und zusätzliche Bindestellen im CPK23-N-Terminus.

Mit einem Programm zur Analyse von ungeordneten Regionen (IDRs) in Proteinen, kann für CPK23 mit über 80 % Wahrscheinlichkeit eine zusätzliche Bindestelle im N-Terminus vorhergesagt werden. Diese befindet sich etwa zwischen der 20.ten und 30.ten Aminosäure (<https://iupred2a.elte.hu/>) (Mészáros et al., 2018).

4.1.5 Die Regulation der ABFs

In Protoplasten- und Hefe-Reporter-Assays können CPK23 und weitere CPKs, wahrscheinlich über Phosphorylierung konservierter Aminosäuren, direkt über ABFs den ABA-Signalweg induzieren. Für die ABF-abhängige Induktion ist im Gegensatz zu Experimenten ohne zusätzlich exprimiertes ABF keine N-terminale Modifikation der CPKs erforderlich. Unterschiede zwischen den verschiedenen CPKs und den beiden verwendeten Systemen könnten auf eine differentielle Regulation durch PP2Cs hinweisen. Eine Interaktion von CPK23 mit PP2Cs in Protoplasten konnte jedoch nur für HAB1 und HAI1 gezeigt werden. ABF1 interagiert hingegen mit den meisten PP2Cs und kann durch diese direkt inhibiert werden.

ABFs ermöglichen die Anpassung an unvorteilhafte Umweltbedingung über die Expression von LEA-Genen, darunter auch *Responsive to Dessication 29B* (RD29B) (Yoshida et al., 2010). Möglich wird dies, über die hier enthaltenen ABRE-Elemente (häufig in Kooperation mit sogenannten coupling Elementen), das Haupt-*cis*-regulatorische Element in der Expression ABA-induzierbarer Zielgene (Hobo et al., 1999). Insbesondere Membran-ungebundenes CPK23 ist in der Lage den ABF-abhängigen pRD29B-LUC Reporter zu induzieren. Da für CPKs eine direkte Regulation der ABFs über Phosphorylierung gezeigt wurde, liegt der Schluss nahe, dass auch CPK23 den ABA-Signalweg über die Phosphorylierung von ABFs induziert. Daher wurden in dieser Arbeit ABF1, ABF2, ABF3 und ABF4 mit CPK23 koexprimiert. CPK23 war in Protoplasten-Assays in der Lage den ABA-Signalweg über alle 4 ABFs zu induzieren (Abb. 3.14-A). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CPK23 ABF2

Diskussion

an der Position S86 und S94 phosphoryliert. Eine ABF2-S86A-S94A Mutante konnte dementsprechend nicht mehr in Hefe transaktiviert werden (Ruschhaupt, 2018). In dieser Arbeit wurde der Befund ebenfalls in Protoplasten bestätigt. Auch hier war CPK23 nicht in der Lage den Signalweg über ein derart modifiziertes ABF2 zu induzieren (Anhang 5.7). Es wurde geschlussfolgert, dass die Phosphorylierung durch CPK23 an diesen Stellen eine Änderung der ABF2-Proteinstruktur bewirkt. Die für die Aktivität wichtige C1-Domäne von ABF2 löst sich durch die Phosphorylierung der inhibierenden C2-Domäne von dieser und der Transkriptionsfaktor ist aktiviert (Ruschhaupt, 2018). Da die ABFs in dem Bereich der Phosphorylierungsstellen S86 und S94 streng konserviert sind und alle dementsprechend das gleiche Motiv aufweisen (Abb. 4.5), ist es möglich, dass alle ABFs über CPK23 in der gleichen Weise aktiviert werden. Eine der ABF2-S94A entsprechenden Variante für ABF1 konnte noch durch CPK23 aktiviert werden (Anhang 5.7), ein Umstand der die Wichtigkeit der S86 Phosphorylierungsstelle für eine CPK23-abhängige Aktivierung hervorhebt. Auch CPK32 phosphoryliert ABF4 an Ser110 und eine S110A Mutante zeigte einen deutlichen Rückgang von ³²P-Einbau. Ser118 wurde hier scheinbar nicht CPK32-abhängig phosphoryliert (Choi et al., 2005). CPK3 und CPK16 phosphorylieren ABF3 *in-vitro* an Ser134. Statt einer zusätzlichen Phosphorylierung von Ser126 konnte hier hingegen eine von Thr128 gezeigt werden (Chang et al., 2019). Ser110 und Ser118 in ABF4, sowie Ser126 und Ser134 in ABF3, entsprechen dabei Ser86 und Ser94 in ABF2. Man kann also davon ausgehen, dass die meisten im ABA-Signalweg involvierten CPKs die ABFs in der konservierten C2-Domäne der ABFs phosphorylieren. Für diese Annahme spricht ebenfalls, dass diese möglichen Phosphorylierungsstellen jeweils auch Bestandteil des konservierten L-X-R/K-X-X-S/T CPK-Konsensus-Motivs sind (Kawamoto et al., 2015).

ABI5	GVGVFSGGSRGNEDANNKRGIANESSLPRQGS ⁸⁶ LTLPAPLCRKTVD ⁹⁴ EVWSEIHRGGGSGNG	173
ABF2	-----LGGGQEG ⁸⁶ LQLQRQGS ⁹⁴ LTLPRTLSQKTVDQVWKDLSKVGSSGVG	114
ABF3	NIGGLAVGVG-----GESGGFFTGGSLQRQGS ⁸⁶ LTLPRTISQ ⁹⁴ KRVDDVWKELMKEDDIGNG	154
ABF1	-----AP-----GPSGFVPGGNLQRQGS ⁸⁶ LTLPRTLSQ ⁹⁴ KTVDEVW ⁹⁴ KYLNSKEGSNG-	123
ABF4	-----AQ-----PGAGIPPPGGNLQRQGS ⁸⁶ LTLPRTISQ ⁹⁴ KTVDEVW ⁹⁴ KCLITKDG ⁹⁴ NMEG	138
	* ***** :.:* **:*. : .	

Abb. 4. 5: Alignment der ABFs mit ABI5.

Die Phosphorylierungsstelle S86 von ABF2 ist in allen ABFs und ABI5 konserviert, die Phosphorylierungsstelle an Position 94 jedoch nur in den ABFs. Die Phosphorylierungsstellen sind dabei Bestandteil des konservierten L-X-R/K-X-X-S/T CPK-Konsensus-Motiv (Kawamoto et al., 2015).

Regulation der ABFs durch CPKs

Neben CPK23 konnten auch andere CPKs in dieser Arbeit den ABA-Signalweg in Protoplasten über ABF1-4 induzieren (Abb. 3.26-A). In diesem Experiment wurden N-terminal unmodifizierte CPK-Varianten verwendet, die mit Ausnahme von CPK4 und CPK11 über Myristoylierung und Palmitoylierung (CPK10, CPK15, CPK21, CPK23, CPK31) oder nur über Myristoylierung (CPK3 und CPK5) mit der Membran assoziiert sind (Abb. 3.25). Trotzdem konnte eine Induktion des ABA-Signalweges neben CPK4 und CPK11 (welche durch eine Deletion im N-Terminus nicht an die Membran gebunden sind) auch für CPK23 und CPK10 in vergleichbaren und für CPK3 und CPK5 in geringerem Umfang gezeigt werden. Da es in Protoplasten *in-vivo* Assays nicht möglich ist, zwischen einer direkten oder indirekten Induktion der ABFs zu unterscheiden, wurde das Experiment im heterologen Hefesystem in Anwesenheit von ABF2 wiederholt. Auch in diesem System konnten die positiven Induktoren CPK4, CPK11, CPK10, CPK3 und CPK5 den ABA-Signalweg direkt über ABF2 aktivieren (Abb. 3.26), jedoch waren in diesem Fall die Tendenzen teilweise umgekehrt: (1) CPK4 und CPK11 zeigten im Hefe-System im Gegensatz zu dem Experiment in Protoplasten nur eine schwache Induktion des ABA-Signalweges. Möglicherweise handelt es sich bei ABF2 um kein direktes Zielprotein, da eine *in-vitro* Phosphorylierung nur für ABF1 und ABF4 gezeigt wurde (Zhu et al., 2007). Die entsprechende Induktion in Col-0 Protoplasten könnte folglich durch endogen vorhandenes ABF1 und ABF4 vermittelt werden. Auch möglich ist eine in Hefe, aufgrund fehlender Faktoren, ausbleibende Stabilisierung oder Aktivierung. CPK4 und CPK11 werden *in-planta* zwar über ABA stimuliert indem das Protein-Level erhöht wird, dies geht jedoch nicht mit einer gesteigerten Expression einher (Zhu et al., 2007). Vielmehr wird hier die Protein-Stabilität in Anwesenheit von ABA gesteigert, möglicherweise indem der Abbau verhindert wird oder über post-translationale Modifikationen durch ein ABA-abhängiges Protein. Die CPK4 und CPK11-abhängige Phosphorylierung der ABFs wurde dabei nach Immunopräzipitation der CPKs aus Keimlingen nachgewiesen. Es ist daher möglich, dass die beiden CPKs bereits davor durch andere pflanzliche Proteine aktiviert wurden und dieser Vorgang für die Phosphorylierung der ABFs notwendig ist. Dafür spricht, dass die ABF-Phosphorylierung stärker ausfiel, wenn die Keimlinge vorher mit exogenem ABA behandelt wurden (Zhu et al., 2007). Da dieser Mechanismus in Protoplasten, durch die hier ebenfalls vorhandenen pflanzlichen Proteine möglich ist, in Hefe jedoch nicht, könnte dieser Unterschied die Diskrepanz zwischen den beiden Analyse-Systemen erklären. Auch ist es möglich, dass in Protoplasten zwischengeschaltete Enzyme existieren, welche das Signal an ABFs weiterleiten. So wurde in einer vorangegangenen Arbeit eine Interaktion zwischen RCAR1 und RCAR3 mit dem CPK23 aus Ler-0 nachgewiesen (Korte, 2009). CPK11 ist ebenfalls in der Lage mit CPKs zu interagieren und durch Phosphorylierung des CPK24 N-Terminus Einfluss auf Kalium-Kanäle in Pollenschläuchen zu nehmen. Interessanterweise zählt CPK24 dabei zu den CPKs, die trotz vorhandener Myristoylierung und Palmitoylierung sowohl an der Membran als auch im Kern

vorzufinden sind. Die Interaktion mit CPK11 findet hingegen nur an der Membran statt (Zhao et al, 2013). Es ist nicht bekannt, ob die Kernlokalisierung von CPK24 mit diesem Umstand in Zusammenhang steht, beispielsweise indem entweder die CPK11-abhängige Phosphorylierung von CPK24 eine Lokalisationsänderung hin zum Kern oder aber eine stringenter Membranlokalisierung bewirkt. CPK24 weist jedenfalls eine geeignete CPK-Konsensus-Sequenz zu Beginn des N-Terminus in der Form V-X-R-X-X-S₂₄ auf. Ein möglicher analoger Mechanismus mit CPK23 oder CPK10 als CPK11-Substrat scheint hingegen unwahrscheinlich, da beide in dieser Region über keine CPK-Konsensus-Sequenz verfügen. (2) CPK10 und CPK23 zeigten in beiden getesteten Systemen eine gleichermaßen starke Induktion des ABA-Signalweges über die verwendeten ABFs. Folglich handelt es sich bei diesen beiden CPKs um direkte Aktivatoren der ABFs. (3) Für CPK3 und CPK5 war in Protoplasten nur eine geringe Induktion des Signalweges über die ABFs erkennbar, während dieser Effekt über ABF2 in Hefe deutlich stärker ausgeprägt war (Abb. 3.26). Dies zeigt, dass CPK3 und CPK5 beide in der Lage sind über die ABFs den ABA-Signalweg zu regulieren, dies aufgrund ihrer Lokalisation *in-planta* aber möglicherweise nicht im theoretisch-möglichen Umfang bewerkstelligen können. Da CPK3 nur über eine Myristoylierungsstelle, aber über kein palmitoylierbares Cystein verfügt, und CPK5 gemeinhin als ebenfalls nur myristoyliert gilt, können beide Proteine in Pflanzen jedoch auch in Cytosol und Kern lokalisieren (Yip Delormel and Boudsocq, 2019) (Chang et al., 2019) (Kawamoto et al., 2015). Folglich scheint diese Erklärung nichtzutreffend zu sein. Wahrscheinlich ist eine in Pflanzen stärker erfolgende negative Regulation durch inhibierende Faktoren. Hier sind als Gegenspieler besonders PP2Cs denkbar. Die 7 in Hefe vorhandenen PP2Cs spielen zwar ebenfalls eine Rolle unter Umweltstress (Sharmin et al., 2014) und sind in der Lage MAP Kinasen zu inhibieren (Offley and Schmidt, 2019), eine regulierende Funktion auf pflanzliche Komponenten des ABA-Signalweges ist jedoch nicht beschrieben. Nach aktuellem Stand kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass endogen in Hefe vorhandene PP2Cs einen Einfluss auf die getesteten CPKs haben. Unterschiede zwischen den beiden Systemen beruhen folglich eher auf dem Einfluss endogener pflanzlicher PP2Cs im Protoplasten-System.

Regulation des ABA-Signalweges durch PP2Cs

Um aufzuzeigen, inwiefern PP2Cs CPKs beeinflussen können, wurden beispielhaft Interaktionsstudien zwischen den pflanzlichen PP2Cs und CPK23 durchgeführt. Zwar wurde für CPK23 bereits eine Interaktion mit PP2Cs beschrieben, diese Ergebnisse sind jedoch meist durch Y2H-Interaktionsstudien ermittelt worden (PP2CA interagiert hier beispielsweise mit CPK23 (Korte, 2009)). Das Y2H-System weist bei Membrangebundenen Proteinen jedoch aufgrund unterschiedlicher Lokalisationen deutliche Limitierungen auf (Fujikawa and Kato, 2007). Um diese zu umgehen, wurden Interaktionsstudien in dieser Arbeit direkt in Protoplasten über *split-Luciferase Assays* durchgeführt. Hier konnte eine Interaktion von CPK23 mit HAB1 und HAI1 beobachtet werden, die scheinbar jedoch nur an der

Diskussion

Membran abläuft, da nicht-membrangebundenes CPK23 diese Interaktion nicht zeigte (Abb. 3.20). Das Anhängen eines Teils des Luciferase-Gens an CPK23 führte jedoch zu einem deutlichen Rückgang des Luciferase-Signals. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Interaktionen mit der anderen Hälfte der Luciferase durch eine veränderte Faltung erschwert werden und nicht alle Interaktionen nachweisbar waren. In Y2H war jedoch keine Interaktion zwischen PP2Cs und CPK23 zu beobachten (Abb. 3.22). Die Ergebnisse legen nahe, dass Interaktionen zwischen CPKs und PP2Cs *in-planta* stattfinden. In jedem Fall ist für CPK3 und CPK5 eine Regulierung über die PP2Cs denkbar. Falls diese stärker als für CPK23 ausfällt, könnte dies den Unterschied zwischen den Protoplasten und den Hefe Ergebnissen teilweise erklären. Auch der umgekehrte Weg wäre möglich. Für CPK12 wurde die Phosphorylierung und Aktivierung von ABI2 gezeigt. CPKs können folglich auch negativ über die PP2Cs auf den ABA-Signalweg wirken und diesen somit ausbalancieren (Zhao et al., 2011). Ein hypothetisch durch CPK3 und CPK5 aktiviertes PP2C könnte so beispielsweise den ABA-Signalweg direkt auf Ebene der ABFs negativ regulieren.

In Y2H-Experimenten konnte bereits eine direkte Interaktion zwischen PP2Cs und den ABFs gezeigt werden (Lynch et al., 2012). Die Interaktion von ABF1 mit HAB1, HAI1, HAI3, AHG1 und PP2CA (Abb. 3.23-A/B) legt nahe, dass eine direkte PP2C-abhängige Regulation des ABA-Signalweges auch *in-planta* bereits auf Stufe der ABFs erfolgen kann. Einhergehend damit konnte der ABA-Signalweg in Anwesenheit von ABF1 nicht über das nicht-interagierende ABI1, jedoch über PP2CA, reprimiert werden (Abb. 3.23-C/D). Dass nicht mit PP2Ca interagierende CPK23 konnte entsprechend die PP2CA-vermittelte Reprimierung von ABF1 aufheben, während eine aktive SnRK2.6-Variante, welche selbst durch PP2CA inhibiert wird (Ruschhaupt, 2018), dies nicht vermochte (Abb. 3.21). Es ist denkbar, dass CPK23 eine Position in ABF1 phosphoryliert, welche nicht durch PP2CA dephosphoryliert wird, wohingegen der gegenteilige Fall für die SnRK2.6-abhängige Phosphorylierung gilt.

4.1.6 CPK23 im ABA-Signalweg: Eine Frage der Lokalisation

Die Befähigung von CPK23 und CPK10 in Anwesenheit von ABFs den ABA-Signalweg trotz fehlender artifizieller N-terminaler Modifizierung zu induzieren, wirft die Frage auf unter welchen Umständen CPKs ihre Lokalisation ändern können. Eine solche Lokalisationsänderung wird möglicherweise durch die ABFs selbst initiiert, wodurch eine gegenseitige Regulation der beiden Komponenten denkbar scheint. Die Mechanismen, durch welche dies im Detail ermöglicht werden könnte, werden diskutiert und in den Kontext aktueller Literatur eingeordnet.

CPK10 konnte als einziges der getesteten membran-assoziierten CPKs neben CPK23 in Protoplasten und Hefe in Anwesenheit von ABFs den ABA-Signalweg induzieren (Abb. 3.26). Während in Hefe jedoch

Diskussion

nachweislich die Membranbindung der CPKs durch die starke Galactose-abhängige Überexpression über den GAL1-Promotor, wahrscheinlich aufgrund einer Überladung der Membran, aufgehoben wurde (Abb. 3.29-A), ist dies im Protoplasten-System nicht der Fall. Im Gegensatz zu CPK23 ist für CPK10 jedoch bereits eine Bedingung beschrieben, unter der eine Membranablösung erfolgt: in Anwesenheit von Nitrat löst sich CPK10 von der Membran, an der es vorher über den *heatshot*-Faktor HSP1 ABA-abhängig den Stomataschluss über Kalium-Kanäle unter Trockenstress reguliert hat (Zou et al., 2010) und aktiviert im Kern den *NIN-Like*-Protein (NLP) Transkriptionsfaktor NLP7 (Liu et al., 2017a). Ähnlich wie es für CPK23 postuliert ist, übernimmt CPK10 damit eine Doppelfunktion: Regulation von Transportproteinen in der Membran und nach N-terminaler Aktivierung die Induktion von Signalwegen. Daher stellt sich die Frage, ob dies auch ABA-abhängig für CPK23 der Fall ist. Jedoch kann eine CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges bei Zugabe von exogenen ABA nicht beobachtet werden, eher erfolgt der gegenteilige Effekt: Zugabe von ABA verringerte die Induktion des ABA-Signalweges bei Abwesenheit der ABFs (Abb. 3.1-E). Nur in Anwesenheit der ABFs konnte eine direkte CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges beobachtet werden (Abb. 3.15-C). Folglich ist es denkbar, dass ABFs indirekt selbst die Aktivierung von CPK23 und CPK10 bewirken. Diese Aktivierung würde entsprechend ABA-unabhängig ablaufen oder zumindest der Effekt in Gegenwart von ABA durch die bereits dadurch stark-erfolgte Induktion des ABA-Signalweges maskiert werden. Tatsächlich ist N-terminal unmodifiziertes CPK23 in höheren Umfang im Cytosol zu beobachten gewesen, wenn es mit ABF1 koexprimiert wurde (Abb. 4.6-A). Ein solcher, vom Transkriptionsfaktor abhängiger Transport von Komponenten der Signalkaskade, wurde bereits für den transkriptionellen Repressor JAZ9 im Jasmonat-Signalweg beschrieben (Withers et al., 2012). In diesem Fall bindet der Transkriptionsfaktor MYC2 selbst an ein Arginin im N-Terminus von JAZ9 und induziert dadurch dessen Translokation in den Nukleus. In Abwesenheit von MYC2 ist entsprechend keine Kernlokalisierung von JAZ9 zu beobachten. Interessanterweise wird MYC2 durch ABA aktiviert und eine Interaktion zwischen ABF3 und MYC2 konnte bereits gezeigt werden (Liu et al., 2018a) (Riemann et al., 2015). Auch wenn eine Interaktion zwischen CPKs und MYC2 bisher nicht beschrieben ist, so ist eine Involvement von MYC2 nicht komplett auszuschließen. Auch der NLP7 Transkriptionsfaktor ist unter bestimmten Umständen nicht kernlokalisiert: (1) bei 22°C ist NLP7 hauptsächlich im Cytosol lokalisiert und kann an der Membran mit CPK28 interagieren. Unter Kälte wird CPK28 über ein Calcium-Signal C-terminal aktiviert und phosphoryliert NLP7, welches daraufhin in den Kern translokalisiert (Ding et al., 2022). CPK28 selbst ändert hierbei jedoch nicht die Lokalisation. (2) Unter Nitrat-Mangel ist NLP7 ebenfalls im Cytosol lokalisiert. Phosphorylierung durch CPK10, CPK30 und CPK32 bewirkt den Transport von NLP7 in den Kern. Unter diesen Bedingungen sind jedoch auch die involvierten CPKs im Kern lokalisiert. Die Interaktion zwischen diesen beiden Komponenten des Nitrat-Signalweges erfolgt ebenfalls im Kern (Liu et al., 2017a). Es ist jedoch nicht geklärt über welchen Mechanismus die Lokalisationsänderung der

CPKs erfolgt (Liu et al., 2021). Möglicherweise existiert hier ebenfalls eine gegenseitige Regulation und NLP7 beeinflusst selbst die Lokalisation der involvierten CPKs. Da ABFs im Gegensatz zu NLP7 ihre Lokalisation nicht ändern, ist es wahrscheinlich, dass die ABFs die Aktivierung von CPKs steuern, indem sie die Expression von Zielgenen induzieren, die wiederum selbst mit den CPKs interagieren und diese beeinflussen (Abb. 4.6-D). Dies könnte erklären, warum in Protoplasten nur CPK10 und CPK23 einen deutlichen Effekt zeigten (positiver *feedback-loop* über ABF-Signalweg führt zu Aktivierung), wohingegen dies für CPK3 und CPK6 trotz deutlicher Aktivität in Hefe in Protoplasten nicht zu beobachten war. Letztere sind womöglich unter den getesteten Bedingungen nicht N-terminal aktivierbar und ändern ihre Lokalisation nicht.

Artifizielle Modifikationen von CPK23 geben Hinweise auf Aktivierungsmechanismen

Um Herauszufinden über welche post-translationalen Modifikationen dieser potenzielle Aktivierungsmechanismus ablaufen könnte, wurden verschiedene Mimiken für derlei Prozesse analysiert. In Protoplasten führten sowohl die Mimik einer Phosphorylierung im N-Terminus (S5D-Variante ist aktiv), einer proteolytischen Spaltung (N-terminale Deletions-Varianten sind aktiv), als auch eines de-palmitoylierten Proteins (C3A Varianten sind aktiv) zu aktiven Varianten (Abb. 3.1-D) (Abb. 3.27). Diese Varianten wurden bereits in 4.1.4 ausführlich diskutiert. Um diesen Befund auch im heterologen Hefesystem zu bestätigen, CPKs unter dem starken GAL1-Promotor jedoch durch die hieraus resultierende Überladung der Membran keine Membran-Lokalisation mehr aufwiesen (Abb. 3.29-A), wurden verschiedene Promotoren getestet. Dabei erwies sich der CYC1-Promotor für Studien in Hefe als geeignet: unter diesem exprimiertes natives CPK23 zeigte eine eindeutige Membran-Lokalisation (Abb. 3.29-D), während N-terminal modifiziertes CPK23 hauptsächlich im Cytosol zu erkennen war. Entsprechend konnte eine Induktion des ABA-Signalweges auch nur über die modifizierten Varianten erreicht werden (Abb. 3.29-C). Die Mimik einer de-palmitoylierten CPK23-Version wurde dabei erstaunlicherweise jedoch nur sehr schwach exprimiert. Trotz deutlicher cytosolischer Lokalisation war es daher nicht möglich den ABA-Signalweg über diese Variante zu induzieren. Da eine starke Expression von CPK23 toxisch auf Hefezellen wirkte (Anhang 5.6), ist es zumindest denkbar, dass auch schwach exprimiertes, aber hyperaktives CPK23 von den Hefezellen *gesilenced* wird. Warum dies jedoch nur für die C3A-Mutation, nicht jedoch die anderen Mutationen zutreffen sollte, ist schwer zu erklären. Zusammengefasst lassen die hier geschilderten Experimente den Schluss zu, dass CPKs über folgende mögliche Aktivierungsmechanismen N-terminal aktiviert werden könnten: (1) Regulierte Intramembrane Proteolyse (RIP), (2) Phosphorylierung, (3) De-Palmitoylierung (Liu et al., 2018b) (Offringa and Huang, 2013). In Abb. 4.6 werden diese schematisch dargestellt und in den folgenden Abschnitten die jeweilige Wahrscheinlichkeit für eine Involvierung dieser Mechanismen diskutiert.

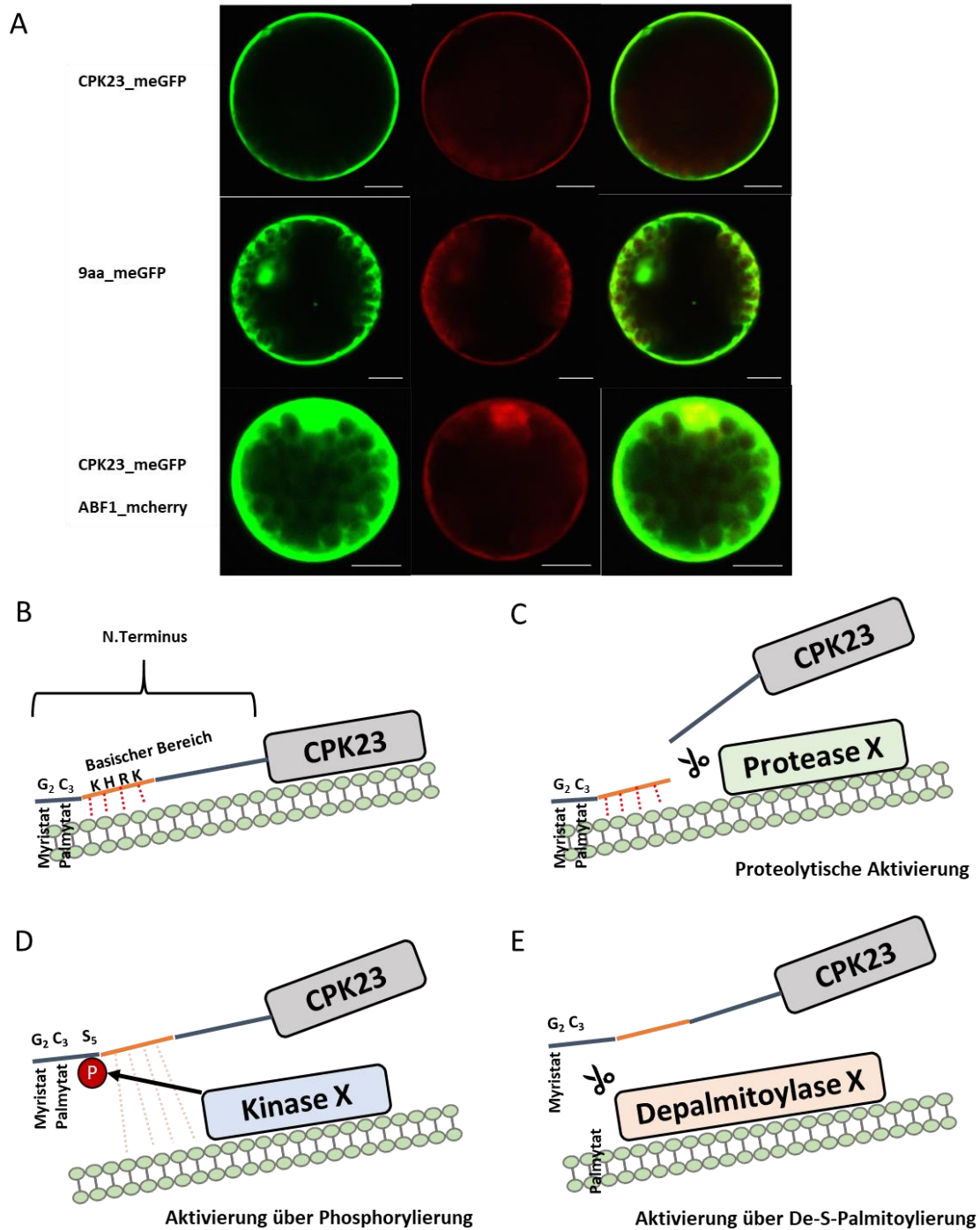


Abb. 4. 6: Mögliche N-terminale Aktivierungsmechanismen für CPK23.

(A) CPK23 lokalisiert an der Membran, während N-terminal modifiziertes CPK23 (9aa) auch cytosolische Lokalisation aufweist. Wird CPK23 in Gegenwart von ABF1 exprimiert, weist CPK23 in diesem Fall eine Co-Lokalisation mit ABF1 im Kern und zusätzlich cytosolische Lokalisation auf. Für das Experiment wurden CPK23-meGFP-Varianten und ABF1-mcherry in Col-Protoplasten kotransformiert und die Lokalisation nach 16 h Inkubation mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops dokumentiert. (B) Unter normalen Bedingungen ist CPK23 über Myristoylierung und Palmitoylierung an der Membran gebunden. Ein basischer Bereich im CPK23 N-Terminus stabilisiert über Wechselwirkungen die Bindung

an die negativ-geladene Membran. (C) Über eine Protease könnte ein Teil des N-Terminus von CPK23 abgeschnitten werden. Während dieser in der Membran verbleibt, würde der Hauptteil des CPK23-Proteins die Membranbindung verlieren. (D) Ebenfalls ist es möglich, dass das Einbringen einer zusätzlichen negativen Ladung in den N-Terminus die Bindung des Proteins an die Membran aufhebt. Dieser Schritt könnte über eine unbekannte Kinase erfolgen. (E) Auch ist es möglich, dass ein depalmitoylierendes Enzym den Palmitat-Rest von CPK23 entfernt. Auf diese Weise würde nur die Myristoylierung verbleiben, welche jedoch die Membranständigkeit von CPK23 nicht gewährleisten könnte.

Aktivierungsmechanismus - Regulierte Intramembrane Proteolyse (RIP)

Da kurze N-terminale Deletionen von CPK23 sowohl in Protoplasten (Abb. 3.1-D/F), als auch in Hefe (Ruschhaupt, 2018), zu einer starken Aktivierung des ABA-Signalweges führten und diese Modifikation im weitesten Sinne eine Proteolyse mimikt, ist es möglich, dass CPK23 über einen solchen Prozess aktiviert wird. Diesen bezeichnet man als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP). Bei RIP werden transmembrane Helices durch intramembrane Proteasen hydrolysiert. Dabei wird in einem initialen Schritt (auch als *ectodomain shedding* bezeichnet) innerhalb der Ectodomäne an einer Peptidbindung nahe der Transmembrandomäne (TMD) geschnitten. Dadurch wird die Ectodomäne in das extrazelluläre Milieu entlassen und ein Membran-gebundener Stummel verbleibt. Dieser wird in einem zweiten Schritt innerhalb der TMD geschnitten, die sogenannte intramembrane Proteolyse (Lichtenthaler and Steiner, 2007). In bakteriellen Systemen werden hauptsächlich membrangebundene Transkriptionsfaktoren und anti-Sigma Faktoren durch *site-2* Proteasen (S2P) hydrolysiert (Rawson et al., 1997). Das erste identifizierte Homolog zu S2P in Arabidopsis trägt den Namen EGY1 und gehört zu einer Gruppe von insgesamt 6 Genen, welche aber allesamt in der Chloroplasten-Membran lokalisiert sind (Chen et al., 2004). Daher kann eine proteolytische Wirkung dieser Protein-Familie aufgrund der Lokalisation praktisch ausgeschlossen werden. In Arabidopsis sind aber noch 3 weitere Familien zu finden: Rhomboide, Preseniline und Signal-Peptid Proteasen (Adamiec et al., 2017). Rhomboide besitzen eine Serin-Histidin katalytische Dyade und zählen zu den *serine-type* Proteasen (Erez et al., 2009). Die beiden katalytischen Aminosäuren sitzen dabei in konservierten Motiven innerhalb der Transmembran-Domäne (Lemberg and Freeman, 2007). Die TMD des Rhomboid-Substrats wird über die intramembrane *exosite* gebunden und die Erkennungssequenz des Substrats (die außerhalb und innerhalb der TMD liegen kann) interagiert mit der aktiven Region des Rhomboids. Die nun erfolgende Hydrolyse an der Erkennungssequenz durch Rhomboid spaltet den cytosolischen Teil des Zielproteins ab, die Transmembrandomäne verbleibt innerhalb der Membran (Strisovsky et al., 2009). Da es bei den 20 bekannten Rhomboid-Homologen in Arabidopsis, 2 Proteine mit Membran-Lokalisation gibt (RBL4 und RBL14), ist zumindest eine räumliche Nähe zu CPK23 gegeben. Ihre Rolle in Pflanzen ist jedoch nicht gut untersucht und ihre Funktion daher schwer fassbar (Adamiec et al., 2017). Preseniline

(PSEN) und Signal-Peptid Peptidasen (SSPs) gehören zur Klasse der Asparagin Proteasen. Sie haben einen ähnlichen Aufbau und besitzen je zwei katalytisch aktive Asparaginsäure-Reste (Wang et al., 2006). Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Orientierung innerhalb der Membran (Erez et al., 2009). In Arabidopsis wurden die Gene für zwei PSENs, ein SPP, sowie 5 SPP-like gefunden. Auch wenn in ihrer Primärstruktur alle Motive für eine katalytische Aktivität vorhanden sind, so wurde diese bisher experimentell noch nicht bestätigt. Außerdem befindet sich keines der Proteine an der Plasmamembran (Tamura et al., 2008). Da nur zwei der in RIP involvierten Proteine in Pflanzen eine Membran-Lokalisation zeigen (RBL4 und RBL14), und CPK23 zusätzlich nur membran-assoziiert ist, folglich über keine TMDs verfügt und daher wahrscheinlich nicht als Substrat in Frage kommt, kann wohl davon ausgegangen werden, dass dieser Mechanismus in der N-terminalen Aktivierung von CPK23 nicht involviert ist.

Aktivierungsmechanismus - Phosphorylierung

Auch die Mimik einer S5D-Phospho-Mimik Variante war sowohl in Protoplasten (Abb. 3.1-C), als auch in Hefe in der Lage den ABA-Signalweg zu induzieren (Ruschhaupt, 2018). Dass Phosphorylierung eine Membran-Ablösung auslösen kann, wurde bereits in Säugern demonstriert. *Myristoylated Alanine-Rich C-kinase Substrate* (MARCKS) wird über Myristoylierung an der Membran gebunden und stellt dort ein Substrat für die Proteinkinase C (PKC) dar. Dieses phosphoryliert MARCKS und bewirkt somit eine Ablösung von der Membran, die Myristoylierung kann dies nicht verhindern (Thelen et al., 1991). Bei diesen Prozessen spielt die negative Ladung der Membran eine entscheidende Rolle. Hier sind insbesondere die zwei monovalenten Phospholipide Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) beteiligt. Sie machen etwa 15 und 10 % des Lipid-Anteils in Membranen aus und tragen damit zur negativen Ladung dieser bei (Goldenberg and Steinberg, 2010). Für die Bindung von MARCKS an die Membran ist nicht nur der Myristat-Rest verantwortlich, sondern auch die polybasische Ladung des Enzyms (Kim et al., 1994). Dabei bringt die Myristoyl-Gruppe das Protein in die Nähe der Membran, woraufhin die polybasische Domäne in Wechselwirkung mit dem sauren Milieu der Membran treten kann (Goldenberg and Steinberg, 2010). Durch die Phosphorylierung wird folglich eine negative Ladung eingebracht, die die elektrostatischen Interaktionen mit der ebenfalls negativ geladenen Membran stört und die Membran-Assoziation aufhebt. Für CPK23 gibt es im N-Terminus 21 geladene Aminosäuren, von diesen haben 13 eine negative Ladung. Um die Myristoylierungs- und Palmitoylierungs- Position gibt es einen Cluster von 4 positiv-geladenen Aminosäuren (KHRK an Position 7-10, (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo/)). Diese Stelle kann daher ebenfalls als basische Domäne bezeichnet werden, die potentiell mit der Membran in elektrostatische Wechselwirkungen treten und die Membran-Assoziation zusätzlich verstärken kann. Direkt vor diesem basischen Bereich befinden sich zwei phosphorylierbare Serin-Reste, S5 und S6. Die Mimik einer

Diskussion

Phosphorylierung an S5 von CPK23 führte trotz vorhandener Myristoylierung und Palmitoylierung zu einer hyperaktiven CPK, die den ABA-Signalweg deutlich induzieren konnte und nicht mehr membrangebunden vorlag (Abb. 3.1-C). Die Phosphorylierung in diesem Bereich ist in der Lage die Bindung an die Membran aufzuheben. Eine Autophosphorylierung in diesem Bereich konnte für CPK23 zwar nicht detektiert werden (Pleißner, 2015a), denkbar ist jedoch eine Phosphorylierung durch andere Kinasen. In Mais wurde in Y2H-Assays bereits für eine Vielzahl von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK oder MPK) eine Interaktion mit CPKs gezeigt. Dabei zeigten von den 9 getesteten CPKs 4 eine Interaktion mit MAPKs. ZmCPK15 (*Zea mays*) interagiert dabei mit 8 der 19 MAPKs aus Mais (Khalid et al., 2019). Das MAPK-Modul wird durch abiotischen-Stress, Hormone und Mitogen induziert und beinhaltet die Wirkung dreier Proteinkinasen: einer MAP Kinase Kinase Kinase (MKKK bzw MEKK), einer MAP Kinase Kinase (MKK bzw MEK) und der MAP Kinase (MAPK bzw MPK) (Kumar et al., 2013). Sie aktivieren einander über *relay*-Phosphorylierungen: MEKK phosphoryliert MEK an zwei Serin/Threonin-Resten eines S/T-X₃₋₅-S/T-Motives im MEK-Aktivierungsloop (Nanda et al., 2014). Aktiviertes MEK phosphoryliert MAPK via Dual-Phosphorylierung in einem konservierten T-X-Y Motiv des MAPK-Aktivierungsloops und dieses reguliert wiederum *downstream*-Zielproteine über weitere Phosphorylierungen (Kumar et al., 2020). Die CPK23-Sequenz weist im N-Terminus zwei mögliche MAPKKK-Konsensus Motive auf: (1) S₅-X-X-X-X-T₁₁ und (2) S₆-X-X-X-X-T₁₁. Da es sich bei den hierbei flankierten Aminosäuren um die basische Domäne von CPK23 handelt, könnte eine entsprechende MAPKKK-abhängige Dual-Phosphorylierung die elektrostatische Komponente der Membran-Assoziation potenziell komplett negieren. Eine aminoternale Regulation von CPK23 über MAPKKKs ist damit, insbesondere angesichts der nachgewiesenen Aktivität von CPK23-S5D, plausibel. Interessanterweise werden MAPKKKs zusätzlich auch ABF-abhängig exprimiert. ABF2, ABF3 und ABF4 können an ABRE-Elemente im Promotor des MAPKKK18-Gens binden und damit direkten Einfluss auf dessen transkriptionelle Regulation nehmen (Zhao et al., 2023). Auch wurden in MAPK-Signalwegen bereits Phosphorylierungs-abhängige Lokalisationsänderungen beobachtet. In Petersilie wird PcMKK5 (84 % Homologie zu AtMKK5) durch Behandlung mit Pep-13, ein in *Phytophthora* an Oberflächen exponiertes Lipid, aktiviert und dieses phosphoryliert PcMPK3 (*Petroselinum crispum*) und PcMPK6. Aufgrund dieser Phosphorylierung ändern die beiden MPKs ihre Lokalisation und gelangen in den Zellkern. Jedoch sind alle hier involvierten Proteine (MKK5 und MPK3/6) von Beginn an bereits cytosolisch und lediglich an MKK5 verankert (Lee et al., 2004). Typischerweise bestehen MAPKKKs, MAPKKs und MAPKs aus einer Kinase Domäne und einer unstrukturierten Schwanzregion, weisen aber keine Membran-Verankerungsmechanismen auf und sind daher hauptsächlich im Cytosol und im Kern vorzufinden. Da ihre Substrate überall in der Zelle vorhanden sind, ist jedoch anzunehmen, dass auch die regulierende Kinase selbst im entsprechenden Kompartiment anzutreffen sein sollte. Daher ist eine Verankerung über Interaktion mit Zielproteinen denkbar (Krysan and Colcombet, 2018). MPK6 kann

Diskussion

beispielsweise sowohl das cytosolische ACS-Enzym, den nuklearen TF ERF104, als auch membranständiges PIN1 phosphorylieren (Jia et al., 2016). SnRK2 Enzyme, von denen Untergruppe II und III ABA-abhängig sind, können durch osmotischen Stress aktiviert werden. Obwohl SnRK2-Enzyme in unterschiedlichen Graden auch zu Autophosphorylierung fähig sind, wurde geschlussfolgert, dass eine Phosphorylierung durch andere Kinasen wahrscheinlicher ist (Boudsocq et al., 2007). Als Aktivatoren wurden schließlich die durch osmotischen Stress aktivierbaren *RAF-like* MAPKKKs identifiziert (Saruhashi et al., 2015). Die B2/B3 Familie der RAFs reguliert dabei den ABA-Signalweg, indem SnRK2 der Untergruppe II phosphoryliert werden, die B4 Familie reguliert den ABA-unabhängigen Signalweg über die Phosphorylierung der SnRK2 Enzyme der Untergruppe I (Fàbregas et al., 2020) (Katsuta et al., 2020). Da sowohl CPK23 als auch SnRK2 im ABA-Signalweg aktiv sind und dort ähnliche Zielproteine regulieren (SLAC1, ABFs) und CPK23 nicht über ABA aktivierbar ist, besteht die Möglichkeit, dass beide auch über ähnliche Enzyme aktiviert werden. Daher wurden in dieser Arbeit auch *RAF-like* MAPKKKs mit CPK23 in Hefe- und Protoplasten-Assays koexprimiert (Anhang 5.8). In beiden Fällen konnte jedoch keine Aktivierung von CPK23 ermittelt werden. Dies spricht für eine differentielle Regulierung zwischen CPKs und SnRKs im ABA-Signalweg. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass eine *RAF-like* abhängige Phosphorylierung von CPK23 spezifisch ist und das hier involvierte Enzym nicht getestet wurde, jedoch scheinen die für SnRK2-beobachteten Phosphorylierungs-Ereignisse nicht auf eine solche hinzuweisen (Fàbregas et al., 2020). Es gibt jedoch 48 *RAF-like* im Arabidopsis-Genom, davon gehören nur 22 Stück zur Untergruppe B. Die *RAF-like* MAPKKKs der Untergruppe B in Pfeffer sind hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, eine mögliche Interaktion mit dem membranständigen CPK23 ist aufgrund der räumlichen Trennung unwahrscheinlich. Der Großteil der Untergruppe C ist jedoch im Cytoplasma lokalisiert. Mitglieder dieser Gruppe werden ebenfalls durch ABA und abiotischen Stress induziert (Lim and Lee, 2022). Auch wenn *RAF-like* MAPKKKs der Untergruppe B in Arabidopsis (besonders unter Kontroll-Bedingungen) cytoplasmatische Lokalisation zeigen, so könnte die Lokalisation dieser Gruppe in Pfeffer doch einen Hinweis auf die Funktion in Arabidopsis geben und diese entsprechend möglicherweise keine membran-assoziierten Zielproteine haben (Soma et al., 2020). In Arabidopsis konnten RAF36 und RAF22 aus Untergruppe C, beide negative Regulatoren des ABA-Signalweges, mit einer Vielzahl an SnRK2s interagieren und sich, je nach Bedingung, gegenseitig phosphorylieren und inaktivieren (Kamiyama et al., 2021). Da MAPKs bereits als Interaktoren von CPKs und MAPKKKs als Aktivatoren von Kinasen des ABA-Signalweges beschrieben wurden, ist eine Regulierung von CPK23 durch den MAPK-Signalweg sehr gut vorstellbar.

Aktivierungsmechanismus - De-Palmitoylierung

Da die Myristoylierung nur eine schwache, aber irreversible, Membranverankerung gewährleistet, die Palmitoylierung hingegen zu einer starken und theoretisch reversiblen Verankerung in der Membran führt und zusätzlich die Mimik eines depalmitoylierten CPK23 (C3A-Mutation) Membran-ungebunden und stark aktiv war (Abb. 3.27) (Abb. 3.29-D), ist eine N-terminale Aktivierung von CPK23 über De-S-Palmitoylierung ein plausibler Mechanismus. Während die S-Acylierung in Pflanzen gut untersucht ist und 24 PATS mit konserviertem DHHC-Motiv bekannt sind (Batistič, 2012), war bis vor kurzem wenig Wissen über De-S-Palmitoylierende Enzyme in Pflanzen vorhanden. In Säugetieren ist dieser Mechanismus jedoch bereits länger bekannt und einige Enzyme wurden hier bereits beschrieben: Palmitoyl Protein Thioesterase 1 (PPT1) ist für die De-Palmitoylierung von H-Ras nach Hormon-Stimulierung zuständig. Es ist jedoch hauptsächlich in Lysosomen und späten Endosomen lokalisiert und daher wahrscheinlich nicht an De-Palmitoylierungs-Vorgängen an der Membran beteiligt (Verkruyse and Hofmann, 1996). Acyl Protein Thioesterasen (APTs) sind hingegen im Cytosol und teilweise an Membranen lokalisiert und regulieren hier das *Trafficking* peripherer Membran-Proteine (Vartak et al., 2014). Lange Zeit wurde APT1 als primäre De-Palmitoylase in Zellen angesehen. Da jedoch APT1-Mutanten in *Drosophila* und *C. elegans* keine Phänotypen zeigten und zusätzlich in Experimenten der Hauptteil der H-Ras Depalmitoylase-Aktivität in unlöslichen Zellfraktionen gefunden wurde und nicht in APT1-enthaltenen löslichen Fraktionen, wurde klar dass andere Depalmitoylasen ebenfalls an der Depalmitoylierung von Membran-gebundenen Substraten beteiligt sein müssen (Ahearn et al., 2011). ABHD17 wird in allen Vertebraten exprimiert und weist multiple Cysteine im N-Terminus auf. Über diese wird es via S-Palmitoylierung an der Membran verankert und kommt somit in die Nähe der Zielproteine (Martin and Cravatt, 2009) (Lin and Conibear, 2015). Die ABHD-Familie besteht aus mindestens 17 Mitgliedern, die allesamt den namensgebenden α/β -Hydrolase *fold* aufweisen. Dieser besteht aus 8 β -Strängen, die ein Kern- β -Faltblatt bilden, welches von Loops umgeben ist. In diesen Loop-Regionen sitzt die katalytische-Triade, bestehend aus Histidin, Säure und Nucleophil (meistens Serin, Asparaginsäure und Histidin) (Yokoi et al., 2016) (Lord et al., 2013). Während für APTs und PPTs keine Homologen in *Arabidopsis* existieren, gibt es Enzyme, die die konservierte ABHD-Domäne aufweisen. Die ABHD17-like Acyl Protein Thioesterasen (ABAPTs) Familie hat in *Arabidopsis* 11 Mitglieder (Liu et al., 2021). Sie besitzen zwar wie ABHD17 die konservierte katalytische Triade, unterscheiden sich aber im Mechanismus ihrer Membran-Verankerung voneinander: während tierisches ABHD17 über multiple Palmitoylierungen an die Membran gebunden wird, werden ABAPTs nur über eine Myristoylierung am N-terminalen Glycin mit der Membran assoziiert. Dementsprechend sind ABAPTs auch global in der Pflanzenzelle lokalisiert. Trotzdem konnten ABAPTs die Palmitoylierung und damit die Membran-Bindung von Schlüsselkomponenten der Pathogenabwehr (beispielsweise BIK1, PBL1 und PBS1) aufheben. Die De-S-Palmitoylierung von BIK1

Diskussion

und PBL1 erfolgt dabei durch ABAPT8, die von PBS1 durch ABAPT11 (Liu et al., 2021). CPK23 hat mit diesen Substraten gewisse Ähnlichkeiten: alle 4 werden zusätzlich myristoyliert, alle 4 besitzen ein Serin zwei Positionen hinter dem Palmitoylierungsmotiv und alle 4 entsprechen sich mindestens in den ersten 5 Aminosäuren (Abb. 3.28-A). Eine Wirkung der ABAPTs wurde darüber hinaus auch bereits in Phytohormon-Signalwegen nachgewiesen: SA induziert die Expression von ABAPT11, dieses kann mit über Palmitoylierung an die Membran gebundenen Brassinosteroid Signalkinasen (BSKs) interagieren und diese durch De-Palmitoylierung von der Membran lösen. Da eine Membranlokalisierung von BSKs für deren physiologische Funktion unerlässlich ist, werden diese durch diesen Schritt inaktiviert und der durch sie induzierte BR-Signalweg folglich reprimiert (Liu et al., 2023). Da die ABAPT-Zielproteine im N-Terminus um die Palmitoylierungsstelle eine leichte Homologie zu CPK23 aufweisen und ABAPTs auch in Phytohormon-Signalwegen wirken können, wurde der Einfluss von ABAPTs auf CPK23 in Protoplasten- (Abb. 3.28-B) und Hefe-Reporter Assays (Abb. 3.30-A) untersucht, sowie die Lokalisation von CPK23 in Anwesenheit der ABAPTs betrachtet (Abb. 3.28-C). Keine der ABAPTs konnte eine direkte Aktivierung von CPK23 bewirken, obwohl sie in der Protoplasten-Membran kolokalisierten. CPK23 zeigte in *split*-Luciferase Assays zwar eine Interaktion mit ABAPT8, nicht jedoch mit ABAPT11 (Abb. 3.32-C). Diese Interaktion konnte nur in CPK23-Versionen mit unmodifizierten N-Terminus beobachtet werden. Wurde der N-Terminus deletiert oder die Palmitoylierung durch eine 9aa-Fusion aufgehoben unterblieb die Mutation (Abb. 3.32-C). Für eine Interaktion muss CPK23 folglich entweder zwingend an der Membran gebunden sein oder zumindest über ein im vorderen Bereich des N-Terminus befindliche Erkennungssequenz für ABAPTs verfügen. Erstaunlicherweise konnte PBS1 hier sowohl mit ABAPT8, als auch mit ABAPT11 interagieren, ein Fusionsprotein aus PBS1 und CPK23 (Abb. 3.331-A) jedoch wieder nur mit ABAPT8 (Abb. 3.32-C). Dies kann bedeuten, dass PBS1 über mehr als nur eine Erkennungssequenz verfügt und durch mehr als ein ABAPT prozessiert werden kann. Wenn CPK23 zusätzlich hypothetisch über eine Erkennungssequenz für ABAPT8 verfügt, wären im Fusionsprotein folglich mehr ABAPT8-Erkennungssequenzen als ABAPT11-Erkennungssequenzen vorhanden und die Bindung an ABAPT8 damit bevorzugt. Zusätzlich kann es sein, dass im Fusionsprotein PBS1 durch CPK23 verdeckt wird und PBS1 dadurch unzugänglicher für die ABAPTs ist. Die geringe Interaktion von ABAPT11 mit dem Fusionsprotein kann auch erklären, warum in Protoplasten-Assays nur eine geringfügige ABAPT11-abhängige Induktion des Signalweges durch PBS1-CPK23 zu beobachten war (Abb. 3.32-B). Da nur wenig ABAPT11 einen Zugang zu PBS1 hat, wird dieses auch nur in geringem Umfang prozessiert und der Signalweg dadurch nur schwach induziert. Interessanterweise konnte dieser Effekt (die Interaktion von PBS1 sowohl mit ABAPT11 als auch mit ABAPT8) in Y2H-Analysen nicht beobachtet werden (Abb. 3.31-D). Hier zeigte PBS1 nur eine leichte Interaktion mit ABAPT11, nicht jedoch mit ABAPT8. Jedoch war die Lokalisation von PBS1 in Hefen anders als in Protoplasten: während PBS1 auch in dieser Arbeit in Protoplasten an der Membran gebunden war und diese

Diskussion

Assoziation in Anwesenheit von ABAPT11 aufgehoben wurde, so war PBS1 und das PBS1-CPK23-Fusionsprotein in Hefe stets cytosolisch (Abb. 3.31-C). Im Gegensatz zu CPK23 verfügen RIN4, PBL1 und PBS1 nicht über eine zusätzliche basische Domäne im Bereich um die Palmitoylierung und sind daher trotz gleicher post-translationaler Modifikationen möglicherweise weniger stark als CPK23 mit der Membran assoziiert. Während dieser Umstand in Pflanzen scheinbar keine Rolle spielt, könnte er die unterschiedliche Lokalisation in Hefe aufgrund Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellmembran möglicherweise erklären. Da CPK23 scheinbar für die Bindung von ABAPT8 im *split-Luciferase* System auf die Membranständigkeit angewiesen ist, könnte dies erklären, warum die Interaktion zwischen PBS1 und ABAPT8 in Hefe unterblieb. Dass ABAPT8 trotz Interaktion mit CPK23 dieses nicht aktivieren konnte, wirft die Frage auf, ob ABAPTs eine zusätzliche Aktivierung benötigen um katalytisch aktiv zu werden oder ob die Interaktion allgemein nur die Befähigung von depalmitoylierenden Enzymen zur Bindung von CPKs unterstreicht, diese jedoch kein spezifisches Substrat für die ABAPTs darstellen. Da ersteres (ABAPT-Aktivierung) laut den bisher bekannten Studien nicht benötigt wird und die Regulation der ABAPTs ausschließlich auf Expressions-Ebene zu erfolgen scheint, ist zweite Annahme logischer: CPKs sind möglicherweise ein Substrat für depalmitoylierende Enzyme, jedoch scheinbar nicht für ABAPTs. Dafür sprechen auch die Expressions-Analysen, die zeigen das ABAPT5/7/8/9 und 11 hauptsächlich in Pollen, ABAPT1/2/3/4 und 10 in allen Geweben außer Pollen, exprimiert werden (Li et al., 2022). Das interessante ABAPT8 wird folglich in Pflanzen nicht im gleichen Organell wie CPK23 exprimiert, eine Regulation von CPK23 durch ABAPT8 *in-planta* ist folglich unwahrscheinlich. Trotz allem steht die Erforschung der de-palmytoylierenden Enzyme in Pflanzen noch am Anfang. Sollten weitere Enzym-Familien entdeckt werden (in Säugetieren gibt es mindestens 16 weitere ABHD-Familien) (Lord et al., 2013), ist es wahrscheinlich dass CPKs für eine dieser ein Substrat darstellen.

4.2 Die Funktion von CPK23 in ABA-unabhängigen Signalwegen

Auch die Wahrnehmung von Stress kann zu einer dynamischen Änderung der subzellulären Lokalisation von Proteinen führen. Diese Änderungen beruhen dabei entweder auf Modifikationen des Lipid-Status des Proteins oder auf Interaktionen mit membran-assoziierten Biomolekülen (Ku et al., 2022). In *Medicago falcata* ändert beispielsweise der über S-Palmitoylierung an die Membran gebundene Transkriptionsfaktor NACsa in Abhängigkeit von Trockenstress seine Lokalisation und gelangt in den Zellkern. Dieser Vorgang wird durch MtAPT1, einem Homolog zu tierischen APT1 in *Medicago* vermittelt. Die Expression von MtAPT1 selbst wird dabei durch Trockenstress ausgelöst (Duan et al., 2017). Während es folglich für APT1 keine Homologen in Brassicaceae gibt (zu denen

Diskussion

Arabidopsis gehört), ist dies in anderen Pflanzen-Familien wie den Fabaceae (zu denen Medicago gehört), durchaus der Fall. Die größte Sequenz-Identität zu MtAPT1 hat dabei in Arabidopsis die AtALT-Familie, die hier an der Generierung von Fettsäuren beteiligt ist (Duan et al., 2017). Trotzdem wäre es interessant zu überprüfen, ob auch MtAPT1 in Arabidopsis in der Lage wäre CPK23 zu prozessieren, da dies Hinweise auf den generellen Aktivierungs-Mechanismus von CPK23 liefern könnte. Eine Lokalisations-Änderung von CPKs in Abhängigkeit von Trockenstress konnte bisher nicht gezeigt werden, jedoch gibt es Hinweise auf eine Veränderung der CPK23-Lokalisation in Reaktion auf Kälte. Dies konnte in dieser Arbeit in kalte-gestressten Protoplasten gezeigt werden (Abb. 3.9-A).

4.2.1 Die Rolle von CPK23 in der Kältestress-Antwort

Unter Kälte konnten Hinweise für eine verringerte Membranständigkeit von CPK23 erbracht werden. Gleichzeitig wird unter dieser Bedingung der ABA-Signalweg durch CPK23 nicht mehr induziert. Mögliche Gründe für diese beiden Befunde werden diskutiert.

Die Plasmamembran dient als Primär-Sensor von Kältestress in Pflanzen. Sinkt die Temperatur, geht dies mit einer Änderung der Membran-Fluidität einher (Murata and Los, 1997). Die Membran-Versteifung aktiviert hier sitzende Calcium-permeable Mechano-sensitive- (AtMCA1 und AtMCA2) und Ligand-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle und erzeugt dadurch einen transienten Ca^{2+} -Influx in das Cytosol (Wei et al., 2021). Durch diesen *second-messenger* wird das Kälte-Signal an Calcium-Sensoren weitergegeben, zu denen neben CMLs, CBLs und CIPKs auch CPKs gehören. Das Expressions-Level von CPKs wird dabei häufig durch Temperatur-Schwankungen moduliert (Tsai et al., 2007). Die meisten im ABA-Signalweg involvierten CPKs zeigen jedoch laut <https://bar.utoronto.ca/eplant/> kaum eine kalte-induzierte Veränderung ihrer Expressionsrate. Während dies auf CPK3/10/11/12 und 32 zutrifft, zeigen CPK4 (Steigerung der relativen Expressionsrate von 70 auf 217) und CPK5 (Steigerung der relativen Expressionsrate von 150 auf 495) 24h nach Kältebehandlung jeweils eine etwa 3-fache Steigerung ihrer Expressionsrate (Abb. 4.7). In Reis-Zellen konnte gezeigt werden, dass AtCIPK21 zu einer Erhöhung der CPK und MAPK Expression unter Kältestress beitragen kann (Tang and Thompson, 2020). Das von Beginn an nur schwach exprimierte CPK23 zeigt als einziges der hier betrachteten CPK-Proteine eine deutliche kalte-induzierte Reduktion der relativen Expressionsrate. Diese sinkt innerhalb von 24h von 17 auf 2 und damit annähernd um Faktor 10 ab. Wenn CPK23 in Reaktion auf Kälte seine Lokalisation ändert und damit theoretisch aktiviert vorliegt, könnte dies folglich ein negativer *Feedback-Loop* sein, um die CPK23-abhängige Regulation des ABA-Signalweges zu mindern. Dafür würde jedenfalls die lange Zeitspanne sprechen, die bis zum Eintreten der Expressions-Reprimierung verstreicht.

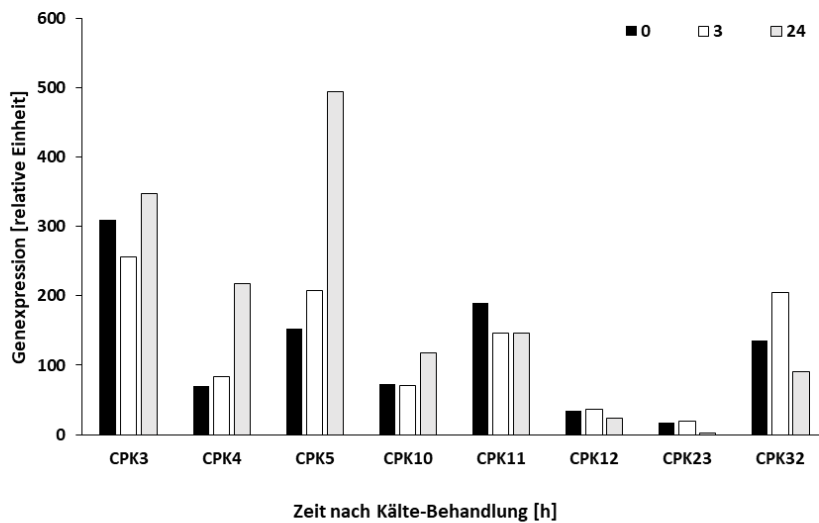


Abb. 4. 7: Die Genexpression verschiedener CPKs unter Kälte.

Die meisten CPKs zeigen nach Kältebehandlung keine Beeinflussung ihrer Expressionsrate. Für CPK4 und CPK5 ist diese jedoch erhöht und für CPK23 stark verringert (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>).

Mögliche Gründe für die CPK23-Lokalisationsänderung unter Kälte

Neben CPKs wird unter Kältestress auch die Expression von anderen Faktoren des ABA-Signalweges differentiell reguliert. Während ABF2, ABF3 und ABF4 hauptsächlich unter Salz- und Trockenstress exprimiert werden, wird die ABF1-Expression durch Kältestress induziert (Sharma et al., 2011). Da auch N-terminal unmodifiziertes CPK23 insbesondere in Gegenwart von koexprimierten ABF1 in Protoplasten in der Lage war, über dieses den ABA-Signalweg zu regulieren, wurde bereits diskutiert, dass der Signalweg, welcher zur Membran-Abspaltung von CPK23 führt, über die ABFs angesteuert werden könnte. Jedoch ist der hier möglicherweise vorliegende Mechanismus nach wie vor ungeklärt (Abb. 4.6). Kälte-abhängige Lokalisationsänderung ist bereits für einige Proteine dokumentiert worden. Das Redox-Protein Thioredoxin-h2 (Trx-h2) ist unter Normalbedingung an der Membran über Myristoylierung gebunden. Unter Kälte wird jedoch die NLS in seinem C-Terminus exponiert und ein Transport in den Zellkern ausgelöst. Dort reduziert es die Disulfid-Bindungen von inaktiven CBF-Oligomeren, welches zur Freisetzung von aktiven CBF-Monomeren führt. Diese wiederum leiten die Expression von *cold-responsive* (COR) Genen ein (Lee et al., 2021a). In der hier zitierten Arbeit wird jedoch diskutiert, dass die Membranablösung möglicherweise durch eine kälte-abhängige De-Myristoylierung ausgelöst wird. Da bislang jedoch keine Proteine beschrieben wurden, die diesen Prozess vermitteln und die N-Myristoylierung gemein hin als irreversibel angesehen wird, ist dieser Punkt strittig. Denkbar ist in diesem Fall, dass die Exponierung der NLS unter Kältestress (Ku et al.,

2022) bereits ausreichend ist, um die schwache Membranassoziation durch die N-Myristoylierung aufzuheben. Diese Möglichkeit wurde bereits durch die Doppel-Lokalisation von CPK23 nachgewiesen (Choi et al., 2005), welches ebenfalls trotz Myristoylierung im Kern anzutreffen ist. Selbst falls ein solches de-myristoylierendes Protein in Pflanzen gefunden werden sollte, wäre es schwer dieses mit einer Lokalisationsänderung von CPK23 unter Kälte in Verbindung zu bringen, da CPK23 im Gegensatz zu Trx-h2 zusätzlich über eine stabile Palmitoylierung in der Membran verankert wird. Ein Aufheben der Myristoylierung würde wahrscheinlich keine Lokalisationsveränderung bewirken. Wahrscheinlicher wäre hierfür eher die ausbleibende Myristoylierung von CPK23. Dadurch würde CPK23 nicht mehr initial in der Membran verankert werden und könnte nicht zusätzlich palmitoyliert werden, da dieser Schritt durch transmembrane PATs vermittelt wird (Zhang et al., 2015). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass durch ABA, aber auch durch osmotischen-, oxidativen- und Trockenstress, die Expression des wichtigsten myristoylierenden Enzyms NMT1 stark reduziert wird. Auf diese Weise kann beispielsweise die Myristoylierung der Membran-assoziierten E3-Ligase RGLG1 ABA-abhängig inhibiert werden und dieses daraufhin mit cytosolischen PP2CA interagieren (Belda-Palazon et al., 2019). Dieser Befund könnte zusätzlich erklären, warum auch Pflanzenlinien mit N-terminal unmodifizierten CPK23 einen Keimungsphänotyp unter abiotischen Stress zeigen: Unter abiotischen Stress wird die Expression von NMT1 reprimiert, neu synthetisiertes CPK23 liegt dementsprechend häufiger auch nicht-Myristoyliert vor und wird daher nicht an der Membran lokalisiert und kann folglich den ABA-Signalweg effektiver beeinflussen (Abb. 4.8-A/B). Unter Kältestress gibt es zusätzliche Beeinflussungen der NMT1-Wirkung: Die Interaktion zwischen NMT1 und EGR2 ist bei 4°C stark gestört. Unter Normalbedingung interagiert die membran-assoziierte *clade-E growth-regulating 2* (EGR2) Phosphatase mit SnRK2.6 und inhibiert sie. In Folge von Kälte wird aufgrund der ausbleibenden Interaktion mit NMT1 vermehrt un-myristoyliertes EGR2 gebildet, welches nicht mehr mit SnRK2.6 interagieren kann, wodurch dessen Inhibierung aufgehoben wird (Ding et al., 2019). Falls dies einen generellen Mechanismus darstellt und allgemein die Interaktion von NMT1 mit Zielproteinen gestört ist, wäre dies auch ein Ansatz, um eine mögliche Lokalisationsänderung von CPK23 bei Kältestress zu erklären.

Mögliche Gründe für die schwache CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges unter Kälte

Interessanterweise ist eine Lokalisationsänderung von CPK23 nicht mit einer Aktivitäts-Steigerung in Protoplasten und Hefe korreliert (Abb.3.9-B-G). In beiden Fällen ist eher das Gegenteil messbar: die Induktion des ABA-Signalweges durch CPK23 unter Kälte sinkt merklich oder bleibt zumindest unverändert. Dies gilt sowohl für membranständiges, als auch N-terminal modifiziertes CPK23. Bereits bei Temperaturen ab 12°C kann für modifizierte CPK23-Varianten keine konzentrationsabhängige Induktion des ABA-Signalweges mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.9-F/G). Dass den ABA-Signalweg

Diskussion

sehr stark induzierende RCAR1 ist jedoch kaum vom Kälte-Effekt betroffen (Abb. 3.10-A). Dieser Befund kann mehrere Gründe haben: (1) unter Kälte ist die Gen-Expression allgemein stark inhibiert. Dadurch wird weniger CPK23 exprimiert und die Induktion des ABA-Signalweges folglich abgeschwächt. Dagegen spricht jedoch zum einen die unverändert starke Induktion durch RCAR1 und zum anderen die zusätzliche Normalisierung auf einen Kälte-unabhängigeren Auxin-Reporter (Kälte beeinflusst hauptsächlich den Auxin-Transport und weniger den Auxin-Signalweg) (Shibasaki et al., 2009). (2) Wenn Kälte die Interaktion von EGR2 mit NMT1 inhibiert und davon ausgegangen werden kann, dass dies ebenfalls auf die NMT1-Interaktion mit CPK23 zutrifft, dann ist möglicherweise auch die Interaktion von CPK23 mit anderen Zielgenen, beispielsweise den ABFs, beeinträchtigt. (3) die Myristoylierung könnte wichtig für die Interaktion mit Zielproteinen sein. Über andere mögliche Aktivierungsschritte (De-Palmitoylierung, Phosphorylierung) würde der Myristat-Rest womöglich erhalten bleiben und bei der Interaktion mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle spielen. Dagegen spricht jedoch die volle Funktionsfähigkeit von N-terminal modifizierten CPK23-Varianten, die ebenfalls über keine Myristoylierung mehr verfügen (Abb. 3.27). (4) Nicht CPK23 ist für die Reprimierung des ABA-Signalweges unter Kälte verantwortlich, sondern die interagierenden Proteine. Falls ABFs unter Kälte an Protein-Stabilität einbüßen oder unter diesen Bedingungen weniger stark exprimiert werden, würde dies den Befund ebenfalls erklären. Dagegen spricht jedoch, dass RCAR1 unter Kälte den ABA-Signalweg noch hinreichend regulieren kann (Abb. 3.10-A) und für ABF1 unter Kälte sogar eine Expressions-Erhöhung beschrieben ist (Sharma et al., 2011). (5) Der Zeitpunkt der Messung ist nicht gut gewählt. Wenn durch die Kälte erst die NMT1-Expression herunterreguliert werden muss, damit neu synthetisiertes CPK23 auch nicht-myristoyliert vorliegt und dieses dann erst noch die Induktion des Reporters über die ABFs regulieren muss, könnte das System mehr als die gewählten 16h Inkubation für die Etablierung eines Luciferase-Signals benötigen. Dagegen spricht, dass auch modifiziertes CPK23 den ABA-Signalweg eher zu inhibieren scheint (Abb. 3.10-A) (Abb. 3.9-B/C/F/G). Dies deutet vielmehr auf eine direkte negative Regulation des ABA-Signalweges durch CPK23 unter Kälte hin. (6) CPK23 wechselt unter Kälte den Signalweg. Neben ABF1 sind in Kälte-Signalwegen hauptsächlich DREB1-Transkriptionsfaktoren involviert. Im Gegensatz zu ABFs erkennen diese in Promotoren nicht das ABA-abhängige ABRE-Motiv (pRD29B), sondern das DRE-Motiv (pRD29A). Sie sind somit Bestandteil der ABA-unabhängigen Kälte-Antwort (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Die hier beschriebenen möglichen Mechanismen von CPK23 unter Kälte sind in Abb. 4.8 schematisch dargestellt.

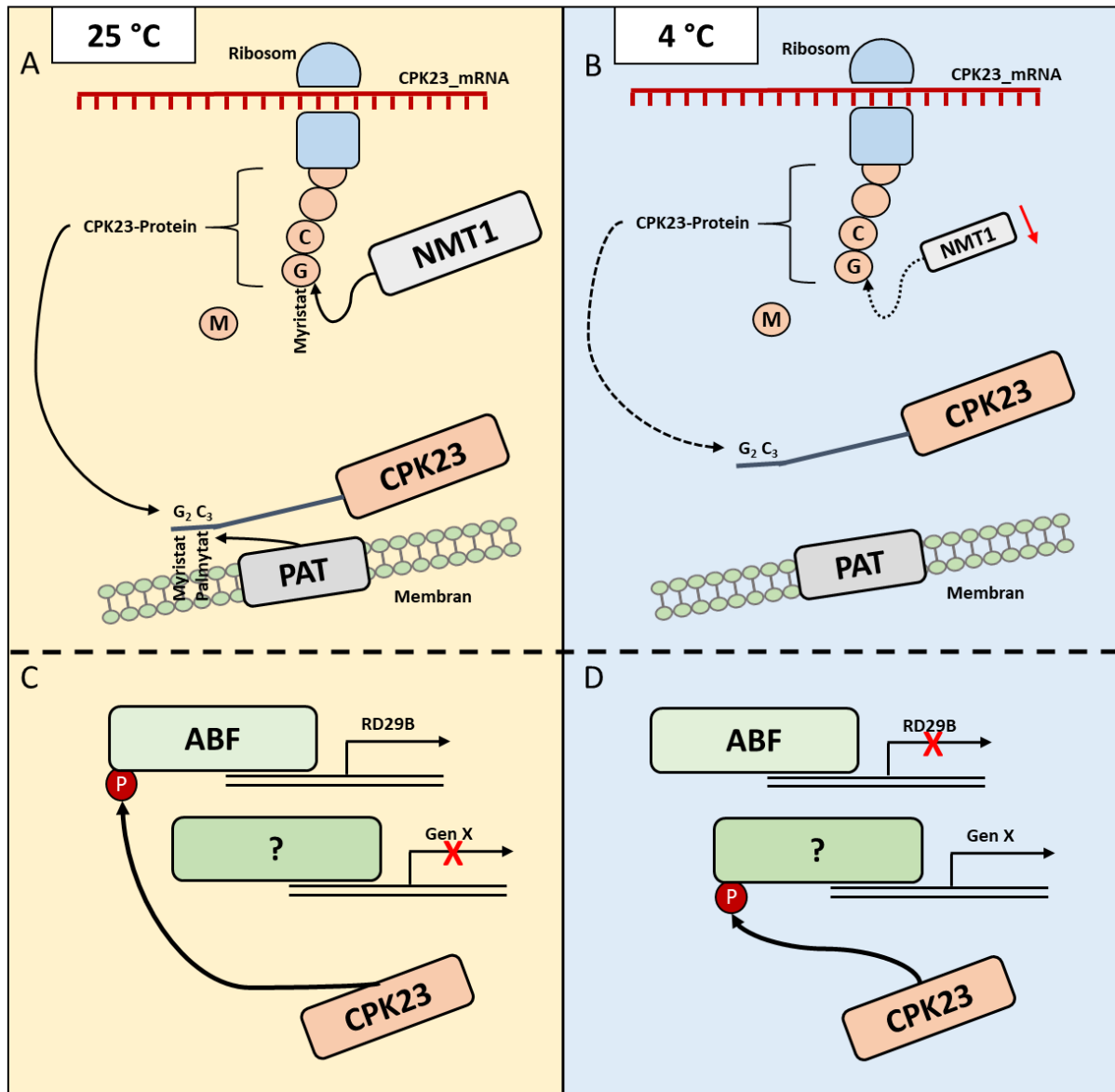


Abb. 4. 8: Mögliche CPK23-abhängige Mechanismen unter Kälte.

(A) Während CPK23 bei Normalbedingung effektiv durch NMT1 myristoyliert wird und über diese Modifikation an die Membran gebunden wird, ist es möglich, (B) dass unter Kälte diese Interaktion gestört ist (möglicherweise durch ein Ausbleiben der Interaktion aufgrund zu gering exprimierten NMT1). (C) Während CPK23 unter Normalbedingung den ABA-Signalweg positiv reguliert, ist diese Regulation unter Kälte nicht mehr erkennbar. (D) Daher ist es denkbar, dass CPK23 unter Kälte ein anderes unbekanntes Protein reguliert, welches wiederum nicht mehr im ABA-Signalweg involviert ist.

4.2.2 Der Einfluss von CPK23 auf DREBs

Um zu untersuchen, ob CPK23 unter Kälte auch weitere Signalwege regulieren kann, wurde die CPK23-abhängige Regulation von DREB-Transkriptionsfaktoren untersucht. CPK23 konnte DREB1- und DREB2-TFs in Protoplasten Reporter-Assays regulieren, wobei verschiedene DREBs unterschiedlich auf den ABA-Signalweg und einen ABA-unabhängigen Signalweg wirkten. Da der ABA-Signalweg über DREB1B zusätzlich negativ reguliert wurde, ist es möglich die veränderte Regulation dieses Signalweges unter Kälte auf dessen Einfluss zurückzuführen.

Das *dehydration-responsive element* (DRE) hat die Sequenz A/GCCGAC und reguliert die Expression von Kälte-induzierbaren Genen (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). In Arabidopsis sind die *DRE/C-repeat-binding proteins* (DREB1/CBFs) die wichtigsten hier involvierten Transkriptionsfaktoren (Stockinger et al., 1997). Die drei Master-Regulatoren der Kälte-induzierbaren Gen-Expression (DREB1A/DREB1B/DREB1C) gehören zu den *APETALA2/ethylene-responsive factor* (AP2/ERF) und werden durch Kälte induziert (Shinwari et al., 1998). Lange Zeit wurde angenommen, dass ICE1 die DREB1-Expression reguliert. In den letzten Jahren wird dieser Befund jedoch angezweifelt (Kidokoro et al., 2022). Mittlerweile wird angenommen, dass Pflanzen Kälte-Stress in Form zweier getrennter Signale wahrnehmen und die DREB1-Expression differentiell auf die jeweilige Stress-Form erfolgt: (1) ein schnelles Absinken der Temperatur führt zu einer durch *Calmodulin-Binding Transcription Activator* (CAMTA)-induzierten Expression von DREB1B und DREB1C, während (2) ein graduelles Absinken der Temperatur zur Expression von DREB1A und DREB1C durch *clock-related MYB-like-TFs* führt (Kidokoro et al., 2017) (Kidokoro et al., 2021). Da CAMTA-TFs über eine Calmodulin-Bindestelle verfügen, sind diese wahrscheinlich für die Integration des Ca^{2+} -Signals verantwortlich (Kidokoro et al., 2022). Interessanterweise wird die Expression von CAMTA3 und CAMTA5, welche bei schnellen Temperaturstürzen die Expression von DREB1B bewirken, selbst nicht durch Kälte induziert. Vielmehr scheinen diese Kälte-abhängig post-transkriptionell aktiviert zu werden (Kidokoro et al., 2022). Dies ist auch für DREB1 der Fall: (1) Nach Phosphorylierung durch *Cold-Responsive Protein Kinase 1* (CRPK1) erhöhen 14-3-3 Proteine die Import-Rate von DREB1 (Liu et al., 2017b), (2) das bereits beschriebene Trx-h2 interagiert nach Aufhebung seiner Myristoylierung mit inaktiven DREB1-Oligomeren und reduziert diese zu aktiven Monomeren (Lee et al., 2021b) und (3) *Basic Transcription Factor 3* (BTF3) interagieren nach Aktivierung durch SnRK2.6 mit DREB1s um deren Stabilität unter Kälte zu erhöhen (Ding et al., 2018). Während DREB1-Proteine zwar nicht über das klassische **L-X-R/K-X-X-S/T** CPK-Konsensus-Motiv verfügen, kann bei einer weniger strengen Auslegung dieser Sequenz durchaus ein geeignetes Motiv entdeckt werden. Statt eines Lysins an erster Position des CPK-Phosphorylierungs-Motivs ist hier bereits auch eine andere hydrophobe Aminosäure ausreichend (Chang et al., 2019). Entsprechend handelt es sich bei der in DREB1s konservierten **A-L-R-G-R-S** Sequenz ebenfalls um ein

CPK-Konsensus-Motiv. Dieses Motiv findet sich in der α -Helix der AP2/ERF-Domäne, welche bei der Erkennung und Bindung des DRE-Elementes involviert ist. Die α -Helix ist Bestandteil des RAYD-Elements und diesem wird neben einer Rolle in der Protein-Protein Interaktion auch ein Konformations-abhängiger Einfluss auf die, in der DNA-Bindung involvierten, YRG-Region zugeschrieben (Akthar et al., 2012). Eine Phosphorylierung dieses Motivs durch CPK23 könnte entsprechend sowohl Einfluss auf DNA-Bindung als auch Protein-Protein Interaktionen nehmen.

Regulierung der DREB1-Transkriptionsfaktoren

Um zu testen, ob CPK23 unter Kältestress den Signalweg wechselt, wurde dieses mit den verschiedenen DREB1s koexprimiert und dabei unter Normalbedingung und 4°C Kälte die Induktion des pRD29B-LUC (enthält ABRE-Motiv) und des pRD29A-LUC (enthält DRE-Motiv) Reporters analysiert (Abb. 3.11). Um einen ABF-abhängigen Effekt zu reduzieren, wurde dabei in *dABF1/2/3/4 Knockout* Pflanzen gearbeitet. Da diese hauptsächlich die Induktion des ABRE-Motivs beinhaltenden pRD29B-Reporters steuern, war dessen Induktion in den Experimenten allgemein sehr niedrig (Abb. 3.11-C/F/I). Dabei konnte gezeigt werden, dass CPK23 über DREB1A unter Normalbedingungen sowohl den ABA-abhängigen Signalweg als auch den ABA-unabhängigen Signalweg (unter Kälte und bei Normalbedingung) induzieren konnte (Abb. 3.11-A/B). CPK23 scheint daher als positiver Aktivator von DREB1A zu fungieren. DREB1C hingegen wurde durch CPK23 scheinbar negativ beeinflusst. Die Induktion der beiden Signalwege war in Gegenwart von CPK23 im Vergleich zur Kontrolle reduziert, sank jedoch nicht in einen negativen Bereich ab (Abb. 3.11-G/H). Dies war jedoch bei der Koexpression mit DREB1B der Fall (Abb. 3.11-D/E). Bereits die Expression von DREB1B allein war in der Lage den ABA-Signalweg negativ zu beeinflussen. Dieser Effekt wurde in Gegenwart von CPK23 weiter verstärkt. Während unter Normalbedingungen kein CPK23-abhängiger Einfluss auf die ABA-unabhängigen Signalwege zu beobachten war, war hier unter Kälte hingegen ein positiver Effekt erkennbar (Abb. 3.11-D/E). Falls CPK23 unter Kälte andere Signalwege als den ABA-abhängigen reguliert, ist DREB1B folglich ein guter Kandidat: Unter Kälte löst sich CPK23 von der Membran und beeinflusst DREB1B, entweder direkt oder indirekt über die Phosphorylierung anderer Proteine, beispielsweise BTF3, und führt zu dessen Aktivierung. Über dieses wird zum einen der ABA-unabhängige Signalweg stärker induziert und zum anderen der ABA-Signalweg selbst abgeschwächt. Dies würde auch erklären, warum CPK23 unter Kälte nicht den ABA-Signalweg aktiviert, sondern vielmehr eine Abschwächung zu beobachten ist (Abb. 3.10): die schnell einsetzende Kälte führt zu einer erhöhten Expression von DREB1B via CAMTA-TFs und führt damit zu mehr Zielprotein für das nun aktive CPK23. Die gezeigte Inhibierung von DREB1C könnte diesen Effekt zusätzlich verstärken, da DRB1C die Expression von DREB1B und DREB1A negativ reguliert (Novillo et al., 2004). Wird DREB1C folglich selbst durch CPK23C negativ reguliert, sinkt die DREB1C-abhängige Inhibierung von DREB1A und DREB1B. Ob die DREB1B-

Diskussion

abhängige Reprimierung des ABA-Signalweges dabei in einer direkten Art erfolgt, beispielsweise indem DREB1B an Elemente des pRD29B-Promotors bindet und damit ein weiteres ablesen durch andere TFs verhindert (Rojo, 2001), wie es beispielsweise für ARF1 und ARF2, die als Repressoren des Auxin-Signalweges gelten (Ulmasov et al., 1999), der Fall ist, oder aber indirekt via der Bindung und damit des Wegfangens positiver Regulatoren des ABA-Signalweges erfolgt, ist hier nicht abschließend zu klären. Da auch ABFs selbst mit DREBs interagieren können (Lee et al., 2010), ist es theoretisch möglich, dass DREB1B nach Aktivierung durch CPK23 mit ABFs interagiert (oder umgekehrt) und diese dadurch nicht mehr den ABA-Signalweg aktivieren können. Dagegen spricht jedoch der Umstand, dass die reprimierende Wirkung von DREB1B nur in Anwesenheit eines nativen pRD29B-LUC Reporters, nicht jedoch eines künstlichen 8xABRE-LUC Reporters beobachtet werden konnte (Abb. 3.12). Während beide Reporter durch ABF1 induziert werden konnten (da ABF1 die ABRE-Elemente in diesen erkennt), erfolgte eine DREB1B-abhängige Reprimierung nur im pRD29B-Promotor. Würde die Inhibierung des ABA-Signalwegs auf einer direkten Interaktion von ABF1 mit DREB1B beruhen, müsste hingegen in beiden Fällen eine Reprimierung erkennbar sein. Folglich ist es wahrscheinlich, dass DREB1B an andere Elemente des pRD29B-Promotors, nicht jedoch an das ABRE-Motiv bindet und damit die Transkription durch ABFs unterbindet. Die Fähigkeit zur Bindung an dieses unbekannte Element im pRD29B-Promotor ist möglicherweise Phosphorylierungsabhängig: die CPK23-abhängige Phosphorylierung von DREB1B würde dementsprechend dessen Binde-Aktivität an das unbekannte Element im Promotor erhöhen (Abb. 4.9).

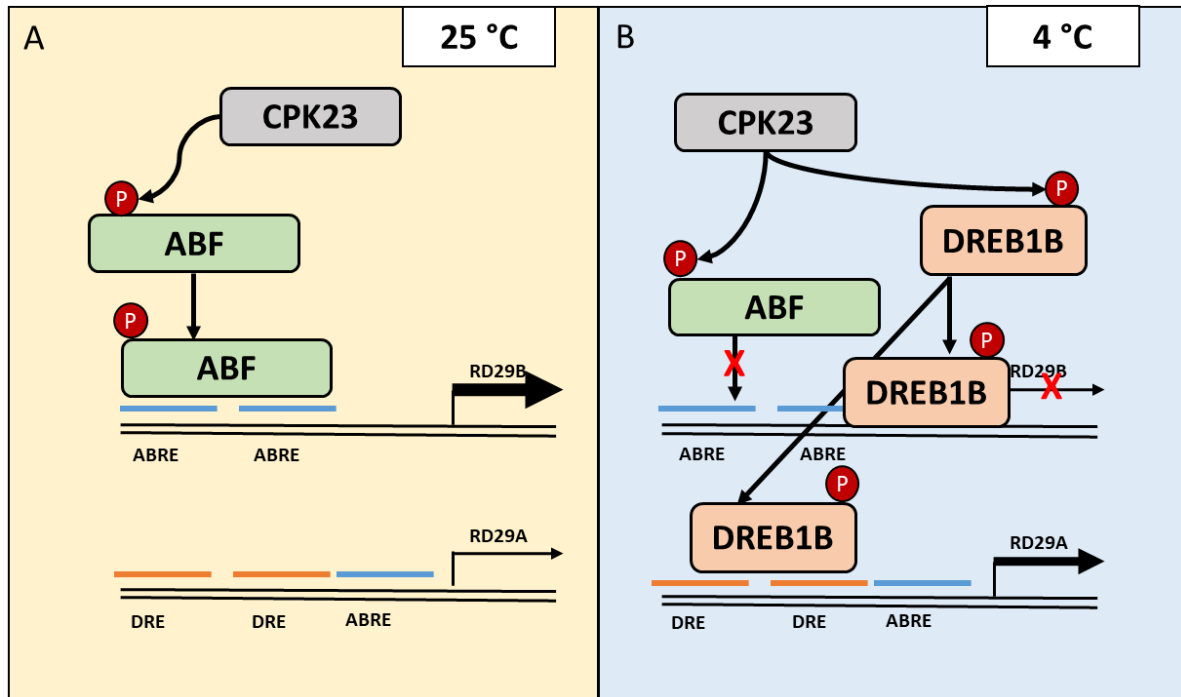


Abb. 4. 9: Möglicher Mechanismus über welchen der ABA-Signalweg CPK23-abhängig unter Kälte inhibiert werden kann.

(A) Unter Normalbedingung aktiviert CPK23 über ABFs den ABA-Signalweg. (B) Unter Kälte wird vermehrt DREB1B exprimiert, welches einen zusätzlichen Interaktionspartner für CPK23 darstellen könnte. Nach Aktivierung/Stabilisierung von DREB1B über eine CPK23-abhängige Phosphorylierung, kann dieses möglicherweise zum einen den ABA-Signalweg inhibieren (Bindung an den RD29B-Promotor), während andererseits der ABA-unabhängige Signalweg über dieses verstärkt positiv reguliert wird (Bindung an den RD29A-Promotor).

Der umgekehrte Vorgang ist für ARF2 bekannt. Hier führt die Kalium-abhängige Phosphorylierung von ARF2 zu einem Absinken der DNA-Bindefähigkeit (Zhao et al., 2016). Interessanterweise weisen DREB1-überexprimierende Pflanzen ebenfalls Zwergwachstum und eine verzögerte Entwicklung auf (Wi et al., 2022). Diesen Befund teilen sie mit Pflanzen-Linien, welche hyperaktives CPK23 überexprimieren (Abb. 3.2-B).

Regulierung der DREB2-Transkriptionsfaktoren

CPK23 beeinflusste jedoch nicht nur DREB1s, sondern wirkte in Protoplasten-Assays auch als positiver Aktivator von DREB2A (Abb. 3.13). DREB2A wird unter Trocken- und Salzstress exprimiert und ähnlich wie ARF2 kann seine DNA-Bindefähigkeit als Folge einer Phosphorylierung abnehmen (Agarwal et al., 2007). Da DREB2A nur unter Stressbedingungen die Expression seiner Zielgene auslöst, wird davon ausgegangen, dass es durch post-translationale Modifikationen aktiviert werden muss (Sakuma et al.,

2006). Unter Normalbedingungen sorgt eine negativ-regulierende PEST-Domäne innerhalb des Proteins für dessen Instabilität (Yao et al., 2020). Dieser Befund ist auch in den Protoplasten-Assays zu beobachten. Unter Normalbedingungen war maximal eine 5-fache Induktion des pRD29A-Reporters (ABA-unabhängiger Signalweg) zu beobachten, während diese in Gegenwart von CPK23 oder unter Salzstress auf die doppelte Induktion anstieg (Abb. 3.13). Dies könnte darauf hinweisen, dass CPK23 DREB2A durch Phosphorylierung stabilisiert. Unter zusätzlichem Salzstress war jedoch kaum noch ein positiver CPK23-Effekt auf DREB2A mehr auszumachen. Möglicherweise ist unter diesen Bedingungen DREB2A bereits hinreichend stabilisiert, um eine zusätzliche Stabilisierung obsolet zu machen. Da DREB2A unter Salzstress und Trockenstress exprimiert wird, könnte die verringerte Keimungsrate von CPK23-überexprimierenden Linien unter diesen Bedingungen ebenfalls auf einer CPK23-abhängigen Aktivierung von DREB2A beruhen (Abb. 3.2-C). Allerdings konnte in Protoplasten-Experimenten nur in Abwesenheit von Salz eine CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges erreicht werden, in Gegenwart von Salz wurde dieser Signalweg jedoch nicht induziert (Abb. 3.13). Andererseits wurde dieses Experiment in *dABF1/2/3/4 Knockout*-Linien durchgeführt, für DREB2A ist jedoch eine Interaktion mit ABF2 beschrieben (Lee et al., 2010). Daher ist es möglich, dass in Trocken- und oder Salz-gestressten Pflanzen ein kooperativer Effekt erfolgt, über welchen die Transkription ABA-regulierter Gene gewährleistet wird und welcher durch aktives CPK23 in Form eines dualen Mechanismus (Aktivierung und Stabilisierung durch Phosphorylierung) zusätzlich unterstützt wird.

4.2.3 Die Rolle von CPK23 in der Nitrat-Antwort

In Abwesenheit von Nitrat zeigten transgene Pflanzen eine erhöhte Keimungsrate. Da dies ein Hinweis auf eine direkte Involvierung von CPK23 im Nitrat-Signalweg ist, werden mögliche Zielproteine in diesem Signalweg diskutiert.

Während CPK23-überexprimierende Pflanzen unter abiotischen Stress eine verringerte Keimungsrate aufwiesen, war unter Stickstoff-Mangelbedingungen der gegenteilige Effekt sichtbar und die entsprechenden Linien zeigten eine erhöhte Keimungsrate (Abb. 3.4). Dieser Effekt ist auf den ersten Blick schwer erklärbar: Unter niedrig-Stickstoffbedingungen ist die Dormanz der Samen normalerweise erhöht, da die Pflanze ein Keimen unter ungünstigen Bedingungen verhindern will. Die Dormanz ist vom ABA-Gehalt der Pflanzen abhängig. Erst wenn in Anwesenheit von Nitrat das vorhandene ABA durch das im ABA-Katabolismus involvierte CYP707A2 abgebaut wird, kann die Keimung gestartet werden (Vidal et al., 2014). Daher stellt sich die Frage, wie die Überexpression eines Gens, welches den

Diskussion

ABA-Signalweg verstärkt und damit gerade unter ungünstigen Bedingungen ein Keimen verhindern sollte, unter Nitrat-Mangel ein früheres Keimen ermöglichen kann. Zwei allgemeine Mechanismen sind hierbei denkbar: (1) das Fehlen von Nitrat in Gegenwart von CPK23 führt zu einer schnelleren Keimung (Keimungsförderer unter Stickstoff-Mangelbedingung) oder (2) das Vorhandensein von Nitrat in Gegenwart von CPK23 verhindert die Keimung (Keimungsinhibitor unter Normalbedingung). Die Datengrundlage lässt hier keine eindeutige Einordnung zu, bedenkt man allerdings die bereits unter Normalbedingungen geringe Keimungsrate in den entsprechenden Linien (Abb. 3.4-A), ist die zweite Variante hier wahrscheinlicher. Die Frage, die sich als Nächstes stellt, ist die nach dem zugrundeliegenden Mechanismus. Auch hier sind zwei Varianten möglich: (1) die Aufnahme von Nitrat oder dessen Reduktion ist in den entsprechenden Linien gestört und die veränderte Nitrat-Konzentration oder dessen Reduktions-Produkte im Samen bewirken den Phänotyp oder (2) der Nitrat-Signalweg ist gestört und die De-Regulierung dieses ermöglicht oder verhindert ein Keimen je nach Bedingung. Im ersten Fall würde der Phänotyp wahrscheinlich durch eine Modifikation der Nitrat-Transporter oder der Nitrat-Reduktase zustande kommen. Der Nitrat-Sensor/Transporter NRT1.1 wird bereits in dormanten Samen exprimiert, das Expressions-Level nimmt aber bei Wässerung des Samens und Beginn der Keimung zu (Alboresi et al., 2005). Zusätzlich erfolgt eine Regulierung über CIPK23 via Phosphorylierung, welche ebenfalls über die Dormanz des Samens entscheidet (Guo et al., 2001) (Ho et al., 2009). Auch SnRK2.6 kann NRT1.1 phosphorylieren und damit die Aufnahme von Nitrat absenken (Su et al., 2021). Die Nitrat Reduktase (NR) kann ebenfalls direkt zum Keimen beitragen, indem Nitrat oder Nitrit zu Stickoxid (NO), einem Dormanzbrecher, reduziert werden (Bethke et al., 2004). CPK17 ist in der Lage die Nitrat Reduktase in Arabidopsis zu phosphorylieren, jedoch benötigt es zusätzlich die Bindung eines 14-3-3 Proteins an das phosphorylierte Protein, um dessen Aktivität zu inhibieren (Lambeck et al., 2010). Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass auch eine *nia1 nia2* Doppelmutante, in welcher die NR-Aktivität auf unter 1 % gesunken ist, in Anwesenheit von Nitrat nach wie vor keimen kann, obwohl das NO-Level hier stark reduziert ist. Da die Nitrat-abhängige Keimung folglich nicht durch Nitrat-Assimilationsprodukte ausgelöst wird, ist folglich der Nitrat-Signalweg selbst ausschlaggebend (Yan et al., 2016). Wird *NIN-like* Protein 8 (NLP8), ein Master-Regulator der Nitrat-abhängigen Keimung, ausgeknockt, verlieren die Pflanzen ihre Fähigkeit in Gegenwart von Nitrat zu keimen (derselbe Befund gilt je nach Blickwinkel auch für CPK23-OE Linien (Abb. 3.4)). Bei vorhandenem Nitrat kann NLP8 an den Promotor von CYP707A2 binden und dieses exprimieren. Die Folge der CYP707A2-Expression ist ein Absinken des ABA-Levels, welches zum Keimen der Samen führt. Wenn kein Nitrat vorhanden ist, bleibt die Bindung an den Promotor aus, der ABA-Signalweg bleibt angeschaltet und der Samen bleibt dormant. Denselben Effekt hat der NLP8-KO: wird kein NLP8 gebildet, kann CYP707A2 nicht gebildet werden und damit nicht zum ABA-Katabolismus beitragen (Yan et al., 2016). Für NLP7 wurde bereits eine Regulation durch CPKs, jedoch nicht durch CPK23, gezeigt

(Liu et al., 2017a). Zwar ist NLP7 Bestandteil des Nitrat-Signalwegs, jedoch nicht der Nitrat-abhängigen Keimung, da nur die Re-Integration von NLP8, nicht jedoch von NLP7, den Phänotyp von NLP8-KO Pflanzen retten kann (Yan et al., 2016).

Regulation des Nitrat-Signalweges durch CPK23

Da NLPs durch CPKs beeinflusst werden können, ist es folglich möglich, dass auch NLP8 durch CPK23 beeinflusst wird. Hierbei sind erneut zwei Mechanismen denkbar: (1) Wenn kein Nitrat vorhanden ist, stabilisiert CPK23 dennoch NLP8 und ermöglicht über diesen die Reprimierung des ABA-Signalweges (Keimungsförderer durch Stabilisation von NLP8 unter Nitratmangel). (2) Wenn Nitrat vorhanden ist, wird das stabilisierte NLP8 durch CPK23 inaktiviert und kann dementsprechend die Keimung nicht mehr durch ein Absenken des ABA-Gehalts ermöglichen (Keimungsinhibitor durch Inaktivierung von NLP8 unter Normalbedingung). Dass auch membrangebundenes CPK23 den Nitrat-abhängigen Keimungsphänotyp zeigte (Abb. 3.5), könnte an der vorherigen Stratifizierung der Samen liegen. Durch die rapide einsetzende Kälte unterbleibt möglicherweise die Myristoylierung (Belda-Palazon et al., 2019) und es liegt teilweise membranungebundenes CPK23 vor, welches wiederum den kernlokalisierten Transkriptionsfaktor phosphorylieren kann. In Experimenten, die vorher eine Involvement von CPK23 im Nitrat-Signalweg wegen eines Ausbleibens der Induktion eines NIR-LUC-Reporters ausgeschlossen haben, lag CPK23 jedoch membranständig vor (Liu et al., 2017a). Da es nicht abhängig von Nitrat die Lokalisation ändert, konnte unter diesen Bedingungen eine Reporter-Induktion nicht nachgewiesen werden. Würde in diesem Experiment jedoch eine membranungebundene Version von CPK23 benutzt werden, könnte womöglich aufgeschlüsselt werden, ob CPK23 über NLP8 den Nitrat-Signalweg beeinflusst und in welcher Weise. Neben einem NIR-LUC Reporter wäre auch der Einsatz eines pCYP707A2-LUC Reporters zielführend, da dieser spezifisch durch NLP8 angesteuert wird. Sollte CPK23 über NLP8 einen solchen Reporter in Abwesenheit von Nitrat induzieren, wäre die Rolle von CPK23 die eines Keimungsförderers (unter Stickstoff-Mangelbedingung). Wenn CPK23 den Reporter in Abhängigkeit von NLP8 und Anwesenheit von exogenem Nitrat negativ reguliert, würde CPK23 als Keimungsinhibitor (unter Normalbedingung) fungieren. Alternativ wäre es auch möglich den ABA-Gehalt in Samen und Keimlingen von CPK23-Überexpressionslinien bei An- und Abwesenheit von Nitrat im Vergleich zu WT-Linien zu ermitteln. Die hier geschilderten Ergebnisse und Überlegungen zeigen (zusammengefasst in Abb. 4.10), dass CPK23 auch abseits des ABA-Signalweges viele potenzielle Funktionen einnehmen und regulatorisch in den ABA-unabhängigen Kälte-, sowie den Nitrat-Signalweg involviert sein könnte. Da CPK23 auch an der Membran viele unterschiedliche Funktionen erfüllt und hinsichtlich der anzusteuern Kanäle erstaunlich unspezifisch zu sein scheint, ist dies zumindest nicht auszuschließen.

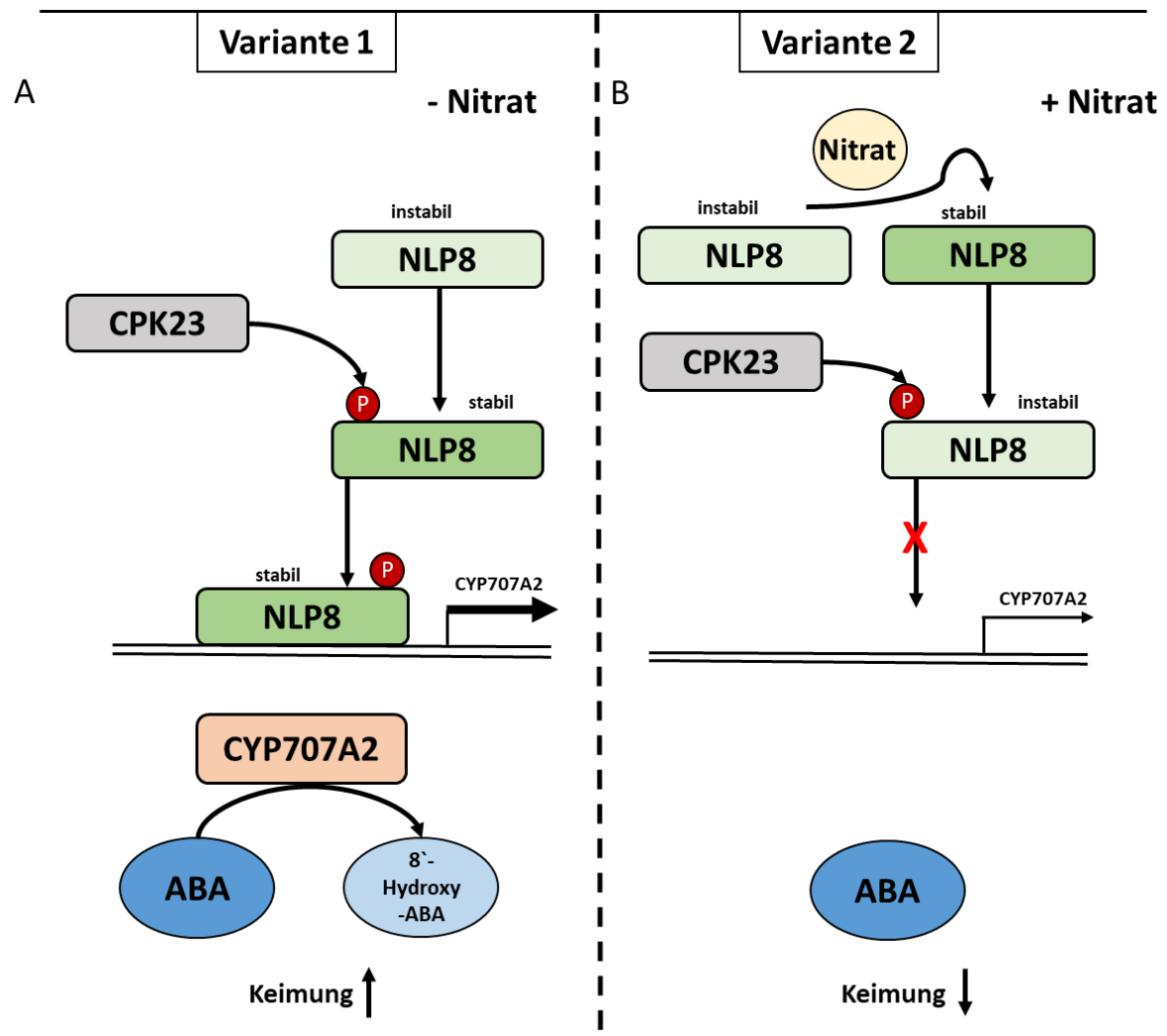


Abb. 4. 10: Mögliche Mechanismen über welche CPK23 im Nitrat-Signalweg involviert sein könnte.

Da CPK23-überexprimierende Pflanzen unter Nitratmangel eine erhöhte Keimungsrate aufweisen, ist eine Involvement im Nitrat-Signalweg möglich. Hier sind zwei Mechanismen denkbar: (A) unter Nitratmangel stabilisiert CPK23 NLP8 und führt dadurch zur Expression des ABA-Katabolismus-Gens CYP707A2. Dieses konvertiert ABA zum inaktiven 8'-Hydroxy-ABA. Es kommt daher auch in Abwesenheit von Nitrat zur Keimung. (B) Alternativ wird bei Anwesenheit von Nitrat, das bereits stabilisiert vorliegende NLP8 durch CPK23 wieder destabilisiert. In der Folge bleibt der ABA-Signalweg angeschaltet und die Samen keimen unter günstigen Bedingungen nicht aus.

4.3 Unterschiede zwischen CPK23-Ökotypen

Nicht nur zwischen verschiedenen CPKs gibt es große Unterschiede in ihrer Fähigkeit unterschiedliche Signalwege zu regulieren, auch bereits zwischen verschiedenen Arabidopsis-Ökotypen sind Unterschiede, unter anderem in ihrer Toleranz abiotischen Stress zu tolerieren, aber bereits auch in der Morphologie, erkennbar (Koorneef et al., 2004). Zwischen den Ökotypen Col-0 und Ler-0 sind beispielsweise sowohl Unterschiede in ihrer Fähigkeit unter Salzstress zu keimen, als auch in der Blatt-Struktur beschrieben (Pérez-Pérez et al., 2002). Das Studium natürlicher Variation kann hierbei Auskunft über die genetische Grundlage der entwicklungsbiologischen Prozesse in Arabidopsis geben. Da Arabidopsis-Pflanzen weltweit in allen denkbaren Habitaten vorzufinden sind, kann ihnen eine große Fähigkeit zur Anpassung an verschiedene ökologische Nischen zugesprochen werden. Die lokalen Populationen werden daher klassischerweise als Ökotypen bezeichnet. Mittlerweile wird jedoch davon ausgegangen, dass diese mehr auf Selbst-Kompatibilität und der hohen Rate an Selbst-Bestäubung, als eine erhöhte Adaptionsrate, zurückzuführen ist (Shindo et al., 2007). Daher wird aktuell meist der neutrale Begriff „*accessions*“, der keine lokale Adaption impliziert, bevorzugt (Mitchell-Olds, 2001). In dieser Arbeit wurde CPK23 aus drei *Accessions* miteinander verglichen. Dafür wurden die zueinander ähnlichen Varianten aus Bur-0 und Ler-0 gewählt, sowie Col-0. Die Arabidopsis Variante Bur-0 wurde 1959 in der Burren-Region in West-Irland gesammelt. Die Tagestemperaturen dieser zwischen Meereslevel und 300 m Höhe gelegenen Region erreichen im Sommer durchschnittlich lediglich 14 °C. Die Bur-0 *Accession* zeichnet sich durch große Samen und große Rosetten-Blätter, sowie einer hohen *nitrogen-use-efficiency* (NUE) und schwacher Toleranz bei hohen Stickstoff-Konzentrationen aus (Curtidor, 2021). Col-0 zeigt hinsichtlich der Stickstoff-Toleranz einen gegengesetzten Phänotyp und weist nur eine geringe NUE auf (Chardon et al., 2010). Auch ist Col-0 weniger Salztolerant als Bur-0 und gilt allgemein als Salz-sensitiv (Katori et al., 2010). Col-0 stammt aus einem einzelnen Samen einer unbehandelten heterogenen Landsberg-Population die George Rédei von der Universität in Columbia 1957 für Experimente mit Röntgenstrahlen zur Verfügung gestellt wurden. Die Col-0-Linie stammt folglich nur dem Namen nach her aus Amerika, ist von seiner Genetik her aber ursprünglich aus Zentraleuropa und dient seit 1996 als Standard-Arabidopsis-Ökotyp (Somssich, 2019). Obwohl der Landsberg-*erecta* Ökotyp zu dieser Zeit mehr genutzt wurde, wurde trotzdem Col-0 für die erste Arabidopsis-Sequenzierung gewählt, da die Ler-0 Linie durch die Experimente mit Röntgenstrahlung einige unnatürliche Mutationen aufwies, wohingegen dies in der Col-0 Linie nicht der Fall war. Die Ler-0 Linie stammt ursprünglich aus Landsberg an der Warthe (La-1) in Polen und trägt den Namenszusatz *erecta* (er), da dieses Gen durch die Strahlen-Behandlung mutiert wurde. Die mutierte La-1 Linie wird daher als Ler-0 bezeichnet, auch wenn mittlerweile die Bezeichnung Ler-1 und Ler-2 ebenfalls geläufig sind (Zapata et al., 2016). Ler-0 weist dabei eine

Diskussion

geringere Toleranz gegenüber Kälte und ABA-Behandlung als der Col-0 WT auf (Wu et al., 2021). Aber auch auf genomischer Ebene gibt es große Unterschiede zwischen den beiden *Accessions*: Zu Beginn der DNA-Sequenz von Chromosom 4 weist Ler-0 im Vergleich mit Col-0 eine große Inversion auf. Die meisten in Europa befindlichen Linien teilen diesen Befund mit Ler-0 und der Großteil der wenigen Col-0 artigen Linien sind dabei in Deutschland und Schweden zu finden (Zapata et al., 2016). CPK23 befindet sich in dieser Chromosom-Region und unterscheidet sich somit hinsichtlich seiner Orientierung in Ler-0 und Col-0. Zusätzlich beträgt die Sequenz-Homologie von CPK23C zu CPK23L über das Gesamt-Protein gerade einmal 89,6 %. Wird hierbei nur der N-Terminus betrachtet sinkt die Homologie sogar auf 68,8 % (Czap, 2015). Die Varianten aus Bur-0 und Ler-0 unterscheiden sich hingegen im N-Terminus nur in 3 Aminosäuren, in der Kinase-Domäne in 6 Aminosäuren und in der Calmodulin-Domäne in einer Aminosäure (Abb. 1.9). Das entspricht einer Sequenz-Homologie von etwa 98 % über das gesamte Protein. Trotzdem sind große Unterschiede zwischen CPK23L und CPK23B hinsichtlich ihrer Fähigkeit den ABA-Signalweg zu induzieren beobachtbar.

4.3.1 Unterschiede zwischen CPK23 aus Bur-0 und Ler-0 – Die Kinase-Domäne

Während CPK23B in der Lage war, den ABA-Signalweg deutlich zu induzieren, war dies in Protoplasten- und Hefe-Assays nicht für CPK23L zu beobachten (Abb. 3.7). Um herauszufinden, ob dieser Befund auf die Kinase-Domäne oder die N-terminale Region zurückzuführen ist, wurden *domain-swaps* der beiden Varianten generiert und getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus hier nicht involviert ist und das Ergebnis unabhängig von diesem für die jeweilige Kinase auftritt (Abb. 3.8-A-D). Folglich ist hier die Kinase-Domäne selbst für den Effekt verantwortlich. Die wahrscheinlichste Annahme ist eine Mutation im Aktivierungsloop von CPK23L. Dieser verbindet das DFG Motiv mit dem APE-Motiv, wird häufig phosphoryliert und durch Peptidsubstrate gebunden, die dadurch Zugang zum aktiven Zentrum der Kinase bekommen (Christie et al., 2013). Das DFG-Motiv ist dabei die Mg^{2+} -Bindestelle, das APE-Motiv dient der Stabilisierung des Aktivierungsloops (Taylor and Kornev, 2011). Jedoch ist dieser Sequenz-Bereich für CPK23B und CPK23L identisch. Insgesamt gibt es in der Kinase-Domäne nur 6 Aminosäuren, die für CPK23B und CPK23L unterschiedlich sind (Anhang 5.2). 3 dieser entsprechen für CPK23L der Variante aus CPK23C. Da CPK23C dieselbe Aktivität auf den ABA-Signalweg wie CPK23B zeigt, können die entsprechenden Aminosäuren außer Acht gelassen werden. Zwei Aminosäuren unterscheiden sich zwischen allen 3 CPKs: die Position 186 (CPK23C = Asparagin, CPK23B = Methionin, CPK23L = Lysin) und die Position 298 (CPK23C = Asparaginsäure, CPK23B = Glycin, CPK23L = Glutaminsäure). Lediglich Position 290 unterscheidet sich zwischen CPK23B (Arginin) und CPK23L (Serin) und entspricht im aktiven CPK23C (ebenfalls Arginin) der Aminosäure aus CPK23B.

Der Einfluss der Aminosäure an Position 290 auf die Kinase-Aktivität von CPK23

Damit stellt diese Aminosäure den wahrscheinlichsten Kandidaten für den Unterschied zwischen CPK23L und CPK23B dar. Tatsächlich führte eine Mutation von Arginin zu Serin an dieser Position zu einer deutlichen Aktivitätsabschwächung für CPK23B in Protoplasten (Abb. 3.8-C), während besonders in Hefe die umgekehrte Mutation zu einer Aktivitätssteigerung für CPK23L führte (Abb. 3.8-D). Auch CPK23C wurde durch die R290S Mutation teilweise inhibiert (Abb. 3.8-C). Dies spricht für eine wichtige Funktion dieser Aminosäure. Eine Erklärung ist hier jedoch schwierig. Um den Einfluss der Einzelmutationen auf die Proteinstabilität von CPK23 zu ermitteln, wurde das *online-tool* DDMut (<https://biosig.lab.uq.edu.au/ddmut>) verwendet. Dieses ermittelt Änderungen der freigesetzten Energie in Abhängigkeit der eingeführten Mutation (Zhou et al., 2023). Für die Einführung der R290S Mutation nimmt die vorhergesagte Proteinstabilität um 0,22 kcal/mol (CPK23C) und 0,17 kcal/mol (CPK23B) ab, die umgekehrte Mutation hat für CPK23L quasi keinen Einfluss auf die Proteinstabilität. Auch zwischen den Aminosäuren, mit denen das Arginin in CPK23B und CPK23C und den Aminosäuren, mit denen das Serin in CPK23L in Wechselwirkungen treten kann, gibt es keine Unterschiede. In beiden Fällen kommt es zu Wechselwirkungen mit Trp293, Pro294 und Asp287 (<https://biosig.lab.uq.edu.au/ddmut/>). Auch in der Orientierung des Aminosäurerests an Position 290 gibt es keine großen Unterschiede, der Rest liegt in allen 3 CPK23-Varianten exponiert auf der Oberfläche des Proteins (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Abb. 4.11-D). Die mit der Aminosäure an Position 290 interagierenden Aminosäuren werden in Abb. 4.11 dargestellt.

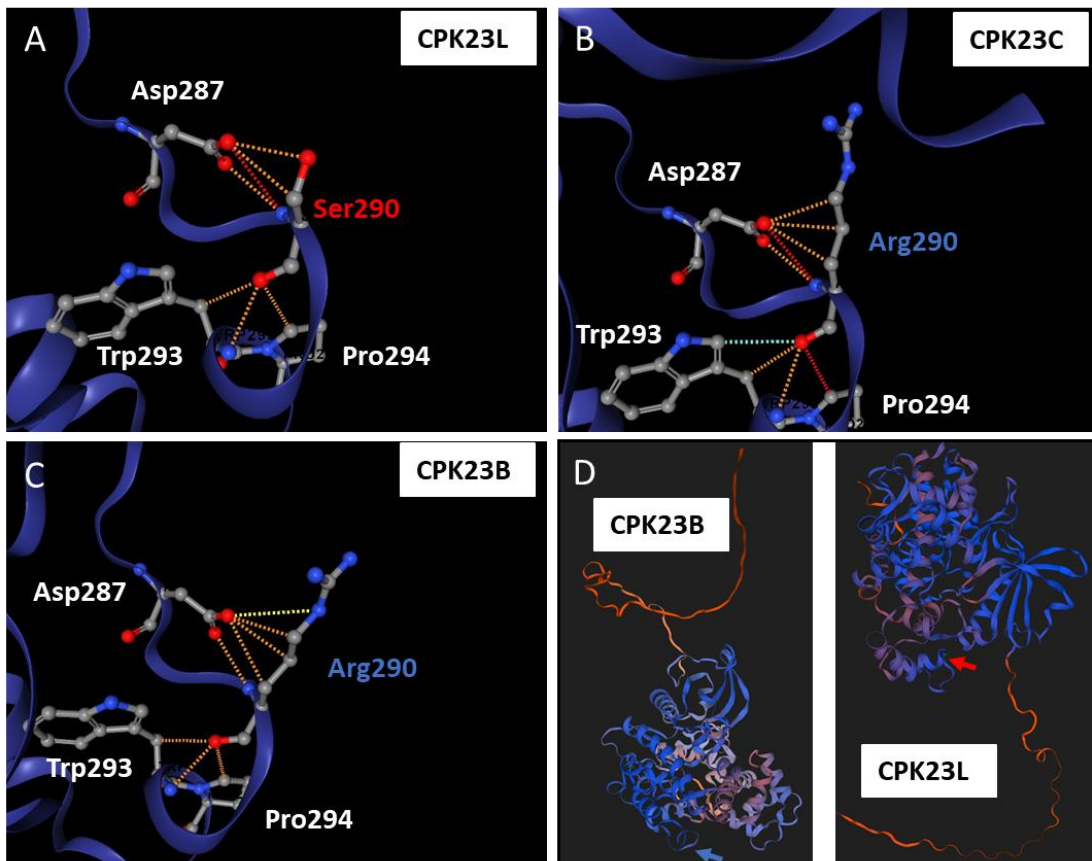


Abb. 4. 11: Der Einfluss der Position 290 auf die Proteinstruktur von CPK23.

(A) Das Serin an Position 290 von CPK23L geht dieselben Bindungen ein, wie das entsprechende Arginin in CPK23C (B) und CPK23B (C) (<https://biosig.lab.uq.edu.au/ddmut/>). (D) Auch ist die entsprechende Aminosäure in CPK23L, wie in CPK23B, weiterhin unverändert exponiert auf der Außenseite des Proteins zu finden (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Daher wurde bereits spekuliert, dass die Aminosäure an Position 290 als Docking-Motiv in der Substrat-Bindung beteiligt ist (Czap, 2015). Da sich weder die Proteinstruktur noch die Stabilität des Proteins durch Einfügen des Serin-Restes ändert, die Position 290 durch die exponierte Lage aber gleichzeitig gut für andere Proteine zugänglich sein dürfte, ist es möglich, dass sich durch das Serin eine Änderung der CPK23-Regulation ergibt. In CPK23L dient das Serin hier möglicherweise als Phosphorylierungsstelle, die bei erfolgter Phosphorylierung das Protein inaktiviert. SnRK2.6 ist beispielsweise in der Lage CPK23C durch Phosphorylierung von T213 zu inaktivieren (Czap, 2015). Ein ähnlicher Mechanismus wäre hier denkbar. Da die Position in 3D Strukturen einen großen Abstand zum aktiven Zentrum und dem Aktivierungsloop zeigt, ist ein Einfluss einer solchen Modifikation auf die Aktivität des Enzyms selbst aber nur in Folge einer resultierenden Konformationsänderung denkbar. Möglicherweise hebt eine Phosphorylierung vielmehr die Fähigkeit mit anderen

Diskussion

Zielproteinen (zum Beispiel ABFs) zu interagieren auf. Da die in der CPK23B Kinase-Domäne vorliegende Aminosäure Arginin (R) aufgrund der alkalischen Seitenkette basisch und positiv geladen ist, werden hier möglicherweise Interaktionen mit Substraten ermöglicht, die bei einer Phosphorylierung der potenziellen analogen Interaktionsfläche in CPK23L aufgrund der negativen Ladung nicht möglich sind. SnRK1.1 verhindert beispielsweise über die Phosphorylierung der Protein-Tyrosin Phosphatase PTP1 dessen Interaktion mit MPK6 und hebt damit die PTP1-abhängige negative Regulierung von MAPK6 auf (Cho et al., 2016). Durch das Serin an Position 290 ergibt sich in CPK23L die Sequenz S₂₉₀-Q-P-W-P-S₂₉₅. MEKKs aktivieren MAPK-Kinasen über die Phosphorylierung zweier Serin/Threonin-Reste eines konservierten S/T-X₃₋₅-S/T Motives im Aktivierungs-Loop (Nanda et al., 2014). Eine entsprechende S290R Mutation hebt diese Konsensus-Sequenz in CPK23L auf, während die umgekehrte R290S Mutation diese in CPK23B einführt. Aufgrund der Sequenz ist daher eine negative Regulierung von CPK23L durch MEKKs potenziell möglich. Während B-Typ RAF-like MEKKs SnRK2s über Phosphorylierung aktivieren, werden diese wiederum über RAFs des C-Typs inaktiviert (Kamiyama et al., 2021). Ein ähnlicher Vorgang ist folglich auch für CPK23L denkbar. Einen Hinweis auf die Wichtigkeit von Position 290 gibt auch die globale Verteilung des SNPs. Während in Schweden 100 % aller untersuchten CPK23-Ökotypen ein Arginin an dieser Position tragen, verschiebt sich das Gleichgewicht in wärmeren Ländern hin zum inaktiven Serin: in Spanien tragen 55 % der CPK23-Varianten ein Serin, in Frankreich 57 % und in Italien sogar 70 % (Anhang 5.3.1). Möglicherweise ist die aktive Arginin-Variante also mit Kälte assoziiert.

4.3.2 Unterschiede zwischen CPK23 aus Bur-0 und Col-0 – die N-terminale Domäne

In vorangegangenen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass Kälte einen Einfluss auf CPK23 haben kann, indem die Lokalisation des Proteins unter diesen Bedingungen scheinbar angepasst wird (Abb. 3.9-A). Dieser Effekt wurde zum Teil einer veränderten NMT1-Expression oder einer abgeschwächten Interaktion mit diesem zugeschrieben. Andere Experimente deuteten jedoch ebenfalls eine Involvierung eines ABF-abhängigen Signalweges an. Diese Experimente konnten zeigen, dass auch N-terminal unmodifiziertes CPK23 bei Koexpression mit ABFs, besonders in Anwesenheit von ABF1, in der Lage war den ABA-Signalweg über diese zu induzieren (Abb. 3.15). Interessanterweise konnte dies nicht für die CPK23-Varianten aus Bur-0 und Ler-0 beobachtet zu werden (Abb. 3.16). Da nicht auszuschließen ist, dass dieser Effekt durch die Kinase-Domäne vermittelt wird, beispielsweise durch eine unterschiedliche Affinität zu Zielproteinen, wurden auch in diesem Fall *domain-swaps* erstellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass für eine Aktivierung der ABFs über N-terminal unmodifiziertes CPK23 strikt der N-Terminus der Col-0 CPK23 Variante benötigt wird. Wurde der CPK23 N-Terminus

Diskussion

aus Bur-0 oder Ler-0 vor die Kinase aus Col-0 kloniert, sank die Induktion des ABA-Signalweges in Anwesenheit von ABF1 ab. Wurde hingegen der N-Terminus aus Col-0 vor die Kinasen aus Ler-0 und Bur-0 kloniert, war der umgekehrte Effekt zu beobachten (Abb. 3.17-A-C). Da die 9aa-Versionen dieser Konstrukte in vergleichbarem Umfang den ABA-Signalweg induzieren konnten (Abb. 3.17-D/E), kann geschlossen werden, dass (1) die Proteinstabilität in den *swap*-Varianten nicht beeinträchtigt ist, dass (2) die Proteine voll funktionsfähig sind und (3) die Regulation der Kinase-Domäne selbst nicht vom jeweiligen N-Terminus abhängig ist. Zum anderen zeigt dieses Ergebnis aber auch, dass es weder eine differentielle Affinität zu Zielproteinen noch eine differentielle Regulierung durch inhibierende Enzyme, beispielsweise PP2Cs, gibt. Die schlüssigste Annahme ist folglich, dass der CPK23C N-Terminus bevorzugt auf Stimuli reagiert, welche eine Lokalisationsänderung auslösen. Falls die N-Termini aus Bur-0 und Ler-0 nicht auf solche reagieren, bleibt das entsprechende Protein Membran-gebunden und kann folglich auch den ABA-Signalweg nicht beeinflussen. Die wahrscheinlichste Variante ist hierbei ein Stimulus in Form eines interagierenden und regulierenden Proteins. (1) Entweder unterbleibt durch diesen Stimulus eine Modifikation, beispielsweise in Form eines nicht mehr interagierenden NMT1, oder aber (2) dieser bewirkt eine zusätzliche Modifikation, beispielsweise durch Phosphorylierung im N-Terminus oder einer De-Palmitoylierung. Dieser Stimulus wäre hierbei spezifisch für den Col-0 N-Terminus. Da unter Normalbedingungen weder CPK23 mit N-Terminus aus Col-0 noch Varianten aus Bur-0 und Ler-0, eine Induktion des ABA-Signalweges zeigten (Abb. 3.7-B/C), obwohl unter diesen Bedingungen NMT1 normal exprimiert wird, ist es unwahrscheinlich, dass NMT1 eine differentielle Affinität zu den verschiedenen N-Termini aufweist. Wäre dies der Fall, müsste CPK23C unter Normalbedingungen bereits auch cytosolisch vorliegen. Dies kann jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.1-D). Folglich ist die zweite Annahme wahrscheinlicher.

Unterschiede in der vorhergesagten Bindestelle im CPK23 N-Terminus

Tatsächlich konnte bei der Analyse des CPK23C N-Terminus über den ANCHOR2 *prediction* Algorithmus mit 82 % Wahrscheinlichkeit eine Bindestelle zwischen der 20.ten und 30.ten Aminosäure vorhergesagt werden (Abb. 4.4) (Abb. 4.12-A). Der N-Terminus aus Bur-0 und Ler-0 weist diese zusätzliche Bindestelle jedoch nicht auf (maximal 50 %) (<https://iupred2a.elte.hu/>) (Abb. 4.12-C). Zuerst wurde angenommen, dass diese Bindestelle in der Interaktion mit ABFs involviert ist. Da jedoch auch Varianten mit Bur-0 und Ler-0 nach einer Modifikation des N-Terminus über die ABFs den ABA-Signalweg induzieren konnten und dies zusätzlich auch in Hefe-Assays zu beobachten war (Abb. 3.27-B/C), ist diese Annahme wohl nichtzutreffend. Für die Interaktion mit den ABFs scheint vielmehr die Kinase-Domäne verantwortlich zu sein. Die bereits beschriebenen Unterschiede zwischen der Ler-0- und Bur-0 CPK23-Kinase Domäne unterstreichen dies (Abb. 3.8). Realistischer ist folglich die Annahme, dass die Bindestelle für die Interaktion mit einem aktivierenden Faktor, welcher die Membranablösung

Diskussion

vermittelt, wichtig ist. Neben 5 SNPs weist der CPK23 N-Terminus von Col-0 im Vergleich zu Bur-0 zwei Insertionen auf: ein zusätzliches G an Position 17 und 8 Aminosäuren zwischen Position 36 und 43. Der N-Terminus aus Bur-0 verfügt im Vergleich zu dem aus Col-0 über eine 9 Aminosäure lange Insertion (entspricht in CPK23C Position 60) (Anhang 5.2). Definiert man die 8 Aminosäuren-Insertion von CPK23C als Col-0 Typ und die entsprechende Deletion in CPK23B und CPK23L als Bur-0 Typ, so entsprechen 80 % der CPK23-Varianten dem Col-0 Typ (Abb. 3.18-A/B). Varianten, in denen in CPK23C die Insertion entfernt wurde, zeigten eine schwächere Induktion des ABA-Signalweges, während die Re-Integration der Insertion in Bur-0 mit einer Steigerung der Aktivität auf den ABF-abhängigen ABA-Signalweg einherging (Abb. 3.18-C/D). Dass dieser Befund auf eine Veränderung der Affinität zu möglichen interagierenden Proteinen zurückzuführen sein kann, zeigt erneut die Bindestellen-Analyse via ANCHOR2. Das Einfügen der Bur-0 Deletion in CPK23C verringert die Wahrscheinlichkeit einer Bindestelle von 82 % auf etwa 64 % (Abb. 4.13-A/B). Gleichzeitig erhöht die Re-Integration der Col-0 Insertion in den Bur-0 N-Terminus die Wahrscheinlichkeit von 50 % auf 78 % (<https://iupred2a.elte.hu/>) (Abb. 4.13-C/D). Die Position der CPK23C-Insertion befindet sich dabei in räumlicher Nähe zum palmitoylierten C₃ (32 Aminosäuren) und zu den vorhersagbaren MEKK-Konsensus Sequenzen S₅-X-X-X-X-T₁₁ und S₆-X-X-X-X-T₁₁ (24 Aminosäuren). Die Anlagerung eines entsprechenden Enzyms an die vorhersagbare Interaktionsfläche in CPK23C könnte folglich die für eine aminoterminal Aktivierung notwendigen enzymatischen Reaktionen (Depalmitoylierung oder Phosphorylierung) vermitteln, wohingegen diese Prozessierung in CPK23B und CPK23L aufgrund der fehlenden zusätzlichen Interaktionsfläche nicht möglich oder zumindest unwahrscheinlicher wäre. Weder die 1 Aminosäuren Insertion in CPK23C noch die 9 Aminosäuren Insertion in CPK23B haben *in-silico* einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit dieser Bindestelle. Man kann daher schlussfolgern, dass die 8 Aminosäuren-Insertion in CPK23C essenziell für dessen Aktivierung ist und daher ein geeigneter Faktor für die Einteilung der verschiedenen CPK23-Ökotypen darstellt: CPK23-Varianten des Col-0 Typs sind N-Terminal aktivierbar, Varianten des Bur-0 Typs sind es nicht. Die hier beschriebenen Zusammenhänge werden in Abb. 4.12 schematisch dargestellt.

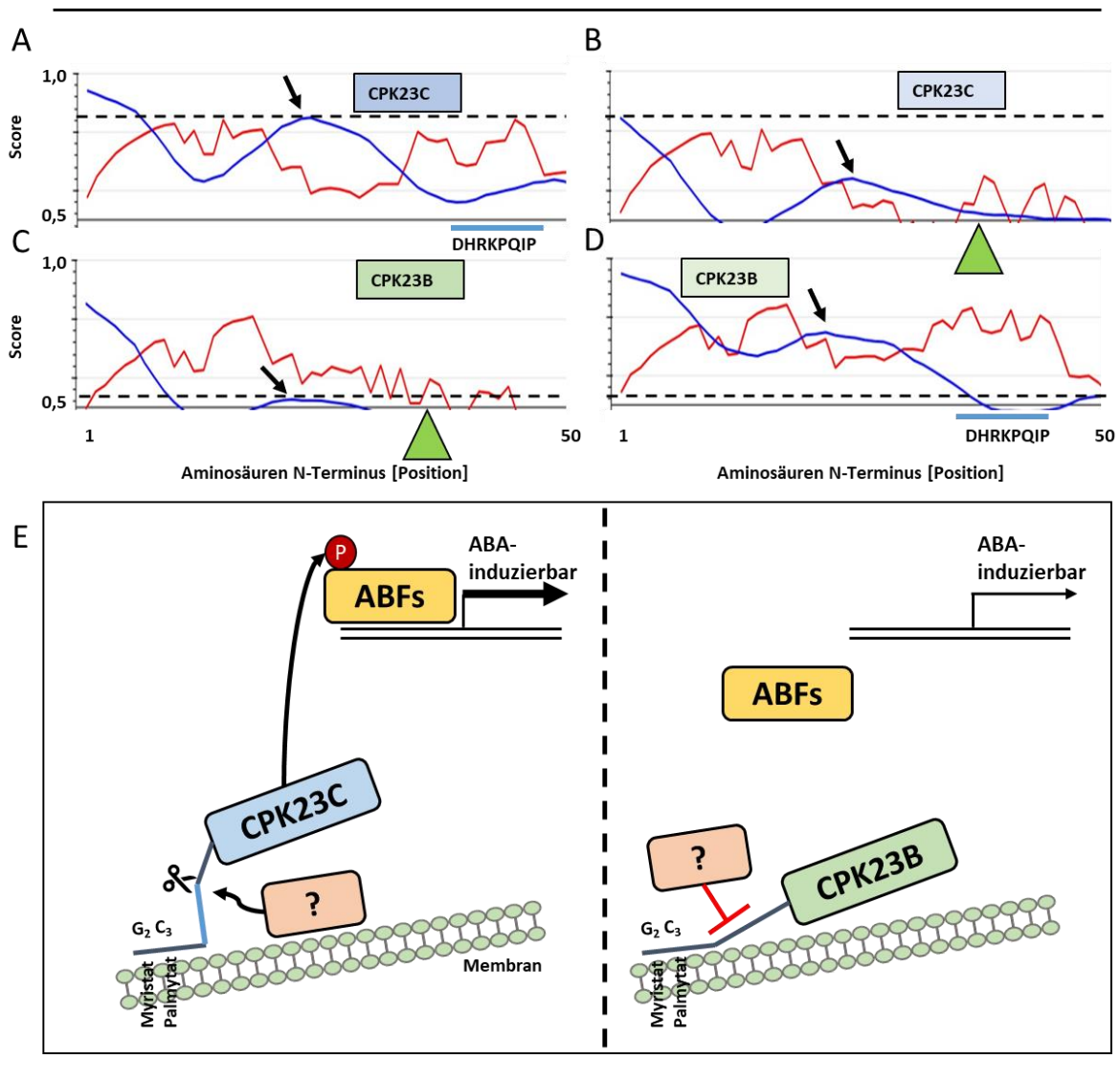


Abb. 4. 12: Ökotypische Unterschiede im CPK23-N-Terminus können zu einer differenziellen Aktivierbarkeit führen.

(A) CPK23C weist mit über 80 % Wahrscheinlichkeit eine Bindestelle im N-Terminus auf. (B) Wird eine spezifische Sequenz, welche im CPK23C N-Terminus vorhanden ist, im CPK23B N-Terminus jedoch deletiert, sinkt die Wahrscheinlichkeit für diese Bindestelle ab. (C) Das Vorhandensein dieser Deletion hat auch im nativen CPK23B N-Terminus einen negativen Einfluss auf das Vorhandensein der vorausgesagten Bindestelle, (D) da eine Integration der Sequenz aus CPK23C in CPK23B, die Wahrscheinlichkeit für diese erhöht (<https://iupred2a.elte.hu/>). (E) Es ist daher möglich, dass der unbekannte Effektor, welcher möglicherweise die N-terminale Aktivierung von CPK23C bewirkt, mit dieser Bindestelle interagiert. Da aufgrund der Deletion in CPK23B diese Bindestelle in diesem nicht vorhanden ist, unterbleibt hier möglicherweise die Interaktion mit dem unbekannten Faktor.

Diskussion

Die zwei Typen gehen dabei häufig mit zwei konservierten SNPs einher: der Col-0 Typ weist immer ein Isoleucin an Position 47, und annähernd nie ein Tryptophan an Position 53 auf. Ist an Position 47 hingegen ein Threonin, folgt stets auch ein Tryptophan an Position 53 (Positionsangaben entsprechen hierbei der CPK23C-Variante und weichen bedingt durch die Deletion im Bur-0 Typ ab). Diese Kombination entspricht in 60 % der Fälle dem Bur-0 Typ (Abb. 3.19-A/B). Das Tryptophan an Position 53 des Bur-0 Typs (entspricht in Bur-0 wegen Deletion Position 44) war bereits früher Bestandteil von Überlegungen und eine Rolle in der Regulation der Kinase-Domäne wurde diskutiert (Czap, 2015). Auch denkbar wäre, dass CPK23 des Bur-0 Typs durch eine Phosphorylierung des Threonins inaktiviert werden. Entsprechende Single und Doppel-Mutationen für die beiden SNPs zeigten jedoch keinen eindeutigen Effekt (Abb. 3.19-C). Auch spielten sie in der Generierung der Bindestelle oder deren Wahrscheinlichkeit keine Rolle (<https://iupred2a.elte.hu/>). Aufgrund dieser Erkenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Aminosäuren wahrscheinlich keinen Beitrag zur differentiellen Regulation der verschiedenen CPK23-Varianten beitragen und lediglich evolutionär mit der Col-0 Insertion assoziiert sind.

4.3.3 Unterschiede zwischen CPK23 aus Ler-0 und Col-0 – der Phänotyp

In dieser Arbeit wurden Überexpressionslinien für CPK23C im Col-0 WT erstellt. Diese Linien wiesen im Vergleich zum WT, neben einer Erhöhung in der Expressionsrate, auch einen Unterschied in der CPK23C-Aktivität auf. Durch das Fehlen der Calmodulin-Domäne ist in diesen Linien die Funktion von CPK23 nicht mehr von einer Induktion durch Calcium abhängig. CPK23C liegt in diesen Linien dementsprechend de-reguliert vor. Zusätzlich wurden auch Varianten generiert, die N-terminal modifiziert sind und daher keine Membran-Assoziationsbefähigung mehr besitzen. Die entsprechenden Linien zeigten ein sensitives Keimungsverhalten unter abiotischen Stressbedingungen und exogener ABA-Zugabe (Abb. 3.2). Zusätzlich war die Blatt-Temperatur erhöht (Abb. 3.3). Dies ist ein Hinweis auf eine Involvierung im Stomata-Schluss, da Beeinträchtigungen der Stomata-Öffnung (gleichbedeutend mit erhöhter Rate an geschlossenen Stomata) mit einer Verringerung der Transpiration einhergehen (Merlot et al., 2002). Ebenfalls erfolgte die Stomata-Öffnung in Reaktion auf sinkende CO₂-Werte verzögert (Abb. 3.3-A-C) und eine lichtabhängige Stomata-Regulation ist gar teilweise verloren gegangen (Abb. 3.3-D-F). Da Analysen des CPK23-Proteins in dieser Arbeit einen deutlichen Einfluss auf die ABF-abhängige Induktion des ABA-Signalweges zeigen konnten (Abb. 3.14), ist es in diesem Zusammenhang folgerichtig anzunehmen, dass die hier beschriebenen Phänotypen der Überexpressions-Linien ebenfalls auf einer veränderten Regulation und erhöhten Induktion des ABA-Signalweges beruhen. Auch im Ler-0 *background* existiert eine bereits gut beschriebene

Überexpressionslinie: die EMS-Mutante *gca2-1* wurde anhand ihres ABA-insensitiven Wurzelwachstums isoliert und weist im Vergleich zum Ler-0 WT eine erhöhte Rate an CPK23-Transkript auf (Korte, 2009). Ähnlich wie CPK23 ist auch hier der Stomataschluss unter hohen CO₂-Konzentrationen beeinträchtigt (Young et al., 2006). Jedoch war die Blatt-Temperatur in diesem Fall verringert (Abb. 3.34-C/D). Eine verringerte Blatt-Temperatur ist hierbei ein Hinweis auf eine erhöhte Stomata-Öffnung. Auch SnRK2.6 KO-Pflanzen weisen eine erhöhte Blatt-Temperatur auf (Mustilli et al., 2002). In diesem Fall macht der Befund allerdings Sinn: Da SnRK2.6 ein positiver Aktivator des ABA-Signalweges und von in der Stomata-Regulation involvierten SLAC1 darstellt (Brandt et al., 2015), führt ein SnRK2.6 KO zu einem Ausbleiben der SnRK2.6-abhängigen SLAC1-Aktivierung. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung der Stomata-Öffnung und damit zu einem Absinken der Blatt-Temperatur durch erhöhte Transpiration. Folglich sollte eine SnRK2.6 Überexpression den Gegenteiligen Effekt haben, damit zu einer Verringerung der Stomata-Öffnung führen und zu einer erhöhten Blatt-Temperatur beitragen. Eine solche ABA-abhängige Reduktion der Stomata-Öffnung konnte in SnRK2.6-Überexpressionslinien auch bereits gezeigt werden (Acharya et al., 2013). Damit weist die CPK23-Überexpressionslinie *gca2-1* einen gegensätzlichen Effekt sowohl zu CPK23-, als auch zu SnRK2.6-Überexpressionslinien in Col-0 auf. Auch der CO₂-abhängige Effekt war in *gca2-1* deutlich stärker ausgeprägt, der Stomataschluss unter niedrig-CO₂ erfolgte hier überhaupt nicht mehr (Abb. 3.34-C). Dieser gegenteilige Effekt war auch in Keimungsprozessen sichtbar, in denen *gca2-1* ABA-insensitiv auf abiotischen Stress reagierte (Abb. 3.34-A/B). Diese Beobachtungen sind nur schwer erklärbar: Zwar ist CPK23L aufgrund der schwächeren Kinase-Aktivität ein deutlich schwächerer Induktor des ABA-Signalweges als CPK23C (Abb. 3.7-B/C), in Anwesenheit von ABFs konnte über CPK23L der ABA-Signalweg jedoch nach wie vor induziert werden (Abb. 3.7-D). CPK23L ist damit ebenfalls ein positiver Regulator des ABA-Signalweges. Warum eine Überexpression von CPK23L in Ler-0 (*gca2-1*) folglich negativ auf den ABA-Signalweg wirken sollte ist zumindest fraglich.

Eine differentielle CPK23-Expression kann zu unterschiedlichen Phänotypen führen

Eine mögliche Antwort kann hier die Expressionsrate und Regulierung von CPK23 in Ler-0 liefern. Zum einen ist die Expressionsrate von CPK23L unter Normalbedingungen in Ler-0 bereits 2,7-fach höher als die von CPK23C in Col-0 (Czap, 2015), zum anderen führt die exogene Zugabe von ABA in Ler-0 zu einer Reduktion von CPK23, während dies in Col-0 nicht beschrieben ist (Korte, 2009). Folglich ist es denkbar, dass CPK23L in Ler-0 unter Normalbedingungen bereits hoch exprimiert vorliegt und der ABA-Signalweg über dieses bereits initial induziert (*Priming*) wurde. Dies würde zum einen teilweise erklären, wieso Ler-0 sensitiver auf abiotischen Stress als Col-0 reagiert, und zum anderen eine Begründung für den Unterschied der CPK23-KOs in den jeweiligen Ökotypen liefern: während der CPK23-Single KO keinen eindeutigen Phänotypen liefert, ist der CPK23-KO in Ler-0 (*gca2-2*) in der

Diskussion

Keimung insensitive gegenüber abiotischem Stress (Abb. 3.34-A/B). Wenn CPK23L in Ler-0 von Beginn an stärker exprimiert wird, hat folglich auch dessen Ausschalten einen größeren Effekt. Wenn nun die Expressionsrate von CPK23L in Ler-0 zusätzlich erhöht wird, wie es in *gca2-1* der Fall ist, ist auch der Einfluss auf das *Priming* des ABA-Signalweges folglich noch höher als in WT-Pflanzen. Kurz nach Eintritt der Stress-Bedingungen wird jedoch die Expression von CPK23L ABA-abhängig reduziert (Korte, 2009) und die durch dieses vermittelte Aktivierung des ABA-Signalweges wird wieder aufgehoben. Da potenziell das Ausgangslevel der CPK23-Aktivität (das *Priming* des ABA-Signalweges) bereits höher als im WT ist, hat die Erniedrigung dieser Aktivität in *gca2-1* folglich möglicherweise einen umso gravierenderen Effekt und der ABA-Signalweg wird noch stärker als im Ler-0 WT abgeschwächt. Die Folge wäre eine erhöhte Insensitivität. Auch wurde beschrieben das RCAR1 durch CPK23L-abhängige Phosphorylierung in Ler-0 und *gca2-1* zu einer Abschwächung des ABA-Signalweges beiträgt (Korte, 2009). Die beobachtbare ABA-Insensitivität wäre folglich auch über die Zielproteine von CPK23L zumindest zu einem geringen Teil erklärbar. Die Expression von CPK23L unter dem endogenen Promotor von CPK23C in *gca2-2* (Abb. 3.35) und auch nach Einkreuzen dieser Linie in *gca2-1* (Abb. 3.36), führte jedoch zu einer Angleichung der Keimungsrate unter steigenden ABA-Konzentrationen an den Ler-0 WT und ähnelte dem Effekt, der durch die Expression von CPK23C und CPK23B in *gca2-2* beobachtet werden konnte. Dies bedeutet, dass der beobachtete Effekt in *gca2-1* wahrscheinlich nicht mit der Protein-Aktivität von CPK23L assoziiert werden kann, sondern eher auf die differentielle Expressions-Regulation in den verschiedenen Ökotypen zurückzuführen ist. Der Promotor von CPK23L unterscheidet sich dabei stark von dem für CPK23C: Deletion und Insertion haben hier zu einem Austausch größerer Fragmente geführt, die im jeweils anderen Ökotyp nicht vorhanden sind. Allgemein ist die Homologie zwischen den beiden Promotoren nur sehr gering und es gibt zahlreiche Basen-Austausche (Czap, 2015). Erstaunlicherweise ist der Terminatorbereich zwischen beiden Ökotypen hingegen stark konserviert und annähernd deckungsgleich. Dies könnte ein Hinweis auf einen evolutionären Druck im für die Protein-Expression verantwortlichen Promotor sein und die deutlichen Unterschiede zwischen der *gca2-1* Mutante einerseits, und dem in *gca2-2* unter dem endogenen CPK23C-Promotor exprimierten CPK23L andererseits, teilweise erklären (Abb. 3.35). Allgemein sind die Effekte der *gca2-1* Mutante jedoch so gravierend, dass auch eine Involvierung anderer Gene nicht ausgeschlossen ist.

Der mögliche Einfluss weiterer Mutationen auf *gca2-1*

Eine Sequenzierung von *gca2-1* zeigte eine Vielzahl von Mutationen, darunter 5 vorzeitige Stop-Codons, 9 *Frameshifts*, 3 Deletionen und 3 Insertionen (Abb. 3.33-C). Das von einem vorzeitigen Stop-Codon betroffene SLAH4 wird hauptsächlich in Wurzeln exprimiert, ist ein Homolog zu dem Anionenkanal SLAC1 (Zheng et al., 2015) und kann durch Salzstress induziert werden (Qiu, 2015). Auch

Diskussion

wenn SLAH4 somit aufgrund seines Expressionsortes nicht in der Stomata-Regulierung involviert ist, auch wenn diese im Ler-0 WT von Col-0 abweichen könnte, so ist ein Einfluss in der Stickstoff-Aufnahme nicht ausgeschlossen. Ein solcher konnte für SLAH3 gezeigt werden, welches für ein normales Pflanzen-Wachstum benötigt wird (Zheng et al., 2015). Auch ein Auxin *response factor* (ARF) ist in der *gca2-1* Mutante betroffen: Das Gen für ARF4, einem transkriptionellen Repressor der Auxin-Antwort (Zhang et al., 2021), weist einen *frame-shift* auf. ARF4 ist in der Regulation der Gametophyten Entwicklung in Arabidopsis beteiligt (Liu et al., 2018c), in Tomaten ist ARF4 zusätzlich in der Wurzelentwicklung, der Toleranz gegenüber Salz- und osmotischen Stress durch Beeinflussung der stomatären-Leitfähigkeit, sowie dem ABA-Gehalt unter Stressbedingungen involviert (Bouzroud et al., 2019). Das Gen für das Cyclophilin CYP59 weist ebenfalls einen *frame-shift* auf. Da die Aktivität von CYP59 mit Transkriptions- und pre-mRNA-Prozessen in Verbindung gebracht wird (Gullerova et al., 2006), kann eine Mutation in diesem bereits potentiell große Veränderung in der pflanzlichen Gen-Expression bewirken. Da in *gca2-1* obendrein noch der MAP-Kinase Signalweg (5'UTR von MAPKKK13), der ABA-Signalweg (3'UTR von PYL6 und PYR1) und der Ethylen-Signalweg (*missense* in ERF2) betroffen sind und es damit Beeinflussungen der meisten Phytohormon-Signalwege gibt, ist es fast unmöglich Aussagen darüber zu treffen, ob eine Mutation einen bestimmten Phänotyp bewirkt. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Expressionsrate von CPK23L in *gca2-1* zumindest nicht allein die gravierenden Phänotypen der Mutante erklären kann.

Die Ergebnisse der hier präsentierten Experimente lassen zumindest den Schluss zu, dass nicht die Aktivität von CPK23L in Ler-0 entscheidend ist, sondern dessen Expressions-Regulation. CPK23 stellt damit nicht nur ein Protein dar, welches in verschiedenen Prozessen und Signalwegen involviert ist, es gibt zusätzlich auch ökotypisch-spezifische Unterschiede hinsichtlich seiner Aktivität, seiner Aktivierung und seiner Regulation und machen es damit selbst in der vielfältigen Gruppe der pflanzlichen CPKs einzigartig.

5 Anhang

5.1 Protein-Sequenzen von CPK23

Die Aminosäure-Sequenz von CPK23C, CPK23B und CPK23L wurde aus (Czap, 2015) entnommen und stammt ursprünglich aus der Datenbank des *1001 genomes project* (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>). Der N-Terminus wurde in rot markiert, die Kinase-Domäne in schwarz und die Calmodulin-Domäne in blau. Die Positionen für Modifikationen (N-Terminus) und von wichtigen Motiven (DFG-Motiv und APE-Motiv in der Kinase-Domäne) wurden unterstrichen. **C-terminal Verkürzte CPK23-Varianten** wurden generiert, indem die **Calmodulin-Domäne** (gesamter blauer Bereich) abgetrennt wurde; **domain-swaps** wurden generiert, indem der **N-Terminus** (gesamter roter Bereich) vor die Kinase-Domäne (gesamter schwarzer Bereich) einer anderen CPK23-Variante kloniert wurde.

> CPK23C

MG**C**F**S****S****K****H****R****K****T****Q****N****D****G****G****G****E****R****S****I****P****V****Q****T****H****I****V****D****Q****V****P****D****H****R****K****P****Q****I****P****S****P****S****I****P****S****V****R****D****P****E****T****I****L****G****K****P****F****E****D****I****R****K****F****Y****S****L****G****R****E****L****G****R****G****G****L**
GITYMCKEIGTGNINYACKSILKRKLISELGREDVKTEIQIMQHLGQPNVVEIKGSYEDRHSVHLMELCAGGELFDRII
AQGHYSERAAAGTIKSIVDVVQICHNLNGVIHRDLKPENFLFSSKEENAMLKVTDFGLSAFIEEGKIYKDVVGSPYVAP
EVLRQSYGKEIDIWSAGVILLCGVPPFWADNEEGVFEILKCIDFVREPWPSISDSAKDLVEKMLTEDPKRRITA
AQVLEHPWIKGGEAPEKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKLLALKVSAVSLSEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQ
TGLSRLRSRLSETEVQQLVEASDVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLHHDEHVHKAHQHLDKDKNGHITRDELESAMK
EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH

> CPK23B

MG**C**F**S****S****K****H****R****K****T****Q****S****D****G****G****E****R****S****I****P****I****N****P****V****Q****T****H****I****V****D****Q****V****P****T****P****S****T****P****I****S****V****R****Y****P****E****T****I****L****G****K****G****K****A****L****G****I****L****G****K****P****F****E****D****I****R****K****F****Y****S****L****G****K****E****L****G****R****G****Q****F**
GITYMCKEISTGNINYACKSILKRKLISEQGREDVKTEIQIMQHIFGQPNVVEIKGAYEDRQYIHLVLMELCAGGELFDRI
IARGHYSERAAAGIIRSIVSVVQICHFMGVIHRDLKPENFLFSSKEENAMLKVTDFGLSAFIEEGKVYQDVAGSPYVA
PEVLRRSYGKEIDIWSAGVILLCGVPPFWADNEIGIFDEILKCEIDFRQPWPSISGSAKDLVKKMLTEDPKRRITA
EQVLEHPWIKGGEAPDKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKLLALKVSAVSLSEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQ
TGLSRLRSRLSETEVQQLVEASDVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLHHDEHVHKAHQHLDKDKNGHITRDELESAMK
EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH

Anhang

CPK23L	NKLKKLALKVSAVSLSEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQTGLSRLRSRLSETEVQ *****	411
CPK23C	QLVEASDVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLHHDEHVHKAHQHLDKDKNGHITRDELESAMK	471
CPK23B	QLVEASDVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLHHDEHVHKAHQHLDKDKNGHITRDELESAMK	471
CPK23L	QLVEASDVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLHQDEHVHKAHQHLDKDKNGHITRDELESAMK *****:*****	471
CPK23C	EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH	520
CPK23B	EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH	520
CPK23L	EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH *****	520

5.3 Verteilung des Arginin/Serin SNPs an Position 290

5.3.1 Verteilung in Europa

Die jeweilige Aminosäure an Position 290 in verschiedenen CPK23-Ökotypen wurde mittels der *1001 genome project* Datenbank ermittelt (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>). Berücksichtigt wurden dabei nur Ökotypen, bei denen die Sequenzierung in dem entsprechenden Bereich vorlag. Die Mittelwerte der Tageshöchsttemperatur, beziehungsweise Tagesmindesttemperatur wurde über die Internet-Seite (<https://www.wetter.de/klima/europa/Land>, wobei Land durch das jeweils gewünschte Land zu ersetzen ist) ermittelt und in die Tabelle eingetragen.

	Schweden	Bulgarien	Deutschland	Spanien	England	Frankreich	Portugal	Italien
Serin (S) an Position 290	0	10	39	48	8	13	3	14
Arginin (R) an Position 290	152	3	23	37	12	10	4	6
Mittelwert der Tageshöchsttemperatur [°C]	9.0	12.9	13.6	14.7	14.8	14.9	18.3	18.8
Mittelwert der Tagesmindesttemperatur [°C]	4.5	4.6	6.1	6.3	7.1	7.4	13.9	15.1
Verhältnis S/R [%]	0	77	63	56	40	57	43	70

5.3.2 Von den Höhenmetern-abhängige Verteilung in Spanien

Um zu ermitteln, ob die Verteilung des SNPs an Position 290 in Spanien mit den Höhenmetern korreliert, wurden die Koordinaten der Fundorte der jeweiligen Ökotypen (<https://1001genomes.org/accessions.html>) in google maps eingegeben (<https://earth.google.com/web/>) und die an der jeweiligen Position angegebene Höhe notiert. Das Ergebnis wird in Form eines Boxplots (<https://www.statskingdom.com/advanced-boxplot-maker.html>) wiedergegeben. Die dem Boxplot zugrunde liegenden Werte werden in einer Tabelle angegeben. Aufgrund der geringen Unterschiede im Mittelwert (824 m bei Arginin, 816 m bei Serin) zeigt ein T-Test keine statistische Signifikanz (in Excel 2013: =T.Test(Spalte mit Arginin;Spalte mit Serin;zweiseitige Verteilung;homoskedastisch) =

Anhang

0,93). Da die größten Unterschiede im Median zu finden sind (Arginin an Position 290 = 867 m, Serin an Position 290 = 749 m) wurde zusätzlich der Mood's Median Test angewendet (<https://atozmath.com/CONM/NonParaTest.aspx?q=mmt>). Auch hier konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

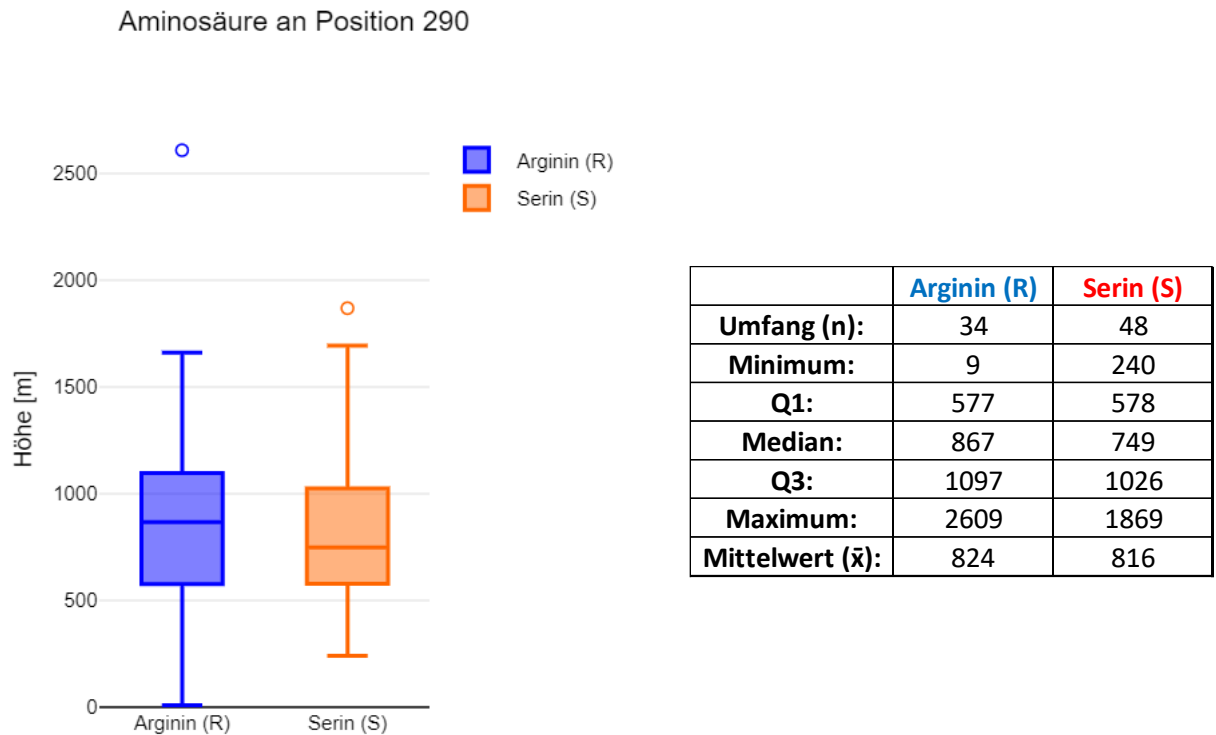


Abb. 5. 1: Einfluss der Höhenmeter auf die Verteilung des SNPs an Position 290 in Spanien.

5.4 Einfluss von Kälte auf die Enzym Aktivität in Protoplasten

5.4.1 Kälte-abhängiger Einfluss auf den pRD29B:LUC-Reporter

Werden Protoplasten Kälte ausgesetzt (in dem hier gezeigten Experiment 10 °C), erfolgt die Signal-Induktion verzögert. Hierfür verantwortlich ist unter anderem der Temperatur Koeffizient (Q_{10}) (Reyes et al., 2008), welcher die Abnahme der Enzym-Aktivität in Abhängigkeit von sinkenden Temperaturen beschreibt: Bei einer Abnahme der Temperatur um 10 °C sinkt die Enzymaktivität um Faktor 2-3 ab. Dies ist auch in Protoplasten-Reporter Assays zu beobachten. Sank die Temperatur (hier von 25 °C auf 10 °C), nahm das Luciferase-Signal [RFU] in Kontroll-Proben um den Faktor 6 ab. Auch der GUS-Wert wurde reduziert, hier um den Faktor 3-4. Damit kann durch die Normalisierung der LUC-Werte auf die

GUS-Werte etwas mehr als 50 % der Kälte-abhängigen Reprimierung ausgeglichen werden. Während in Proben mit CPK23 der GUS-Wert unter Kälte in einem vergleichbaren Umfang absank, war hier der negative Einfluss auf die Luciferase-Werte deutlich erhöht: Sie sanken um den Faktor 10 bis 16 ab. Dies könnte ein Hinweis auf eine negative Regulierung des pRD29B:LUC-Reporters durch CPK23 unter Kälte darstellen. Das Luciferase-Signal in Anwesenheit von RCAR1 wurde hingegen nur um den Faktor 4 gedrückt, folglich könnte es sich bei diesem um einen positiven Regulator unter Kälte handeln.

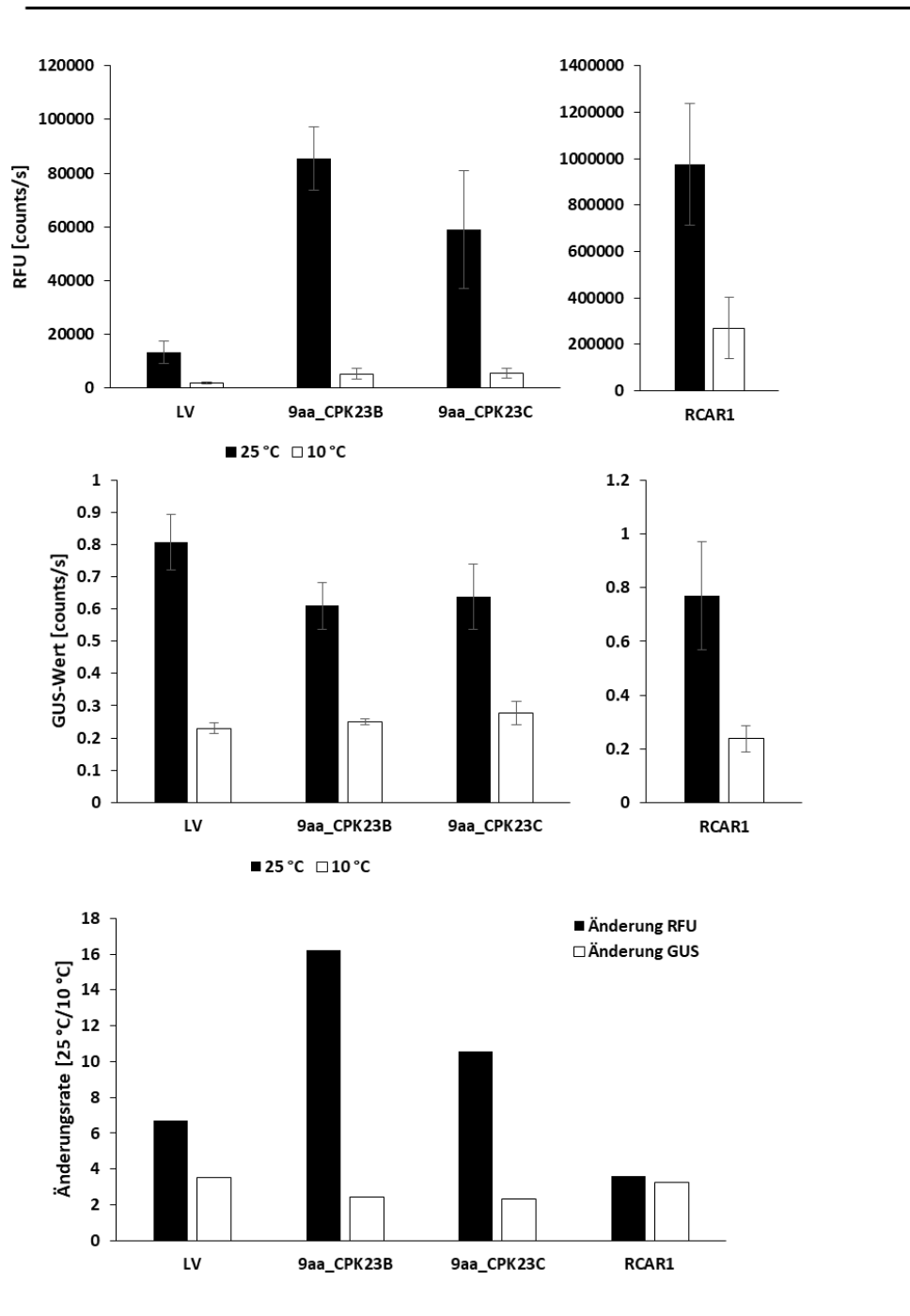


Abb. 5. 2: Einfluss von Kälte auf Luciferase- und GUS-Werte.

Die Luciferase-Werte sinken in Abhängigkeit von CPK23 stärker ab als die entsprechenden GUS-Werte. Col-0 Protoplasten wurden mit Effektoren transformiert und die Protoplasten nach 4 h Inkubation bei 25 °C auf 4 °C und 25 °C aufgeteilt. Nach 16 h Gesamt-Inkubation wurden der LUC-Wert und der GUS-Wert gemessen und in die Diagramme eingetragen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standard-Abweichungen (n=3). Zusätzlich wurden die beiden Werte für Kontroll- und Kälteproben ins Verhältnis gesetzt und in ein weiteres Diagramm eingetragen.

5.4.2 Kälte-abhängiger Einfluss auf den pDR5:LUC-Reporter

Auch die Induktion des Auxin-Reporters pDR5:LUC wird kälteabhängig reprimiert. Da keine der in diesem Experiment verwendeten Effektoren einen Einfluss auf den Auxin-Reporter haben sollten, und der Auxin-Signalweg durch Kälte hauptsächlich auf Ebene von Transportern, und weniger auf Ebene der Signaltransduktion modifiziert wird (Shibasaki et al., 2009), kann man anhand der Induktion des Auxin-Signalweges den reinen negativen Kälte-Einfluss auf die Proteinaktivität, bzw. auf die Protein-Expression beobachten. Weil die verwendeten Effektoren den Auxin-Signalweg nicht induzieren können, war der Signalweg in allen Proben und bei allen Konzentrationen auch bei Normaltemperatur (25 °C) kaum induziert. Unter Kälte (12 °C) sank in allen Proben die Induktion um Faktor 2-3, wie es die Q₁₀-Regel nahelegt. Eine weitere Reduktion der Temperatur (8 °C) brachte keine deutlich gesteigerte Reprimierung.

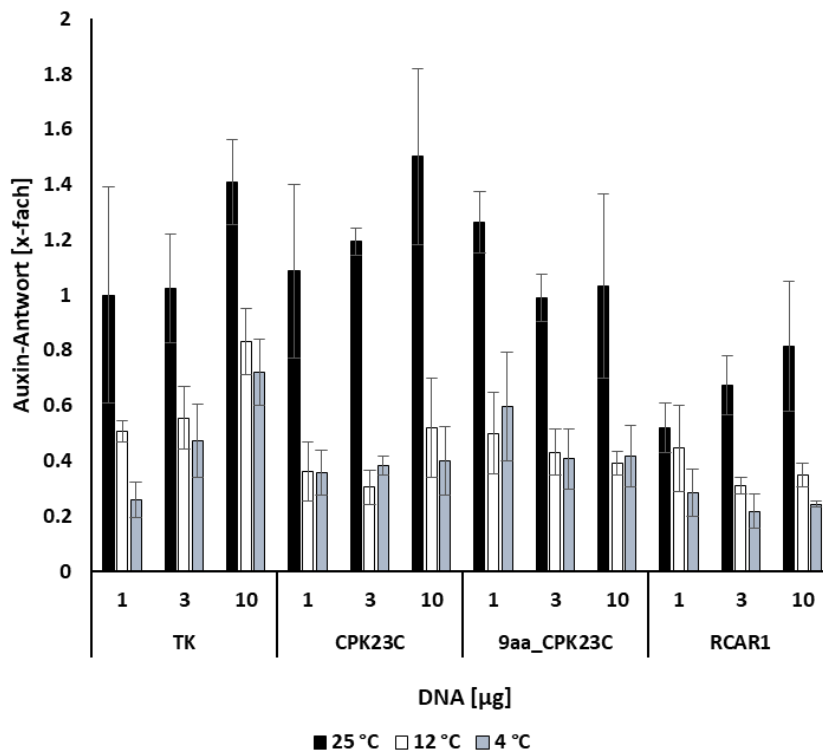


Abb. 5. 3: Einfluss von Kälte auf die Induktion eines Auxin-Reporters.

Der pDR5-LUC Reporters wird durch die verwendeten Effektoren nicht induziert. Auch hier ist durch Kälte bereits ein deutlicher negativer Effekt zu beobachten, der jedoch keine Unterscheidung zwischen den jeweiligen Effektoren zulässt. Für das Experiment wurden die Effektoren mit dem pDR5:LUC-Reporter in Col-0 Protoplasten koexprimiert. Nach 4 h Inkubation wurden die Proben auf die jeweiligen Temperaturen aufgeteilt. Die Ermittlung der LUC- und GUS-Werte erfolgte nach 16 h Inkubation. Der 1 µg TK Wert bei 25 °C diene als Referenz. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

5.5 Keimungsphänotypen

5.5.1 Col-0 transformiert mit pCPK23::X::tCPK23

Auch bei Expression von CPK23 unter dem endogenen Promotor kann ein Absinken der Keimungsrate bereits bei geringen ABA-Konzentrationen beobachtet werden. Insbesondere N-terminale CPK23-Versionen sind bereits bei Normalbedingungen in der Keimung reduziert. Für das Experiment wurden je circa 3x 50 Samen pro Messpunkt auf entsprechende MS-Platten ausgebracht und die Keimungsrate nach 3 Tagen ermittelt. In den Diagrammen wird zusätzlich die Keimungsrate angegeben.

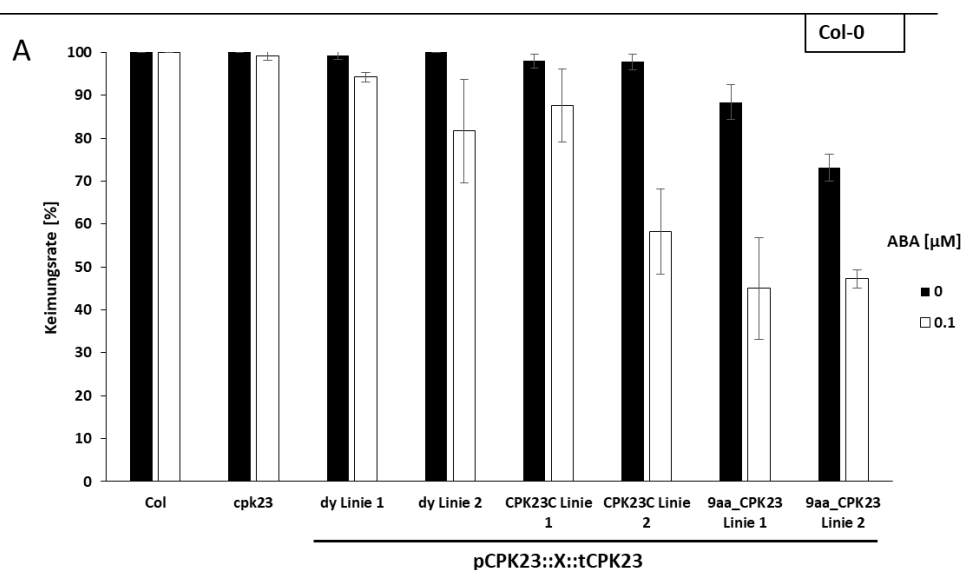


Abb. 5. 4: Auch bei CPK23-Expression unter dem endogenen Promotor ist die Keimungsrate beeinflusst.

Bei Expression unter dem endogenen CPK23-Promotor zeigen transgene Linien eine Reduktion ihrer Keimungsrate nach ABA-Behandlung. Modifizierte CPK23-Linien sind hier bereits unter Normalbedingungen beeinträchtigt. Je 50 Samen der verwendeten transgenen Linien wurden auf ½-MS-Platten mit (0,1 µM) und ohne ABA ausgebracht. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten in Dauerlicht umgesetzt und nach 3 Tagen die Keimungsrate ermittelt. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

5.5.2 ABF-Knockout Linien

ABF-Knockout Linien (dABF1 und dABF2/3/4) zeigten unter abiotischem Stress eine im Vergleich zum Col-0 WT erhöhte Keimungsrate. Für das Experiment wurden die entsprechenden Samen (3x 50 Stück) auf ½-MS-Platten mit verschiedenen Stressbedingungen ausplattiert und die Keimungsrate im Anschluss an eine zwei-tägige Stratifizierung über eine Zeitdauer von 5 Tagen ermittelt. Zusätzlich wurde die Standardabweichung in die Diagramme eingetragen.

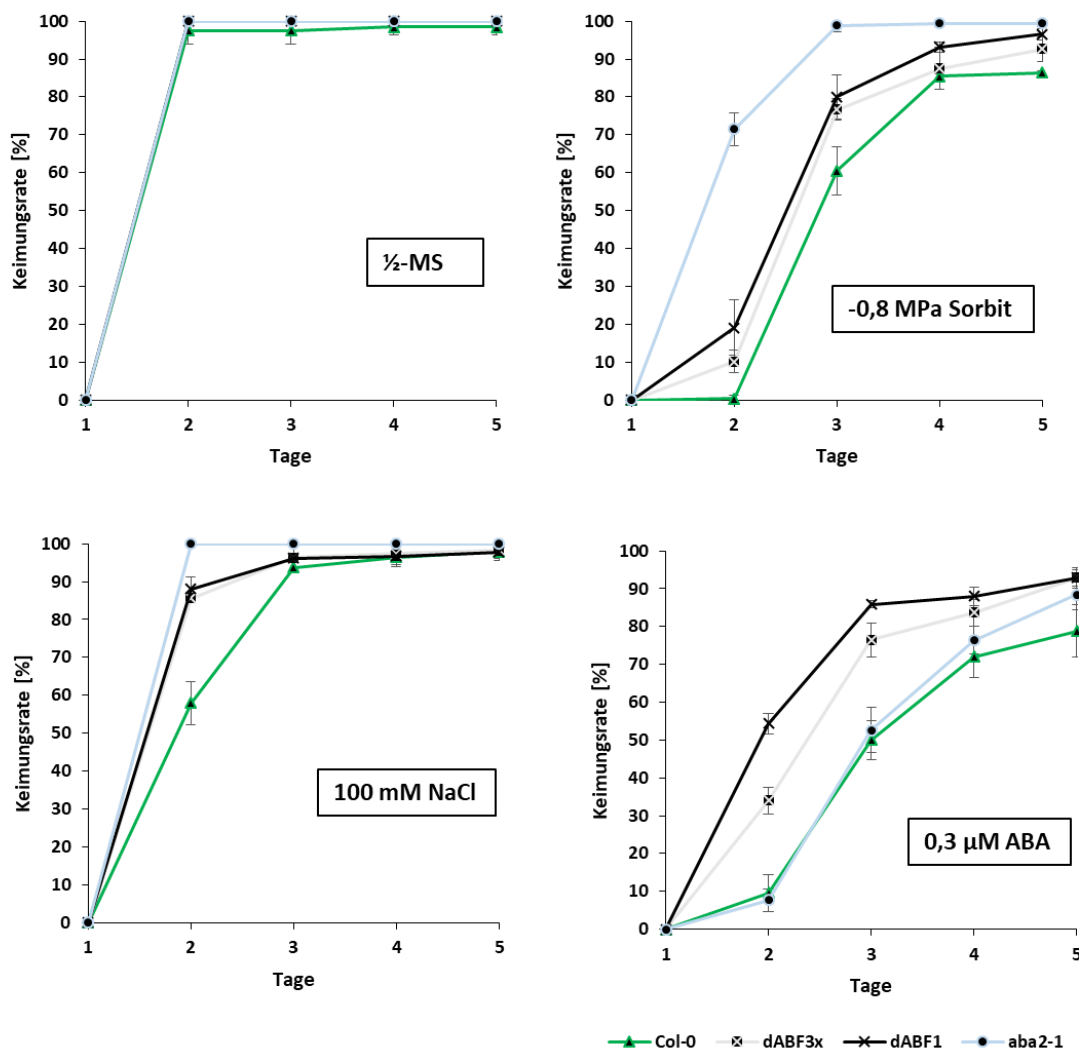


Abb. 5: ABF-Knockout Linien keimen unter abiotischen Stress schneller als der WT.

Samen von dABF1- und dABF2/3/4-Pflanzen keimten unter verschiedenen abiotischen Stressbedingungen (-0,8 MPa Sorbit, 100 mM NaCl und 0,3 µM ABA) schneller als der Col-0 WT aus. Für das Experiment wurden je 50 Samen transgener Linien auf ½-MS-Platten mit den angegebenen Konzentrationen an NaCl, ABA und Sorbit gegeben. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten in Dauerlicht umgesetzt und über einen Zeitraum von 5 Tagen die Keimungsrate ermittelt. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3).

5.5.3 dABF1-Linien transformiert mit pCPK23::X::tCPK23

Wurden dABF1-Pflanzen mit CPK23 unter Kontrolle des endogenen CPK23-Promotors transformiert, keimten die resultierenden Linien bei Anwesenheit von 0,3 μ M ABA deutlich langsamer als die Ausgangslinien. Jedoch war die gleiche Beobachtung in Kontroll-Linien mit Toter-Kinase (TK-Linien) und LV (dy-Linien) -Element ersichtlich. Für das Experiment wurden die entsprechenden Samen auf $\frac{1}{2}$ -MS-Platten ausgebracht (je 3x 50 Samen) und über 5 Tage die Keimungsrate ermittelt. Das Vorhandensein der korrekten Transformanden wurde mittels Genotypisierung nachgewiesen.

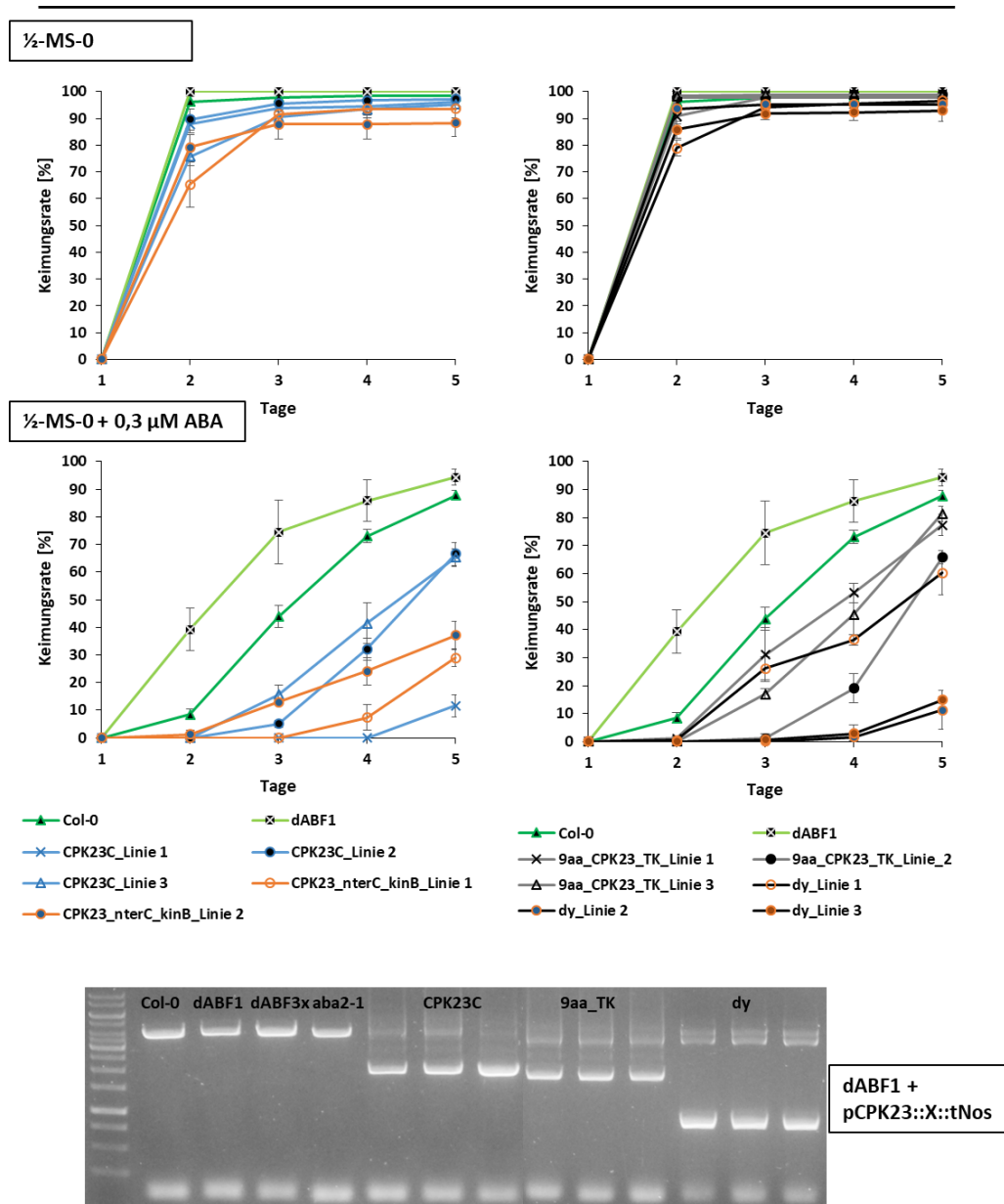


Abb. 5. 6: Mit CPK23 und entsprechenden Kontrollen transformierte dABF1-Linien zeigen vergleichbare Effekte.

Anhang

Für das Experiment wurden je 50 Samen transgener Linien auf ½-MS und ½-MS-Platten mit 0,3 µM ABA ausgebracht. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten in Dauerlicht umgesetzt und über einen Zeitraum von 5 Tagen die Keimungsrate ermittelt. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). Das Vorhandensein der korrekten Konstrukte in den Pflanzenlinien wurde über Genotypisierung ermittelt.

5.5.4 dABF2/3/4-Linien transformiert mit pCPK23::X::tCPK23

Samen von mit CPK23 unter Kontrolle des endogenen Promotors transformierte dABF2/3/4-Linien keimten in Anwesenheit von 0,3 µM ABA deutlich langsamer als die entsprechende Ausgangslinie. Dieser Effekt war aber ebenfalls bei Kontroll-Linien (TK und dy) zu beobachten. Für das Experiment wurden je 3x 50 Samen auf den entsprechenden ½-MS-Platten ausplattiert und die Keimungsrate über 5 Tage ermittelt. Das Vorhandensein der korrekten Gene in den Linien wurde mittels Genotypisierung bestätigt.

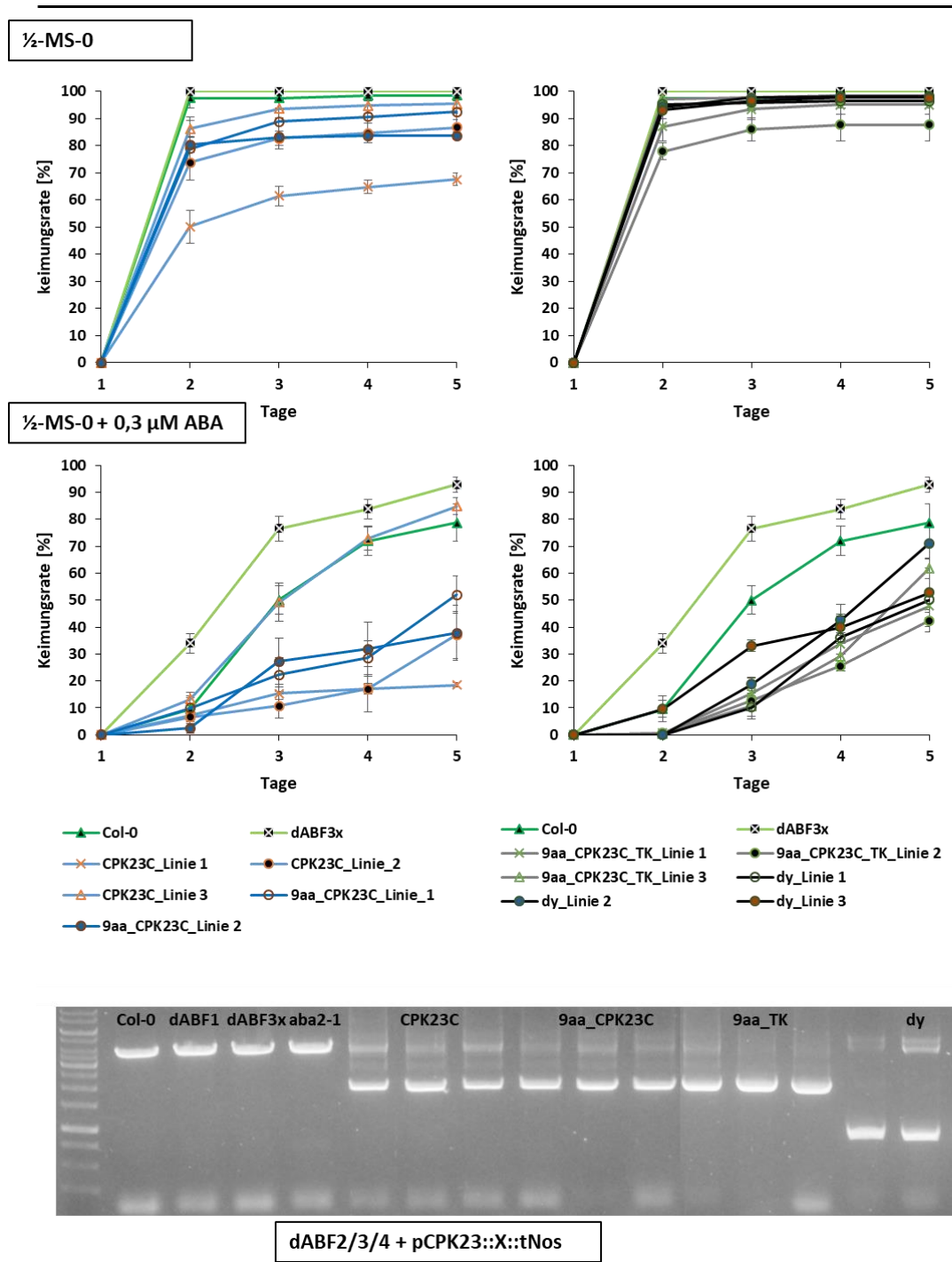


Abb. 5. 7: Mit CPK23 und entsprechenden Kontrollen transformierte dABF2/3/4-Linien zeigen vergleichbare Effekte.

Für das Experiment wurden je 50 Samen transgener Linien auf ½-MS und ½-MS-Platten mit 0,3 µM ABA ausgebracht. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten in Dauerlicht umgesetzt und über einen Zeitraum von 5 Tagen die Keimungsrate ermittelt. Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). Das Vorhandensein der korrekten Konstrukte in den Pflanzenlinien wurde über Genotypisierung ermittelt.

5.5.5 CPK23-*Knockout* Linien

Um zu überprüfen, ob *Knockout*-Linien von CPK23 einen Keimungseffekt zeigen, wurde Saatgut einer *cpk23* und einer dCPK5/6/11/23 Linie auf ½-MS-Platten mit steigender Konzentration an ABA ausgebracht. Im Vergleich zum Col-0 WT konnte dabei keine ABA-tolerantere Keimung beobachtet werden.

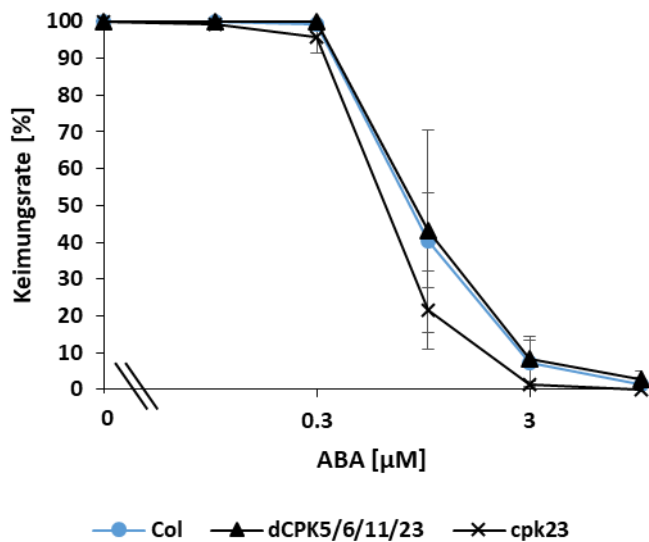


Abb. 5. 8: CPK23-KO Linien zeigen keine gesteigerte Keimungsrate unter Stressbedingung.

Für das Experiment wurden je 50 Samen transgener Linien auf ½-MS Platten mit steigender ABA-Konzentration ausgebracht. Nach 2 Tagen Stratifizierung wurden die Platten in Dauerlicht umgesetzt und nach 5 Tagen die Keimungsrate ermittelt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3).

5.6 Starke Expression von CPK23 in Hefe hemmt das Zellwachstum

Wurde CPK23 in Hefe exprimiert, hing die Bildung von Hefe-Kolonien vom verwendeten Promotor ab. Umso stärker der verwendete Promotor (pSAC6 < pRPL183 < pHHF2 < pTDH), umso weniger Kolonien wurden gebildet. Die entsprechende Kontrolle mit Toter Kinase zeigte diese Einschränkung nicht. Für das Experiment wurden Hefezellen (6685) mit den entsprechenden Konstrukten transformiert und auf SD-Platten ausplattiert. Das Wachstum der Hefekolonien wurde nach 3 Tagen analysiert.

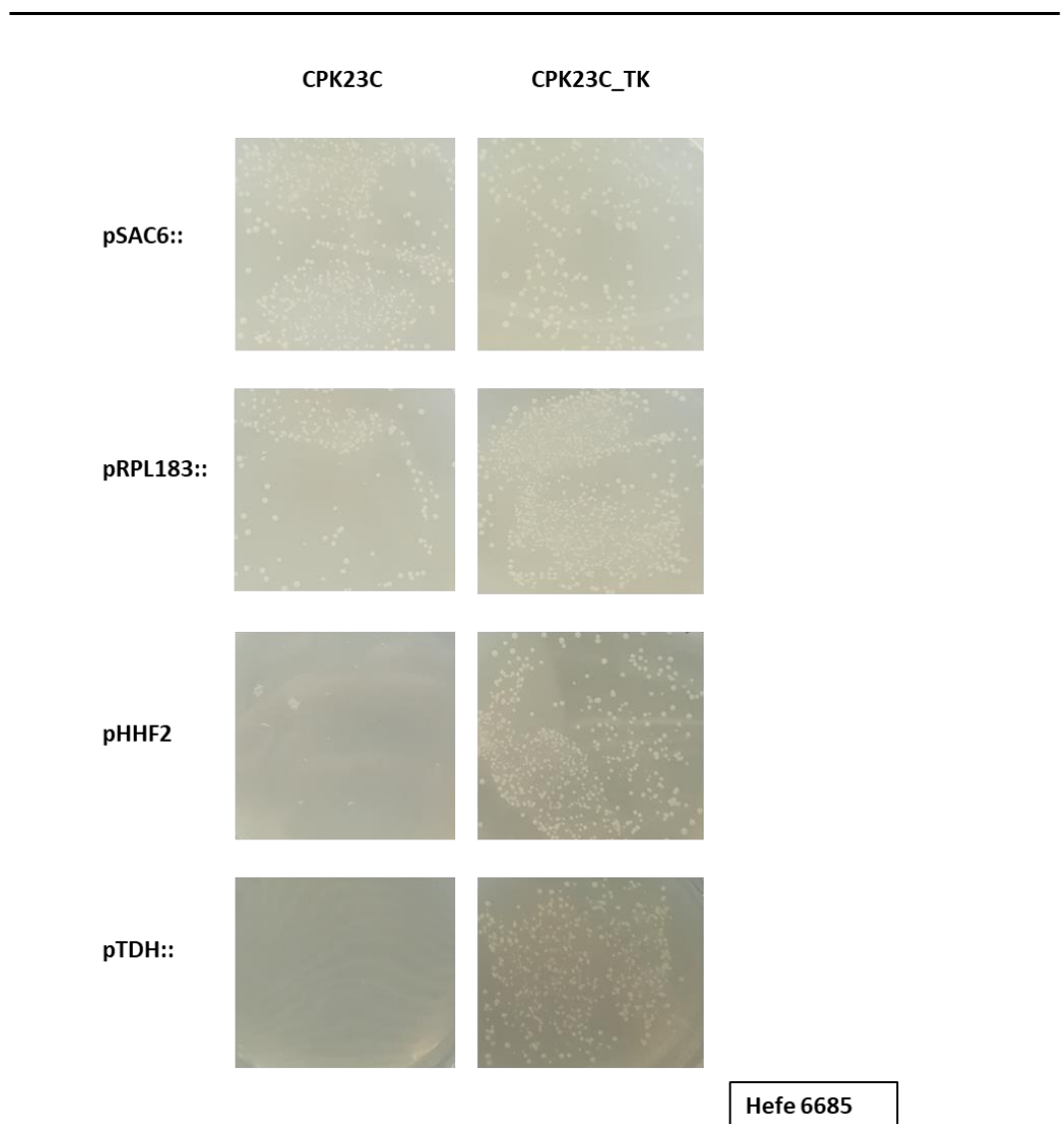


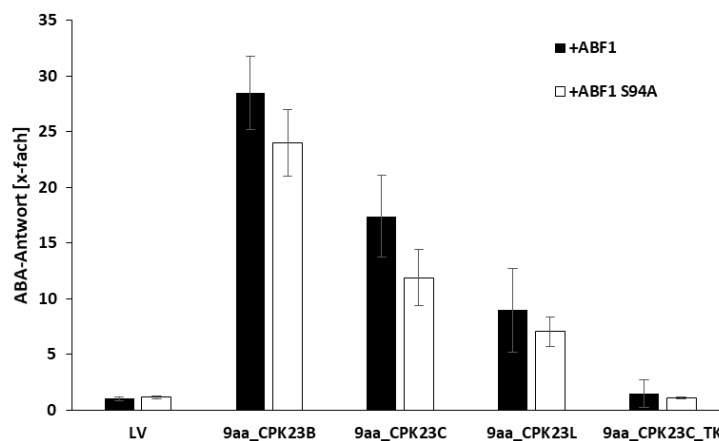
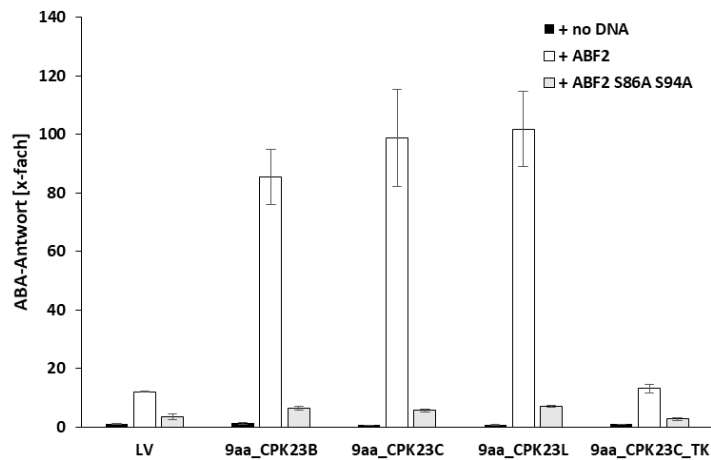
Abb. 5. 9: Expression von CPK23 hemmt das Hefewachstum abhängig von der Expressions-Stärke.

Wurde CPK23 in Hefen exprimiert, sank die Koloniebildung in Abhängigkeit des verwendeten Promotors. Für eine Kontroll-Probe (TK) war dieser Effekt nicht beobachtbar. Für das Experiment wurden die Effektoren unter dem angegebenen Promotor in Hefezellen (6685) transformiert und auf SD-Selektions-Platten ausplattiert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Koloniewachstum dokumentiert.

5.7 ABF-Mutanten in transgenen Assays

In Col-0 Protoplasten konnte CPK23 über eine ABF2_S86A_S94A Mutante nicht mehr den p8ABRE_LUC Reporter induzieren, während dies über ABF2 möglich war. Für das Experiment wurden Protoplasten mit Effektoren und den verschiedenen ABFs in 3 verschiedenen Ansätzen transfiziert und die Induktion des Reporters nach 18 h gemessen. Die Reporter-Aktivität wurde auf die ermittelten GUS-Werte transformiert und Mittelwerte, sowie Standardabweichung in das Diagramm eingetragen. In Hefe konnte CPK23 jedoch nach wie vor über eine ABF1_S94A Mutante den p4xABRE-Reporter induzieren. Für das Experiment in Hefe wurden 6685-Hefezellen mit den entsprechenden ABFs (pADH (-402)) und den Effektoren (pGAL1) transformiert. Es wurden jeweils 3 Kolonien gepickt, in SD-Medium angezogen und auf deep-well Platten verteilt (pro Kolonie zwei technische Replikate) und die Expression durch Zugabe von Galactose gestartet. Die bei der anschließenden Messung ermittelten Luciferase-Werte wurde auf die OD₆₀₀ normalisiert.

Col-0, p8xABRE_LUC



Hefe 6685, p4xABRE_LUC

Abb. 5. 10: CPK23 kann über ABF1_S94A den ABA-Signalweg induzieren, jedoch nicht über ABF2_S86A_S94A.

Für das Experiment wurden die Effektoren zusammen mit ABF2 und entsprechenden Mutationen in Col-0 Protoplasten kotransfiziert. Nach 16 h Inkubation wurden die ermittelten Luciferase-Werte auf die korrespondierenden GUS-Werte normalisiert. Der LV ohne ABF diente als Referenz. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). Zusätzlich wurde CPK23 mit ABF1 und ABF1_S94A in Hefezellen kotransformiert. Die Expression der Effektoren wurde über Galactose-Zugabe gestartet. Nach 16 h wurde die durch den p4xABRE:LUC-Reporter gebildete Luciferase ermittelt und auf die OD₆₀₀ der Zellen normalisiert. Der LV mit ABF1 diente als Referenz. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=6).

5.8 RAF-like MAPKKs sind keine Aktivatoren von CPK23

Die Co-Expression verschiedener RAF-Proteine (RAF1/3/4/18/24) mit CPK23 führte in Protoplasten zu keiner Aktivierung von CPK23. Der ABA-Signalweg wurde in Anwesenheit der verschiedenen RAFs stets

Anhang

weiterhin nur auf Niveau der TK-Kontrolle induziert. Für das Experiment wurden *aba2-1* Protoplasten mit den verschiedenen Effektoren transfiziert (pro Messpunkt 3 Transfektionen) und der entstandene Luciferase-Wert auf den GUS-Wert normalisiert. Das Diagramm enthält die entsprechenden Mittelwerte und die Standardabweichung. Auch in Hefe hatte die Co-Expression verschiedener RAFs (1/3/4/20/35/16/6/5/2/42) keinen Einfluss auf die pCYC1::CPK23-abhängige Induktion des ABA-Signalweges. Für das Experiment wurden Hefezellen mit den entsprechenden Effektoren transformiert und je 3 Kolonien für den Assay verwendet. Die durch den p8xABRE-Reporter gebildete Luciferase wurde auf die OD₆₀₀ der Hefen normalisiert und Mittelwerte und Standardabweichung in ein Diagramm eingetragen.

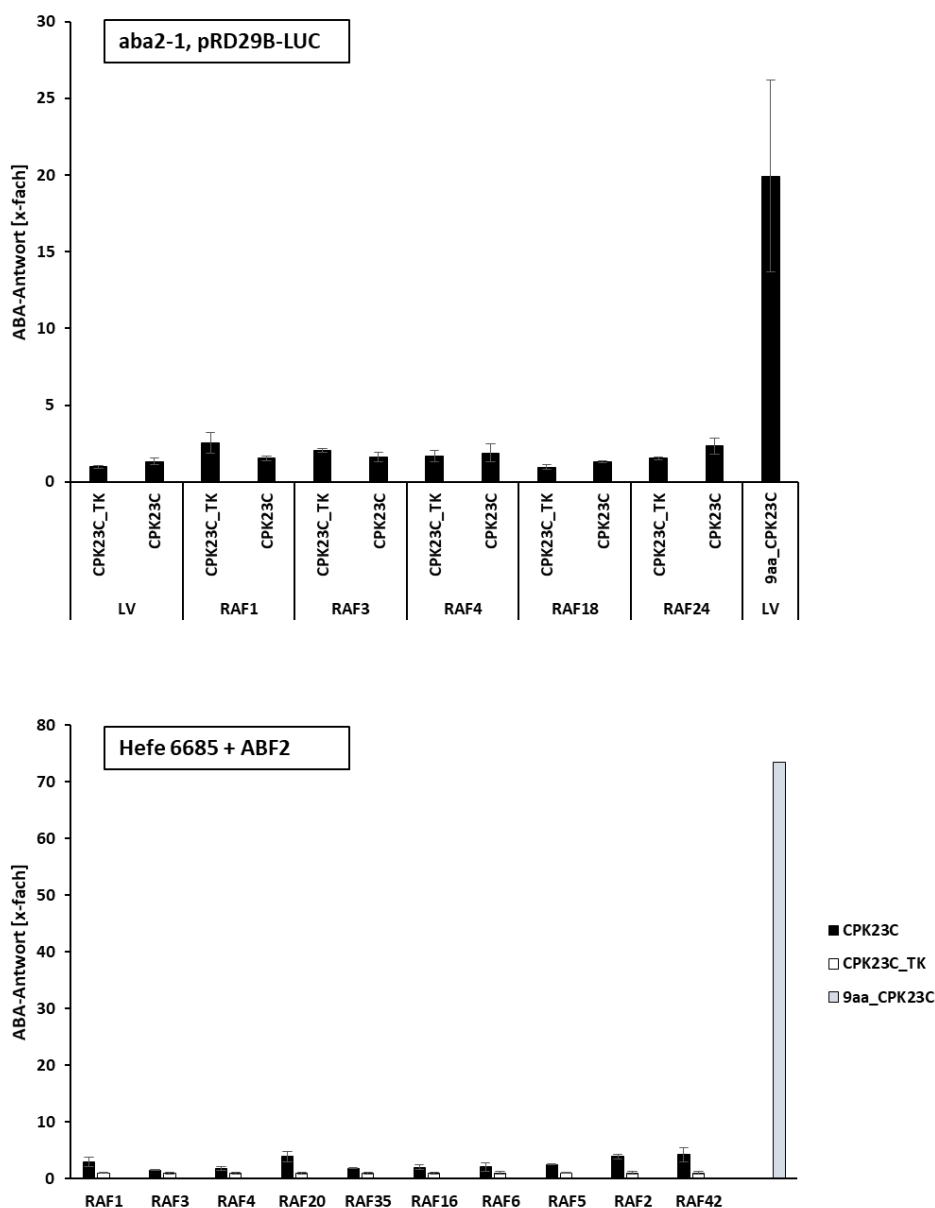


Abb. 5. 11: CPK23 kann nicht durch RAF-like MAPKKs aktiviert werden.

RAF-like MAPKKs der Untergruppe B wurden mit CPK23C_TK und CPK23C in *aba2-1* Protoplasten transfiziert. Nach 16 h Inkubation wurde die durch den pRD29B:LUC-Reporter gebildete Luciferase gemessen und auf den entsprechenden GUS-Wert normalisiert. 9aa_CPK23C diente als Positivkontrolle. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3). Zusätzlich wurden RAF-like MAPKKs der Untergruppe B mit verschiedenen CPK23 Varianten unter dem CYC1-Promotor und ABF2 unter dem ADH3-Promotor in Hefezellen (6685) transformiert. Nach 16 h Inkubation wurde die durch den p4xABRE:LUC-Reporter gebildete Luciferase ermittelt und auf die OD₆₀₀ der Hefezellen normalisiert. Der CPK23C_TK Wert für die jeweiligen RAF-like MAPKKs diente als Referenz. 9aa_CPK23C diente als Positiv-Kontrolle. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen (n=6).

5.9 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Die Bezeichnungen beziehen sich auf die private Primer-Liste des Autors.

Tabelle 7: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

CPK23B und CPK23L_swaps	GG_C-D_CPK23L_kin_F1	TAGAAGACAATTTACAGCTTGGGGAAAGAATTAG
CPK23B und CPK23L_Position 290	GG_C-D_CPK23B_kin_F1	TAGAAGACAATTTACAGCTTGGGGAAAGAATTAG
	GG_C-D_CPK23L_n-ter_R	TAGAAGACAATAAAATTTCTGATATCTTGAAG
	GG_C-D_CPK23B_n-ter_R	TAGAAGACAATAAAATTTCTTATGTCCTGAAG
	GG_C-D_CPK23L_S290R_R1	TAGAAGACAAGGCGTTCAAATCAATTTGCGATT
	GG_C-D_CPK23L_S290_F2	TAGAAGACAACGCCAACCATGGCCTTCTATATC
	GG_C-D_cpk23B_R290S_R1	TAGAAGACAAGGCTTTCAAATCAATTTGCGATT
	GG_C-D_cpk23B_R290S_F2	TAGAAGACAAAGCCAACCATGGCCTTCTATATC
CPK23C_swaps	CPK23C_n-ter_R	TAGAAGACAATAAAATTTCTGATGTCCTCG
	CPK23C_kin_F1	TAGAAGACAATTTACAGCTTGGGGAGAGAATTAG
	CPK23C_n-ter_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGTTT CAGCAG
CPK23C_R290S	CPK23C_S290R_F2	TAGAAGACAATCTGAGCCATGGCCTTCTATATC
	CPK23C_S290R_R1	TAGAAGACAACAGATACAAAATCAATTTGCGATT
CPK23C_S5D	CPK23 S5D fw	CCATGGGTTGCTTCGACAGTAAACACCGGAAAAC

	CPK23 S5D rev	GTTTTCCGGTGTACTGTGCTGAAGCAACCCATGG
CPK23C_G2A_C3A	CPK23 G2C3A fw	GGGTCTCACACCATGGCTGCCTTCAGCAGTAAACA C
	CPK23 G2C3A rev	GTGTTTACTGCTGAAGGCAGCCATGGTGTGAGACC C
d68_CPK23C	d68 CPK23C fw	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGTACAGCTT GGGGAGAGAATTAG
d50_CPK23C	d50 CPK23C fw	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGTTCGAG ATCCAGAGACGATTTTAG
d38_CPK23C	d38 CPK23C fw	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAAACCTC AAATCCCATCACCATC
d19_CPK23C	d19 CPK23C fw	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGTCAATTCC GATAATTCCAGTTC
CPK23C_D53Y	CPK23C_D53Y_fw	TAGAAGACAATATCCAGAGACGATTTTAGGT
	CPK23C_D53Y_rev	TAGAAGACAAGATATCGAACTGAGATGGGTA
Dreb2a	DREB2a_fw	ATGGCAGTTTATGATCAGAGTG
	DREB2a_rev	TTAGTTCTCCAGATCCAAGTAAC
	gg_DREB2a_f_1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCAGTTT ATGATCAGAGTG
	gg_DREB2a_r_1	TAGAAGACAAGTTTCGTTATACTCTTTCCA
	gg_DREB2a_f_2	TAGAAGACAAAACCGTAGAAGAAGTTTCTAC
	gg_DREB2a_r_2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGTCTCCAGAT CCAAGTAAC
DREB1A	DREB1A_F	ATGAACTCATGTTCTGCTTTTTTC
	DREB1A_R	TTAATAGCTCCATAAGGACAC
	gg_DREB1A_F_1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAACTCATT TTCTGCTTTTTTC
	gg_DREB1A_R_1	TAGAAGACAACGAGGACTCGTAATCGGAGCC
	gg_DREB1A_F_2	TAGAAGACAACCTCGTTTCTCAGGCGGTGATT
	gg_DREB1A_R_2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATAACTCCATA ACGATAC
SLAC1	gg_slac1_F_1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAGAGGA AACAGTCAAATG
	gg_slac1_R_1	TAGAAGACAAGTTTACCATCTTCAGTTCT
	gg_slac1_F_2	TAGAAGACAAAACCAAAGATGATTCTATAAATG
	gg_slac1_R_2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGTGATGCGAC TCTTCCTCTGC
DREB1B	DREB1B gg F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAACTCATT TTCAGCTTTTTTC
	DREB1B gg R1	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGTA ACTCCAAA GCGACACGTC
DREB1C	DREB1C gg F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAACTCATT TTCTGCCTTT
	DREB1C gg F2	TAGAAGACAAAACCTTGGTGGAGGCTATTTA
	DREB1C gg R1	TAGAAGACAAGTTTCTCCATGTCAAGACC
	DREB1C gg R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATAGCTCCATA AGGACACGTC
ABI5	gg_ABI5_F	ATGGTAACTAGAGAAACGAAG
	gg_ABI5_R	TTAGAGTGGACAACCTCGGGTT

Anhang

	gg_ABI5_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGTAACTA GAGAAACGAAG
	gg_ABI5_F2	TAGAAGACAAGCAATCCTCTATCTACTCATTG
	gg_ABI5_F3	TAGAAGACAAACCTCGACAAGGCTCTTTGAC
	gg_ABI5_F4	TAGAAGACAAAACCTGTTGATGAGGTTTGGTC
	gg_ABI5_F5	TAGAAGACAATCTTCAGATGGATTAGGACA
	gg_ABI5_F6	TAGAAGACAAGCAGAGGAGGATGATCAAGAAC
	gg_ABI5_R1	TAGAAGACAATTGCCTTCCCAAAGAAGTAAAC
	gg_ABI5_R2	TAGAAGACAAAGGTAGACTAGACTCGTTCGC
	gg_ABI5_R3	TAGAAGACAAAGTTTTCTACAAAGCGGAGC
	gg_ABI5_R4	TAGAAGACAAAGATACCGGGCTTAACGGTCC
	gg_ABI5_R5	TAGAAGACAACCTGCCTTCTCTCCACTACTTTC
	gg_ABI5_R6	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAGTGGACAA CTCGGGTTCCTC
ABF1	gg_ABF1_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTACTC ACATTGATATC
	gg_ABF1_R_final	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCGGACCGGTA AGGGTTCTTCT
	gg_ABF1_S94D_F 2	TAGAAGACAAGATCAGAAAACGTTCGATGAA
	gg_ABF1_S94D_R 1	TAGAAGACAAGATCAAGCGTTCTAGGCAAGG
	gg_ABF1_S94A_F 2	TAGAAGACAAGCTCAGAAAACGTTCGATGAA
	gg_ABF1_S94A_R 1	TAGAAGACAAGAGCAAGCGTTCTAGGCAAGG
CPK5	gg_CPK5_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGCAATT CTTGCCGTGGA
	gg_CPK5_F2	TAGAAGACAAATCTAATTCCGACCATTCCACC
	gg_VPK5_R1	TAGAAGACAAAGATGACAAGTTGGTGGTAGA
	gg_CPK5_R_final- vk	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAATTGCTTGA GACGAGAAAAG
	gg_CPK5_FL_F3	TAGAAGACAAGGACATCATCAAAGAAGTTGA
	gg_CPK5_FL_R2	TAGAAGACAAGTCCTCAAGGAAAACATCAGC
	gg_CPK5_FL_R_fin al	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCGCGTCTCTCA TGCTAATGTT
CPK6	gg_CPK6_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGCAATT CATGTCGTGGT
	gg_CPK6_R1	TAGAAGACAAGAGTCCAAAATCAATGGCCTT
	gg_CPK6_F2	TAGAAGACAAACTCTCTGTTTTCTCAAACC
	gg_CPK6_R_vk_fi nal	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAAACTGTTTTA GACGAGACAA
	gg_CPK6_FL_F3	TAGAAGACAAGGACATAATCAAAGAAGTAGA
	gg_CPK6_FL_R2	TAGAAGACAAGTCCTCAAGAAAACATCGGT
	gg_CPK6_FL_R_fin al	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCACATCTCTCA TGCTGATGTT
CPK3	gg_CPK3_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGCCACA GACACAGCAAG
	gg_CPK3_R1-1	TAGAAGACAAAGATAGACCAAAGTCTGTAGC

	gg_CPK3_F2-1	TAGAAGACAAATTCTTCAAGCCAGGTGATAA
	gg_CPK3_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAATTGTTCA TCCTGGATAA
	gg_CPK3_F2-2	TAGAAGACAATCTGTATTCTTCAAGCCAGGTGATA AGT
	gg_CPK3_R1-2	TAGAAGACAACAGATAGACCAAAGTCTGTAGCTT
CPK15	gg_CPK15_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGCTT TAGCAGCAAA
	gg_CPK15_R1	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAATTGCTTCA TCCGAGATAA
CPK32	gg_CPK32_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTAATT GTTGCGGAACA
	gg_CPK32_R1	TAGAAGACAAAAGTCCGTAATCAATCGAGAA
	gg_zw_CPK32_F1 undR2_F	TAGAAGACAAACTTCACCACGGTGGTGGAGATGG AGGTGGTAGATTGTCTTCTA
	gg_zw_CPK32_F1 undR2_R	ATCTTCTGTTTGAAGTGGTGCCACCACCTCTACCTC CACCATCTAACAGAAGAT
	gg_CPK32_F2	TAGAAGACAATAGACCTCTTAAGCTTATCGT
	gg_CPK32_R2	TAGAAGACAAAGATAGACCAAATCAATCGC
	gg_CPK32_F3	TAGAAGACAAATCTGTTTTCTTTAAACCAGG
	gg_CPK32_R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAAGTCTTCA ACCTTGCCCT
	gg_zw_CPK32_F1 undR2_R_neu	TAGAAGACAATCTACCACCTCCATCTCCACCACCGT GGTGAAGTTTGTCTTCTA
CPK28	gg_CPK28_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTGTCT GTTTCTCCGCC
	gg_CPK28_R1	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAAATTGTCTTA AGTTGTTTCAAG
CPK10	gg_CPK10_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTA ACTGTAACGCCTGT
	gg_CPK10_R1	TAGAAGACAAGTCTCGATATCGACAGCTGT
	gg_CPK10_F2	TAGAAGACAAGGACGTTGTCGTGAGGTAGC
	gg_CPK10_R2	TAGAAGACAAAGGATCTCTCTTAAAATCAAG
	gg_CPK10_F3	TAGAAGACAATCCTTGGCCTCAGATATCAGA
	gg_CPK10_R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAAGTCTTCA ACCTAGATCT
CPK31	gg_CPK31_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGCT ACAGCAGTAAG
	gg_CPK31_R1	TAGAAGACAAAGTTTTCTCAACGCATTTTCG
	gg_CPK31_F2	TAGAAGACAAAACCTTCAGGTAAGACTTACGC
	gg_CPK31_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAAATTGCTTCA ATCGAGATAA
CPK1	gg_CPK1_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTAATA CTTGTGTTGGA
	gg_CPK1_R1	TAGAAGACAAGTTTTGACGTCAGTCCCTGG
	gg_CPK1_F2	TAGAAGACAAAACCAAGGACAGAGAGATTTCG
	gg_CPK1_R2-1	TAGAAGACAAGTTTTCTGCTTAGTCTCTGG
	gg_CPK1_R2-2	TAGAAGACAATGACTTGTTTTCTGCTTAGTCTCTG G
	gg_CPK1_F3-1	TAGAAGACAAAACCAAGCCGGAGTCAAACC

	gg_CPK1_F3-2	TAGAAGACAAGTCAGAAACCAAGCCGGAGTCAAA ACC
	gg_CPK1_R3	TAGAAGACAAAGTTTTCTCTGCAACTGA
	gg_CPK1_F4	TAGAAGACAAAAGTAAACTTCAAGGAATT
	gg_CPK1_R4	TAGAAGACAACCTTTTCGACACATAAAAAAGT
	gg_CPK1_F5	TAGAAGACAAAAGACTACGGGGAAGGAGTT
	gg_CPK1_R5	TAGAAGACAAGAGATCTCGATGCATAACACCA
	gg_CPK1_F6	TAGAAGACAATCTCAAGCCCGAGAATTTTCT
	gg_CPK1_R6	TAGAAGACAACGTTTTCAAGAGGGAATCTTC
	gg_CPK1_F7	TAGAAGACAAAACGATTGATTTTGGACTCTC
	gg_CPK1_R7	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAACTGCTTCA TACGGCTCAG
CPK23C del 35-42(39)	gg_CPK23C_d35- 42_R1	TAGAAGACAAGGGGACTTGATCAACGATATG
	gg_CPK23C_d35- 42_F1	TAGAAGACAACCCCTCACCATCGATACCCATCTCA
	gg_CPK23C_d35- 39_F2	TAGAAGACAACCCCAAATCCCATCACCATCGATA
CPK23B_in_d35-42C	gg_CPK23B_in35- 42_An1	CCCAGATCATCGTAAACCTCAAATCCCA
	gg_CPK23B_in35- 42_An2	GAGTTGGGATTTGAGGTTTACGATGATC
	gg_CPK23B_in_d3 5-42C_R1	TAGAAGACAATGGGACTTGATCAACGATATG
	gg_CPK23B_in_d3 5-42C_F2	TAGAAGACAACTCCATCGACACCCATCTCA
A_B pCYC1	gg_A-B_pCYC1_f	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGCGGATTTGGCGAG CGTTGGTTGGT
	gg_A-B_pCYC1_r	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACAGAGATTAGTGTG TGTATTTGTGT
D-E_GS-LINK_FLUC	gg_FLUC_C_R1	TAGAAGACAAGTCCTCGTCCCAGTAAGCTAT
	gg_FLUC_C_F2	TAGAAGACAAGGACGAACACTTCTTCATAGT
	gg_FLUC_C_R2	TAGAAGACAAAAGCCTGCCACGCCCGCGTC
	gg_FLUC_C_F3	TAGAAGACAACCTTCCCACGATGACGCCGG
	FLUC_C_R_fin	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGATTTTACAATTTGG ACTTTCCGCCCTT
	LNK_FLUC_A1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAAGGGAGGTGGGT CTGGTGGGGGTGGGTCTGGTGGG
	LNK_FLUC_A2	CCATCCCACCAGACCCACCCACCCAGACCCACCTC CCTTTGAGACCCGTAAAGTCTTCAT
	LNK_FLUC_C_F1	TAGAAGACAAATGGGACCTATGATTATGTCC
	gg_FLUC_N_R1	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGATTTTATCCATCCT TGCAATCAAGGC
	LNK_FLUC_N_F1	TAGAAGACAAATGGAGGACGCCAAAACATAAAG AAA
D-E GAL4AD	gg_D- E_GAL4AD_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAAGGGAGATAAAGC GGAATTAATTCCC
	gg_D- E_GAL4AD_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGATTTTAAGCGTAA TCTGGTACGTCGTA

D-E GAL4BD	gg_D- E_GAL4BD_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAAGGGAAAGCTACT GTCATCTATCGAAC
	gg_D- E_GAL4BD_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGATTTTACAGGTCT CCTCTGAGATCAG
CPK23B_T38I	CPK23B_T38I_F	TCCCAACTCCATCGATACCCATCTCAGTTCGA
	CPK23B_T38I_R	TCGAACTGAGATGGGTATCGATGGAGTTGGGA
CPK23B_Y44D	CPK23B_Y44D_F	CCCATCTCAGTTCGAGATCCAGAGACAATTTT
	CPK23B_Y44D_R	AAAATTGTCTCTGGATCTCGAACTGAGATGGG
CPK23C_I47T	CPK23C_I47T_F	ATCCCATCACCATCGACACCCATCTCAGTTCGA
	CPK23C_I47T_R	TCGAACTGAGATGGGTGTCTGATGGTATGGGAT
CPK23C_D53Y	CPK23C_D53Y_F	ACCCATCTCAGTTCGATATCCAGAGACGATTTT
	CPK23C_D53Y_R	AAAATCGTCTCTGTATCTCGAACTGAGATGGGT
CPK23B/C_swaps	CPK23C_I47T_F1	TAGAAGACAACACCCATCTCAGTTCGAGATC
CPK23B/C_swaps + SNPs	CPK23C_I47T_R1	TAGAAGACAAGGTGTCTGATGGTATGGGATT
	CPK23C_D53Y_F1	TAGAAGACAATATCCAGAGACGATTTTAGGT
	CPK23C_D53Y_R1	TAGAAGACAAGATATCGAACTGAGATGGGTA
	CPK23C_D53Y_R1 _x	TAGAAGACAAGATATCGAACTGAGATGGGTG
	CPK23C_del_I47T _R1_x2	TAGAAGACAAGGTGTCTGATGGTATGGGACT
	CPK23B_T38I_F1	TAGAAGACAATACCCATCTCAGTTCGATATC
	CPK23B_T38I_R1	TAGAAGACAAGGTATCGATGGAGTTGGGACT
	CPK23B_Y44D_F1	TAGAAGACAAGATCCAGAGACAATTTTAGGT
	CPK23B_Y44D_R1	TAGAAGACAAGATCTCGAACTGAGATGGGTG
	CPK23B_Y44D_R_ x1	TAGAAGACAAGATCTCGAACTGAGATGGGTA
	CPK23B_T38I_R_x 2	TAGAAGACAAGGTATCGATGGAGTTGGGATT
	CPK23B_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGCTT CAGCAGTAAACACC
	CPK23_vk_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAATTGCTTCA TACGTGATAA
	CPK23_nterB_R	TAGAAGACAATAAAATTTCTTATGTCCTCGAAG
	CPK23_kinC_F	TAGAAGACAATTTACAGCTTGGGGAGAGAATTAG
	CPK23C_nterF_n	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGTTT CAGCAG
CFPK23C_G2A	mutag_CPK23C_G 2A_F1	GTACGGGTCTCACACCATGGCTTGTTCAGCAGTA AACACCG
	mutag_CPK23C_G 2A_R1	CGGTGTTTACTGCTGAAACAAGCCATGGTGTGAGA CCCGTAC
CPK23C_C3A	mutag_CPK23C_C 3A_F1	CGGGTCTCACACCATGGGTGCTTTCAGCAGTAAAC ACCGGAA
	mutag_CPK23C_C 3A_R1	TTCCGGTGTTTACTGCTGAAAGCACCCATGGTGTG AGACCCG
CPK23B_G2A	mutag_CPK23B_G 2A_F1	GTACGGGTCTCACACCATGGCTTGTTCAGCAGTA AACACCG
	mutag_CPK23B_G 2A_R1	CGGTGTTTACTGCTGAAGCAAGCCATGGTGTGAGA CCCGTAC
CPK23B_C3A	mutag_CPK23B_C 3A_F1	CGGGTCTCACACCATGGGTGCCTTCAGCAGTAAAC ACCGGAA

	mutag_CPK23B_C3A_R1	TTCCGGTGTTTACTGCTGAAGGCACCCATGGTGTGAGACCCG
CPK23B_G2A_C3A (CPK23B_C3A ist template)	mutag_CPK23B_C3A_G3A_F1	GGTACGGGTCTCACACCATGGCTGCCTTCAGCAGTAAACACCG
	mutag_CPK23B_C3A_G3A_R1	CGGTGTTTACTGCTGAAGGCAGCCATGGTGTGAGACCCGTACC
NMT1	gg_NMT1_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCAGATAACAATCACCA
	gg_NMT1_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTAAGAGAACAAGCCCGAG
CPK23B/C/L_C3A	gg_CPK23C_C3A_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTGCTTTCAGCAGTAAA
	gg_CPK23B_C3A_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTGCCTTCAGCAGTAAA
	gg_CPK23L_C3A_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTGCCTTCAGCAGTAAA
CPK23B/C/L_G2A	gg_CPK23C_G2A_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTTGTTTCAGCAGTAAA
	gg_CPK23B_G2A_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTTGCTTCAGCAGTAAA
	gg_CPK23L_G2A_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTTGCTTCAGCAGTAAA
ABAPT1	ABAPT1_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGAGGTGTGACTTCTTCA
	ABAPT1_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTTCGGTAGCTCGACTTCTGTC
ABAPT2	ABAPT2_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGAGGAGTAACTTCATCA
	ABAPT2_F2	TAGAAGACAAAACACTAGTAAACCCGAGAAGTC
	ABAPT2_R1	TAGAAGACAAAGTTTTCTTAGATTTCTCCAG
	ABAPT2_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCCAGACTGAACCTTTTTCT
ABAPT3	ABAPT3_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGAGGTGTGACGTCATCA
	ABAPT3_R1	TAGAAGACAATATATCTTCTGTTTTGCTCC
	ABAPT3_F2	TAGAAGACAATATAATCCTTTATGGCCAATC
	ABAPT3_F3	TAGAAGACAAAACATACTGGTTCGACATCTT
	ABAPT3_R2	TAGAAGACAATGTTTTCTTCACTGGATACAT
	ABAPT3_R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTCAGACCGTACTCTATCCAA
ABAPT4	ABAPT4_F	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGAGGGGTGACGTCATCG
	ABAPT4_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTCGGAGCGA ACTCTATCCAA
ABAPT5	ABAPT5_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGAGCGGTGACGTCATCA
	ABAPT5_F2	TAGAAGACAAAACGAAGAGAGGTAATCAGGT
	ABAPT5_R1	TAGAAGACAACGTTTTTTCAGCTTCAATACTTC
	ABAPT5_F3	TAGAAGACAAACATGGGAAGCAATTATTTGA

	ABAPT5_R2	TAGAAGACAAATGTGACCAATTAACAACATC
	ABAPT5_R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTTAGCTGTTG CTGTAGGCTT
ABAPT6	ABAPT6_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGAATTG CGACGTCGACT
	ABAPT6_F2	TAGAAGACAAACCACGTCTCCGAGCACTTGT
	ABAPT6_R1	TAGAAGACAATGGTAGACGAGAAGCAAGCTC
	ABAPT6_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAACCTCTGCAA CTGCATTCTT
ABAPT7	ABAPT7_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGAGGTG TTACATCATCG
	ABAPT7_F2	TAGAAGACAAACACGGAAAACGGCTCTGGGA
	ABAPT7_R1	TAGAAGACAAGTGTGACCAATCAACTACTTC
	ABAPT7_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTGTGGGAGCT TGCTCTGCTTG
ABAPT8	ABAPT8_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTAATG TGACGTCAAAT
	ABAPT8_F2	TAGAAGACAAATTCGCCGGAGTGTGCGCTGA
	ABAPT8_R1	TAGAAGACAAGAATACCAGCTTCCCGGTCTC
	ABAPT8_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCCGTTTCCCGA ATTTCAAGCA
	ABAPT8_F4	TAGAAGACAAAACCGGGAAGCTGGTATTCGC
	ABAPT8_R3	TAGAAGACAAGTTTTCGTCATCTTCGTTAC
ABAPT9	ABAPT9_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTGCAA AGTTCGCTTTC
	ABAPT9_F2	TAGAAGACAAAACCGGAAAGCTTATGTTTAC
	ABAPT9_R1	TAGAAGACAAGTTTTCTCGTCTTTACCCAC
	ABAPT9_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTCTTTGCTGA ATCTCAAGCA
ABAPT10	ABAPT10_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGGTGCA TGTTCTCTCAC
	ABAPT10_F2	TAGAAGACAACGACCCATCTCTCGACGTCAA
	ABAPT10_R1	TAGAAGACAAGTCGCCGGCGGAGGGAAAAGT
	ABAPT10_F3	TAGAAGACAAACTTCGTGTTCTATGTCATGT
	ABAPT10_R2	TAGAAGACAAAAGTCCAGAGAGAATGCCGCT
	ABAPT10_R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCCCTTCACTCT TCTCCAACGT
ABAPT11	ABAPT11_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGTGACGT ACGTGAGCGCG
	ABAPT11_R1	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTTCTGTAT CTTCTTTCCT
PBS1	PBS1_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGTTT CTCGTGTTTT
	PBS1_F2	TAGAAGACAAGCTTCATCATCCCAACTTAGT
	PBS1_R1	TAGAAGACAAAAGCAGACTGAGCATAAGAAC
	PBS1_F3	TAGAAGACAACAGACAGAGCGAGCAGGGTAC
	PBS1_R2	TAGAAGACAATCTGCGTTTTCTCCCTCAAAT
	PBS1_R3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTACCCGGTAC TGTTGCTCTC

PBS1_GS_CPK23	gg_PBS1_nostop_R_fin	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCCCGGTACTGT TGCTCTCTGA
	SDM_PBS1_C3A_F	GAAGCACCATGGGTGCTTTCTCGTGTGTTTATTGATTCG
	SDM_PBS1_C3A_R	ATCAAAACACGAGAAAGCACCCATGGTGCTTCCAG A
	GS_CPK23d19_F	TAGAAGACAAAGTGGTGCGGAGGTAGCTCAATT CCGATAATTCC
	CPK23vk_R	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAATTGCTTCA TACGTGATAA
gca2_DeCap_Primer	GCA2_DeCap_F	GAGTTTTCCGGTGTGTTACTGCTGAAGCAAC
	GCA2_DeCap_R	CAAAGACCGTAGGACTTGATGAGACTGAGAATT
A-B_pCPK23C	PCPK23C_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGCGGATGTTAGCTC TCATCTCAACCGAC
	pCPK23C_F2	TAGAAGACAAGCCGCTAAACTACAAAAGA
	pCPK23C_F3	TAGAAGACAAACCTCTTCTATGGGCTTCCT
	pCPK23C_F4	TAGAAGACAACCAACATAATTTTTAACCAAC
	pCPK23C_R1	TAGAAGACAACGGCCTTCTGTACAAAAGATT
	pCPK23C_R2	TAGAAGACAAAGGTAGACGTTGAGGTAGAAG
	pCPK23C_R3	TAGAAGACAATTGGAGACAAAAAGAAAATAA
	pCPK23C_R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACAGATAGTAAAGGA GGAGACTTTTCGTAG
E-F_tCPK23C	tCPK23C_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAATCCCAAGACTAC ATAGATCCAACGGA
	tCPK23C_F2	TAGAAGACAAACTTCCTTCGGGAAAAAAAAT
	tCPK23C_R1	TAGAAGACAAAAGTAGACTCGGAAGCTAGAC
	tCPK23C_R2	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACTCACCTGTCAATG CTCTGAAACC
CPK23B	CPK23B_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGGTTGCTT CAGCAGTAAACACC
	CPK23B_F2	TAGAAGACAAGAGGACATAAGGAAATTTACAGCT TGGGG
	CPK23B_F3	TAGAAGACAAGAAAACAGAGATTAGATAATGCA GC
	CPK23B_F4	TAGAAGACAAAGATCCTAAGAGACGAATCACTGCT G
	CPK23B_R1	TAGAAGACAACCTCGAAGGGTTTACCTAAAATCCC TAATG
	CPK23B_R2	TAGAAGACAATTTACATCTTCTCTACCCTGCTCAC
	CPK23B_R3	TAGAAGACAAATCTTCGGTTAGCATCTTCTTAACAA GATC
	CPK23B_R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGTGGAATGGA TACTGTTTCCC
CPK23L	CPK23L_F1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAATGGGTTGCTTCAG CAGTAAAC
	CPK23L_F2	TAGAAGACAATATCAGGAAATTTACAGCTTG
	CPK23L_F3	TAGAAGACAAAACAGAGATTAGATAATGCAG
	CPK23L_F4	TAGAAGACAATCCTAAGAGACGAATCACTGC
	CPK23L_R1	TAGAAGACAAGATATCTTCGAAGGGTTTACC
	CPK23L_R2	TAGAAGACAATGTTTTACATCTTCTCTACCCTG

Anhang

	CPK23L_R3	TAGAAGACAAAGGATCTTCGGTTAGCATCTTC
	CPK23L_R4	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCTGTGGAATGGATACT GTTTCCC

6 Quellen

- ABEL, S. & THEOLOGIS, A. 1994. Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J*, 5, 421-7.
- ABELES, F. B., MORGAN, P. W. & SALTVEIT, M. E. 1992. CHAPTER 1 - Introduction and Historical Perspectives. In: ABELES, F. B., MORGAN, P. W. & SALTVEIT, M. E. (eds.) *Ethylene in Plant Biology (Second Edition)*. New York: Academic Press.
- ACHARYA, B. R., JEON, B. W., ZHANG, W. & ASSMANN, S. M. 2013. Open Stomata 1 (<scp>OST</scp>1) is limiting in abscisic acid responses of Arabidopsis guard cells. *New Phytologist*, 200, 1049-1063.
- ADAMIEC, M., CIESIELSKA, M., ZALAŚ, P. & LUCIŃSKI, R. 2017. Arabidopsis thaliana intramembrane proteases. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39.
- AGARWAL, P., AGARWAL, P. K., NAIR, S., SOPORY, S. K. & REDDY, M. K. 2007. Stress-inducible DREB2A transcription factor from Pennisetum glaucum is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 189-198.
- AHEARN, I. M., TSAI, F. D., COURT, H., ZHOU, M., JENNINGS, B. C., AHMED, M., FEHRENBACHER, N., LINDER, M. E. & PHILIPS, M. R. 2011. FKBP12 binds to acylated H-ras and promotes depalmitoylation. *Mol Cell*, 41, 173-85.
- AKRAM, M., HUSSAIN, M., AKHTAR, S. & RASUL, E. 2002. Impact of NaCl Salinity on Yield Components of some Wheat Accessions/Varieties. *Int J Agric Biol*, 4.
- AKHTAR, M., JAISWAL, A. TAJ, G., JAISWAL, J. P., QURESHI, M. I., SINGH, N. K. 2012. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *Journal of Genetics*, 3, 385-395
- ALBORESI, A., GESTIN, C., LEYDECKER, M. T., BEDU, M., MEYER, C. & TRUONG, H. N. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell Environ*, 28, 500-12.
- ALI-RACHEDI, S., BOUINOT, D., WAGNER, M.-H. L. N., BONNET, M., SOTTA, B., GRAPPIN, P. & JULLIEN, M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of Arabidopsis thaliana. 219.
- ALI, F., QANMBER, G., LI, F. & WANG, Z. 2022. Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *Journal of Advanced Research*, 35, 199-214.
- AMES, J. 1996. Portrait of a myristoyl switch protein. 6, 432-438.
- AN, C. & MOU, Z. 2011. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity^F. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53, 412-428.
- ARGUESO, C. T., HANSEN, M. & KIEBER, J. J. 2007. Regulation of Ethylene Biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 92-105.
- ASAI, S., ICHIKAWA, T., NOMURA, H., KOBAYASHI, M., KAMIYOSHIHARA, Y., MORI, H., KADOTA, Y., ZIPFEL, C., JONES, J. D. G. & YOSHIOKA, H. 2013. The Variable Domain of a Plant Calcium-dependent Protein Kinase (CDPK) Confers Subcellular Localization and Substrate Recognition for NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 14332-14340.
- ASSMANN, S. M. 2003. OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in Arabidopsis guard cells. *Trends in Plant Science*, 8, 151-153.
- BARNABÁS, B., JÄGER, K. & FEHÉR, A. 2007. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment*, 0, 071030190532001.
- BARRERO-SICILIA, C., SILVESTRE, S., HASLAM, R. P. & MICHAELSON, L. V. 2017. Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in Arabidopsis and its extremophile relative Eutrema salsugineum. *Plant Science*, 263, 194-200.
- BASKIN, J. M. & BASKIN, C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1-16.

Quellen

- BASSHAM, D. C. & RAIKHEL, N. V. 2000. Plant Cells Are Not Just Green Yeast. *Plant Physiology*, 122, 999-1002.
- BATISTIC, O. 2012. Genomics and localization of the Arabidopsis DHHC-cysteine-rich domain S-acyltransferase protein family. *Plant physiology*, 160, 1597-1612.
- BATISTIČ, O. 2012. Genomics and Localization of the Arabidopsis DHHC-Cysteine-Rich Domain S-Acyltransferase Protein Family. *Plant Physiology*, 160, 1597-1612.
- BELDA-PALAZON, B., JULIAN, J., COEGO, A., WU, Q., ZHANG, X., BATISTIC, O., ALQURAIISHI, S. A., KUDLA, J., AN, C. & RODRIGUEZ, P. L. 2019. ABA inhibits myristoylation and induces shuttling of the RGLG1 E3 ligase to promote nuclear degradation of PP2CA. *The Plant Journal*, 98, 813-825.
- BENDER, K. W., ZIELINSKI, R. E. & HUBER, S. C. 2018. Revisiting paradigms of Ca²⁺ signaling protein kinase regulation in plants. *Biochem J*, 475, 207-223.
- BETHKE, P., GUBLER, F., JACOBSEN, J. & JONES, R. 2004. Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, 219.
- BETHKE, P. C., LIBOUREL, I. G. L., AOYAMA, N., CHUNG, Y. Y., STILL, D. W. & JONES, R. L. 2007. The Arabidopsis Aleurone Layer Responds to Nitric Oxide, Gibberellin, and Abscisic Acid and Is Sufficient and Necessary for Seed Dormancy. 143, 1173-1188.
- BINDER, A., LAMBERT, J., MORBITZER, R., POPP, C., OTT, T., LAHAYE, T. & PARNISKE, M. 2014. A Modular Plasmid Assembly Kit for Multigene Expression, Gene Silencing and Silencing Rescue in Plants. *PLoS ONE*, 9, e88218.
- BINDER, B. M. 2020. Ethylene signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 22, 7710-7725
- BOATWRIGHT, J. L. & PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. 2013. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. *Molecular Plant Pathology*, 14, 623-634.
- BOUDSOCQ, M., DROILLARD, M.-J., BARBIER-BRYGOO, H. & LAURIÈRE, C. 2007. Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 63, 491-503.
- BOUDSOCQ, M., DROILLARD, M. J., REGAD, L. & LAURIÈRE, C. 2012. Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? *Biochem J*, 447, 291-9.
- BOUZROUD, S., BARBOSA, M., GASPARINI, K., FAHR, M., BENDAOU, N., BOUZAYEN, M., ZSÖGÖN, A., ABDELAZIZ, S. & ZOUINE, M. 2019. Loss of AUXIN RESPONSE FACTOR 4 function alters plant growth, stomatal functions and improves tomato tolerance to salinity and water deficit.
- BRANDT, B., MUNEMASA, S., WANG, C., NGUYEN, D., YONG, T., YANG, P. G., PORETSKY, E., BELKNAP, T. F., WAADT, R., ALEMÁN, F. & SCHROEDER, J. I. 2015. Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis guard cells. *eLife*, 4.
- BRIGHT, J., DESIKAN, R., HANCOCK, J. T., WEIR, I. S. & NEILL, S. J. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 45, 113-122.
- BUSH, D. S. 1995. Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 95-122.
- CAARLS, L., PIETERSE, C. M. J. & VAN WEES, S. C. M. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- CADMAN, C. S. C., TOOROP, P. E., HILHORST, H. W. M. & FINCH-SAVAGE, W. E. 2006. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *The Plant Journal*, 46, 805-822.
- CAMPOS, M. L., KANG, J.-H. & HOWE, G. A. 2014. Jasmonate-Triggered Plant Immunity. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 657-675.
- CASTREC, B., DIAN, C., CICCONE, S., EBERT, C. L., BIENVENUT, W. V., LE CAER, J.-P., STEYAERT, J.-M., GIGLIONE, C. & MEINNEL, T. 2018. Structural and genomic decoding of human and plant myristoylomes reveals a definitive recognition pattern. *Nature Chemical Biology*, 14, 671-679.

Quellen

- CHANG, H.-C., TSAI, M.-C., WU, S.-S. & CHANG, I.-F. 2019. Regulation of ABI5 expression by ABF3 during salt stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Botanical Studies*, 60.
- CHARDON, F., BARTHÉLÉMY, J., DANIEL-VEDELE, F. & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. 2010. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *J Exp Bot*, 61, 2293-302.
- CHEHAB, E. W., PATHARKAR, O. R., HEGEMAN, A. D., TAYBI, T. & CUSHMAN, J. C. 2004. Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. *Plant physiology*, 135, 1430-1446.
- CHEN, G., BI, Y. R. & LI, N. 2004. EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *The Plant Journal*, 41, 364-375.
- CHEN, W., SALARI, H., TAYLOR, M., JOST, R., BERKOWITZ, O., BARROW, R., QIU, D., BRANCO, R. & MASLE, J. 2018. NMT1 and NMT3 N-Methyltransferase Activity Is Critical to Lipid Homeostasis, Morphogenesis and Reproduction. *Plant Physiology*, 177, pp.00457.2018.
- CHENG, S.-H., WILLMANN, M. R., CHEN, H.-C. & SHEEN, J. 2002. Calcium Signaling through Protein Kinases. The *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiology*, 129, 469-485.
- CHÉREL, I. & GAILLARD, I. 2019. The Complex Fine-Tuning of K⁺ Fluxes in Plants in Relation to Osmotic and Ionic Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 715.
- CHINNUSAMY, V., ZHU, J.-K. & SUNKAR, R. 2010. Gene Regulation During Cold Stress Acclimation in Plants. Humana Press.
- CHINNUSAMY, V., ZHU, J. & ZHU, J.-K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12, 444-451.
- CHO, H., WEN, T., WANG, Y., SHIH, M. 2016. Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in *Arabidopsis* under submergence. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2745-2760
- CHOE, S. 2006. Brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Physiologia Plantarum*, 126, 539-548.
- CHOI, H.-I., HONG, J.-H., HA, J.-O., KANG, J.-Y. & KIM, S. Y. 2000. ABFs, a Family of ABA-responsive Element Binding Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1723-1730.
- CHOI, H.-I., PARK, H.-J., PARK, J. H., KIM, S., IM, M.-Y., SEO, H.-H., KIM, Y.-W., HWANG, I. & KIM, S. Y. 2005. *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase AtCPK32 Interacts with ABF4, a Transcriptional Regulator of Abscisic Acid-Responsive Gene Expression, and Modulates Its Activity. *Plant Physiology*, 139, 1750-1761.
- CHRISTIE, M., BOLAND, A., HUNTZINGER, E., WEICHENRIEDER, O. & IZAURRALDE, E. 2013. Structure of the PAN3 Pseudokinase Reveals the Basis for Interactions with the PAN2 Deadenylase and the GW182 Proteins. *Molecular Cell*, 51, 360-373.
- CHRISTODOULOU, J., MALMENDAL, A., HARPER, J. F. & CHAZIN, W. J. 2004a. Evidence for Differing Roles for Each Lobe of the Calmodulin-like Domain in a Calcium-dependent Protein Kinase. 279, 29092-29100.
- CHRISTODOULOU, J., MALMENDAL, A., HARPER, J. F. & CHAZIN, W. J. 2004b. Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 279, 29092-100.
- CLOUGH, S. J. & BENT, A. F. 1998. **Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana***. *The Plant Journal*, 16, 735-743.
- COLLIN, A., DASZKOWSKA-GOLEC, A. & SZAREJKO, I. 2021. Updates on the Role of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) and ABSCISIC ACID-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTORS (ABFs) in ABA Signaling in Different Developmental Stages in Plants. *Cells*, 10, 1996.
- CONIBEAR, E. & DAVIS, N. G. 2010. Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance. *Journal of Cell Science*, 123, 4007-4010.
- CURTIDOR, C. M. 2021. Elucidating the molecular basis of enhanced growth in the *Arabidopsis thaliana* accession Bur-0.

Quellen

- CUSHMAN, J. C. & BOHNERT, H. J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 117-124.
- CUTLER, S. R., RODRIGUEZ, P. L., FINKELSTEIN, R. R. & ABRAMS, S. R. 2010. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651-679.
- CZAP, G. 2015. The protein kinase CPK23, natural variation and function in abscisic acid signaling. *Dissertation Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan*.
- DAMMANN, C. 2003. Subcellular Targeting of Nine Calcium-Dependent Protein Kinase Isoforms from Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 132, 1840-1848.
- DANIEL, NURULHIKMA, MOVAHEDI, M., LOZANO-JUSTE, J., GUILLERMINA, BERCKHAN, S., NORA, JORGE, CRISTINA, PEARCE, S. P., GEORGE, HAMALI, B., TALLOJI, P., DANIEL, COEGO, A., BEYNON, J., ALABADÍ, D., BACHMAIR, A., LEÓN, J., JULIE, FREDERICA & MICHAEL 2014. Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular Cell*, 53, 369-379.
- DEKKERS, B. J. W., HE, H., HANSON, J., WILLEMS, L. A. J., JAMAR, D. C. L., CUEFF, G., RAJJOU, L., HILHORST, H. W. M. & BENTSINK, L. 2016. The Arabidopsis DELAY OF GERMINATION 1 gene affects ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) expression and genetically interacts with ABI3 during Arabidopsis seed development. *The Plant Journal*, 85, 451-465.
- DING, Y., JIA, Y., SHI, Y., ZHANG, X., SONG, C., GONG, Z. & YANG, S. 2018. OST1-mediated BTF3L phosphorylation positively regulates CBFs during plant cold responses. *The EMBO Journal*, 37.
- DING, Y., LV, J., SHI, Y., GAO, J., HUA, J., SONG, C., GONG, Z. & YANG, S. 2019. EGR2 phosphatase regulates OST1 kinase activity and freezing tolerance in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 38.
- DING, Y., YANG, H., WU, S., FU, D., LI, M., GONG, Z. & YANG, S. 2022. CPK28-NLP7 module integrates cold-induced Ca²⁺ signal and transcriptional reprogramming in Arabidopsis. *Sci Adv*, 8, eabn7901.
- DODD, A. N., KUDLA, J. & SANDERS, D. 2010. The Language of Calcium Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593-620.
- DUAN, M., ZHANG, R., ZHU, F., ZHANG, Z., GOU, L., WEN, J., DONG, J. & WANG, T. 2017. A Lipid-Anchored NAC Transcription Factor Is Translocated into the Nucleus and Activates Glyoxalase I Expression during Drought Stress. *The Plant Cell*, 29, 1748-1772.
- DUERMAYER, L., KHODAPANAH, E., YAN, D., KRAPP, A., ROTHSTEIN, S. J. & NAMBARA, E. 2018. Regulation of seed dormancy and germination by nitrate. *Seed Science Research*, 28, 150-157.
- EARL, H. J. & DAVIS, R. F. 2003. Effect of Drought Stress on Leaf and Whole Canopy Radiation Use Efficiency and Yield of Maize. *Agronomy Journal*, 95, 688-696.
- EDEL, K. H. & KUDLA, J. 2016. Integration of calcium and ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 83-91.
- EDRISI MARYAN, K., FARROKHI, N. & SAMIZADEH LAHIJI, H. 2023. Cold-responsive transcription factors in Arabidopsis and rice: A regulatory network analysis using array data and gene co-expression network. *PLOS ONE*, 18, e0286324.
- EREZ, E., FASS, D. & BIBI, E. 2009. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459, 371-378.
- FÀBREGAS, N., YOSHIDA, T. & FERNIE, A. R. 2020. Role of Raf-like kinases in SnRK2 activation and osmotic stress response in plants. *Nature Communications*, 11.
- FAROOQ, M., WAHID, A., KOBAYASHI, N., FUJITA, D. & BASRA, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185-212.
- FERNANDO, V. C. D., AL KHATEEB, W., BELMONTE, M. F. & SCHROEDER, D. F. 2018. Role of Arabidopsis ABF1/3/4 during det1 germination in salt and osmotic stress conditions. *Plant Molecular Biology*, 97, 149-163.
- FERNANDO, V. C. D. & SCHROEDER, D. F. 2016. Role of ABA in Arabidopsis Salt, Drought, and Desiccation Tolerance. InTech.

Quellen

- FINCH-SAVAGE, W. E. & LEUBNER-METZGER, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 501-523.
- 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. & ROCK, C. D. 2005. Redundant and Distinct Functions of the ABA Response Loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. 59, 253-267.
- FINKELSTEIN, R. R., GAMPALA, S. S. L. & ROCK, C. D. 2002. Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell*, 14, S15-S45.
- FINKELSTEIN, R. R. & LYNCH, T. J. 2000. The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene ABI5 Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *The Plant Cell*, 12, 599-609.
- FRANZ, S. 2008. CHARAKTERISIERUNG DER CDPKs CPK21 & CPK23 AUS ARABIDOPSIS THALIANA. *Dissertation FU-Berlin*.
- FRICKE, W., AKHIYAROVA, G., WEI, W., ALEXANDERSSON, E., MILLER, A., KJELLBOM, P. O., RICHARDSON, A., WOJCIECHOWSKI, T., SCHREIBER, L., VESELOV, D., KUDOYAROVA, G. & VOLKOV, V. 2006. The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1079-1095.
- FUCHS, S., TISCHER, S. V., WUNSCHER, C., CHRISTMANN, A. & GRILL, E. 2014. Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 5741-5746.
- FUJIKAWA, Y. & KATO, N. 2007. TECHNICAL ADVANCE: Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in Arabidopsis protoplasts. *The Plant Journal*, 52, 185-195.
- FUJIOKA, S. & YOKOTA, T. 2003. BIOSYNTHESIS AND METABOLISM OF BRASSINOSTEROIDS. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 137-164.
- FUJITA, Y., FUJITA, M., SATOH, R., MARUYAMA, K., PARVEZ, M. M., SEKI, M., HIRATSU, K., OHMETAKAGI, M., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17, 3470-88.
- FUJITA, Y., FUJITA, M., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124, 509-525.
- FUJITA, Y., YOSHIDA, T. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2013a. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 147, 15-27.
- FUJITA, Y., YOSHIDA, T. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2013b. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol Plant*, 147, 15-27.
- GARCÍA-LEÓN, D. 2015. *Weather and Income: Lessons from the main European regions*.
- GEIGER, D., SCHERZER, S., MUMM, P., MARTEN, I., ACHE, P., MATSCHI, S., LIESE, A., WELLMANN, C., AL-RASHEID, K. A. S., GRILL, E., ROMEIS, T. & HEDRICH, R. 2010. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 8023-8028.
- GENARD, H., LE SAOS, J., BILLARD, J.-P., TREMOLIERES, A. & BOUCAUD, J. 1991. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. *Plant physiology and biochemistry (Paris)*, 29, 421-427.
- GHASEMI PIRBALOUTI, A., SAJJADI, S. E. & PARANG, K. 2014. A Review (Research and Patents) on Jasmonic Acid and Its Derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 347, 229-239.
- GIFFORD, J. L., WALSH, M. P. & VOGEL, H. J. 2007. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J*, 405, 199-221.
- GILLAND, B. 2002. World population and food supply. *Food Policy*, 27, 47-63.
- GOLDENBERG, N. M. & STEINBERG, B. E. 2010. Surface charge: a key determinant of protein localization and function. *Cancer Res*, 70, 1277-80.

- GONZÁLEZ-GUZMÁN, M., APOSTOLOVA, N., BELLÉS, J. M., BARRERO, J. M., PIQUERAS, P., PONCE, M. R., MICOL, J. L., SERRANO, R. & RODRÍGUEZ, P. L. 2002. The Short-Chain Alcohol Dehydrogenase ABA2 Catalyzes the Conversion of Xanthoxin to Abscisic Aldehyde. *The Plant Cell*, 14, 1833-1846.
- GUAN, C., WANG, X., FENG, J., HONG, S., LIANG, Y., REN, B. & ZUO, J. 2014. Cytokinin Antagonizes Abscisic Acid-Mediated Inhibition of Cotyledon Greening by Promoting the Degradation of ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 Protein in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 164, 1515-1526.
- GUILFOYLE, T. J. & HAGEN, G. 2007. Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 453-460.
- GULLEROVA, M., BARTA, A. & LORKOVIĆ, Z. J. 2006. AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA*, 12, 631-643.
- GUO, F. Q., WANG, R., CHEN, M. & CRAWFORD, N. M. 2001. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell*, 13, 1761-77.
- GUY, C. L. 1990. Cold Acclimation and Freezing Stress Tolerance: Role of Protein Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 187-223.
- HAMEL, L.-P., SHEEN, J. & SÉGUIN, A. 2014. Ancient signals: comparative genomics of green plant CDPKs. 19, 79-89.
- HARMON, A. C., YOO, B.-C. & MCCAFFERY, C. 1994. Pseudosubstrate Inhibition of CDPK, a Protein Kinase with a Calmodulin-like Domain. 33, 7278-7287.
- HARPER, J. F., BRETON, G. & HARMON, A. 2004. DECODING Ca²⁺ SIGNALS THROUGH PLANT PROTEIN KINASES. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 263-288.
- HAYAT, F., LI, J., IQBAL, S., KHAN, U., ALI, N. A., PENG, Y., HONG, L., ASGHAR, S., JAVED, H. U., LI, C., SONG, W., TU, P., CHEN, J. & SHAHID, M. A. 2023. Hormonal Interactions Underlying Rootstock-Induced Vigor Control in Horticultural Crops. *Applied Sciences*, 13, 1237.
- HAZMAN, M., SÜHNEL, M., SCHÄFER, S., ZUMSTEG, J., LESOT, A., BELTRAN, F., MARQUIS, V., HERRGOTT, L., MIESCH, L., RIEMANN, M. & HEITZ, T. 2019. Characterization of Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile) Hormonal Catabolic Pathways in Rice upon Wounding and Salt Stress. *Rice*, 12.
- HEITZ, T., SMIRNOVA, E., WIDEMANN, E., AUBERT, Y., PINOT, F. & MÉNARD, R. 2016. The Rise and Fall of Jasmonate Biological Activities. Springer International Publishing.
- HEMSLEY, P. A. 2015. The importance of lipid modified proteins in plants. 205, 476-489.
- HETHERINGTON, A. M. & WOODWARD, F. I. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424, 901-908.
- HIROSE, N., TAKEI, K., KUROHA, T., KAMADA-NOBUSADA, T., HAYASHI, H. & SAKAKIBARA, H. 2007. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59, 75-83.
- HO, C.-H., LIN, S.-H., HU, H.-C. & TSAY, Y.-F. 2009. CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell*, 138, 1184-1194.
- HOBO, T., ASADA, M., KOWYAMA, Y. & HATTORI, T. 1999. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J*, 19, 679-89.
- HOLDSWORTH, M. J., BENTSINK, L. & SOPPE, W. J. J. 2008a. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179, 33-54.
- HOLDSWORTH, M. J., FINCH-SAVAGE, W. E., GRAPPIN, P. & JOB, D. 2008b. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends Plant Sci*, 13, 7-13.
- HURST, C. H. & HEMSLEY, P. A. 2015. Current perspective on protein S-acylation in plants: more than just a fatty anchor? 66, 1599-1606.
- HUSSAIN, M. I., LYRA, D.-A., FAROOQ, M., NIKOLOUDAKIS, N. & KHALID, N. 2016. Salt and drought stresses in safflower: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36.
- HWANG, I. 2002. Two-Component Signal Transduction Pathways in Arabidopsis. 129, 500-515.

Quellen

- HWANG, I., SHEEN, J. & MÜLLER, B. 2012. Cytokinin Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 353-380.
- INGRAM, J. R., KNOCKENHAUER, K. E., MARKUS, B. M., MANDELBAUM, J., RAMEK, A., SHAN, Y., SHAW, D. E., SCHWARTZ, T. U., PLOEGH, H. L. & LOURIDO, S. 2015. Allosteric activation of apicomplexan calcium-dependent protein kinases. 112, E4975-E4984.
- ITEN, M., HOFFMANN, T. & GRILL, E. 1999. Receptors and Signalling Components of Plant Hormones. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 19, 41-58.
- ITO, T., ISHIDA, S., OE, S., FUKAZAWA, J. & TAKAHASHI, Y. 2017. Autophosphorylation Affects Substrate-Binding Affinity of Tobacco Ca(2+)-Dependent Protein Kinase1. *Plant Physiol*, 174, 2457-2468.
- ITO, T., NAKATA, M., FUKAZAWA, J., ISHIDA, S. & 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, 1592-1604.
- JAMES, P., HALLADAY, J. & CRAIG, E. A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425-36.
- JESSICA, MICHAEL & HANS 2007. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal*, 405, 199-221.
- JIA, W., LI, B., LI, S., LIANG, Y., WU, X., MA, M., WANG, J., GAO, J., CAI, Y., ZHANG, Y., WANG, Y., LI, J. & WANG, Y. 2016. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in Arabidopsis. *PLOS Biology*, 14, e1002550.
- KAMIYAMA, Y., HIROTANI, M., ISHIKAWA, S., MINEGISHI, F., KATAGIRI, S., ROGAN, C. J., TAKAHASHI, F., NOMOTO, M., ISHIKAWA, K., KODAMA, Y., TADA, Y., TAKEZAWA, D., ANDERSON, J. C., PECK, S. C., SHINOZAKI, K. & UMEZAWA, T. 2021. Arabidopsis group C Raf-like protein kinases negatively regulate abscisic acid signaling and are direct substrates of SnRK2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2100073118.
- KANCHISWAMY, C., TAKAHASHI, H., QUADRO, S., MAFFEI, M. E., BOSSI, S., BERTEA, C., ZEBELO, S., MUROI, A., ISHIHAMA, N., YOSHIOKA, H., BOLAND, W., TAKABAYASHI, J., ENDO, Y., SAWASAKI, T. & ARIMURA, G.-I. 2010. Regulation of Arabidopsis defense responses against Spodoptera littoralis by CPK-mediated calcium signaling. 10, 97.
- KANG, J.-Y., CHOI, H.-I., IM, M.-Y. & KIM, S. Y. 2002. Arabidopsis Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 14, 343-357.
- KANG, X., XU, G., LEE, B., CHEN, C., ZHANG, H., KUANG, R. & NI, M. 2018. HRB2 and BBX21 interaction modulates Arabidopsis ABI5 locus and stomatal aperture. *Plant Cell Environ*, 41, 1912-1925.
- KATORI, T., IKEDA, A., IUCHI, S., KOBAYASHI, M., SHINOZAKI, K., MAHASHI, K., SAKATA, Y., TANAKA, S. & TAJI, T. 2010. Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of Arabidopsis thaliana accessions. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1125-1138.
- KATSUTA, S., MASUDA, G., BAK, H., SHINOZAWA, A., KAMIYAMA, Y., UMEZAWA, T., TAKEZAWA, D., YOTSUI, I., TAJI, T. & SAKATA, Y. 2020. Arabidopsis Raf-like kinases act as positive regulators of subclass III SnRK2 in osmostress signaling. *The Plant Journal*, 103, 634-644.
- KAWAMOTO, N., SASABE, M., ENDO, M., MACHIDA, Y., ARAKI, T. 2015. Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation. *Scientific Reports*
- KETCHUM, R. E. B., WARREN, R. S., KLIMA, L. J., LOPEZ-GUTIÉRREZ, F. & NABORS, M. W. 1991. The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cell cultures of the halophytic grass Distichlis spicata L. *Journal of Plant Physiology*, 137, 368-374.
- KHALID, M. H. B., RAZA, M. A., YU, H. Q., KHAN, I., SUN, F. A., FENG, L. Y., QU, J. T., FU, F. L. & LI, W. C. 2019. Expression, Subcellular Localization, and Interactions of CPK Family Genes in Maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6173.
- KIDOKORO, S., HAYASHI, K., HARAGUCHI, H., ISHIKAWA, T., SOMA, F., KONOURA, I., TODA, S., MIZOI, J., SUZUKI, T., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2021. Posttranslational regulation

- of multiple clock-related transcription factors triggers cold-inducible gene expression in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2021048118.
- KIDOKORO, S., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2022. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses. *Trends Plant Sci*, 27, 922-935.
- KIDOKORO, S., YONEDA, K., TAKASAKI, H., TAKAHASHI, F., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2017. Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature. *Plant Cell*, 29, 760-774.
- KIM, J., SHISHIDO, T., JIANG, X., ADEREM, A. & MCLAUGHLIN, S. 1994. Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *J Biol Chem*, 269, 28214-9.
- KIM, S., KANG, J.-Y., CHO, D.-I., PARK, J. H. & KIM, S. Y. 2004. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal*, 40, 75-87.
- KIM, S. Y. 2005. The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiologia Plantarum*, 0, 051129032003001.
- KNIGHT, H., TREWAVAS, A. J. & KNIGHT, M. R. 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8, 489-503.
- KOORNNEEF, M., ALONSO-BLANCO, C. & VREUGDENHIL, D. 2004. NATURALLY OCCURRING GENETIC VARIATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA*. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 141-172.
- KORTE, A. 2009. Identification and characterization of the Abscisic acid response regulator GCA2 in *Arabidopsis thaliana* *Dissertation Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan*.
- KRYSAN, P. J. & COLCOMBET, J. 2018. Cellular Complexity in MAPK Signaling in Plants: Questions and Emerging Tools to Answer Them. *Front Plant Sci*, 9, 1674.
- KU, Y.-S., CHENG, S.-S., CHEUNG, M.-Y., LAW, C.-H. & LAM, H.-M. 2022. The Re-Localization of Proteins to or Away from Membranes as an Effective Strategy for Regulating Stress Tolerance in Plants. *Membranes*, 12, 1261.
- KUCERA, B., COHN, M. A. & LEUBNER-METZGER, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15, 281-307.
- KUMAR, K., RAINA, S. K. & SULTAN, S. M. 2020. *Arabidopsis* MAPK signaling pathways and their cross talks in abiotic stress response. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29, 700-714.
- KUMAR, K., WANKHEDE, D. P. & SINHA, A. K. 2013. Signal convergence through the lenses of MAP kinases: paradigms of stress and hormone signaling in plants. *Frontiers in Biology*, 8, 109-118.
- LAMBECK, I., CHI, J.-C., KRIZOWSKI, S., MUELLER, S., MEHLMER, N., TEIGE, M., FISCHER, K. & SCHWARZ, G. 2010. Kinetic Analysis of 14-3-3-Inhibited *Arabidopsis thaliana* Nitrate Reductase. *Biochemistry*, 49, 8177-8186.
- LATA, C. & PRASAD, M. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4731-4748.
- LATZ, A., MEHLMER, N., ZAPF, S., MUELLER, T. D., WURZINGER, B., PFISTER, B., CSASZAR, E., HEDRICH, R., TEIGE, M. & BECKER, D. 2013. Salt Stress Triggers Phosphorylation of the *Arabidopsis* Vacuolar K⁺ Channel TPK1 by Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs). 6, 1274-1289.
- LE, Q. T., TRUONG, H. A., NGUYEN, D. T., YANG, S., XIONG, L. & LEE, H. 2023. Enhanced growth performance of *abi5* plants under high salt and nitrate is associated with reduced nitric oxide levels. *J Plant Physiol*, 286, 154000.
- LEE, E. S., PARK, J. H., WI, S. D., CHAE, H. B., PAENG, S. K., BAE, S. B., PHAN, K. A. T., KIM, M. G., KWAK, S.-S., KIM, W.-Y., YUN, D.-J. & LEE, S. Y. 2021a. Demyristoylation of the Cytoplasmic Redox Protein Trx-h2 Is Critical for Inducing a Rapid Cold Stress Response in Plants. *Antioxidants*, 10, 1287.
- LEE, E. S., PARK, J. H., WI, S. D., KANG, C. H., CHI, Y. H., CHAE, H. B., PAENG, S. K., JI, M. G., KIM, W.-Y., KIM, M. G., YUN, D.-J., STACEY, G. & LEE, S. Y. 2021b. Redox-dependent structural switch and CBF activation confer freezing tolerance in plants. *Nature Plants*, 7, 914-922.

Quellen

- LEE, H., GANGULY, A., BAIK, S., CHO, H. 2021. Calcium-dependent protein kinase 29 modulates PIN-FORMED polarity and Arabidopsis development via its own phosphorylation code. *The Plant Cell*, 33, 3513-3531.
- LEE, J., RUDD, J. J., MACIOSZEK, V. K. & SCHEEL, D. 2004. Dynamic Changes in the Localization of MAPK Cascade Components Controlling Pathogenesis-related (PR) Gene Expression during Innate Immunity in Parsley. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 22440-22448.
- LEE, S. J., KANG, J. Y., PARK, H. J., KIM, M. D., BAE, M. S., CHOI, H. I. & KIM, S. Y. 2010. DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. *Plant Physiol*, 153, 716-27.
- LEMBERG, M. K. & FREEMAN, M. 2007. Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Research*, 17, 1634-1646.
- LESKINEN, P., VIRTA, M. & KARP, M. 2003. One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast*, 20, 1109-13.
- LI, J.-F., BUSH, J., XIONG, Y., LI, L. & MCCORMACK, M. 2011. Large-Scale Protein-Protein Interaction Analysis in Arabidopsis Mesophyll Protoplasts by Split Firefly Luciferase Complementation. *PLoS ONE*, 6, e27364.
- LI, J. & JIN, H. 2007. Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends in Plant Science*, 12, 37-41.
- LI, J., ZHANG, M. & ZHOU, L. 2022. Protein S-acyltransferases and acyl protein thioesterases, regulation executors of protein S-acylation in plants. *Front Plant Sci*, 13, 956231.
- LI, S.-B., XIE, Z.-Z., HU, C.-G. & ZHANG, J.-Z. 2016. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- LIANG, X. & ZHOU, J.-M. 2018. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 267-299.
- LICHTENTHALER, S. F. & STEINER, H. 2007. Sheddases and intramembrane-cleaving proteases: RIPpers of the membrane. *EMBO reports*, 8, 537-541.
- LIESE, A. 2013. Regulation and function of AtCPK21 and AtCPK23 in abiotic stress response and ABA signal transduction. *Dissertation FU-Berlin*.
- LIESE, A., EICHSTÄDT, B., LEDERER, S., SCHULZ, P., OEHLISCHLÄGER, J., FEIJÓ, J. A., SCHULZE, W. X., KONRAD, K. R. & ROMEIS, T. 2023. Imaging of plant calcium-sensor kinase conformation monitors real time calcium decoding in planta. Cold Spring Harbor Laboratory.
- LIESE, A. & ROMEIS, T. 2013. Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833, 1582-1589.
- LIM, C. W. & LEE, S. C. 2022. Genome-wide identification and expression analysis of Raf-like kinase gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Signaling & Behavior*, 17.
- LIN, D. T. & CONIBEAR, E. 2015. ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization. *Elife*, 4, e11306.
- LIN, J.-R. & HU, J. 2013. SeqNLS: Nuclear Localization Signal Prediction Based on Frequent Pattern Mining and Linear Motif Scoring. *PLoS ONE*, 8, e76864.
- LIN, Q., WANG, S., DAO, Y., WANG, J. & WANG, K. 2020. Arabidopsis thaliana trehalose-6-phosphate phosphatase gene TPPI enhances drought tolerance by regulating stomatal apertures. *Journal of Experimental Botany*, 71, 4285-4297.
- LIU, K.-H., NIU, Y., KONISHI, M., WU, Y., DU, H., SUN CHUNG, H., LI, L., BOUDSOCQ, M., MCCORMACK, M., MAEKAWA, S., ISHIDA, T., ZHANG, C., SHOKAT, K., YANAGISAWA, S. & SHEEN, J. 2017a. Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature*, 545, 311-316.
- LIU, L., GAO, H., LI, S., HAN, Z., LI, B. 2012. Calcium signaling networks mediate nitrate sensing and responses in Arabidopsis. *Plant Signal Behav*, 10.
- LIU, N., HAKE, K., WANG, W., ZHAO, T., ROMEIS, T., TANG, D. 2017. CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE5 Associates with the Truncated NLR Protein TIR-NBS2 to Contribute to exo70B1-Mediated Immunity. *The Plant Cell*, 29, 746-759.

Quellen

- LIU, S., LV, Z., LIU, Y., LI, L. & ZHANG, L. 2018a. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics and Molecular Biology*, 41, 624-637.
- LIU, X., CHEN, Z., HUANG, L., OUYANG, Y., WANG, Z., WU, S., YE, W., YU, B., ZHANG, Y., YANG, C. & LAI, J. 2023. Salicylic acid attenuates brassinosteroid signaling via protein de-S-acylation. *Embo j*, 42, e112998.
- LIU, X., HU, P., HUANG, M., TANG, Y., LI, Y., LI, L. & HOU, X. 2016. The NF-YC–RGL2 module integrates GA and ABA signalling to regulate seed germination in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 7, 12768.
- LIU, X., LI, M., LI, Y., CHEN, Z., ZHUGE, C., OUYANG, Y., ZHAO, Y., LIN, Y., XIE, Q., YANG, C. & LAI, J. 2021. An ABHD17-like hydrolase screening system to identify de-S-acylation enzymes of protein substrates in plant cells. *Plant Cell*, 33, 3235-3249.
- LIU, Y., LI, P., FAN, L. & WU, M. 2018b. The nuclear transportation routes of membrane-bound transcription factors. *Cell Communication and Signaling*, 16.
- LIU, Z., JIA, Y., DING, Y., SHI, Y., LI, Z., GUO, Y., GONG, Z. & YANG, S. 2017b. Plasma Membrane CRPK1-Mediated Phosphorylation of 14-3-3 Proteins Induces Their Nuclear Import to Fine-Tune CBF Signaling during Cold Response. *Mol Cell*, 66, 117-128.e5.
- LIU, Z., MIAO, L., HUO, R., SONG, X., JOHNSON, C., KONG, L., SUNDARESAN, V. & YU, X. 2018c. ARF2-ARF4 and ARF5 are Essential for Female and Male Gametophyte Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 59, 179-189.
- LOBELL, D. B., BURKE, M. B., TEBALDI, C., MASTRANDREA, M. D., FALCON, W. P. & NAYLOR, R. L. 2008. Prioritizing Climate Change Adaptation Needs for Food Security in 2030. *Science*, 319, 607-610.
- LOPEZ-MOLINA, L., MONGRAND, S. & CHUA, N.-H. 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 4782-4787.
- LORD, C. C., THOMAS, G. & BROWN, J. M. 2013. Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831, 792-802.
- LU, S. X. & HRABAK, E. M. 2013. The myristoylated amino-terminus of an *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase mediates plasma membrane localization. 82, 267-278.
- LU, Y., CHEN, X., WU, Y., WANG, Y., HE, Y. & WU, Y. 2013. Directly Transforming PCR-Amplified DNA Fragments into Plant Cells Is a Versatile System That Facilitates the Transient Expression Assay. *PLoS ONE*, 8, e57171.
- LYNCH, T., ERICKSON, B. J. & FINKELSTEIN, R. R. 2012. Direct interactions of ABA-insensitive(ABI)-clade protein phosphatase(PP)2Cs with calcium-dependent protein kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response. *Plant Molecular Biology*, 80, 647-658.
- MA, S.-Y. & WU, W.-H. 2007. AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Molecular Biology*, 65, 511-518.
- MA, Y., SZOSTKIEWICZ, I., KORTE, A., MOES, D., YANG, Y., CHRISTMANN, A. & GRILL, E. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324, 1064-8.
- MACMILLAN, J. 2001. Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20, 387-442.
- MAIERHOFER, T., DIEKMANN, M., OFFENBORN, J. N., LIND, C., BAUER, H., HASHIMOTO, K., S. AL-RASHEID, K. A., LUAN, S., KUDLA, J., GEIGER, D. & HEDRICH, R. 2014. Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. 7, ra86-ra86.
- MARTIN, B. R. & CRAVATT, B. F. 2009. Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nature Methods*, 6, 135-138.

Quellen

- MARTIN, D. D. O., BEAUCHAMP, E. & BERTHIAUME, L. G. 2011. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*, 93, 18-31.
- MARTÍN, M. L. & BUSCONI, L. 2001. A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant physiology*, 125, 1442-1449.
- MASHIGUCHI, K., TANAKA, K., SAKAI, T., SUGAWARA, S., KAWAIDE, H., NATSUME, M., HANADA, A., YAENO, T., SHIRASU, K., YAO, H., MCSTEEN, P., ZHAO, Y., HAYASHI, K. I., KAMIYA, Y. & KASAHARA, H. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 18512-18517.
- MAYERHOFER, H., PANNEERSELVAM, S., KALJUNEN, H., TUUKKANEN, A., MERTENS, H. D. T. & MUELLER-DIECKMANN, J. 2015. Structural Model of the Cytosolic Domain of the Plant Ethylene Receptor 1 (ETR1). *Journal of Biological Chemistry*, 290, 2644-2658.
- MCLAUGHLIN, S. & ADEREM, A. 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci*, 20, 272-6.
- MERCHANTE, C., ALONSO, J. M. & STEPANOVA, A. N. 2013. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 554-560.
- MERLOT, S., GOSTI, F., GUERRIER, D., VAVASSEUR, A. & GIRAUDAT, J. 2001. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J*, 25, 295-303.
- MERLOT, S., MUSTILLI, A.-C., GENTY, B., NORTH, H., LEFEBVRE, V., SOTTA, B., VAVASSEUR, A. & GIRAUDAT, J. 2002. Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal*, 30, 601-609.
- MÉSZÁROS, B., ERDŐS, G. & DOSZTÁNYI, Z. 2018. IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research*, 46, W329-W337.
- MITCHELL-OLDS, T. 2001. Arabidopsis thaliana and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 693-700.
- MORI, I. C., MURATA, Y., YANG, Y., MUNEMASA, S., WANG, Y.-F., ANDREOLI, S., TIRIAC, H., ALONSO, J. M., HARPER, J. F., ECKER, J. R., KWAK, J. M. & SCHROEDER, J. I. 2006. CDPKs CPK6 and CPK3 Function in ABA Regulation of Guard Cell S-Type Anion- and Ca²⁺- Permeable Channels and Stomatal Closure. *PLoS Biology*, 4, e327.
- MORI, K., RENHU, N., NAITO, M., NAKAMURA, A., SHIBA, H., YAMAMOTO, T., SUZAKI, T., IIDA, H. & MIURA, K. 2018. Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca²⁺ increase and cold tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 8.
- MOTT, K. A. 1988. Do Stomata Respond to CO₂ Concentrations Other than Intercellular? *Plant Physiol*, 86, 200-3.
- MUNNS, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 239-250.
- MUNNS, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167, 645-663.
- MUNNS, R. & TESTER, M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- MURATA, N. & LOS, D. A. 1997. Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiol*, 115, 875-879.
- MUSTILLI, A.-C., MERLOT, S., VAVASSEUR, A., FENZI, F. & GIRAUDAT, J. R. M. 2002. Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. Article, publication date, and citation information can be found at www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.007906. *The Plant Cell*, 14, 3089-3099.
- NAKASHIMA, K., FUJITA, Y., KANAMORI, N., KATAGIRI, T., UMEZAWA, T., KIDOKORO, S., MARUYAMA, K., YOSHIDA, T., ISHIYAMA, K., KOBAYASHI, M., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2009a. Three Arabidopsis SnRK2 Protein Kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, Involved in ABA Signaling are Essential for the Control of Seed Development and Dormancy. *Plant and Cell Physiology*, 50, 1345-1363.

Quellen

- NAKASHIMA, K., ITO, Y. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2009b. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses: Figure 1. *Plant Physiology*, 149, 88-95.
- NAKASHIMA, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*, 126, 62-71.
- NAM, K. H. & LI, J. 2002. BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid Signaling. *Cell*, 110, 203-212.
- NAMBARA, E. & MARION-POLL, A. 2005. ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165-185.
- NANDA, S., NAYAK, S., JOSHI, R. K. 2014. Molecular cloning and expression analysis of four turmeric MAP kinase genes in response to abiotic stresses and phytohormones. *Biologia plantarum*, 58, 479-490
- NARUSAKA, Y., NAKASHIMA, K., SHINWARI, Z. K., SAKUMA, Y., FURIHATA, T., ABE, H., NARUSAKA, M., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2003. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*, 34, 137-148.
- NELSON, S. & STEBER, C. 2016. Gibberellin hormone signal perception: down-regulating DELLA repressors of plant growth and development.
- NISHIMURA, N., SARKESHIK, A., NITO, K., PARK, S.-Y., WANG, A., CARVALHO, P. C., LEE, S., CADDELL, D. F., CUTLER, S. R., CHORY, J., YATES, J. R. & SCHROEDER, J. I. 2009. PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 61, 290-299.
- NOVILLO, F., ALONSO, J. M., ECKER, J. R., SALINAS, J. 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 3985-3990
- OFFLEY, S. R. & SCHMIDT, M. C. 2019. Protein phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 65, 41-55.
- OFFRINGA, R. & HUANG, F. 2013. Phosphorylation-dependent Trafficking of Plasma Membrane Proteins in Animal and Plant Cells. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55, 789-808.
- OH, E. 2004. PIL5, a Phytochrome-Interacting Basic Helix-Loop-Helix Protein, Is a Key Negative Regulator of Seed Germination in Arabidopsis thaliana. 16, 3045-3058.
- OH, E., YAMAGUCHI, S., HU, J., YUSUKE, J., JUNG, B., PAIK, I., LEE, H. S., SUN, T. P., KAMIYA, Y. & CHOI, G. 2007. PIL5, a Phytochrome-Interacting bHLH Protein, Regulates Gibberellin Responsiveness by Binding Directly to the GAI and RGA Promoters in Arabidopsis Seeds. 19, 1192-1208.
- OLIEN, C. R. & SMITH, M. N. 1977. Ice Adhesions in Relation to Freeze Stress. 60, 499-503.
- OSUNA, D., PRIETO, P. & AGUILAR, M. 2015. Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- PAREDES GÓMEZ, V., GUTIÉRREZ, A., BLANCO, V. & NAFRÍA, D. 2020. A Methodological Approach for Irrigation Detection in the Frame of Common Agricultural Policy Checks by Monitoring. *Agronomy*, 10, 867.
- PARENT, B., HACHEZ, C., REDONDO, E., SIMONNEAU, T., CHAUMONT, F. & TARDIEU, F. 2009. Drought and Abscisic Acid Effects on Aquaporin Content Translate into Changes in Hydraulic Conductivity and Leaf Growth Rate: A Trans-Scale Approach. *Plant Physiology*, 149, 2000-2012.
- PARK, S. Y., FUNG, P., NISHIMURA, N., JENSEN, D. R., FUJII, H., ZHAO, Y., LUMBA, S., SANTIAGO, J., RODRIGUES, A., CHOW, T. F., ALFRED, S. E., BONETTA, D., FINKELSTEIN, R., PROVART, N. J., DESVEAUX, D., RODRIGUEZ, P. L., MCCOURT, P., ZHU, J. K., SCHROEDER, J. I., VOLKMAN, B. F. & CUTLER, S. R. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324, 1068-71.

Quellen

- PENFIELD, S., JOSSE, E.-M., KANNANGARA, R., GILDAY, A. D., HALLIDAY, K. J. & GRAHAM, I. A. 2005. Cold and Light Control Seed Germination through the bHLH Transcription Factor SPATULA. *Current Biology*, 15, 1998-2006.
- PÉREZ-PÉREZ, J. M., SERRANO-CARTAGENA, J. & MICOL, J. L. 2002. Genetic Analysis of Natural Variations in the Architecture of *Arabidopsis thaliana* Vegetative Leaves. *Genetics*, 162, 893-915.
- PIETERSE, C. M. J., VAN DER DOES, D., ZAMIOUDIS, C., LEON-REYES, A. & VAN WEES, S. C. M. 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489-521.
- PLEIßNER, S. J. 2015a. *Proteinkinasen der Abscisinsäure-Signaltransduktion - in-vitro Charakterisierung und Regulation*.
- PLEIßNER, S. J. 2015b. *Proteinkinasen der Abscisinsäure-Signaltransduktion - in vitro Charakterisierung und Regulation. Dissertation Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan*.
- POOVAIAH, B. W. & DU, L. 2018. Calcium signaling: decoding mechanism of calcium signatures. *New Phytologist*, 217, 1394-1396.
- POTUSCHAK, T., LECHNER, E., PARMENTIER, Y., YANAGISAWA, S., GRAVA, S., KONCZ, C. & GENSCHIK, P. 2003. EIN3-Dependent Regulation of Plant Ethylene Hormone Signaling by Two *Arabidopsis* F Box Proteins. *Cell*, 115, 679-689.
- QIAN, D., ZHANG, Z., HE, J., ZHANG, P., OU, X., LI, T., NIU, L., NAN, Q., NIU, Y., HE, W., AN, L., JIANG, K. & XIANG, Y. 2018. *Arabidopsis* ADF5 promotes stomatal closure by regulating actin cytoskeleton remodeling in response to ABA and drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 70, 435-446.
- QIU, J. 2015. Investigation of chloride transport mechanisms in *Arabidopsis thaliana* root.
- QIU, Q. S., GUO, Y., DIETRICH, M. A., SCHUMAKER, K. S. & ZHU, J. K. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 8436-8441.
- RAGHAVENDRA, A. S., GONUGUNTA, V. K., CHRISTMANN, A. & GRILL, E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15, 395-401.
- RAWSON, R. B., ZELENSKI, N. G., NIJHAWAN, D., YE, J., SAKAI, J., HASAN, M. T., CHANG, T. Y., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 1997. Complementation Cloning of , a Gene Encoding a Putative Metalloprotease Required for Intramembrane Cleavage of SREBPs. *Molecular Cell*, 1, 47-57.
- REECE, J. B., JACKSON, R. B., URRY, L. A., CAIN, M. L., MINORSKY, P. V. & WASSERMAN, S. A. 2012. *Campbell Biology*, Pearson College Division.
- RESH, M. D. 2006. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nature Chemical Biology*, 2, 584-590.
- REYES, B. A., PENDERGAST, J. S. & YAMAZAKI, S. 2008. Mammalian Peripheral Circadian Oscillators Are Temperature Compensated. *Journal of Biological Rhythms*, 23, 95-98.
- RIEMANN, M., DHAKAREY, R., HAZMAN, M., MIRO, B., KOHLI, A. & NICK, P. 2015. Exploring Jasmonates in the Hormonal Network of Drought and Salinity Responses. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- RITONGA, F. N., NGATIA, J. N., WANG, Y., KHOSO, M. A., FAROOQ, U. & CHEN, S. 2021. AP2/ERF, an important cold stress-related transcription factor family in plants: A review. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 1953-1968.
- ROBERTS, D. M. & HARMON, A. C. 1992. Calcium-Modulated Proteins: Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher Plants. 43, 375-414.
- RODZIEWICZ, P., SWARCEWICZ, B., CHMIELEWSKA, K., WOJAKOWSKA, A. & STOBIECKI, M. 2014. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 1-19.
- ROEDER, J., LIU, J., DOCH, I., RUSCHHAUPT, M., CHRISTMANN, A., GRILL, E., HELMKE, H., HOHMANN, S., LEHR, S., FRACKENPOHL, J. & YANG, Z. 2022. Abscisic acid agonists suitable for optimizing plant water use. *Front Plant Sci*, 13, 1071710.

Quellen

- ROJO, F. 2001. Mechanisms of transcriptional repression. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 145-151.
- RONZIER, E., CORRATGÉ-FAILLIE, C., SANCHEZ, F., PRADO, K., BRIÈRE, C., LEONHARDT, N., THIBAUD, J.-B. & XIONG, T. C. 2014. CPK13, a noncanonical Ca²⁺-dependent protein kinase, specifically inhibits KAT2 and KAT1 shaker K⁺ channels and reduces stomatal opening. *Plant physiology*, 166, 314-326.
- ROYCHOUDHURY, A., PAUL, S. & BASU, S. 2013. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 32, 985-1006.
- RUAN, J., ZHOU, Y., ZHOU, M., YAN, J., KHURSHID, M., WENG, W., CHENG, J. & ZHANG, K. 2019. Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2479.
- RUDD, J. J. & FRANKLIN-TONG, V. E. 2001. Unravelling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells. 151, 7-33.
- RUSCHHAUPT, M. 2018. Reconstruction and characterization of the signalling cascade of the phytohormone abscisic acid in yeast. *Dissertation Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan*.
- RUSCHHAUPT, M., MERGNER, J., MUCHA, S., PAPACEK, M., DOCH, I., TISCHER, S. V., HEMMLER, D., CHIASSON, D., EDEL, K. H., KUDLA, J., SCHMITT-KOPPLIN, P., KUSTER, B. & GRILL, E. 2019. Rebuilding core abscisic acid signaling pathways of Arabidopsis in yeast. *The EMBO Journal*, 38.
- SAH, S. K., REDDY, K. R. & LI, J. 2016. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- SAITO, S., HAMAMOTO, S., MORIYA, K., MATSUURA, A., SATO, Y., MUTO, J., NOGUCHI, H., YAMAUCHI, S., TOZAWA, Y., UEDA, M., HASHIMOTO, K., KÖSTER, P., DONG, Q., HELD, K., KUDLA, J., UTSUMI, T., UOZUMI, N. N-myristoylation and S-acylation are common modifications of Ca²⁺-regulated Arabidopsis kinases and are required for activation of the SLAC1 anion channel. *New Phytologist*, 218, 1504-1521
- SAKUMA, Y., MARUYAMA, K., OSAKABE, Y., QIN, F., SEKI, M., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2006. Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, 18, 1292-1309.
- SANDERS, D. 1999. Communicating with Calcium. 11, 691-706.
- SANDERS, D., PELLOUX, J., BROWNLEE, C. & HARPER, J. F. 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 14 Suppl, S401-17.
- SANGWAN, V., FOULDS, I., SINGH, J. & DHINDSA, R. S. 2001. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *The Plant Journal*, 27, 1-12.
- SARUHASHI, M., KUMAR GHOSH, T., ARAI, K., ISHIZAKI, Y., HAGIWARA, K., KOMATSU, K., SHIWA, Y., IZUMIKAWA, K., YOSHIKAWA, H., UMEZAWA, T., SAKATA, Y. & TAKEZAWA, D. 2015. Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E6388-E6396.
- SCHULZE, S., DUBEAUX, G., CECILIATO, P. H. O., MUNEMASA, S., NUHKAT, M., YARMOLINSKY, D., AGUILAR, J., DIAZ, R., AZOULAY-SHEMER, T., STEINHORST, L., OFFENBORN, J. N., KUDLA, J., KOLLIST, H. & SCHROEDER, J. I. 2021. A role for calcium-dependent protein kinases in differential CO₂- and ABA-controlled stomatal closing and low CO₂-induced stomatal opening in Arabidopsis. *New Phytologist*, 229, 2765-2779.
- SCHWARTZ, S. H., QIN, X. & ZEEVAART, J. A. D. 2003. Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology*, 131, 1591-1601.
- SENIN, I. I. 2002. Ca²⁺-Myristoyl Switch in the Neuronal Calcium Sensor Recoverin Requires Different Functions of Ca²⁺-binding Sites. 277, 50365-50372.
- SEO, M., KOIWAI, H., AKABA, S., KOMANO, T., ORITANI, T., KAMIYA, Y. & KOSHIBA, T. 2000. Abscisic aldehyde oxidase in leaves of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 23, 481-488.

Quellen

- SERRAJ, R. & SINCLAIR, T. R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, 25, 333-341.
- SEYFFERTH, C. & TSUDA, K. 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- SEZGIN, M. & KAHYA, M. 2018. Phytohormones. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology*, 8, 35-39.
- SHARMA, P. D., SINGH, N., AHUJA, P. S. & REDDY, T. V. 2011. Abscisic acid response element binding factor 1 is required for establishment of Arabidopsis seedlings during winter. *Molecular Biology Reports*, 38, 5147-5159.
- SHARMIN, D., SASANO, Y., SUGIYAMA, M. & HARASHIMA, S. 2014. Effects of deletion of different PP2C protein phosphatase genes on stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 31, 393-409.
- SHEFFIELD, J., WOOD, E. F. & RODERICK, M. L. 2012. Little change in global drought over the past 60 years. *Nature*, 491, 435-438.
- SHERRARD, M. E. & MAHERALI, H. 2006. THE ADAPTIVE SIGNIFICANCE OF DROUGHT ESCAPE IN AVENA BARBATA, AN ANNUAL GRASS. *Evolution*, 60, 2478-2489.
- SHI, S., LI, S., ASIM, M., MAO, J., XU, D., ULLAH, Z., LIU, G., WANG, Q. & LIU, H. 2018. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs) and Their Roles in Plant Growth Regulation and Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1900.
- SHIBASAKI, K., UEMURA, M., TSURUMI, S. & RAHMAN, A. 2009. Auxin Response in Arabidopsis under Cold Stress: Underlying Molecular Mechanisms *The Plant Cell*, 21, 3823-3838.
- SHIMADA, T. L., SHIMADA, T. & HARA-NISHIMURA, I. 2010. A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 61, 519-528.
- SHINDO, C., BERNASCONI, G. & HARDTKE, C. S. 2007. Natural Genetic Variation in Arabidopsis: Tools, Traits and Prospects for Evolutionary Ecology. *Annals of Botany*, 99, 1043-1054.
- SHINOZAKI, K. & 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, 217-223.
- SHINWARI, Z. K., NAKASHIMA, K., MIURA, S., KASUGA, M., SEKI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. 1998. An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 250, 161-70.
- SIMEUNOVIC, A., MAIR, A., WURZINGER, B. & TEIGE, M. 2016. Know where your clients are: subcellular localization and targets of calcium-dependent protein kinases. *Journal of Experimental Botany*, 67, 3855-3872.
- SINGH, D. & LAXMI, A. 2015. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- SKUBACZ, A., DASZKOWSKA-GOLEC, A. & SZAREJKO, I. 2016. The Role and Regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in Plant Development, Abiotic Stress Responses and Phytohormone Crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- SOMA, F., TAKAHASHI, F., SUZUKI, T., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2020. Plant Raf-like kinases regulate the mRNA population upstream of ABA-unresponsive SnRK2 kinases under drought stress. *Nature Communications*, 11.
- SOMSSICH, M. 2019. A short history of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0. PeerJ.
- STAEL, S., BAYER, R. G., MEHLMER, N., TEIGE, M. 2011. Protein N-acylation overrides differing targeting signals. *FEBS Letters*, 3, 517-522
- STEPONKUS, P. L. 1984. Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, 543-584.
- STOCKINGER, E. J., GILMOUR, S. J. & THOMASHOW, M. F. 1997. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1035-40.

Quellen

- STRISOVSKY, K., SHARPE, H. J. & FREEMAN, M. 2009. Sequence-specific intramembrane proteolysis: identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Mol Cell*, 36, 1048-59.
- SU, H., WANG, T., JU, C., DENG, J., ZHANG, T., LI, M., TIAN, H. & WANG, C. 2021. Abscisic acid signaling negatively regulates nitrate uptake via phosphorylation of NRT1.1 by SnRK2s in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63, 597-610.
- TAKAHASHI, D., LI, B., NAKAYAMA, T., KAWAMURA, Y. & UEMURA, M. 2013. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance. *Front Plant Sci*, 4, 90.
- TAMURA, T., ASAKURA, T., UEMURA, T., UEDA, T., TERAUCHI, K., MISAKA, T. & ABE, K. 2008. Signal peptide peptidase and its homologs in *Arabidopsis thaliana*- plant tissue-specific expression and distinct subcellular localization. *FEBS Journal*, 275, 34-43.
- TANG, W. & THOMPSON, W. A. 2020. Role of the *Arabidopsis* calcineurin B-like protein-interacting protein kinase CIPK21 in plant cold stress tolerance. *Plant Biotechnology Reports*, 14, 275-291.
- TAYLOR, S. S. & KORNEV, A. P. 2011. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 65-77.
- THELEN, M., ROSEN, A., NAIRN, A. C. & ADEREM, A. 1991. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. 351, 320-322.
- THULEAU, P., SCHROEDER, J. I. & RANJEVA, R. 1998. Recent advances in the regulation of plant calcium channels: evidence for regulation by G-proteins, the cytoskeleton and second messengers. 1, 424-427.
- TISCHER, S. V. 2016. Characterisation of abscisic acid receptor complexes in *Arabidopsis thaliana*.
- TISCHER, S. V., WUNSCHHEL, C., PAPACEK, M., KLEIGREWE, K., HOFMANN, T., CHRISTMANN, A. & GRILL, E. 2017. Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 10280-10285.
- TSAI, T. M., CHEN, Y. R., KAO, T. W., TSAY, W. S., WU, C. P., HUANG, D. D., CHEN, W. H., CHANG, C. C. & HUANG, H. J. 2007. PaCDPK1, a gene encoding calcium-dependent protein kinase from orchid, *Phalaenopsis amabilis*, is induced by cold, wounding, and pathogen challenge. *Plant Cell Rep*, 26, 1899-908.
- TYLER, L., THOMAS, S. G., HU, J., DILL, A., ALONSO, J. M., ECKER, J. R. & SUN, T.-P. 2004. DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135, 1008-1019.
- UEGUCHI-TANAKA, M., NAKAJIMA, M., MOTOYUKI, A. & MATSUOKA, M. 2007. Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 183-198.
- UEMURA, M. & STEPONKUS, P. L. 1994. A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiology*, 104, 479-496.
- ULMASOV, T., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T. J. 1999. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5844-5849.
- UNO, Y., FURIHATA, T., ABE, H., YOSHIDA, R., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 11632-11637.
- URAO, T., KATAGIRI, T., MIZOGUCHI, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., HAYASHIDA, N. & SHINOZAKI, K. 1994. Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. 244.
- VARDHINI, B. V. & ANJUM, N. A. 2015. Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Frontiers in Environmental Science*, 2.
- VARTAK, N., PAPKE, B., HERNAN, ROSSMANNEK, L., WALDMANN, H., HEDBERG, C. & PHILIPPE 2014. The Autodepalmitoylating Activity of APT Maintains the Spatial Organization of Palmitoylated Membrane Proteins. *Biophysical Journal*, 106, 93-105.

Quellen

- VAULTIER, M.-N., CANTREL, C., VERGNOLLE, C., JUSTIN, A.-M., DEMANDRE, C., BENHASSAINE-KESRI, G., ÇIÇEK, D., ZACHOWSKI, A. & RUELLAND, E. 2006. Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in Arabidopsis cells. *FEBS Letters*, 580, 4218-4223.
- VERKRUYSE, L. A. & HOFMANN, S. L. 1996. Lysosomal Targeting of Palmitoyl-protein Thioesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15831-15836.
- VIDAL, E. A., MOYANO, T. C., CANALES, J. & GUTIÉRREZ, R. A. 2014. Nitrogen control of developmental phase transitions in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 65, 5611-5618.
- VISHWAKARMA, K., UPADHYAY, N., KUMAR, N., YADAV, G., SINGH, J., MISHRA, R. K., KUMAR, V., VERMA, R., UPADHYAY, R. G., PANDEY, M. & SHARMA, S. 2017. Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 08.
- WAADT, R., SELLER, C. A., HSU, P.-K., TAKAHASHI, Y., MUNEMASA, S. & SCHROEDER, J. I. 2022. Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 680-694.
- WANG, H., YANG, C., ZHANG, C., WANG, N., LU, D., WANG, J., ZHANG, S., WANG, Z.-X., MA, H. & WANG, X. 2011. Dual role of BK1 and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Developmental cell*, 21, 825-834.
- WANG, J., BEHER, D., NYBORG, A. C., SHEARMAN, M. S., GOLDE, T. E. & GOATE, A. 2006. C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J Neurochem*, 96, 218-27.
- WANG, Q., GUAN, Y., WU, Y., CHEN, H., CHEN, F. & CHU, C. 2008. Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, 67, 589-602.
- WANG, Y., LI, L., YE, T., LU, Y., CHEN, X. & WU, Y. 2013. The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 64, 675-684.
- WANG, Z.-Y., BAI, M.-Y., OH, E. & ZHU, J.-Y. 2012. Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annual Review of Genetics*, 46, 701-724.
- WANG, Z., ZHANG, Y., LIU, Y., FU, D., YOU, Z., HUANG, P., GAO, H., ZHANG, Z. & WANG, C. 2023. Calcium-dependent protein kinases CPK21 and CPK23 phosphorylate and activate the iron-regulated transporter IRT1 to regulate iron deficiency in Arabidopsis. *Science China Life Sciences*.
- WASTERNAK, C. & HAUSE, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111, 1021-1058.
- WEI, X., LIU, S., SUN, C., XIE, G. & WANG, L. 2021. Convergence and Divergence: Signal Perception and Transduction Mechanisms of Cold Stress in Arabidopsis and Rice. *Plants*, 10, 1864.
- WELJIE, A., CLARKE, T., JUFFER, A., HARMON, A. & VOGEL, H. 2000. Comparative modeling studies of the calmodulin-like domain of calcium-dependent protein kinase from soybean. *Proteins*, 39, 343-57.
- WEN, J. Q. 2002. Two Novel Mitogen-Activated Protein Signaling Components, OsMEK1 and OsMAP1, Are Involved in a Moderate Low-Temperature Signaling Pathway in Rice. 129, 1880-1891.
- 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. & HUI, R. 2010. Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17, 596-601.
- WERY, J., SILIM, S. N., KNIGHTS, E. J., MALHOTRA, R. S. & COUSIN, R. 1994. Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. *Euphytica*, 73, 73-83.

Quellen

- WI, S. D., LEE, E. S., PARK, J. H., CHAE, H. B., PAENG, S. K., BAE, S. B., PHAN, T. K. A., KIM, W. Y., YUN, D. J. & LEE, S. Y. 2022. Redox-mediated structural and functional switching of C-repeat binding factors enhances plant cold tolerance. *New Phytologist*, 233, 1067-1073.
- WITHERS, J., YAO, J., MECEY, C., HOWE, G. A., MELOTTO, M. & HE, S. Y. 2012. Transcription factor-dependent nuclear localization of a transcriptional repressor in jasmonate hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 20148-20153.
- WON, S. J., CHEUNG SEE KIT, M. & MARTIN, B. R. 2018. Protein depalmitoylases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 83-98.
- WU, Y., ZHANG, D., CHU, J. Y., BOYLE, P., WANG, Y., BRINDLE, I. D., DE LUCA, V. & DESPRÉS, C. 2012. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell reports*, 1, 639-647.
- WU, Z., LIU, Y., LI, B., XIE, C., ZHU, T., LI, W., FENG, R. & HAN, S. 2021. Comparative transcriptome analysis reveals genetic mechanisms of phenotypic differences between Landsberg erecta-0 and Columbia-0 ecotypes in Arabidopsis. Research Square Platform LLC.
- XIAO, X., LI, X., CHEN, C. & GUO, W. 2020. DR5 is a Suitable System for Studying the Auxin Response in the Poncirus trifoliata-Xanthomonas axonopodis pv. citri Interaction. *Horticultural Plant Journal*, 6, 277-283.
- XIONG, L. & ZHU, J.-K. 2003. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 133, 29-36.
- XU, W. & HUANG, W. 2017. Calcium-Dependent Protein Kinases in Phytohormone Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2436.
- YADAV, S. K. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 515-527.
- YALOVSKY, S. 1999. Lipid modifications of proteins – slipping in and out of membranes. 4, 439-445.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6, 251-64.
- YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225-251.
- YAN, D., EASWARAN, V., CHAU, V., OKAMOTO, M., IERULLO, M., KIMURA, M., ENDO, A., YANO, R., PASHA, A., GONG, Y., BI, Y.-M., PROVART, N., GUTTMAN, D., KRAPP, A., ROTHSTEIN, S. J. & NAMBARA, E. 2016. NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in Arabidopsis. *Nature Communications*, 7, 13179.
- YANG, S. F. & HOFFMAN, N. E. 1984. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, 155-189.
- YANG, Z., LIU, J., TISCHER, S. V., CHRISTMANN, A., WINDISCH, W., SCHNYDER, H. & GRILL, E. 2016. Leveraging abscisic acid receptors for efficient water use in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 6791-6.
- YAO, T., ZHANG, J., XIE, M., YUAN, G., TSCHAPLINSKI, T. J., MUCHERO, W. & CHEN, J. G. 2020. Transcriptional Regulation of Drought Response in Arabidopsis and Woody Plants. *Front Plant Sci*, 11, 572137.
- YING, S., HILL, A. T., PYC, M., ANDERSON, E. M., SNEDDEN, W. A., MULLEN, R. T., SHE, Y.-M. & PLAXTON, W. C. 2017. Regulatory Phosphorylation of Bacterial-Type PEP Carboxylase by the Ca²⁺-Dependent Protein Kinase RcCDPK1 in Developing Castor Oil Seeds *Plant Physiology*, 174, 1012-1027.
- YIP DELORMEL, T. & BOUDSOCQ, M. 2019. Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 224, 585-604.
- YIP DELORMEL, T., AVILA-OSPINA, L., DAVANTURE, M., ZIVY, M., LANG, J., VALENTIN, N., RAYAPURAM, N., HIRT, H., COLCOMBET, J., BOUDSOCQ, M. 2022. In vivo identification of putative CPK5 substrates in Arabidopsis thaliana. *Plant Science*, 314, 111-121
- YOKOI, N., FUKATA, Y., SEKIYA, A., MURAKAMI, T., KOBAYASHI, K. & FUKATA, M. 2016. Identification of PSD-95 Depalmitoylating Enzymes. *The Journal of Neuroscience*, 36, 6431-6444.

Quellen

- YOO, S.-D., CHO, Y.-H. & SHEEN, J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2, 1565-1572.
- YOOK, K. 2005. Complementation. *WormBook*, 1-17.
- YOSHIDA, T., CHRISTMANN, A., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., GRILL, E. & FERNIE, A. R. 2019. Revisiting the Basal Role of ABA - Roles Outside of Stress. *Trends Plant Sci*, 24, 625-635.
- YOSHIDA, T., FUJITA, Y., SAYAMA, H., KIDOKORO, S., MARUYAMA, K., MIZOI, J., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2010. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, 61, 672-685.
- YOUNG, J. J., MEHTA, S., ISRAELSSON, M., GODOSKI, J., GRILL, E. & SCHROEDER, J. I. 2006. CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 7506-7511.
- YUAN, P., YANG, T. & POOVAIAH, B. W. 2018. Calcium Signaling-Mediated Plant Response to Cold Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3896.
- ZAPATA, L., DING, J., WILLING, E.-M., HARTWIG, B., BEZDAN, D., JIAO, W.-B., PATEL, V., VELIKKAKAM JAMES, G., KOORNNEEF, M., OSSOWSKI, S. & SCHNEEBERGER, K. 2016. Chromosome-level assembly of *Arabidopsis thaliana* L *er* reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, E4052-E4060.
- ZEIDMAN, R., JACKSON, C. S. & MAGEE, A. I. 2009. Protein acyl thioesterases (Review). 26, 32-41.
- ZHANG, H., LIU, D., YANG, B., LIU, W.-Z., MU, B., SONG, H., CHEN, B., LI, Y., REN, D., DENG, H. & JIANG, Y.-Q. 2019. Arabidopsis CPK6 positively regulates ABA signaling and drought tolerance through phosphorylating ABA-responsive element-binding factors. *Journal of Experimental Botany*, 71, 188-203.
- ZHANG, H., ZHU, J., GONG, Z. & ZHU, J.-K. 2022. Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 23, 104-119.
- ZHANG, J. Z., CREELMAN, R. A. & ZHU, J.-K. 2004. From Laboratory to Field. Using Information from Arabidopsis to Engineer Salt, Cold, and Drought Tolerance in Crops. *Plant Physiology*, 135, 615-621.
- ZHANG, M. M., ZHANG, H. K., ZHAI, J. F., ZHANG, X. S., SANG, Y. L. & CHENG, Z. J. 2021. ARF4 regulates shoot regeneration through coordination with ARF5 and IAA12. *Plant Cell Reports*, 40, 315-325.
- ZHANG, X. S. & CHOI, J. H. 2001. Molecular Evolution of Calmodulin-Like Domain Protein Kinases (CDPKs) in Plants and Protists. 53, 214-224.
- ZHANG, Y.-L., LI, E., FENG, Q.-N., ZHAO, X.-Y., GE, F.-R., ZHANG, Y. & LI, S. 2015. Protein palmitoylation is critical for the polar growth of root hairs in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 15, 50.
- ZHANG, Y., WANG, Z., LIU, Y., ZHANG, T., LIU, J., YOU, Z., HUANG, P., ZHANG, Z. & WANG, C. 2023. Plasma membrane-associated calcium signaling modulates cadmium transport. *New Phytologist*, 238, 313-331.
- ZHAO, G., CHENG, Q., ZHAO, Y., WU, F., MU, B., GAO, J., YANG, L., YAN, J., ZHANG, H., CUI, X., CHEN, Q., LU, F., AO, Q., AMDOUNI, A., JIANG, Y., YANG, B. 2023. The abscisic acid-responsive element binding factors MAPKKK18 module regulates abscisic acid-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 229.
- ZHAO, L., SHEN, L., ZHANG, W., ZHANG, W., WANG, Y., WU, W. 2013. Ca²⁺-Dependent Protein Kinase11 and 24 Modulate the Activity of the Inward Rectifying K⁺ Channels in *Arabidopsis* Pollen Tubes. *The Plant Cell*, 25, 649-661.
- ZHAO, R., SUN, H.-L., MEI, C., WANG, X.-J., YAN, L., LIU, R., ZHANG, X.-F., WANG, X.-F. & ZHANG, D.-P. 2011. The Arabidopsis Ca²⁺-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytologist*, 192, 61-73.

Quellen

- ZHAO, S., ZHANG, M.-L., MA, T.-L. & WANG, Y. 2016. Phosphorylation of ARF2 Relieves Its Repression of Transcription of the K⁺ Transporter Gene HAK5 in Response to Low Potassium Stress. *The Plant Cell*, 28, 3005-3019.
- ZHENG, X., HE, K., KLEIST, T., CHEN, F. & LUAN, S. 2015. Anion channel *SLAH3* functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 38, 474-486.
- ZHIPONOVA, M. K., VANHOUTTE, I., BOUDOLF, V., BETTI, C., DHONDT, S., COPPENS, F., MYLLE, E., MAES, S., GONZÁLEZ-GARCÍA, M.-P., CAÑO-DELGADO, A. I., INZÉ, D., BEEMSTER, G. T. S., DE VEYLDER, L. & RUSSINOVA, E. 2013. Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and expansion in the leaf. *New Phytologist*, 197, 490-502.
- ZHOU, L., FU, Y., YANG, Z. 2009. A Genome-wide Functional Characterization of *Arabidopsis* Regulatory Calcium Sensors in Pollen Tubes. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51, 751-761
- ZHOU, Y., PAN, Q., PIRES, D. E. V., RODRIGUES, CARLOS H. M. & ASCHER, DAVID B. 2023. DDMut: predicting effects of mutations on protein stability using deep learning. *Nucleic Acids Research*, 51, W122-W128.
- ZHU, J.-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, 66-71.
- 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. & ZHANG, D.-P. 2007. Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 3019-3036.
- ZOU, J. J., WEI, F. J., WANG, C., WU, J. J., RATNASEKERA, D., LIU, W. X. & WU, W. H. 2010. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol*, 154, 1232-43.

7 Danksagung

Zum Abschluss einer langen Zeit an einem tollen (mittlerweile leider nicht mehr existentem) Lehrstuhl und vieler Seiten meiner (wahrscheinlich viel zu lang geratenen) Abschlussarbeit, möchte ich an dieser Stelle den Leuten danken, die den positiven Abschluss erst ermöglicht haben.

Prof. Grill möchte ich für die Vergabe des Themas danken. Trotz vieler Rückschläge stand Prof. Grill mir in den letzten 6.5 Jahren immer mit guten Ratschlägen und viel Verständnis zur Seite und hat es auch dankenswerter Weise auf sich genommen, die vielen hier zu Papier gebrachten Seiten Korrektur zu lesen.

Prof. Grill, Prof. Poppenberger und Prof. Schneitz möchte ich bereits im Voraus für die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Dr. Christine Wurmser möchte ich für die Sequenzierung der *gca*-Mutanten und deren Analyse danken.

Dr. Zhenyu Yang möchte ich für die Durchführung und Auswertung der Blatt-Temperatur-Messungen danken und wünsche ihm, seiner Frau Jinghui und ihrem neugeborenen Kind alles Gute für die Zukunft.

Dr. Arthur Korte möchte ich für beratende Gespräche und das stylische „we grill almost everything“-T-shirt danken.

Dr. Michael Riemann danke ich für seine Unterstützung als Mentor.

Dr. Stefanie Ruschhaupt und Dr. Moritz Ruschhaupt danke ich für die Durchsicht meiner Arbeit, nützlicher Ratschläge und angebrachte Kritik.

Bei einem Thema mit vielen Vorreitern, Vordenkern und allgemein Vorgängern, auf deren Ergebnissen und Überlegungen diese Arbeit im Endeffekt beruht, ist es nur fair auch diese hier zu berücksichtigen. Da wären: Annelie Welker, Arthur Korte, Christian Wellman, Gereon Maximilian Czap, Moritz Ruschhaupt, Stefan Fuchs und Sophie Pleißner.

Großer Dank gebührt meinen Kollegen, ohne deren Unterstützung ich mir den Arbeitsalltag nicht hätte vorstellen können (und wahrscheinlich auch nicht hätte meistern können), und die über die Jahre allesamt zu sehr guten Freunden geworden sind: Moritz und Stefanie (Steffi) Ruschhaupt die mich von Beginn an mit offenen Armen aufgenommen haben und immer sofort zur Stelle sind wenn man sie braucht; Isabel (Isa) Alexandra Doch die (fast) von Beginn an meine Leidensgenossin war und mit der ich viele Therapiestunden auf dem Raucherbalkon und bei Cocktailabenden verbracht habe; Aaron Maximilian Klepper (Kleppi) der zeitweise genauso deprimiert ausgesehen hat wie ich mich gefühlt habe und trotzdem immer tolle Ideen hatte; Lisa (Groß) Bohn die sich trotz ihrer Ordnungsliebe ein

Danksagung

Büro/Labor mit mir teilen musste, mir für viele Fahrlässigkeiten netterweise keinen Kuchenstrich gegeben hat, immer mit Stiften/Medium/Protokollen/Stoppuhren etc ausgeholfen und abends gerne Platten für mich umgestellt hat; Jan (Jay) Röder für die Würdigung meines oftmals verkannten Humors und vieler Biere auf dem Balkon oder vor der Playstation, Christoph (Chrisi) Heidersberger für die stets kompetente Unterstützung im Labor und die Zigarettenleihgaben in absoluten Notfällen.

Zu guter Letzt möchte ich natürlich meiner Familie danken, die mir immer den Rücken freigehalten hat. Besonderer Dank gebührt dabei Sandra, die in den letzten Jahren, zusätzlich zu ihrer Rolle als Ehefrau, auch Therapeutin, Chauffeurin, Organisatorin, Motivatorin und Anker, für mich war. Ich liebe dich über alles.

Da eine gute Danksagung nicht mit einer romantischen Geste enden sollte, möchte ich hier mit dem Zitat schließen, welches auch der Begründer des CPK23-Themas (zumindest an diesem Lehrstuhl) Arthur Korte auf Wunsch seiner Kinder und in Anlehnung an seine Heimatstadt Ahrensburg gewählt hat (Korte, 2009):

„Ich geh jetzt in die (freie) Wirtschaft und trinke ein Bier!“

Auf diese Weise schließt sich der (CPK23-) Kreis. Es ist vielleicht kein perfekter Kreis, und er ist vielleicht auch nicht wirklich geschlossen. Aber der letzte Strich (zumindest an diesem Lehrstuhl), der war von mir.