

Technische Universität München

Lehrstuhl für Botanik

Die Proteinkinase CPK23, Ökotyp-spezifische Unterschiede
und Funktion in der Abscisinsäure-Signaltransduktion

Gereon Ullrich Maximilian Czap

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. Wolfgang Liebl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Erwin Grill

2. Univ.-Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer

Die Dissertation wurde am 15.05.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.07.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung	1
Summary.....	2
1. Einleitung.....	3
1.1. Pflanzenhormone.....	3
1.2. Abscisinsäure – Biosynthese und Abbau	5
1.3. ABA Signaltransduktion	7
1.3.1. Der ABA Rezeptorkomplex.....	8
1.3.2. SnRK2 Kinasen – zentrale Regulatoren der ABA Antwort	10
1.3.3. Transkriptionsfaktoren in der ABA Signaltransduktion	12
1.4. Die Integration von Ca ²⁺ Signalen in die ABA Signaltransduktion	14
1.4.1. Calcium abhängige Proteinkinasen.....	15
1.4.2. Die ABA insensitive Mutante <i>gca2</i>	19
1.5. Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.2. Geräte.....	21
2.3. Software	22
2.4. Bakterien- und Hefestämme.....	23
2.5. Arbeiten mit DNA.....	25
2.5.1. Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i>	25
2.5.2. Genomische DNA Präparation aus Pflanze.....	26
2.5.3. Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation von DNA Fragmenten	27
2.5.4. Agarose Gelelektrophorese.....	27
2.5.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	28
2.5.6. Polymerase Kettenreaktion.....	28
2.5.7. Quantitative <i>realtime</i> PCR.....	30
2.6. Arbeiten mit RNA.....	30
2.6.1. RNA Präparation aus pflanzlichem Gewebe.....	30

2.6.2.	cDNA Synthese	31
2.7.	Arbeiten mit Hefe.....	31
2.7.1.	Hefe-Transformation	31
2.7.2.	Histidin Autotrophie Wachstums-Tests (Y2H)	32
2.7.3.	Genaustausch in Hefe	32
2.7.4.	<i>In vivo</i> Luciferase Messung in Hefe.....	33
2.8.	Arbeiten mit Protoplasten	33
2.8.1.	Herstellung der Enzymlösung für die Protoplastenpräparation	33
2.8.2.	Protoplastenpräparation.....	34
2.8.3.	Protoplastentransfektion	34
2.8.4.	Enzymatische Messungen in Protoplasten.....	35
2.9.	Arbeiten mit Pflanzen.....	36
2.9.1.	Anzuchtbedingungen	36
2.9.2.	Samensterilisation	36
2.9.3.	Pflanzentransformation	37
2.9.4.	Physiologische Untersuchungen.....	38
3.	Ergebnisse.....	41
3.1.	Calcium abhängige Proteinkinasen in der ABA-Signaltransduktion	41
3.1.1.	Physiologische Untersuchungen von CPK <i>knockout</i> Pflanzen.....	43
3.1.2.	CPKs im transienten Reportersystem.....	47
3.2.	Ansätze zum gerichteten Gen- <i>knockout</i>	50
3.2.1.	Gen- <i>knockout</i> mittels TAL Effektor Nukleasen	51
3.2.2.	Gen- <i>knockout</i> mittels artifizieller micro RNA	53
3.3.	Natürliche Diversität des CPK23 Locus	56
3.3.1.	Funktionelle Analyse von CPK23 unterschiedlicher Arabidopsis Ökotypen	57
3.3.2.	Bestimmung essentieller Unterschiede der CPK23 Proteinstruktur	60
3.4.	Funktion von CPK23 in der Abscisinsäure Signaltransduktion	68
3.4.1.	Regulation und Interaktion mit Protein Phosphatasen vom Typ2C.....	68
3.4.2.	Regulation und Interaktion mit bZip Transkriptionsfaktoren	71
3.4.3.	Analyse der putativen CPK23 - OST1 Interaktion.....	75
3.5.	Entwicklung eines heterologen Hefe-Reportersystems	82
3.5.1.	Transkriptionelle Regulation in Hefe durch HD-Zip Transkriptionsfaktoren	82
3.5.2.	Konstruktion eines ABRE/ABF Reportersystems.....	86
4.	Diskussion.....	89
4.1.	Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion.....	89

Inhaltsverzeichnis

4.1.1.	Genereller Effekt auf die ABA abhängige Genexpression	89
4.1.2.	Verhältnis zu den Kernkomponenten der ABA Signaltransduktion	92
4.2.	Integration von Ca ²⁺ Signalen in die ABA Signaltransduktion durch CPK23.....	100
4.3.	Funktionelle Redundanz zu CPK23.....	104
4.4.	Genetische Variabilität am CPK23 Locus	108
4.5.	Grundlagen der funktionellen Variabilität von CPK23.....	113
5.	Anhang	119
	Literaturverzeichnis.....	133
	Danksagung.....	155

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Übersicht der wichtigsten Phytohormon Gruppen	4
Abbildung 1.2 Biosynthese von Abscisinsäure in Pflanzen.....	6
Abbildung 1.3 Abbau von Abscisinsäure über 7'-, 8'- und 9'-Hydroxylierung	7
Abbildung 1.4 Übersicht der ABA Signaltransduktion.....	8
Abbildung 1.5 Die Familie der ABA Rezeptor Proteine	9
Abbildung 1.6 Proteinkomplexe von PP2Cs mit SnRK2.6 und RCAR14.....	11
Abbildung 1.7 Übersicht Calcium abhängiger Proteinkinasen in Arabidopsis	16
Abbildung 1.8 Ca ²⁺ abhängige Konformationsänderung und Aktivierung von CPKs	17
Abbildung 3.1 Genmodelle von CPK15, CPK21 und CPK23.....	42
Abbildung 3.2 Genomorganisation von CPK15, CPK21 und CPK23.....	42
Abbildung 3.3 Keimungsrate von CPK KO Linien in Abhängigkeit von ABA	44
Abbildung 3.4 Wurzelwachstum von CPK KO Linien in Abhängigkeit von ABA	45
Abbildung 3.5 Blatt-Oberflächentemperatur von CPK KO Pflanzen in Abhängigkeit von ABA.....	46
Abbildung 3.6 Herstellung konstitutiv aktiver (-ca) und inaktiver (-na) CPK Versionen.....	48
Abbildung 3.7 Einfluss von CPKs auf die Genexpression im transienten Reportersystem	49
Abbildung 3.8 Gerichteter Gen- <i>knockout</i> von CPK21 mit TAL Effektor Nukleasen	51
Abbildung 3.9 TALEN Expressionsstärke transgener Linien.....	52
Abbildung 3.10 <i>Silencing</i> von CPK21 und CPK23 mittels amiRNA	54
Abbildung 3.11 Effekt verschiedener amiRNA Konstrukte auf die CPK21/CPK23 Genexpression	54
Abbildung 3.12 Schematischer CPK23 Aminosäure-Sequenzvergleich unterschiedlicher <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotypen.....	57
Abbildung 3.13 Transiente Expression von CPK23-ca verschiedener Arabidopsis Ökotypen.....	58
Abbildung 3.14 Transiente Expression von GCA2-ca in Abhängigkeit von DNA Menge und ABA	59
Abbildung 3.15 Aminosäure <i>alignment</i> des N-Terminus von CPK23 Ler-0/Col-0.....	61
Abbildung 3.16 Konstruktion und Expression von Ler-0/ Col-0 CPK23 Chimären Proteinen.....	62
Abbildung 3.17 Transiente Expression von GCA2 Y44 <i>phosphosite</i> Mutationen	63
Abbildung 3.18 Transiente Expression von GCA2/CPK23 S218 <i>phosphosite</i> Mutationen	65
Abbildung 3.19 Aminosäure <i>alignment</i> der Kinasedomäne von CPK23 aus Ler-0/Col-0/Bur-0	66
Abbildung 3.20 Transiente Expression von GCA2/CPK23 Bur-0 Punktmutationen	67
Abbildung 3.21 Y2H Interaktionsstudie zwischen GCA2/CPK23 und PP2CA.....	69
Abbildung 3.22 Transiente Co-Expression von CPK23 mit PP2Cs	71
Abbildung 3.23 Transiente Co-Expression von CPK23 und OST1 mit ABFs	72
Abbildung 3.24 Transiente Co-Expression von SnRK 2.2 und 2.3 mit ABFs.....	73
Abbildung 3.25 Y2H Interaktionsstudie zwischen GCA2/CPK23/OST1 und ABFs.....	75
Abbildung 3.26 OST1 Phosphorylierungstellen im GCA2 Protein	76
Abbildung 3.27 Transiente Expression von CPK23-ca T317 <i>phosphosite</i> Mutationen	77

Abbildung 3.28 Transiente Expression von GCA2/CPK23 T213 <i>phosphosite</i> Mutationen.....	78
Abbildung 3.29 Schematischer Aufbau und Funktion eines artifiziellen ABRE Reporterkonstrukts.....	80
Abbildung 3.30 Transiente Co-Expression von OST1 und CPK23	81
Abbildung 3.31 Schematische Aufbau artifizieller HBBE Reporterkonstrukte	83
Abbildung 3.32 Schematische Darstellung der Integration eines Reporterkonstrukts ins Hefe-Genom	85
Abbildung 3.33 Transkriptionelle Regulation durch HD-Zip Transkriptionsfaktoren in Hefe	86
Abbildung 3.34 Schematischer Aufbau und Test eines artifiziellen ABRE Reporterkonstrukts in Hefe.....	87
Abbildung 4.1 Modell des ABA abhängigen GCA2 Effekts.....	91
Abbildung 4.2 Postuliertes Modell der Interaktion zwischen CPK23 und PP2Cs	93
Abbildung 4.3 Strukturmodell der Kinase-Domäne von GCA2	95
Abbildung 4.4 <i>Alignment</i> des aktiven Zentrums verschiedener Kinasen mit GCA2/CPK23	96
Abbildung 4.5 Mögliche Mechanismen der Repression von OST1 durch CPK23.....	97
Abbildung 4.6 Angenommene Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion.....	99
Abbildung 4.7 Ca ²⁺ Regulation von CPK21 und CPK23.....	100
Abbildung 4.8 Ca ²⁺ Signatur der <i>gca2</i> Mutante nach Ca ²⁺ oder ABA Applikation.....	101
Abbildung 4.9 Mögliches Modell der Aktivierung von CPK23 durch Ca ²⁺ und Autophosphorylierung.....	102
Abbildung 4.10 CPK Proteinfamilie und Gencluster auf Chr. IV.....	105
Abbildung 4.11 CPK23 Promotorvergleich zwischen Ler-0 und Col-0 sowie Ökotyp-Expressionsunterschiede	111
Abbildung 4.12 Mögliche regulatorische Stellen im N-Terminus von CPK23.....	115
Abbildung 4.13 Strukturmodell von GCA2 und Position von S290	116
Abbildung 5.1 TALEN Expression in Protoplasten und Verifizierung mittels Restriktionsverdau	119
Tabelle 1 Klassen an der ABA Signaltransduktion beteiligter Transkriptionsfaktoren.....	12
Tabelle 2 Verwendete Oligonukleotide	128
Tabelle 3 Verwendete Plasmide	131

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ABF	ABRE <i>binding factor</i>
ABRE	ABA <i>response element</i>
AREB	ABA- <i>response element binding protein</i>
ABI	ABA <i>insensitive</i>
AFP	ABI <i>five binding protein</i>
AD	Aktivierungsdomäne
AS	Aminosäure
amiRNA	<i>artificial micro RNA</i>
bp	Basenpaare
bZip	<i>Basic leucin zipper</i>
BD	Bindedomäne
BIFC	Bifluoreszenz Komplementation
BSA	Bovine serum albumin
cADP	cyclisches Adenosin Diphosphat
CPK	Calcium abhängige Proteinkinase
CIPK	<i>CBL interacting protein kinase</i>
CBL	Calcineurin <i>b-like</i>
CDS	codierende Sequenz
CML	Calmodulin
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
(c)M	(centi)Morgan
cfu	<i>Colony forming units</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
EF	Elongations Faktor
HD-Zip	Homöodomäne <i>Leucin zipper</i>
HBBE	HD-ZIP <i>binding element</i>
IAA	Indol-3-essigsäure
IP3	Inositoltrisphosphat
Da	Dalton

KO	<i>Knockout</i>
LAR	<i>Luciferase assay reagent</i>
LB	Luria-Bertani
MS	Massenspektrometer
MS	Murashige-Skoog
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MQ	MiliQ
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i>
PP2C	Protein Phosphatase Type 2C
PYR	<i>Pyrabactin resistant</i>
PYL	<i>PYR1-like</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RCAR	<i>Regulatory component of ABA receptor</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
SnRK2	<i>Sucrose non fermenting1 related protein kinase</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SDM	<i>Site directed mutagenesis</i>
SD	<i>Synthetic Dextrose</i>
TALE(N)	<i>Transcription activator like effector (nuclease)</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TF	Transkriptionsfaktor
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
Y2H	<i>Yeast two hybrid</i>
Y3H	<i>Yeast three hybrid</i>
ZFN	<i>Zink finger nuclease</i>
5-FOA	<i>5-Fluoroorotic acid</i>

Zusammenfassung

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) spielt eine zentrale Rolle in der Adaption der Pflanze an abiotische Stressbedingungen wie Kälte, Salz und Trockenheit. Es führt zu einer Inhibierung der Keimung und des vegetativen Wachstums, zur Schließung der Spaltöffnungen der Blätter und zu umfangreichen Veränderungen im Metabolismus der Pflanze. Eine der ersten messbaren Reaktionen ist das Auftreten von Oszillationen der cytosolischen Calcium Konzentration in Schließzellen. Calcium ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, seine Funktion in der ABA Signaltransduktion und die Art und Weise wie Ca^{2+} Konzentrationsschwankungen in konkrete zelluläre Antworten übersetzt werden, ist bisher nur teilweise verstanden. Von zentraler Bedeutung für die Decodierung des Calcium Signals ist die Familie der Calcium abhängigen Proteinkinasen (CPKs). In dieser Arbeit wurde der Effekt eines Mitglieds dieser Proteinfamilie, CPK23, auf die ABA abhängige Genexpression näher untersucht und seine Funktion in der ABA Signaltransduktion analysiert. Durch transiente Expression in Arabidopsis Mesophyll Protoplasten konnte gezeigt werden, dass CPK23 eine Reihe an bZip Transkriptionsfaktoren spezifisch aktiviert und als positiver Regulator der ABA Signaltransduktion wirkt. Transgene CPK23 *knockout* Pflanzen zeigen jedoch keinen nennenswerten ABA abhängigen Phänotyp in physiologischen Reaktionen, wahrscheinlich bedingt durch genetische Redundanz innerhalb der CPK Genfamilie. Um diesem Problem zu begegnen wurden Ansätze zum gezielten Gen *knockout* verwendet. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein heterologes Hefereportersystem etabliert, um die ABA Signaltransduktion näher zu untersuchen. Durch die Verwendung von *yeast two hybrid* konnte gezeigt werden, dass CPK23 auch mit Proteinphosphatasen vom Typ 2C interagiert, sowie die SnRK2 Kinase OST1. Diese beiden Proteinkinasen sind positive Regulatoren der ABA Signaltransduktion und werden möglicherweise vergleichbar durch PP2Cs reguliert. Diese Arbeit belegt auch eine gegenseitige Regulation der beiden Kinasen, die Phosphorylierungsschritte beinhaltet und Teil eines Feedback Mechanismus der ABA Signaltransduktion sein könnte. CPK23 fungiert als positiver Regulator und integriert als solcher potenziell Calcium Signale in die ABA Signaltransduktion. Darüber hinaus zeigt sich am CPK23 Locus ein hohes Maß an Sequenzvariabilität in verschiedenen Arabidopsis Ökotypen. Diese Sequenzvariabilität korreliert mit einem funktionellen Unterschied der verschiedenen CPK23 Proteine *in vivo*. Diese Arbeit hat die molekularen Grundlagen untersucht, die verantwortlich für diese funktionellen Unterschiede sind und diskutiert die Frage, ob der CPK23 Locus die ABA Sensitivität der Pflanze als Ganzes beeinflussen kann.

Summary

The phytohormone abscisic acid (ABA) plays a central role in plant adaptive responses to abiotic stress factors such as drought, salt and cold. It leads to an inhibition of seed germination and vegetative growth, promotes the closure of leaf stomata and leads to a reprogramming of plant metabolism. In an early response, ABA leads to oscillations in cytosolic guard cell calcium concentrations. Calcium is an important secondary messenger. Our understanding of its role in ABA signaling, however, and the way fluctuations of Ca^{2+} concentration are translated into distinct cellular responses remains fragmentary. One major class of proteins responsible for decoding the calcium signal comprises calcium dependent protein kinases (CPKs). This thesis explores the effect of one member of this protein family, CPK23, on ABA dependent gene expression and its function in the ABA signal transduction cascade. Through transient expression in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts, CPK23 was shown to directly activate a number of bZip transcription factors and to thereby positively regulate ABA sensitivity. Transgenic CPK23 KO lines, however, do not show a substantial ABA related phenotype in physiologic responses, which is likely due to genetic redundancy within the CPK gene family. To overcome this issue, targeted gene knockout approaches have been utilized. In addition, a heterologous yeast reporter system has been established within this study to probe ABA signaling. By the use of yeast two hybrid it has been shown that CPK23 also interacts with protein phosphatases of type 2C, as does the SnRK2 kinase OST1. Both kinases seem to be similarly regulated by PP2Cs and function in ABA signaling synergistically as positive regulators. This study, however, also gives evidence for mutual regulation of both kinases, likely including phosphorylation, which may reflect a feedback mechanism in ABA signaling. CPK23 acts as a positive regulator and possibly integrates oscillations of intracellular Ca^{2+} concentrations in the ABA signal transduction cascade. In addition, CPK23 shows a high degree of sequence variability in *Arabidopsis* accessions. This sequence variability correlates with a distinct *in vivo* function of the different CPK23 proteins. This thesis has investigated the molecular mechanisms underlying this functional difference and discusses the question as to whether the CPK23 locus directly influences ABA sensitivity at an organismic level.

1. Einleitung

1.1. Pflanzenhormone

Als ortsgebundene Organismen sind Pflanzen darauf angewiesen Entwicklung und Wachstum den vorherrschenden Umweltbedingungen anzupassen. Da Pflanzen kein Nervensystem wie Tiere besitzen, können Anpassungen nur auf chemischer Basis durch Botenstoffe (Hormone) vermittelt werden. Pflanzliche Hormone (Phytohormone) sind wie tierische Steroidhormone bereits in niedrigen Konzentrationen wirksam, werden allerdings nicht in speziellen Drüsen gebildet und wirken in der Regel auf unterschiedliche Gewebe. Grundsätzlich kann man unterscheiden zwischen wachstumsfördernden Hormonen und wachstumshemmenden (Iten et al., 1999). Die Einteilung in die verschiedenen Hormon-Klassen geschieht dabei nicht zwangsläufig nach chemischer Struktur sondern auch nach Wirkungsweise, weshalb zum Teil sehr unterschiedliche Verbindungen in den verschiedenen Klassen zusammengefasst sind. Abbildung 1.1 zeigt einen bekannten Vertreter sowie Hauptfunktionen der einzelnen Phytohormone. Neben den abgebildeten, schon lange bekannten Phytohormon-Klassen werden neuerdings auch Strigolactone zu den Phytohormonen gezählt, die sich von den Carotinoiden ableiten und in verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt sind (Cheng et al., 2013). Manche Autoren zählen außerdem Peptide zu den Phytohormonen zum Beispiel Systemine, die in der Wundreaktion eine Rolle spielen (Ryan und Pearce, 2003).

Zu den wachstumsfördernden Hormonen gehört Auxin, das das Streckungswachstum, sekundäre Wurzelbildung und die Zellteilung fördert, sowie für die Apikaldominanz verantwortlich ist (Davies, 2010). Brassinosteroide induzieren das Streckungswachstum, sind für die Zelldifferenzierung wichtig und spielen darüber hinaus eine Rolle in abiotischen und biotischen Stressreaktionen (Müssig und Altmann, 1999; Bajguz und Hayat, 2009). Gibberelline induzieren nicht nur Streckungswachstum, sondern auch Blütenbildung und Keimung (Hooley, 1994). Cytokinine fördern, wie der Name ausdrückt, in erster Linie die Zellteilung und wirken Seneszenz hemmend (Gan und Amasino, 1995; Werner et al., 2001).

Auf der Seite der wachstumshemmenden Phytohormone befinden sich Jasmon- und Salizylsäure, die wichtige Botenstoffe in der Pathogenabwehr sind (Delaney et al., 1994; Campos et al., 2014). Außerdem Ethylen das zur Fruchtreife führt und die Seneszenz beschleunigt. Darüber hinaus beeinflusst es den polaren IAA Transport und fördert den Blattfall (Abeles et al., 1992; Negi et al., 2008).

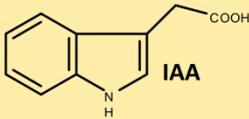
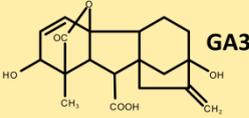
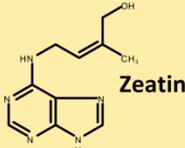
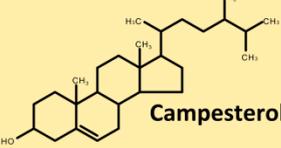
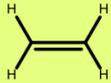
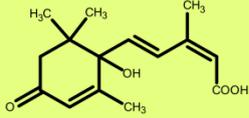
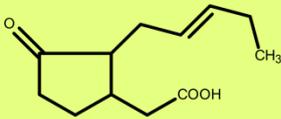
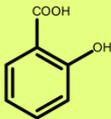
Hormon	Vertreter	Funktion
Auxine	 IAA	Streckungswachstum, Zellteilung, Seitenwurzeln, Apikaldominanz
Gibberelline	 GA3	Streckungswachstum, Keimung, Blütenbildung
Cytokinine	 Zeatin	Zellteilung, Seneszenz
Brassinosteroide	 Campesterol	Streckungswachstum, biotischer/ abiotischer Stress, Zelldifferenzierung
Ethylen		Fruchtreifung, Seneszenz, Epinastie
Abscisinsäure	 H ₃ C, CH ₃ , OH, COOH	Regulation der Spaltöffnungen, Keimruhe, Trocken- und Kältetoleranz
Jasmonsäure	 O, COOH, CH ₃	Pathogen- und Wundreaktion
Salizylsäure	 COOH, OH	Thermogenesis, Pathogen Abwehr

Abbildung 1.1 Übersicht der wichtigsten Phytohormon Gruppen

Einteilung der wichtigsten Phytohormon Gruppen in wachstumsfördernde (gelbe Box) und wachstumshemmende (grüne Box) Substanzen. Jeweils ein typischer Vertreter jeder Gruppe ist gezeigt und die Funktionen in physiologischen Abläufen angegeben.

Abscisinsäure (ABA), die zentraler Gegenstand dieser Arbeit ist, spielt eine wichtige Funktion in der Regulation der Spaltöffnungen (Kim et al., 2010), wirkt in der Keimung antagonistisch zu Gibberellin (Huttly und Baulcombe, 1989) und ist für Trocken-, Salz- und Kältetoleranz der Pflanze wichtig (Christmann et al., 2006), indem sie zum Beispiel zur Akkumulation von osmoprotektiven Substanzen wie Prolin beiträgt (Verslues und Bray, 2006). Neben diesen sehr prominenten Funktionen ist ABA auch in anderen Stressantworten beteiligt, wie dem Schutz vor hohen Lichtintensitäten (Yang et al., 2006; Galvez-Valdivieso et al., 2009) oder in der Pathogenabwehr (Melotto et al., 2006; Adie et al.,

2007). ABA ist allerdings nicht nur ein „Stresshormon“, es ist auch für die normale pflanzliche Entwicklung von Bedeutung (Barrero et al., 2005).

Da verschiedene Phytohormone zum Teil antagonistisch wirken (Anderson et al., 2004; Mur et al., 2006; Han et al., 2009; Bishopp et al., 2011), wird angenommen, dass das Verhalten der Pflanze durch Konzentrationsverhältnisse bestimmt wird, die durch Synthese und Abbau laufend verändert werden können. Im Folgenden soll daher kurz die ABA Biosynthese und der Katabolismus zusammengefasst werden.

1.2. Abscisinsäure – Biosynthese und Abbau

ABA wurde ursprünglich das erste Mal 1963 aus Baumwollfrüchten isoliert und als Fruchtfall fördernde Substanz beschrieben (Ohkuma et al., 1963). Chemisch gesehen handelt es sich um ein monozyklisches Sesquiterpen (3-Methyl-5-(1'-hydroxy-4'-oxo-2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexen-1'-yl)-cis-2,4-pentadiensäure), das man in einer Vielzahl unterschiedlicher Organsimen gefunden hat (Hartung, 2010), unter anderem auch beim Menschen (Bruzzone et al., 2007; Li et al., 2011). In höheren Pflanzen erfolgt die Biosynthese hauptsächlich in Schließzellen, Zellen des Leitgewebes und der Wurzel über die Bildung von Xanthoxin aus dem Carotinoid Zeaxanthin (Abb. 1.2). Zeaxanthin wird plastidär über den Methylerythritol-4-Phosphat-Weg gebildet (Lichtenthaler et al., 1997; Eisenreich et al., 2004). Durch Umwandlung und Spaltung des C₄₀-Carotinoids durch 9-cis Epoxy-carotinoid-Dehydrogenasen (NCEDs) entsteht Xanthoxin (Tan et al., 2003), das ins Cytosol transportiert wird und in zwei weiteren Reaktionsschritten zu Abscisinsäure umgewandelt wird. Die Enzyme der ABA Biosynthese sind weitgehend bekannt (Nambara und Marion-Poll, 2005) und es wurden verschiedene Biosynthese Mutanten mit deutlich reduzierten endogenen ABA Konzentrationen isoliert (Bittner et al., 2001; Xiong et al., 2002; Gonzalez-Guzman et al., 2002; Gonzalez-Guzman et al., 2004; North et al., 2007).

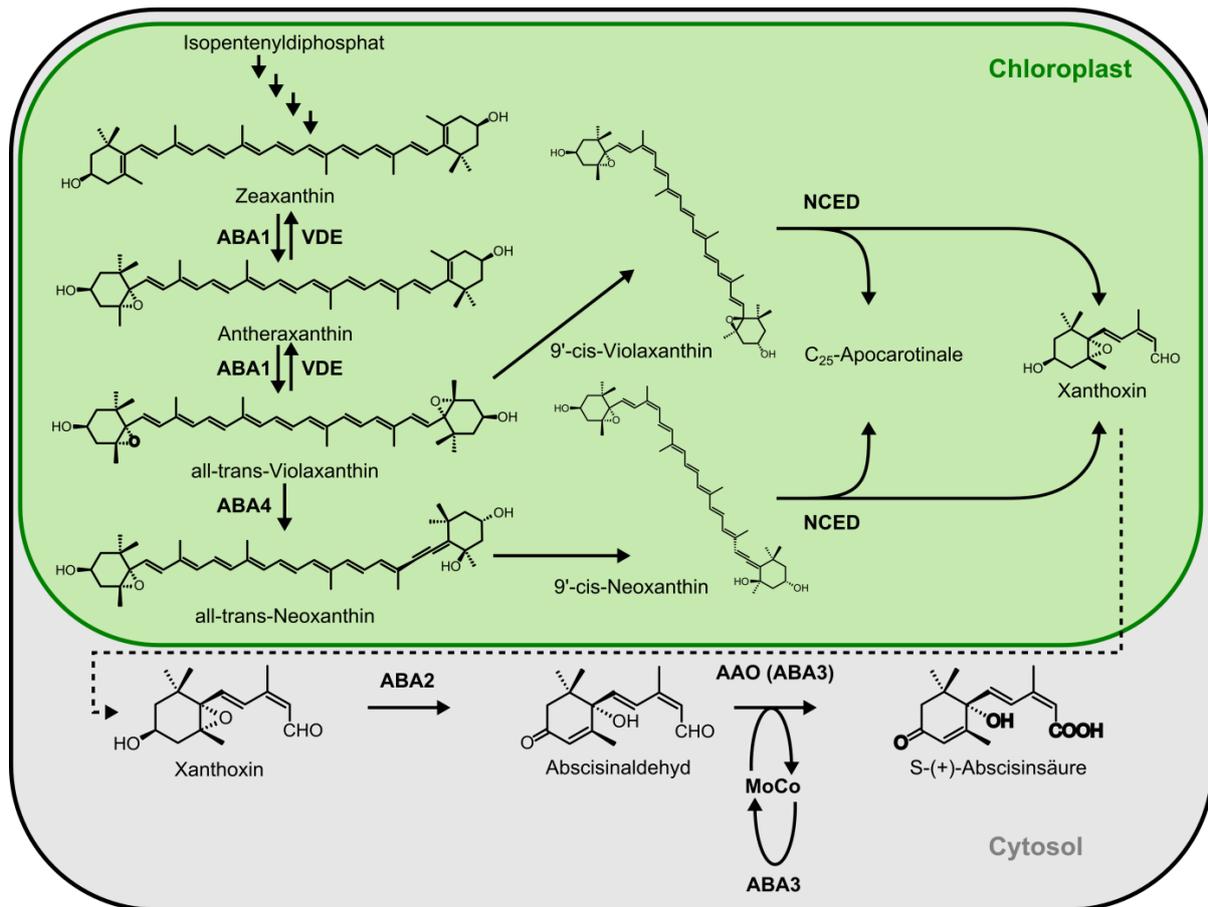


Abbildung 1.2 Biosynthese von Abscisinsäure in Pflanzen

Bildung von Abscisinsäure aus dem C₄₀ Carotinoid Zeaxanthin im Chloroplasten. Zeaxanthin wird aus Isopentenylidiphosphat über den Methylerythritol-4-Phosphat-Weg gebildet. Durch die Beteiligung der Enzyme ABA1 und NCED entsteht in mehreren Reaktionsschritten Xanthoxin. Xanthoxin wird aus dem Chloroplasten ins Cytosol exportiert und in zwei weiteren Reaktionsschritten, katalysiert von den Enzymen ABA2 und AAO3, in Abscisinsäure umgewandelt. Abbildung aus (Wellmann, 2013).

Der Abbau von ABA erfolgt einerseits durch Hydroxylierung entweder am C'7, C'8 oder C'9 Atom (Abb. 1.3) (Kushiro et al., 2004; Zhou et al., 2004), andererseits durch reversible Glucoseester-Konjugat Bildung (Xu et al., 2002; Priest et al., 2006). Der Hauptabbauweg wird durch eine Cytochrom P450 Monooxygenase katalysiert und führt zur Bildung von 8'OH ABA, das letztendlich zu Phaseinsäure bzw. Dihydrophaseinsäure umgewandelt wird. Einige ABA Abbauprodukte zeigen noch biologische Aktivität (Jadhav et al., 2008; Kepka et al., 2011). Die Bildung von Glucoseester-Konjugaten stellt möglicherweise eine Speicherform von ABA dar. Durch die beiden β-Glucosidasen AtBG1 und AtBG2 können die Glucoseester im endoplasmatischen Retikulum beziehungsweise der Vakuole wieder in freies ABA umgewandelt werden (Lee et al., 2006; Xu et al., 2012).

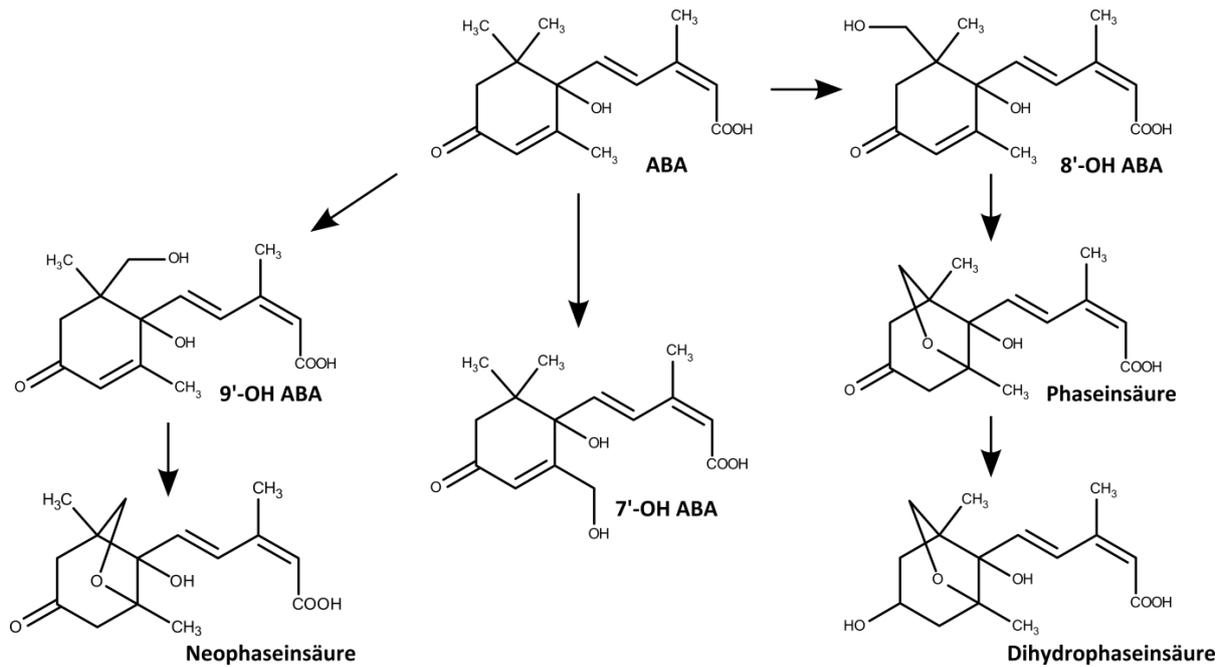


Abbildung 1.3 Abbau von Abscisinsäure über 7'-, 8'- und 9'-Hydroxylierung

Oxidativer Abbau von ABA über Hydroxylierung an den C'7, C'8 und C'9 Atomen und anschließende Oxidation zu Phaseinsäure, Dihydrophaseinsäure oder Neophaseinsäure.

1.3. ABA Signaltransduktion

Um seine Funktion in den verschiedenen physiologischen Prozessen ausführen zu können, muss ABA als Signal erkannt und über eine Signaltransduktionskette in konkrete zelluläre Antworten übersetzt werden. Der erste Schritt einer jeden Signalkaskade ist die Bindung des Liganden an einen Rezeptor. Ist der Ligand nicht membrangängig, beziehungsweise sind keine Transportmechanismen vorhanden, handelt es sich für gewöhnlich um einen membranständigen Rezeptor. ABA wird allerdings durch Transportproteine aktiv in die Zelle transportiert (Kang et al., 2010; Kuromori et al., 2010; Kuromori et al., 2011) und dort durch einen cytosolischen Rezeptor gebunden (Ma et al., 2009). Nach Perzeption des Signals muss dieses in zelluläre Signale übersetzt werden. Dies geschieht durch verschiedene an der Signaltransduktion beteiligte Proteine, dabei sind Proteinkinasen zwischengeschaltet sowie sekundäre Botenstoffe, unter anderem cADP-Ribose, IP₃, H₂O₂ oder Ca²⁺ (Schroeder et al., 2001). Die am Ende der Signaltransduktionskette stehenden Proteine sorgen für die Übersetzung in zelluläre Antworten. In der ABA Signaltransduktion handelt es sich dabei vor allem um zwei Klassen an Proteinen. Einerseits Ionenkanäle (Kim et al., 2010), die für eine sehr schnelle Reaktion, die Schließung der Spaltöffnung verantwortlich sind. Diese Reaktion läuft innerhalb von weniger als 30 Minuten ab (Christmann et al., 2007). Andererseits Transkriptionsfaktoren, die für eine Langzeitadaption verantwortlich sind, und zu einer Veränderung der Genexpressionsmuster führen

(Fujita et al., 2011). Die ABA Signaltransduktion ist grob schematisch in Abbildung 1.4 gezeigt. Im Folgenden werden die Kernkomponenten genauer im Detail vorgestellt.

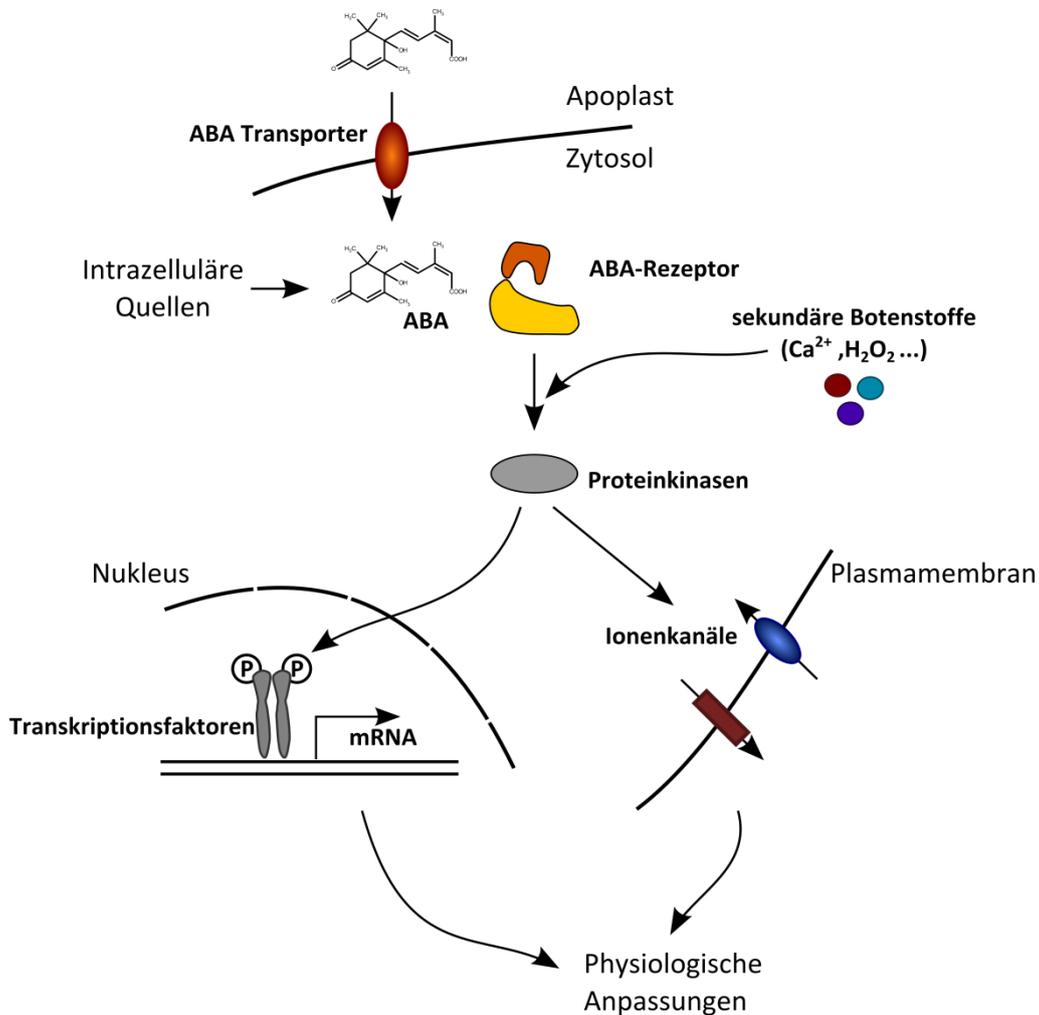


Abbildung 1.4 Übersicht der ABA Signaltransduktion

Vereinfachte Darstellung der ABA Signaltransduktion. ABA wird entweder über Transportproteine aus dem Apoplasten in die Zelle transportiert oder entstammt intrazellulären Quellen, zum Beispiel aus der Spaltung von ABA-Glucoseestern in der Vakuole. ABA wird von einem cytosolisch löslichen Rezeptor gebunden. Die Signaltransduktion umfasst eine Reihe sekundärer Botenstoffe und führt unter Beteiligung von Proteinkinasen zur Regulation von Transkriptionsfaktoren und Ionenkanälen. Diese vermitteln dann die Umsetzung des Signals in physiologische Anpassungen, wie die Schließung der Spaltöffnungen oder Inhibierung von Keimung und Wurzelwachstum.

1.3.1. Der ABA Rezeptorkomplex

2009 gelang zwei Gruppen parallel die Charakterisierung einer Familie von kleinen, etwa 20 kDa großen, cytosolischen Proteinen (Park et al., 2009; Ma et al., 2009). Diese Familie interagiert mit und inhibiert Protein Phosphatasen vom Typ 2C (PP2C), die lange bekannte negative Regulatoren der ABA Signaltransduktion sind. Wie gezeigt werden konnte, geschieht dies durch Bindung und Komplexbildung mit ABA beziehungsweise dem synthetischen ABA Agonist Pyrabactin. Damit war,

nach zuvor gehender langer Suche, der ABA Rezeptor gefunden. Als Bezeichnungen wurde PYR/PYL (für Pyrabactin *resistant* bzw. *PYR1-like*) beziehungsweise RCAR (*regulatory component of ABA receptor*) gewählt (diese Arbeit verwendet im Weiteren Letztere Bezeichnung). Zwar binden RCARs ABA auch allein, allerdings erhöht die Komplexbildung mit PP2Cs die Affinität deutlich und erlaubt eine Bindung im nano-molaren Konzentrationsbereich (Ma et al., 2009; Szostkiewicz et al., 2010; Fuchs et al., 2014). Insofern handelt es sich um einen Rezeptorkomplex mit den PP2Cs als Co-Rezeptoren. Insgesamt gibt es im Arabidopsis Genom 14 RCARs, die sich in 3 Untergruppen auf Basis ihrer Sequenzhomologie einteilen lassen (Abb. 1.5a) und zur Superfamilie der Bet V1 *like* Proteine gehören. RCARs binden spezifisch S-ABA, und mit deutlich niedrigerer Affinität auch die Stereoisomere R-ABA und RS-trans ABA (Ma et al., 2009). Durch Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung in zwei benachbarten *loops* des RCAR Proteins (Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009). Dadurch wird ein geeigneter Bereich zur Interaktion und Bildung des ternären Komplexes mit PP2Cs geschaffen (Yin et al., 2009). PP2Cs tragen durch ein konserviertes Tryptophan (Abb. 1.5b) direkt zur ABA Bindung bei und stabilisieren gleichzeitig den Komplex aus RCAR und ABA, wodurch die Affinität deutlich erhöht wird (Santiago et al., 2009).

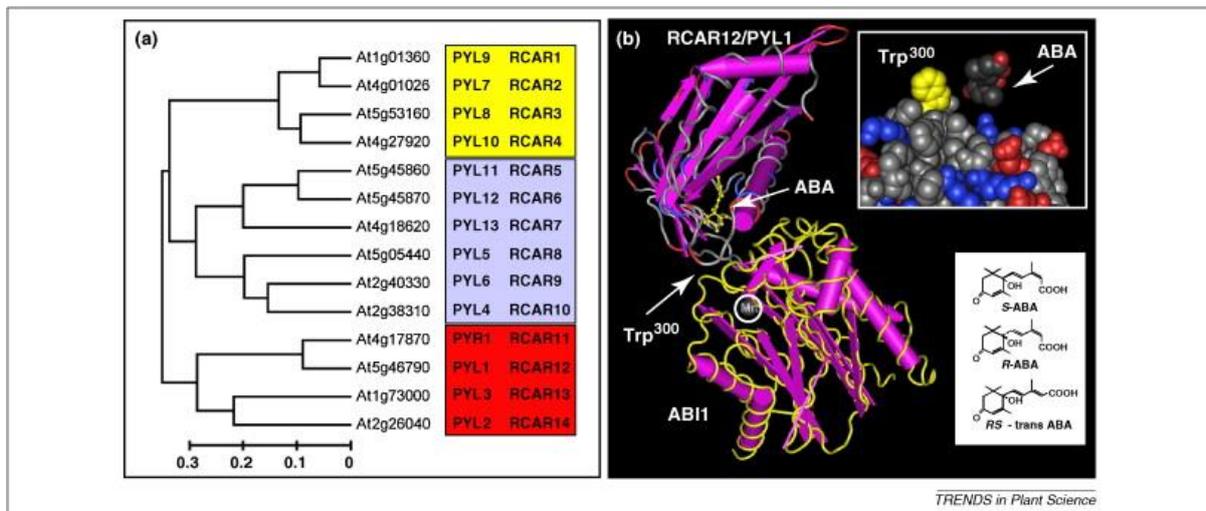


Abbildung 1.5 Die Familie der ABA Rezeptor Proteine

Phylogenetischer Stammbaum (a) der RCAR/PYL Proteine Familie. Die Proteine können in drei Untergruppen eingeteilt werden (I in gelb, II in grau und III in rot). Struktur des ternären Komplexes aus RCAR12, ABA und der Protein Phosphatase ABI1 (b). Tryptophan 300 der Phosphatase ist konserviert und trägt zur Bindung des Liganden bei (weiße Pfeile). Oben rechts vergrößert ist der Bereich der Phosphatase in unmittelbarer Nähe des Liganden mit Trp³⁰⁰ gelb hervorgehoben. Unten rechts abgebildet sind S-ABA und seine Stereoisomere R-ABA und RS-trans ABA, die kaum physiologische Aktivität aufweisen. Abbildung aus (Raghavendra et al., 2010).

Bei den ABA Co-Rezeptoren handelt es sich um Mg²⁺/Mn²⁺ abhängige Proteinphosphatasen. Insgesamt gibt es 80 PP2Cs im Arabidopsis Genom (Xue et al., 2008), allerdings ist nur der *clade A* mit seinen neun Mitgliedern in der Abscisinsäure Signaltransduktion beteiligt (Fuchs et al., 2013). Zwei

Mitglieder dieser Klasse ABI1 und ABI2 wurden in Mutagenese *screens* bereits vor einiger Zeit identifiziert (Meyer et al., 1994; Leung et al., 1994; Rodriguez et al., 1998). Durch EMS Behandlung in diesen Genen hervorgerufene Mutationen erzeugen einen pleiotrop insensitiven Phänotyp, weshalb bereits damals angenommen wurde, dass sich die beiden Protein Phosphatasen in der Signaltransduktion nahe der Signalperzeption befinden müssen. PP2Cs sind cytosolisch und kern-lokalisiert (Moes et al., 2008; Ma et al., 2009) und regulieren Proteinkinasen, Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren (Ohta et al., 2003; Umezawa et al., 2009; Lynch et al., 2012; Brandt et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).

Aus 14 RCARs und 9 PP2Cs lassen sich theoretisch bis zu 126 unterschiedliche Rezeptorkomplexe formen, von denen auch etliche experimentell nachgewiesen werden konnten (Fuchs, 2013). Die unterschiedlichen Rezeptorkomplexe unterscheiden sich in ihrer Affinität und der Sensitivität der ABA Antwort (Antoni et al., 2012; Fuchs et al., 2014). Bedenkt man zusätzlich die unterschiedlichen Expressionsmuster, ergibt sich daraus die Möglichkeit zur Feinjustierung der ABA Reaktion, in Abhängigkeit von Entwicklungsstadien, Zelltypen und unterschiedlichen ABA Konzentrationen (Szostkiewicz et al., 2010).

1.3.2. SnRK2 Kinasen – zentrale Regulatoren der ABA Antwort

Unter den verschiedenen Gruppen an Proteinen, die der Regulation durch PP2Cs unterliegen, kommt einer Familie von Proteinkinasen, den SnRK2 (für *sucrose non fermenting1 related protein kinase*), eine besondere Rolle zu. In Abwesenheit von ABA binden PP2Cs die SnRK Kinasen 2.2/2.3 und 2.6 und halten diese durch Dephosphorylierung in einem inaktiven Zustand (Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009). In Anwesenheit von ABA kommt es zur Komplexbildung zwischen PP2Cs und RCARs. Vergleicht man dabei die vorhandenen Kristallstrukturen von PP2C/RCAR und PP2C/SnRK2 Komplexen, wird deutlich, dass RCARs und SnRK2s nicht nur mit den gleichen Bereichen der PP2Cs interagieren, sondern dass auch die wesentlichen an der Interaktion beteiligten Aminosäuren konserviert sind (Abb. 1.6)(Hao et al., 2011; Xie et al., 2012). Insofern stellen RCARs wahrscheinlich ein Pseudosubstrat für die PP2Cs dar, das in Anwesenheit von ABA dort festgehalten wird (Soon et al., 2012). In Folge dessen werden die SnRK2s aktiviert, dies geschieht durch Phosphorylierung an zwei Serin-Resten im *activation loop* der Kinase, wahrscheinlich durch intramolekulare Autophosphorylierung (Vlad et al., 2010; Ng et al., 2011).

SnRK2s bilden in Arabidopsis eine Familie aus 10 Mitgliedern und werden durch osmotischen Stress aktiviert. Der *knockout* aller 10 Kinasen führt zu deutlich reduzierter Toleranz gegenüber osmotischem Stress und unterstreicht die besondere Bedeutung der SnRK2s in der zugrundeliegenden Signaltransduktion (Fujii et al., 2011).

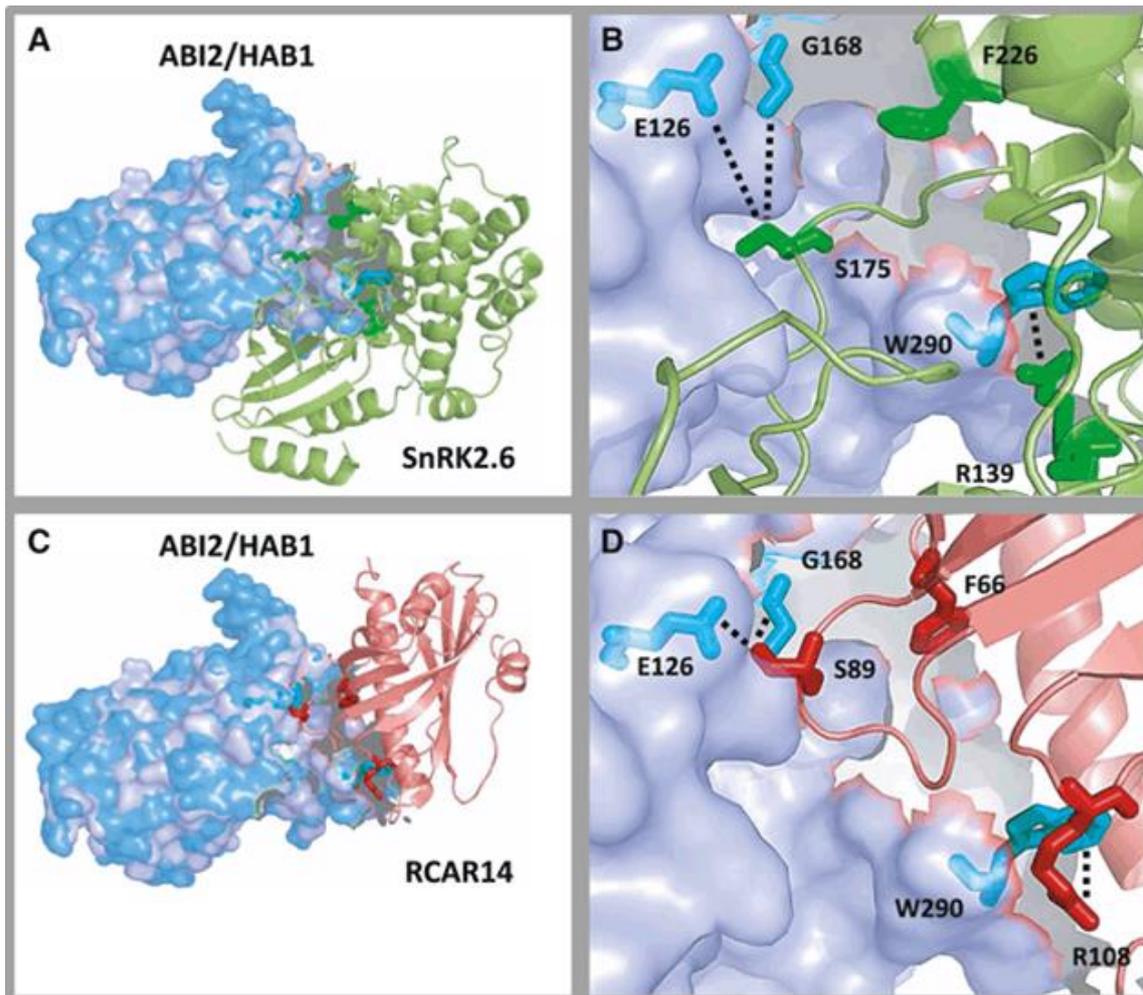


Abbildung 1.6 Proteinkomplexe von PP2Cs mit SnRK2.6 und RCAR14

Überlagerung der Oberflächenstrukturen der Proteinphosphatasen ABI2 (lila) und HAB1 (blau) in Komplex mit SnRK2.6 (grün)(A) beziehungsweise RCAR14 (rot) (C). Für die Interaktionen wesentliche Aminosäuren sind in der Vergrößerung gezeigt (B+D). Dabei handelt es sich bei beiden PP2C Interaktionspartnern um die gleichen Aminosäurereste (F, S und R). Abbildung aus (Fuchs et al., 2013).

Die Reaktion auf osmotischen Stress teilt sich in einen ABA abhängigen und einen ABA unabhängigen Reaktionsweg. Für den ABA abhängigen Teil sind in erster Linie die drei Kinasen 2.2 (auch SnRK2D) 2.3 (SnRK2I) und 2.6 (SnRK2E) verantwortlich. SnRK2.6 ist auch bekannt unter dem Namen OST1 (= *open stomata* 1), der die unerlässliche Rolle der Kinase für die korrekte Regulation der Spaltöffnungen unter Wassermangel widerspiegelt (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). *Knockout* der beiden Kinasen SnRK2.2 und 2.3 führt zu ABA insensitivem Verhalten in Wurzelwachstum und Keimung (Fujii et al., 2007). Dreifach *knockout* Pflanzen zeigen ein insensitives Verhalten in allen drei physiologischen ABA Antworten, Keimung, Wurzelwachstum und Stomata-Regulation und darüber hinaus auch Phänotypen in der normalen pflanzlichen Entwicklung unter Kontrollbedingungen (Fujii und Zhu, 2009). Die Analyse der Genexpressionsmuster der *snrk2dei* Mutante betont die Bedeutung dieser Kinasen für die ABA abhängige Genexpression. Eine große

Anzahl ABA induzierter Gene ist im SnRK2.2/ 2.3/ 2.6 KO Hintergrund deutlich schwächer exprimiert und es wird davon ausgegangen, dass diese drei Kinasen weitgehend redundante Funktion in der Genregulation besitzen (Fujita et al., 2009; Nakashima et al., 2009).

Es ist daher kaum verwunderlich, dass sich unter den SnRK2 Zielproteinen, Transkriptionsfaktoren befinden, worauf im nächsten Abschnitt noch näher eingegangen werden soll. Zudem finden sich darunter auch Ionenkanäle, so reguliert OST1 die Spaltöffnungen durch Phosphorylierung des Anionenkanals SLAC1 (Geiger et al., 2009; Lee et al., 2009) und des Kationenkanals KAT1 (Sato et al., 2009). Zudem wird angenommen, dass OST1 an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist, durch Phosphorylierung der NADPH abhängigen Oxidasen AtrbohF und AtrbohD (Sirichandra et al., 2009; Acharya et al., 2013).

1.3.3. Transkriptionsfaktoren in der ABA Signaltransduktion

Am Ende der ABA Signaltransduktion befinden sich im Nukleus Transkriptionsfaktoren, die durch reversible Phosphorylierung reguliert werden können. Annähernd 10% der Protein codierenden Gene in Arabidopsis werden durch ABA reguliert (Nemhauser et al., 2006), es ist daher nicht überraschend, dass eine ganze Reihe unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren in der ABA abhängigen Genregulation beteiligt sind. Tabelle 1 fasst die wichtigsten Klassen zusammen, führt bekannte Vertreter auf, und gibt die entsprechenden cis-regulatorischen DNA Elemente an.

TF-Klasse (Vertreter)	cis-regulatorisches Element	Referenz
bZIP (ABI5, ABFs)	ABRE (ACGTGG/TC)	1-3
HD-ZIP (HB6)	CAATTATTA/G	4
MYB (MYB2)	MYBR (TAACTG)	5
bHLH (MYC2)	G-box like MYCR (CACATG)	6
AP2 (ABI4, ERF7)	CE1 (CACCG), GCC-Box (AGCCGCC)	7-8
B3 (ABI3)	Sph-Element (CATGCA)	9-10
NAC (ANAC019, 055, 072)	NACR (CATGTG)	11
WRKY (WRKY18, 40, 60)	W-Box (TTGACC/T)	12

Tabelle 1 Klassen an der ABA Signaltransduktion beteiligter Transkriptionsfaktoren

Referenzen: (1)(Choi et al., 2000), (2)(Finkelstein et al., 2005), (3)(Yoshida et al., 2015), (4)(Himmelbach et al., 2002), (5)(Urao et al., 1993), (6)(Abe et al., 1997), (7)(Song, 2005), (8)(Reeves et al., 2011), (9)(Monke et al., 2004), (10)(Nakashima et al., 2006), (11)(Tran et al., 2004), (12)(Rushton et al., 2012)

1.3.3.1 bZip Transkriptionsfaktoren

Bei den wahrscheinlich wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die ABA Signaltransduktion, handelt es sich um eine Untergruppe der *basic region/leucine zipper* (bZip) Transkriptionsfaktoren. Sie bilden eine Familie aus 75 Mitgliedern in Arabidopsis, die sich auf Basis von Sequenzähnlichkeit in 10 Untergruppen einteilen lässt (Jakoby et al., 2002). In Gruppe A befinden sich etliche Mitglieder, für die eine wichtige Funktion in der ABA Signaltransduktion gezeigt wurde (Finkelstein und Lynch, 2000; Uno et al., 2000). Die sogenannten ABA-responsive element binding proteins (AREB oder auch ABF) binden an ABREs, ein in Promotoren von ABA induzierten Genen häufig vorkommendes cis-regulatorisches DNA Motiv (Busk und Pages, 1998) und wirken als transkriptionelle Aktivatoren. Zur Kontrolle der Genregulation wirken in der Regel mehrere Klassen von Transkriptionsfaktoren zusammen. Für die Induktion der ABA abhängigen Genexpression sind einzelne ABRE Motive nicht ausreichend. Hierfür sind entweder mehrere Kopien dieses Motivs, oder die Kombination mit anderen zum Beispiel dem *coupling element 1* (CE1) nötig (Shen et al., 1996; Narusaka et al., 2003). Dieses wird vom AP2 Transkriptionsfaktor ABI4 gebunden und ermöglicht eine synergistische Wirkung mit dem bZip TF ABI5 (Reeves et al., 2011). Auch der B3 TF ABI3, der an ein sogenanntes SpH oder RY Element bindet, wirkt als Co-Aktivator mit dem bZip TF ABI5 zusammen (Nakamura et al., 2001; Nakashima et al., 2006).

ABFs werden durch reversible Phosphorylierung von Proteinkinasen reguliert. In erster Linie sind SnRK2 Kinasen hierfür verantwortlich (Kobayashi et al., 2005; Fujii et al., 2009), deren besondere Bedeutung für die Regulation der ABFs deutlich wird, wenn man die weitgehend überlappenden Genexpressionsmuster nach ABA Behandlung entsprechender dreifach KO Mutanten vergleicht (Fujita et al., 2009). Neben SnRK2s wurden allerdings auch Calcium abhängige Proteinkinase (CPKs) als Regulatoren von ABFs identifiziert (Choi et al., 2005; Zhu et al., 2007; Zhao et al., 2011a). Negative Regulatoren der ABF Aktivität sind PP2Cs, zum einen durch Inhibition der übergeordneten Kinasen, zum anderen auch durch direkte Interaktion und Dephosphorylierung (Lynch et al., 2012).

ABA führt zu einer Akkumulation von ABFs und es ist anzunehmen, dass der Phosphorylierungsstatus der TFs neben der Transaktivierungsstärke auch Einfluss auf ihre Stabilität *in vivo* hat (Sirichandra et al., 2010). Diese wird reguliert durch die E3 Ubiquitin Protein Ligase *keep on going* (KEG) (Stone et al., 2006), die zum Abbau der ABFs durch das 26S Proteasom führt. Vermittelt wird dieser Abbau wahrscheinlich durch eine kleine Gruppe, den *ABI five binding proteins* (AFP), Interaktoren von ABI5 und anderen ABFs (Lopez-Molina et al., 2003; Garcia et al., 2008). Davon unabhängig wird die ABI5 Stabilität durch die SUMO E3 Ligase SIZ1 reguliert, die allerdings zu einer Stabilisierung und Inaktivierung von ABI5 führt (Miura et al., 2009).

1.3.3.2 HD-ZIP Transkriptionsfaktoren

Hömeodomäne Leucin Zipper (HD-Zip) sind eine weitere Gruppe Transkriptionsfaktoren, die in der ABA Signaltransduktion beteiligt sind. Der Aufbau aus Hömeodomäne und direkt C-terminal anschließendem Leucin zipper, nötig für Interaktion und Dimerisierung, findet sich in dieser Form nur in höheren Pflanzen (Schna und Davis, 1992). HD-Zip Proteine bilden eine Familie aus 47 Mitgliedern unterteilt in vier Untergruppen und sind beteiligt an der Entwicklung von Pflanzenorganen, der Meristem Regulation, sowie Licht- und Hormon Signaltransduktion (Ariel et al., 2007). Für eine ganze Reihe an Klasse I HD-Zip Proteinen wurde eine Funktion in der Reaktion auf abiotischen Stress und in der ABA Signaltransduktion postuliert (Henriksson et al., 2005). Basierend auf der Analyse der ABA abhängigen Phänotypen transgener Linien und von Genexpressionsdaten sind das die TFs HB5, 6, 7 und 12 (Soderman et al., 1999; Johannesson et al., 2003; Olsson et al., 2004). Klasse I HD-Zip Proteine binden an eine kurze pseudopalindromische DNA Sequenz (CAATTATTA/G)(Sessa et al., 1993). Davon abgesehen ist die genaue Stellung von HD-Zip Proteinen in der ABA Signaltransduktion weitgehend unbekannt. Eventuell daran beteiligt sind PP2Cs. Ein Mitglied dieser Klasse, ABI1, interagiert mit dem HD-Zip Protein HB6 in Abhängigkeit seiner Phosphataseaktivität (Himmelbach et al., 2002). Eine *in vivo* Regulation konnte allerdings nicht gezeigt werden. Die Stabilität der HD-Zip Proteine wird wahrscheinlich ähnlich, die der bZip Transkriptionsfaktoren, über das 26S Proteasom reguliert. So wird der Abbau von HB6 von MATH-BTB Proteinen vermittelt unter Beteiligung von CUL3-based Ubiquitin Ligasen (Lechner et al., 2011).

1.4. Die Integration von Ca²⁺ Signalen in die ABA Signaltransduktion

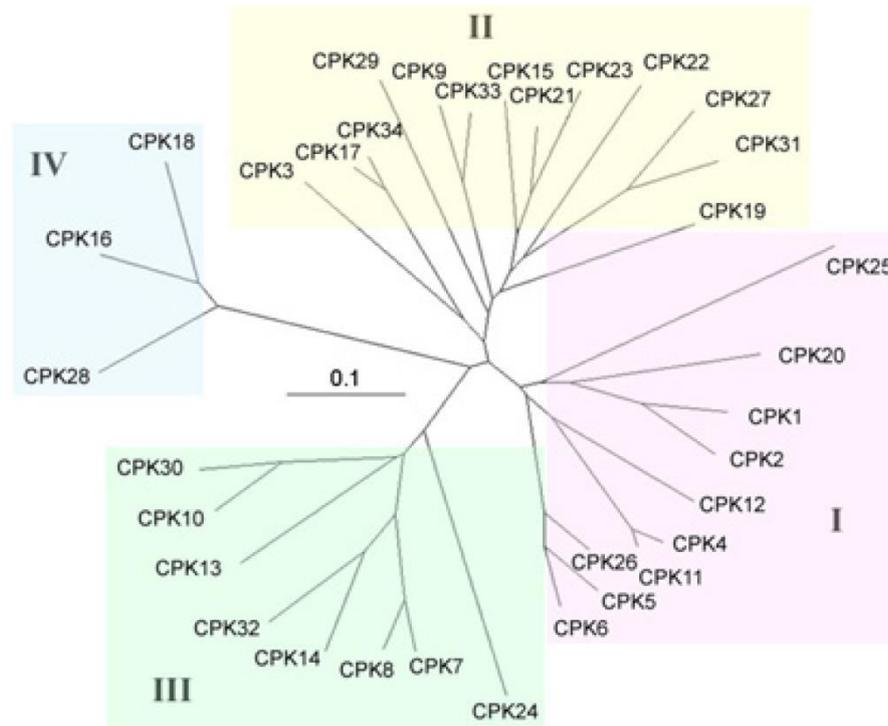
Wie bereits zuvor erwähnt sind eine Reihe sekundärer Botenstoffe in der ABA Signaltransduktion involviert, unter anderem das zweiwertige Kation Ca²⁺. Da Ca²⁺ mit Phosphaten (wie zum Beispiel ATP) fast komplett Wasser unlösliche Komplexe bildet, sind höhere Konzentrationen dieses Ions für die Zelle toxisch. Deswegen unterliegt die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration einer ständigen engen Kontrolle. Eine ganze Reihe an Transport Proteinen sorgt für die Beförderung von Ca²⁺ aus dem Cytoplasma und die Erhaltung von Konzentrationsgradienten zwischen Cytoplasma und anderen Zellorganellen beziehungsweise dem Apoplasten (Sze et al., 2000; Shigaki et al., 2006). So liegen cytoplasmatische Ca²⁺ Konzentrationen im Ruhezustand zwischen 30-90 nM, im endoplasmatischen Retikulum (3 µM) und der Vakuole (5 µM) aber etwa um den Faktor 100-200 höher (Clarkson et al., 1988; Bush et al., 1989). Unter gewissen Umständen kommt es, aus internen oder externen Quellen, zu einem Einstrom von Ca²⁺ Ionen ins Cytoplasma und einer vorübergehenden Erhöhung der Ca²⁺ Konzentrationen. So ist Ca²⁺ als sekundärer Botenstoffe in etlichen physiologischen Prozessen beteiligt, wie dem Wachstum von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren, der Wurzelhaar Symbiose mit

Mikroorganismen, der Kontrolle der Stomataapertur, sowie mechanischen Stimuli und abiotischen Stress Reaktionen (Kudla et al., 2010). Eine ganze Reihe an unterschiedlichen Methoden erlaubt die Visualisierung und Messung von zellulären und organspezifischen Ca^{2+} Konzentrationen. Dazu gehören fluoreszierende Farbstoffe, wie etwa Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985), die Luciferase Aequorin (Knight et al., 1991), FRET basierte Ca^{2+} Sensoren wie Cameleon (Miyawaki et al., 1997; Krebs et al., 2012) und GFP basierte Sensoren wie GECOs (Zhao et al., 2011b). Insbesondere die letzten beiden Methoden erlauben eine Visualisierung von Amplitude, Frequenz und Dauer von Schwankungen der Ca^{2+} Konzentrationen auf zellulärer Ebene. Es wird vermutet, dass in den charakteristischen Schwankungen auf einen bestimmten Impuls, bezeichnet als Calcium Signatur, Informationen codiert vorliegen (Webb et al., 1996). Um diese Informationen in konkrete zelluläre Antworten zu übersetzen, besitzen Pflanzen eine ganze Reihe an Ca^{2+} bindenden Proteinen. Darunter befinden sich Calmodulin und Calmodulin-like Proteine und eine Reihe an Proteinkinase Familien (Harper et al., 2004; Batistic und Kudla, 2012). Insbesondere zwei dieser Familien CBL-*interacting protein kinases* (CIPKs) (Pandey et al., 2004; D'Angelo et al., 2006) und Calcium abhängige Proteinkinasen (CPKs) sind in der abiotischen Stressantwort und der Reaktion auf ABA beteiligt, und erlauben eine Integration von Ca^{2+} Signalen in die ABA Signaltransduktion.

1.4.1. Calcium abhängige Proteinkinasen

Calcium abhängige Proteinkinasen (CPK oder CDPK) bilden in *Arabidopsis thaliana* eine Familie aus 34 Mitgliedern, die sich basierend auf Sequenzinformationen in vier Untergruppen einteilen lässt (Abb.1.7 A). CPKs sind wahrscheinlich durch Genfusion einer Serin/Threonin Kinase mit einem *downstream* befindlichen EF Hand Protein entstanden (Zhang und Choi, 2001) und finden sich in dieser Form nur bei höheren Pflanzen, grünen Algen und einigen einzellern (Billker et al., 2009). Sie vereinen damit einen Ca^{2+} Sensor und den Signalüberträger (Kinasedomäne) in einem Protein. Ca^{2+} Bindung führt zu einer Konformationsänderung und beeinflusst direkt die Aktivität der CPKs (man spricht von einem Sensor *responder*), während andere Ca^{2+} Sensoren, wie zum Beispiel CBLs (Sensor *relay*) mit anderen Proteinen interagieren und deren Aktivität beeinflussen (Sanders et al., 2002). In Abbildung 1.7 B ist der Aufbau einer CPK mit ihren Domänen schematisch gezeigt. CPKs sind als Serin/Threonin Kinasen bezeichnet, für einzelne CPKs wurde allerdings auch Tyrosin Kinase Aktivität gezeigt, in wieweit diese Fähigkeit von der gesamten Proteinfamilie geteilt wird, ist bisher unbekannt (Oh et al., 2012). Die Kinase Domäne ist hochkonserviert, im Gegensatz zum N-terminus der zwischen den einzelnen Mitgliedern der Proteinfamilie sehr variabel ist. Es wird angenommen, dass der N-Terminus die Substratspezifität der einzelnen CPKs bestimmt und für Protein-Protein Interaktionen wichtig ist, diese Hypothese wird durch *domain-swap* Experimente zwischen verschiedenen CPKs unterstützt (Ito et al., 2010).

A



B

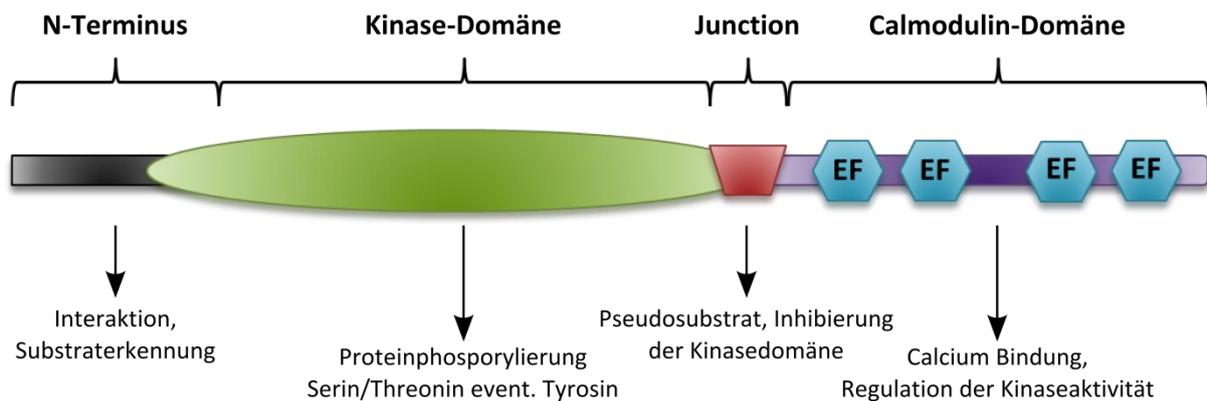


Abbildung 1.7 Übersicht Calcium abhängiger Proteinkinasen in Arabidopsis

Phylogenetischer Stammbaum der Arabidopsis CPKs (A). Die 34 Mitglieder lassen sich basierend auf ihrer Sequenz in vier Untergruppen einteilen. Der Abstand der Verbindungslinien spiegelt den Unterschied in der Nukleotidsequenz wieder, der Wert 0,1 entspricht dabei 10% Unterschied. Abbildung aus (Cheng et al., 2002). Schematischer Aufbau einer CPK mit ihren Domänen (B). CPKs besitzen einen variablen N-Terminus, wichtig für Protein-Protein Interaktionen und Substraterkennung, gefolgt von einer Serin/ Threonin Proteinkinasedomäne. Für einzelne CPKs wurden auch Tyrosinkinase Aktivität gezeigt. Negativ reguliert wird die Kinasedomäne durch eine anschließende *junction* Domäne, die als Pseudosubstrat fungiert. Daran schließt die Calmodulindomäne an, die mit ihren vier EF Händen Ca^{2+} binden kann und anschließend eine Konformationsänderung durchläuft, wodurch die Kinase von der Inhibition durch die *junction* befreit wird.

Ein gemeinsames Merkmal vieler CPKs ist die N-terminale Modifikation durch Acylierung (Boudsocq und Sheen, 2012), entweder Myristoylierung und/ oder Palmitoylierung (Martin und Busconi, 2000; Stael et al., 2011), wodurch eine reversible Verankerung an der Plasmamembran ermöglicht wird.

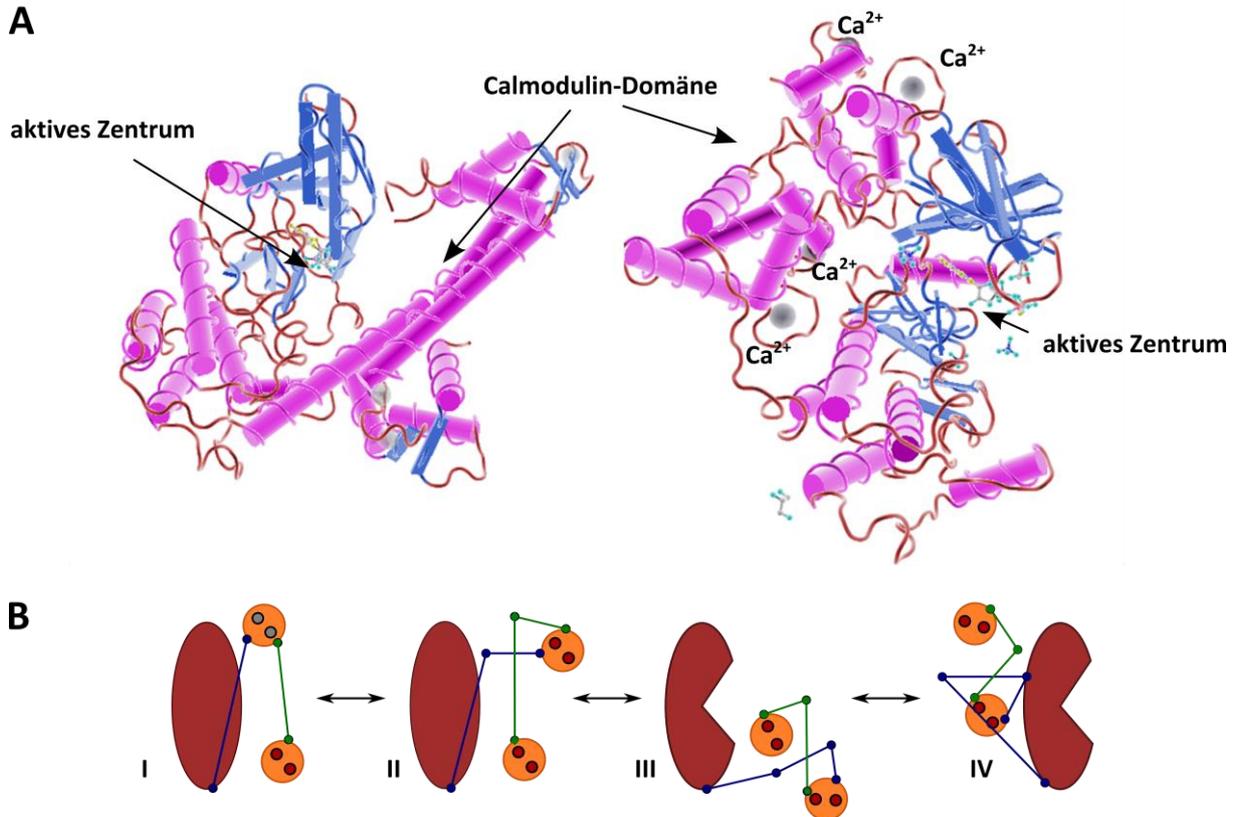


Abbildung 1.8 Ca^{2+} abhängige Konformationsänderung und Aktivierung von CPKs

3D-Modell von CPK1 aus *Toxoplasma gondii* ohne Ca^{2+} (links) und in Komplex mit Ca^{2+} (rechts)(A). Unter Ca^{2+} Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase, bei der sich die regulatorische Calmodulindomäne auf die andere Seite der Kinasedomäne faltet und somit das aktive Zentrum des Proteins frei gibt. Gebundene Ca^{2+} Ionen sind als graue Kugeln dargestellt. Die Abbildung beruht auf der Kristallstruktur von (Wernimont et al., 2011). Darunter abgebildet ist der postulierte Mechanismus (B). Durch Ca^{2+} Bindung an den N- und C- terminalen *loop* (orange) der Calmodulin Domäne kommt es zu einem Bruch zweier alpha-Helices (blau und grün). Dadurch faltet sich die Calmodulin Domäne auf die andere Seite des Proteins und das aktive Zentrum der Kinasedomäne (rot) wird für Substrate zugänglich. Abbildung modifiziert nach (Wernimont et al., 2011).

C-terminal an die Kinase schließt eine *junction* Domäne an, die im inaktiven Status wohl als Pseudosubstrat agiert (Harper et al., 2004). Dahinter befindet sich die Calmodulindomäne, die vier EF Hand Strukturen besitzt und damit eine Bindung von Ca^{2+} und Wahrnehmung intrazellulärer Konzentrationen ermöglicht. Die EF Hände bilden zwei funktionelle Untereinheiten den sogenannten N- und C- *loop*. Die Affinität des C-*loops* für Ca^{2+} ist höher und es wird angenommen, dass bereits unter normalen zellulären Bedingungen die beiden EF Hände des C-*loops* mit Ca^{2+} koordiniert sind (Christodoulou et al., 2004; Harper und Harmon, 2005). Kommt es durch einen Anstieg der

intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen zu einer Bindung an den *N-loop* durchläuft das Protein eine Konformationsänderung. Dabei faltet sich die Calmodulindomäne auf die andere Seite der Kinase, in Folge dessen wird das aktive Zentrum der Kinase von der Inhibition durch die *junction* Domäne befreit und frei zugänglich. Dieser Mechanismus wird unterstützt durch die Auflösung der Kristallstrukturen von CPK1 aus *Toxoplasma gondii*, mit und ohne Ca^{2+} (Abb. 1.8 A), und ist als Schema in Abbildung 1.8 B gezeigt (Wernimont et al., 2011). Erwähnenswert ist darüber hinaus, dass auch Abweichungen von den kanonischen EF Hand Sequenzen toleriert werden und eine korrekte Konformationsänderung erlauben. Allerdings zeigen verschiedene CPKs unterschiedliche Affinitäten und Calciumabhängigkeiten in ihrer Enzymaktivität. Dabei findet man Kinasen mit niedriger basaler Aktivität und sehr starker Calcium Aktivierung. Kinasen mit zumeist höherer basaler Aktivität und schwacher Calciumabhängigkeit und eine letzte Gruppe, die fast komplett Calcium unabhängig zu sein scheint (Boudsocq et al., 2012).

CPKs sind involviert in einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse von biotischen und abiotischen Stressantworten bis hin zu Entwicklungs- und Wachstumsprozessen (Schulz et al., 2013). Man könnte meinen das einzelne CPKs nur in ganz bestimmten Signalwegen beteiligt sind. Es ergibt sich aber zunehmend ein gegenteiliges Bild, für einzelne CPKs wurden Funktionen in gleich mehreren Signalwegen gezeigt. So wurde CPK11 ursprünglich der abiotischen Stressantwort zugeordnet, nachdem gezeigt werden konnte, dass die Kinase den bZip TF ABF4 phosphoryliert (Zhu et al., 2007). Darüber hinaus wurde CPK11 mittlerweile allerdings auch mit der flg22 ausgelösten natürlichen Resistenz in Verbindung gebracht (Boudsocq et al., 2010) und ist ebenfalls wichtig für Wachstum und Überlebensfähigkeit von Pollenschläuchen (Zhao et al., 2013). Ein anderes Beispiel ist CPK6, die zum einen in der ABA Signaltransduktion beteiligt ist, durch Phosphorylierung des Anionenkanals SLAC1 (Mori et al., 2006). Zum anderen wird die Kinase durch flg22 *in vivo* aktiviert und führt zu Induktion der Genexpression vergleichbar zu Veränderungen im Rahmen der natürlichen pflanzlichen Resistenz (Boudsocq et al., 2010). Einzelne CPKs können also gleichzeitig in mehreren Signalwegen beteiligt sein, zusätzlich verkompliziert wird das Bild durch funktionelle Redundanz und synergistisches Zusammenwirken mehrere CPKs in ein und demselben Signalweg. So sind für das Wachstum der Pollenschläuche neben CPK11 auch CPK17, CPK24 und CPK34 wichtig (Myers et al., 2009; Zhao et al., 2013). Als Regulatoren von bZip TF in der ABA Signaltransduktion sind neben CPK11 auch CPK4 und CPK32 beschrieben (Choi et al., 2005; Zhu et al., 2007) und in der Signaltransduktion nach Pathogenbefall sind nach heutigem Wissensstand gleich sechs CPKs (1, 2, 4, 5, 6, 11) involviert (Gao et al., 2013). Zu Bedenken gibt es, dass sich die einzelnen CPKs nicht nur in ihrer Calcium Abhängigkeit, sondern auch ihrer zellulären Lokalisation unterscheiden (Lu und Hrabak, 2002; Dammann et al., 2003), so dass, die durch einen spezifischen Stimulus erzeugte Ca^{2+} Signatur

womöglich nur manche CPKs aktiviert, während andere inaktiv bleiben oder nachgeschaltet sein könnten.

Für die abiotische Stressantwort und die ABA Signaltransduktion sind für eine Reihe an CPKs Funktionen beschrieben worden. Neben den bereits erwähnten Regulatoren von bZip TFs wurde CPK12 als negativer Regulator der ABA Signaltransduktion beschrieben, vermutlich durch Phosphorylierung der PP2C ABI2 (Zhao et al., 2011a). Darüber hinaus könnte CPK10 ein positiver Regulator der ABA Signaltransduktion sein. CPK10 induziert neben CPK30 einen ABA regulierten Promotor in Mais Protoplasten (Sheen, 1996) und CPK10 KO Pflanzen zeigen erhöhten Wasserverlust und reduzierte Resistenz gegen Trockenstress (Zou et al., 2010). Zwei weitere CPKs, die nahe miteinander verwandten Proteine CPK21 und CPK23, sind beteiligt in der Regulation der Stomata in Reaktion auf ABA. Sie phosphorylieren und aktivieren den Anionenkanal SLAH3 (Geiger et al., 2011) und zusammen mit CPK3, CPK6 und der SnRK2 Kinase OST1 auch den Anionenkanal SLAC1 (Mori et al., 2006; Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2010; Brandt et al., 2012). Dabei unterschieden sich allerdings die Phosphorylierungsstellen im SLAC1 Protein zwischen CPK23 und OST1. Auch zeigen CPK23 oder CPK21 KO Mutanten kein insensitives Verhalten im Stomataschluss im Gegensatz zur *ost1* Mutante (Mustilli et al., 2002). Beide Kinasen interagieren wie OST1 mit PP2Cs und werden womöglich in vergleichbarer Art durch sie inhibiert (Geiger et al., 2010).

1.4.2. Die ABA insensitive Mutante *gca2*

Neben der beschriebenen Funktion in der Regulation von Anionenkanälen besitzt CPK23 (At4G04740) wahrscheinlich eine deutlich weiterreichende Funktion in ABA Signaltransduktion. Entscheidende Befunde dafür liefert eine EMS Mutante im *landsberg erecta* Hintergrund, die eine Punktmutation in der 5'UTR des CPK23 Gens trägt, durch die es wahrscheinlich zu einer Überexpression des CPK23 Proteins kommt (Korte, 2009). Diese Mutante, genannt *gca2* (*growth control by ABA*), zeigt ein pleiotrop insensitives Verhalten gegenüber ABA. Dabei ist eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen betroffen, angefangen bei Keimung und Wurzelwachstum (Korte, 2009). Darüber hinaus verhält sich die Mutante in der Kontrolle der Stomata nicht nur insensitiv gegenüber ABA, sondern auch gegenüber H₂O₂ (Pei et al., 2000). Auch gegenüber hohen CO₂ Konzentrationen, die zum Stomataschluss führen, verhält sich die Mutante insensitiv (Young et al., 2006). Erwähnenswert ist außerdem eine Veränderung der Calcium Signatur, die in Schließzellen durch ABA ausgelöst wird (Allen et al., 2001). Neben diesen Defekten in der Stomataregulation, zeigt *gca2* auch Störungen in der vegetativen Entwicklung der Pflanze. So ist das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert und die Rosettenblätter neigen zur verfrühten Seneszenz (Korte, 2009). In der Summe ist der Phänotyp der Mutante derart gravierend, dass spekuliert werden kann, dass CPK23 nicht nur in

der Regulation von Ionenkanälen beteiligt ist, sondern auch Einfluss auf die Genexpression nimmt. CPK23 sollte in der ABA Signaltransduktion eine Position nahe der Signalperzeption einnehmen, da alle typischen ABA Reaktionen betroffen sind.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Abscisinsäure ist von zentraler Bedeutung für die Adaption der Pflanze an abiotische Stressbedingungen wie Kälte, Salz und Trockenheit. In der zu Grunde liegenden Signaltransduktion nehmen Calcium abhängige Proteinkinasen eine wichtige Funktion ein und erlauben potenziell die Übersetzungen von Schwankungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, eines wichtigen sekundären Botenstoffs, in konkrete adaptive Reaktionen. So sind die beiden Proteinkinasen CPK21 und CPK23 beteiligt an der Regulation der Spaltöffnungen unter Trockenstress. Die genaue Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion ist bisher jedoch nur teilweise verstanden. Der pleiotrope Phänotyp der Mutante *gca2* legt allerdings eine weitreichende Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion und eine Beteiligung in der Regulation der Genexpression nahe.

Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis der Funktion von CPK23 in der Abscisinsäure Signaltransduktion. So soll durch die Expression in Arabidopsis Protoplasten der Einfluss von CPK23 auf die ABA abhängige Genexpression näher untersucht werden und CPK23 in Relation zu den zentralen Komponenten der Signalkaskade gesetzt werden. Darüber hinaus zeigt sich ein hohes Maß an natürlicher Variabilität am CPK23 Locus in verschiedenen Arabidopsis Ökotypen. Diese Sequenzvariabilität soll untersucht und der Frage nachgegangen werden, ob damit ein funktioneller Unterschieden einhergeht.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

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

2.2. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Gelelektrophorese-Netzteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Homogenisator	Tissue LyserII	Qiagen
Inkubatoren	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshake	Gerhardt
Kippschüttler	RotoShake Genie	Scientific Industries
Luminometer	Flash'n Glow	Berthold
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
Mikroskope	Stemi SV11	Zeiss
	HBO 50 Axioskop	Zeiss
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
NanoDrop-Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
	C1000 Thermal Cycler	Biorad
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow

Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Gerät	Reprostar 3	Camag
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5242	Eppendorf
	Typ 5415R	Eppendorf
	Universal 16	Hettich
	Rotina 420R	Hettich

2.3. Software

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

- TAIR - <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>
(Ermittlung von DNA Sequenzen)
- Gentle, Vector NTI (Invitrogen)
(Alignments, Übersetzung DNA in Aminosäuresequenzen, Primerdesign)
- 1001 Genomes Browser - <http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>
(Sequenzanalyse unterschiedlicher Arabidopsis Ökotypen)
- Primer3Plus - <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>
(Primerdesign)
- Swiss Model - <http://swissmodel.expasy.org/>
(Proteinstruktur Voraussage)
- GraphPad Prism 6
(Statistische Tests und Auswertungen)
- BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
(Homologievergleich)

2.4. Bakterien- und Hefestämme

In dieser Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet:

Escherichia coli

Stamm	Genotyp	Resistenz	Quelle
DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) phoA	keine	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Tetracyclin	Stratagene

Agrobacterium tumefaciens

Stamm	Genotyp	Resistenz	Quelle
C58 pGV3101	Ti-plasmid pMP90	Rifampicin Gentamycin	Csaba Koncz (MPI Cologne)

E. coli und *A. tumefaciens* wurden in LB-Medium bei 37°C bzw. 30°C bei 200 rpm angezogen. Zur Selektion wurden passende Antibiotika in den folgenden Konzentrationen hinzugegeben:

Antibiotika	Endkonzentration [μ g/ml]	Stock Lösung [mg/ml]
Ampicillin	200	50 in H ₂ O
Kanamycin	25-50	50 in H ₂ O
Rifampicin	100	50 in DMSO
Spectinomycin	100	50 in H ₂ O

LB-Medium:

- 0,5% Hefeextrakt
- 1% Trypton
- 1% NaCl
- 1,6% Agar (für Festmedium)
- pH 7.0 eingestellt (NaOH)

Folgende Hefe-Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Stamm	Genotyp	Quelle
BMA64-1A	MATa; ura3-1; trp1Δ 2; leu2-3,112; his3-11,15; ade2-1; can1-100	(Baudin-Baillieu et al., 1997)
AH109	MATa, trp1-109, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	(James et al., 1996)

Hefen wurden bei 30°C bei 200 rpm in YPD (Vollmedium) oder verschiedenen Selektivmedien kultiviert.

YPD-Medium: 1% Hefeextrakt
2% Pepton
1,6% Agar (für Festmedium)
2% Glucose (nach Autoklavieren steril zugegeben)

SD-Medium: 100 ml 10x Makrosalze
1 ml 1000x Mikrosalze
1,6% Agar (für Festmedium)

Nach Autoklavieren steril zugegeben: 2% Glucose
100 ml 10x Dropout Mix

10x Makrosalze: 10 g/l KH₂PO₄
10,24 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
1 g/l NaCl
1 g/l CaCl₂
50 g/l (NH₄)₂SO₄

1000x Mikrosalze: 2 mg/l Biotin
400 mg/l Ca-Pantothersäure
20 mg/l Folsäure
2 g/l myo-Inositol
400 mg/l Nicotinsäure
200 mg/l p-Aminobenzoessäure
400 mg/l Pyridoxin-HCl
200 mg/l Riboflavin
400 mg/l Thiamin-HCl
500 mg/l Borsäure
40 mg/l Cu₂SO₄
100 mg/l KI

	200 mg/l FeCl ₃
	400 mg/l MnSO ₄
	200 mg/l Na-Molybdat
	400 mg/l ZnSO ₄
10x Dropout-Mix:	200 mg/l L-Adenin-Hemisulfat
	200 mg/l L-Arginin-HCl
	300 mg/l L-Isoleucin
	300 mg/l L-Lysin-HCl
	200 mg/l L-Methionin
	500 mg/l L-Phenylalanin
	200 mg/l L-Threonin
	200 mg/l L-Tyrosin
	200 mg/l L-Uracil
	1500 mg/l L-Valin
	200 mg/l L-Histidin-HCl x H ₂ O
	1000 mg/l L-Leucin
	200 mg/l L-Tryptophan

2.5. Arbeiten mit DNA

2.5.1. Plasmid Präparation aus *E. coli*

Plasmid DNA für die Protoplasten Transfektion wurde mit Hilfe der Jetstar Midi- und Maxi Plasmid DNA Kits der Firma Genomed (Löhne) isoliert. Für die Isolation von kleineren Mengen hochsaubere Plasmid DNA für Sequenzierungsreaktionen wurde das NucleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben. DNA Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm und 260 nm an einem Nanophotometer (Serva).

Für alle anderen Anwendungen wurde Plasmid DNA nach dem Prinzip der alkalische Lyse isoliert. Hierfür wurden *E. coli* Zellen über Nacht bei 37°C in 5 ml LB Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden 2-4 ml Kultur für 2 min bei 13.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lsg.1 resuspendiert, 200 µl Lsg.2 hinzugegeben und mehrmals invertiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden 150 µl Lsg. 3 zugegeben und der Ansatz mehrmals invertiert. Anschließend wurde für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Zum Überstand wurde 900 µl 96% EtOH gegeben um die Plasmid DNA zu fällen. Durch mehrmaliges Invertieren wurde der Ansatz gemischt und anschließend für 20 min bei 13.000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das DNA Pellet in 500 µl 70% EtOH gewaschen. Dafür wurde 2 min bei 13.000 g

zentrifugiert und der Überstand mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Das Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 30-50 µl MQ aufgenommen.

Lösung 1:	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
Lösung 2:	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung 3:	3,1 M Kaliumacetat pH 5,5 pH mit Essigsäure eingestellt

2.5.2. Genomische DNA Präparation aus Pflanze

Die Isolierung genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Murray (Murray und Thompson, 1980). Etwa 50 mg tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurden mit Hilfe von Keramikkügelchen im Tissue Lyser II (Qiagen) aufgeschlossen. Anschließend wurden 550 µl 2x CTAB Puffer zum Blattmaterial geben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Chloroform wurden Proteine gefällt. Nach gründlichem homogenisieren wurden die Proben für 5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und die DNA durch Zugabe von 1 ml 96% EtOH gefällt. Hierfür wurden die Ansätze 15 min bei 4°C bei 13.000 g zentrifugiert. Das erhaltene DNA Pellet wurde zweimal in 80% EtOH gewaschen und danach 5 min bei 37°C getrocknet. Die trockenen Pellets wurden abschließend in 100 µl TE/RNase aufgenommen.

CTAB-Puffer:	2% CTAB 1,4 M NaCl 100 mM Tris/HCl pH 8,0 20 mM EDTA 0,2% β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
TE/RNase:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 10 mg/µl RNase

2.5.3. Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation von DNA Fragmenten

2.5.3.1 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsspaltung mittels Endonukleasen erfolgte mit dem vom Hersteller (Thermo Scientific) empfohlenen Puffersystem und unter entsprechenden Reaktionsbedingungen. Die Menge an Enzym (maximal 10% (v/v) des Reaktionsansatzes) und die Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge. Die eingesetzte Menge Enzym (in Units) berechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$U = \frac{\text{bp Referenz DNA}}{\text{bp Ansatz DNA}} \times \frac{\text{Schnittstellen Ansatz DNA}}{\text{Schnittstellen Referenz DNA}}$$

Die Inkubation erfolgte im Reaktionsgemisch mit den geeigneten Reaktionspuffern für ein bis zwei Stunden bei 37°C beziehungsweise bei reduzierter Enzymmenge (siehe Herstellerangaben) über Nacht. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mit einem Aliquot durch Agarose Gelelektrophorese überprüft. Bei einem präparativen Verdau wurde der gesamte Ansatz im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA anschließend aufgereinigt.

2.5.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Um nach Restriktionen von Vektoren eine Religation zu vermeiden, wurde der 5'-Phosphorylrest durch Zugabe alkalischer Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase) abgespalten. Dafür wurde pro µg DNA eine Einheit Phosphatase eingesetzt. Das Enzym wurde nach Restriktionsverdau zum Reaktionsansatz pipettiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für weitere 10 min bei 65 °C inkubiert.

2.5.3.3 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Ligation von Vektor und Insert DNA Fragmenten erfolgte mit Hilfe von T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) nach Herstellangaben. In der Regel wurde ein molares Verhältnis von 1:3 (Vektor / Insert) verwendet. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde oder bei 4°C über Nacht.

2.5.4. Agarose Gelelektrophorese

Die horizontale Flachbett Agarose Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 1%ige bis 2%ige Gele gewählt. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer suspendiert und unter Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 30-40 °C wurde Ethidiumbromid (0,05 µl/ml Gel einer 10 mg/ml Stammlösung) hinzugegeben und die Lösung in eine Gelform gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoreseapparatur mit

einzelnen PCR-Programmschritte sowie die genaue Temperatur richteten sich nach der verwendeten Polymerase. Ein Standard PCR-Programm sah wie folgt aus:

1) Denaturierung

95-98°C 30-120 sec

2) PCR-Amplifikation: 30-35 Zyklen

95-98°C 10-30 sec (Denaturierung)
55-72°C 15-30 sec (Annealing)
72°C 15-60 sec/kbp (Elongation)

3) Endsynthese

72°C 5 min
22°C unendlich

Die benötigte Annealing-Temperatur der Primer wurde mit Vector NTI (Invitrogen) berechnet. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried), Sigma-Aldrich (Seelze) und MWG Eurofins (Ebersberg) synthetisiert.

2.5.6.1 Kolonie PCR

Für die schnelle Überprüfung von *E. coli*, Agrobakterien oder Hefe Klonen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden 5 µl MQ in PCR Reaktionsgefäße vorgelegt, eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, auf eine Replikaplatte ausgestrichen und die restlichen am Zahnstocher verbliebenen Zellen in den 5 µl resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend im PCR Cycler für 2 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde der PCR Reaktionsansatz zugegeben und ein Standard PCR Programm ausgewählt.

2.5.6.2 Ziel gerichtete Mutagenese

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

98°C 30 sec
98°C 15 sec
60°C 20sec 17x
72°C 2:30 min

72°C 5 min

2.5.7. Quantitative *realtime* PCR

Quantitative *realtime* Analysen wurden mit Hilfe des BioRad CFX96 Real-Time Systems durchgeführt. Für die PCR wurde der GoTaq qPCR Master Mix (Promega) verwendet. Primer für die Q-PCR Analysen wurden mit Primer3Plus entworfen und in HPSF Qualität von MWG (Ebersberg) synthetisiert. Dabei wurden Amplifikate zwischen 50 und 200 bp angestrebt. Zunächst wurden die Primer auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von Template DNA in 1mM TRIS pH 8.0 Puffer mit tRNA (0,1 mg/ml) hergestellt und damit ein Q-PCR Lauf durchgeführt. Mit Hilfe des BioRad CFX Managers wurde das Ergebnis der PCR ausgewertet. Dabei wird für jede Probe der Ct-Wert (*cycle threshold*) berechnet. Aus den Ct-Werten der verschiedenen Verdünnungen lässt sich die Primereffizienz berechnen. Diese sollte idealerweise nahe 100% liegen (+/- 10%) und kann durch unspezifische Bedingung oder schlechte Hybridisierung nach unten oder oben abweichen. Nach erfolgreichem Test der Primer wurden die zu untersuchenden Proben untersucht, dafür wurde jeweils mit drei technischen Replikaten gearbeitet und Ansätze von 11 µl in 96 well PCR Platten verwendet. Dabei wurden 5,5 µl PCR Mix und Primer vorgelegt und 5,5 µl PCR Template in passender Konzentration hinzugefügt. Zur Normalisierung der Signalstärken des zu untersuchenden Gens wurde in dieser Arbeit ein Fragment von UBI10 amplifiziert.

2.6. Arbeiten mit RNA

2.6.1. RNA Präparation aus pflanzlichem Gewebe

Proben für die RNA Extraktion wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und mit Keramikkügelchen mit Hilfe des Tissue Lyser II (Qiagen) für 60 Sekunden mit 30 Hz aufgeschlossen. Die Präparation von RNA erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch an einem Nanophotometer (Serva). Zusätzlich wurde die Integrität der RNA auf einem Agarose Gel überprüft. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.6.2. cDNA Synthese

Die Herstellung von cDNA für Klonierungen und Q-PCR Analysen erfolgte mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo). Für die cDNA Synthese wurde 1 µg gesamt RNA verwendet und vorausgehend für 30 Minuten bei 37°C ein DNase Verdau durchgeführt. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA und anschließender Inkubation bei 65°C für 10 Minuten. Die anschließende cDNA Synthese erfolgte nach Herstellerangaben mit oligo dT Primern. Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.7. Arbeiten mit Hefe

2.7.1. Hefe-Transformation

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zu Transformation von Hefezellen basiert und wurde modifiziert nach Gietz (Daniel Gietz und Woods, 2002). Zunächst wurde eine Vorkultur aus einer Einzelkolonie der zu transformierenden Zellen über Nacht bei 30°C in 5 ml YPD (Vollmedium) oder SD (Minimalmedium) herangezogen. Damit wurden am nächsten Tag eine Hauptkultur von 50 ml YPD auf eine optische Dichte von 0,2-0,4 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,8-1,2 bei 30°C inkubiert. Nach Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurde die Zellen für 5 Minuten bei 1.500 g abzentrifugiert und anschließend in MQ gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 100mM LiAc aufgenommen. Die Hefe-Suspension wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, kurz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend die Zellzahl auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^9$ cfu/ml mit 100 mM LiAc eingestellt. Eine OD von 1 entspricht dabei etwa $1,28 \cdot 10^7$ cfu/ml. Die so für die Transformation vorbereiteten Zellen wurden im Weiteren auf Eis gelagert. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl Zellen verwendet. Diese wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend der Transformationsmix zugegeben, bestehend aus:

- 240 µl PEG 4000 50%
- 36 µl 1 M LiAc
- 10 µl carrier DNA (10mg/ml)
- 65 µl Plasmid (0,1- 10 µg) in H₂O

Die Carrier DNA wurde zuvor 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf Eis gelagert. Nach Zugabe des Transformationsmix wurden die Ansätze gründlich für 1 Minute homogenisiert. Danach erfolgte für 45 Minuten bei 42°C eine Hitzeschockbehandlung. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in MQ resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.7.2. Histidin Autotrophie Wachstums-Tests (Y2H)

Für die Bestimmung von Protein-Protein Interaktionen wurde der Hefestamm AH109 (James et al., 1996) verwendet. Einzelkolonien wurden nach der Transformation mit pGAD und pBRIDGE Vektoren von selektivem SD -L/ -W Platten in 1 ml Selektivmedium über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mit 4 ml YPD aufgefüllt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 inkubiert und anschließend Verdünnungsreihen erstellt. Von drei Verdünnungen wurden jeweils 10 µl auf Platten mit unterschiedlichem Selektivmedium aufgetropft, so dass die einzelnen Tropfen 1000, 100 bzw. 10 Zellen entsprechen. Für die Selektion auf erfolgreiche Doppeltransformation wurde -L/ -W Medium verwendet. Um auf positive Interaktion zu selektieren wurde -L/ -W/ -H oder für eine höhere Stringenz -L/ -W/ -H/ -A Medium verwendet.

2.7.3. Genaustausch in Hefe

Mittels zwei Stufen Genaustausch (Scherer und Davis, 1979) wurde das Genom des Hefestammes BMA64-1A (Baudin-Baillieu et al., 1997) verändert und stabil unterschiedliche Reporterkonstrukte ins Genom integriert. Dafür wurde der Vektor pIS385 verwendet (Sadowski et al., 2007) der homologe Sequenzen des Hefe lys2 Locus besitzt. Da der Vektor keinen Hefe Origin besitzt, kann er nicht eigenständig repliziert werden und muss dafür ins Genom integrieren.

In einem ersten Schritt wurden der Vektor pIS385, in den die verschiedenen Reporterkonstrukte integriert wurden, mit dem Restriktionsenzym NruI linearisiert, um zu einer zielgerichteten Integration am lys2 Locus zu führen. Nach der Hefetransformation erfolgte die Selektion auf erfolgreiche Integration ins Genom auf -URA Selektivmedium. Durch die Integration wird der ursprüngliche lys2 Locus dupliziert.

In einem zweiten Schritt sollte der ursprüngliche Wildtyp lys2 Locus sowie die Plasmidsequenzen mit dem URA3 Marker wieder aus dem Genom entfernt werden. Dafür wurden vier positive Klone auf frische Platten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Von jeder Platte wurde jeweils eine Einzelkolonie in YPD Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ bzw. $1 \cdot 10^7$ cfu/ml verdünnt und 100 µl auf Selektivmedium mit 5-FOA ausplattiert. 5-FOA ermöglicht eine negative Selektion auf Anwesenheit des URA3 Markers (Boeke et al., 1987). Von den 5-FOA resistenten Klonen wurden jeweils fünf mittels Kolonie PCR auf erfolgreichen Genaustausch überprüft und auf YPD und -K Selektivmedium überstrichen.

2.7.4. *In vivo* Luciferase Messung in Hefe

Messungen der Luciferase Aktivität erfolgten in Hefe *in vivo* (Leskinen et al., 2003). Vorkulturen mit Einzelkolonien wurden über Nacht angezogen in entsprechendem Selektivmedium mit Glucose bzw. Galactose, bei Expression von Komponenten unter GAL1 Promotor. Am nächsten Tag wurde die eigentliche Messkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert. 100 µl der Messkultur wurden anschließend für die Messung der Luciferase Aktivität in ein Luminometer Röhrchen (Sarstedt) gegeben und am Berthold *flash`n glow* Luminometer gemessen. Durch Verwendung eines Messpuffers mit niedrigem pH-Wert macht man sich zu Nutze, dass Luciferin in seiner ungeladenen Form die Zellwand und Plasmamembran effektiv passieren kann. Der Messpuffer wurde für jede Messung frisch angesetzt. Die gemessenen Werte wurden zur Auswertung auf die Zellzahl bezogen.

2.8. Arbeiten mit Protoplasten

Die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle zur Präparation und Transfektion von Arabidopsis Protoplasten basieren auf den Protokollen von Abel (Abel und Theologis, 1994) und Yoo (Yoo et al., 2007). Im Weiteren sind Durchführung und eigene Modifikationen beschrieben.

2.8.1. Herstellung der Enzymlösung für die Protoplastenpräparation

Für die Herstellung eines Liters Enzymlösung wurden 10 g Cellulase Onuzuka R10, sowie 2,5 g Mazerozyme in 500 ml 10 mM MES/KOH Puffer mit pH 5.6 gelöst. Anschließend wurden 60 mg vom Proteaseinhibitor AEBSF zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Enzymlösung in 28 mm Dialyseschläuche gefüllt und gegen 5 L 10 mM MES/KOH für 30 Minuten dialysiert. Die Dialyse wurde wiederholt in frischen 5 L MES Puffer. Nach der Dialyse wurden 72 g Mannitol, 6 g BSA (Endotoxin frei) und CaCl₂ zugegeben und das Volumen auf ein 1 L mit MQ Wasser aufgefüllt. Nach vollständigem Lösen aller Komponenten wurde der pH nochmals kontrolliert und gegebenenfalls auf 5.6 angepasst. Abschließend wurde die Lösung steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Enzymlösung:

- 1% Cellulase (Yakult, Japan)
- 0,25% Macerozyme (Yakult, Japan)
- 400 mM Mannitol
- 8 mM CaCl²
- 0,6% BSA
- 5 mM MES/KOH pH 5.6
- ~2,5 nM AEBSF (nach Dialyse)

2.8.2. Protoplastenpräparation

Um Mesophyll Protoplasten für die transiente Transfektion zu erhalten wurden ca. 2 g Blattmaterial von 3-4 Wochen alten Arabidopsis Keimlingen für 3 ½ bis 5 Stunden in 15 ml Enzymlösung verdaut. Dafür wurden die Blätter mit einer Schere abgeschnitten, komplett mit der Enzymlösung in einer Petri-Schale bedeckt und auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden Blattüberreste durch Filtration durch ein 200 µm Nylonnetz entfernt. 10 ml W5 Lösung wurden verwendet um die Petri-Schale zu spülen und anschließend zur Enzymlösung gegeben. Anschließend wurden die Protoplasten gewaschen. Dafür wurde für 2 Minuten mit 60 g und minimaler Beschleunigung zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und mit 10 ml W5 Lösung aufgefüllt. Das Protoplastenpellet wurde danach vorsichtig gelöst und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem sich die Protoplasten abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgenommen und die Protoplasten danach abhängig von der Größe des Pellets in bis zu 5 ml MaMg aufgenommen. Um die Protoplastenzahl zu bestimmen, wurde die Chlorophyll Absorption gemessen. Hierfür wurde Protoplastensuspension in 80% Ethanol 1:20 verdünnt und der Absorptionswert bei 720 nm von dem Wert bei 652 nm abgezogen. Eine Differenz von 1 (unverdünnt) entspricht dabei einer Konzentration von etwa $0,55 \cdot 10^6$ PP/ml. Dieser Wert wurde für Col-0 Wildtyp Protoplasten ermittelt, indem die Anzahl an lebenden Protoplasten zuvor mehrmals, unter Verwendung eines Hematocytometers an einem Zeiss Axioskop ausgezählt wurde. Hierfür wurden die Protoplasten mit Fluoresceindiacetat (FDA) angefärbt. Anschließend wurde die Konzentration auf einen Wert von $1 \cdot 10^6$ PP/ml eingestellt.

W5 Lösung: 2 mM MES/KOH pH 5.7
 154 mM NaCl
 125 mM CaCl₂
 5 mM KCl
 steril filtriert

MaMg: 5 mM MES/KOH pH 5.7
 400 mM Mannitol
 15 mM MgCl₂
 steril filtriert

FDA-Lösung: 1 mg/ml in Aceton

2.8.3. Protoplastentransfektion

Für die Transfektion der zuvor vorbereiteten Protoplasten wurden pro Ansatz 15 µg bis 45 µg DNA verwendet. In der Regel wurden dabei 9 µg eines Reporterkonstrukts, 3 µg eines internen Standards (35S::GUS, #883) und variable Mengen unterschiedlicher Effektor-Konstrukte verwendet. Soweit

nötig wurden die DNA Mengen durch Leervektor (pSK, #400) ausgeglichen. Die DNA Ansätze wurden mit MQ auf 15 µl aufgefüllt, 15 µl 0,8 M Mannitol zugegeben und in 2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl der vorbereiteten Protoplastensuspension zugegeben. Danach wurde 130 µl PEG-Lösung zugegeben und jedes Reaktionsgefäß sofort durch mehrmaliges invertieren gemischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur zwischen 5-15 Minuten wurde 750 µl W5 zugegeben, die Reaktionsgefäße invertiert und für 2 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Pellets in 200 µl WIMK gelöst. Die Ansätze wurden anschließend geteilt und eine Hälfte in der Regel mit ABA induziert. Die Protoplasten wurden bis zur Messung bei 22°C unter Dauerlicht inkubiert und in der Regel nach 16 Stunden gemessen. Bei einigen Experimenten in dieser Arbeit wurde von dieser Inkubationszeit abgewichen und nach nur 6 Stunden gemessen.

PEG-Lösung:	40% PEG 4000 200 mM Mannitol 100 mM CaCl ₂
WIMK:	4 mM MES/KOH pH 5.7 500 mM Mannitol 20 mM KCl steril filtriert

2.8.4. Enzymatische Messungen in Protoplasten

Zur Messung der Genregulation wurden nach transienter Expression in Protoplasten die Aktivitäten der *Photinus pyralis* Luciferase sowie der bakteriellen β-D-Glucuronidase (GUS) bestimmt. GUS wurde dabei konstitutiv unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimiert und diente als interner Standard zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Die gemessenen Luciferase Aktivitäten wurden durch die entsprechenden GUS Werten geteilt und ergeben ein Maß für die ABA abhängige Genexpression. Vor der Messung der Enzymaktivitäten wurden die Reaktionsgefäße wegen eventuell gebildetem Kondenswasser kurz zentrifugiert und anschließend resuspendiert.

2.8.4.1 Luciferase Aktivitätsbestimmungen

Für die Bestimmung der Luciferase Aktivität wurden 50 µl des Transfektionsansatzes in ein Rundboden Luminometer Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und am Berthold *flash`n`glow* Luminometer gemessen. Dabei erfolgte zunächst die Bestimmung der Hintergrund Aktivität für 10 Sekunden, anschließend wurde LAR injiziert und die Luciferase Aktivität für 20 Sekunden gemessen. Die Messung beruht auf der Methode von Luehrsen (Luehrsen et al., 1992).

Luciferase Assay Reagent (LAR): 20 mM Tricine/NaOH pH 7.8

2,7 mM MgSO₄
0,5 mM EDTA
33,3 mM DTT
0,53 mM ATP
520 mg/l Magnesiumcarbonat
200 mg/l Coenzyme A
150 mg/l Luciferin
0,1% Triton X-100

2.8.4.2 β -D-Glucuronidase Aktivitätsbestimmungen

Die Bestimmung der GUS Aktivität erfolgte nach Jefferson (Jefferson et al., 1987). Dabei wurden 50 μ l des Transfektionsansatzes in eine schwarze Microtiterplatte gegeben, 100 μ l GUS-Reagenz zugegeben und anschließend die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 460 nm bei einer Anregung bei 365 nm gemessen. Die Messung erfolgte bei 37°C im Synergy 2 Platerreader (BioTek) über einen Zeitraum von 7 Minuten. Aus den gemessenen Werten wurde die Steigung bestimmt und zur Auswertung der Daten verwendet.

GUS-Reagenz: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0
10 mM EDTA
1 mM DTT
0,1% Triton X-100
0,5 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid

2.9. Arbeiten mit Pflanzen

2.9.1. Anzuchtbedingungen

In dieser Arbeit wurden Pflanzen des Arabidopsis Ökotypus Columbia (Col-0) und einige in diesem Hintergrund generierte Mutanten angezogen. Die Anzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Nema oder Conviron, Kanada) unter Langtagbedingungen von 16 h Licht ($\sim 180 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 22°C, 50% Luftfeuchtigkeit) und 8 h Dunkelheit (17°C, 60% Luftfeuchtigkeit) in fein gesiebter Einheitserde (Typ T) über einer Perlit Schicht.

2.9.2. Samensterilisation

Für die sterile Anzucht wurden Arabidopsis-Samen zunächst 15-30 min in einer Lösung aus 80% (v/v) Ethanol und 0,1% (v/v) Triton-X 100 und dann 3 min in einer 3%igen(v/v) Natriumhypochlorit-Lösung und 0,1% (v/v) Triton-X 100 bei RT geschüttelt. Abschließend wurden die Samen drei bis fünf Mal mit

sterilem ddH₂O gewaschen und unter der Sterilbank auf MS-Platten ausgebracht. Um die eventuell noch vorhandene Dormanz zu brechen, wurden die Platten mit den Samen vor der Kultivierung 2 Tage bei 4°C gelagert. Die Anzucht von Arabidopsis-Keimlingen auf Agar-Platten erfolgte im Zellkulturraum unter Dauerlicht (50 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 22°C) auf einem kombinierten Pflanzenwachstumsmedium, das neben 1% Saccharose und 0,1% MES-Puffer Makrosalze entsprechend dem 1x-MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) sowie Mikrosalze und entsprechend dem 1x- B5-Medium (Gamborg et al., 1968) enthält. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren 9 g/l Agar zu einer 1 x MS-Lösung hinzugeben. Die Zugabe von Antibiotika (20 mg/ml Kanamycin) bzw. ABA (0,1-30 μM) erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 60°C.

10x Makro-Salze:	16,5 g/l NH ₄ NO ₃ 19 g/l KNO ₃ 3,32 g/l CaCl ₂ 1,7 g/l KH ₂ PO ₄ 3,7 g/l MgSO ₄ × 7x H ₂ O
400x B5-Mikrosalze:	0,01 g/l CoCl ₂ × 6x H ₂ O 0,01 g/l CuSO ₄ × 5x H ₂ O 14,6 g/l Na ₂ EDTA 1,2 g/l H ₃ BO ₃ 0,3 g/l KI 4 g/l MnSO ₄ × 4x H ₂ O 0,1 g/l Na ₂ MoO ₄ × 2x H ₂ O 0,8 g/l ZnSO ₄ × 4x H ₂ O 11,2 g/l FeSO ₄ × 7x H ₂ O
1x MS-Medium:	100 ml/l 10x MS-Makrosalze 2,5 ml/l 400x B5-Mikrosalze 10 g/l Saccharose 1 g/l MES/KOH pH 5,8
ABA-Stocklösung:	5 mM ABA in 1% MES/KOH pH 7,5

2.9.3. Pflanzentransformation

Die stabile Transformation von Arabidopsis erfolgte mit der Methode des *floral dips* (Clough und Bent, 1998). Hierfür wurden eine bis vier Pflanzen pro Topf (9x9 cm) in Erde ausgebracht und nach 4-5 Wochen die primären Infloreszenzen abgeschnitten. Dadurch geht die Apikaldominanz verloren und sekundäre Blütentriebe werden induziert. Vor der Transformation wurden weitgeöffnete Blüten sowie Schoten entfernt. Nach 2-5 Tagen wurden die Pflanzen kopfüber in eine Agrobakterien

Suspension für 3 Minuten getaucht. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden die Agrobakterien aus einer Vorkultur über Nacht bei 30°C in 250 ml LB Medium angezogen. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 5.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 6 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Für den *floral dip* wurde die Suspension anschließend auf ein Volumen von 300 ml erweitert. Die gediphten Pflanzen wurden mit einer Plastikhaube über Nacht abgedeckt. Für eine hohe Transformationseffizienz wurde der *dip* gegebenenfalls nach 2-3 Tagen wiederholt.

Infiltrationsmedium: 50ml/l 10x Makrosalze
 1,25 ml/l 400x Mikrosalze
 0,5 g/l MES
 50 g/l Saccharose
 pH mit KOH auf 5,8 eingestellt
 10 µl/l BAP-Stock [10 mg/ml]
 500 µl/l Silwet L-77

Die Selektion der T₁ Samen auf erfolgreiche Transformation erfolgte anschließend entweder mit Kanamycin (20mg/ml) auf MS Platten oder mit Ammonium-Glufosinat (BASTA) in Erde. Hierfür wurden die T₁ Samen auf Erde ausgebracht und eine Woche nach Keimung dreimal im Abstand von zwei Tagen mit BASTA (1:1000 Verdünnung) besprüht.

2.9.4. Physiologische Untersuchungen

2.9.4.1 Messung des Wurzelwachstum

Das Wurzelwachstum von Keimlingen auf ABA-haltigem Medium wurde analysiert, indem auf normalem MS-Medium fünf Tage alte, vertikal gekeimte Keimlinge mit einer Federstahl-Pinzette auf ABA-haltige MS-Platten umgesetzt wurden. Die Position der Wurzelspitze wurde auf der Platte markiert. Diese Platten wurden weitere vier Tage vertikal im Kulturraum bei Dauerlicht (50 µE * m⁻² * s⁻¹, 22°C) inkubiert. Das Wachstum der Wurzel während dieser Zeitspanne wurde mit ImageJ gemessen und zu Analyse Zwecken herangezogen. Die verwendeten ABA Konzentrationen für diese Versuche betragen zwischen 0,3 µM und 30 µM.

2.9.4.2 Analyse des Keimungsverhaltens

Die Analyse des Keimungsverhaltens von Arabidopsis-Samen erfolgte auf MS-Platten mit ABA-Konzentrationen von 0,1 bis 10 µM. Gleich alte Samen der zu analysierenden Pflanzen wurden sterilisiert und vereinzelt auf die jeweiligen Platten ausgebracht. Diese wurden dann für 48 h im Kühlraum bei 4°C stratifiziert. Anschließend wurden die Platten horizontal in einem Kulturraum mit

Dauerlicht ($50 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$, 22°C) zum Keimen gebracht. Die Keimung wurde, nach drei Tagen im Kulturraum ausgewertet. Dabei wurde der Durchbruch der Radicula durch die Samenschale als erfolgte Keimung gewertet.

2.9.4.3 Messung der Blattoberflächentemperaturen

Blattoberflächentemperaturen wurden mit Hilfe der VarioCAM head HiRes 384 von JENOPTIK Laser, Optik Systeme GmbH/InfraTec GmbH (Dresden) gemessen. Dabei wurde die Software Ibris Remote zur Messung und Ibris 3 zur Auswertung verwendet. Die Pflanzen wurden hierfür unter Kurztag Bedingungen angezogen und nach 4-6 Wochen mit $50 \mu\text{M}$ ABA besprüht. Die Oberflächentemperaturen wurden jeweils vor und $2 \frac{1}{2}$ h Stunden nach der Behandlung gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Calcium abhängige Proteinkinasen in der ABA-Signaltransduktion

Calcium abhängige Proteinkinasen gehören zu einer Proteinfamilie mit 34 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana*, die für Pflanzen einzigartig ist (Cheng et al., 2002). Sie besitzen eine besondere Struktur und vereinen eine Serin/Threonin Kinase Domäne mit einer Ca^{2+} bindenden regulatorischen Domäne (Harper et al., 2004). Diese Kombination ermöglicht die gleichzeitige Wahrnehmung von intrazellulären Konzentrationsänderungen des sekundären Botenstoffs Ca^{2+} und die Weiterleitung des Signals an untergeordnete Komponenten. Dies macht CPKs zu wichtigen Bestandteilen unterschiedlicher Signaltransduktionswegen. Neben Entwicklungsprozessen spielen sie sowohl in der biotischen als auch in der abiotischen Stress-Antwort eine zentrale Rolle (Boudsocq und Sheen, 2012). Das Pflanzenhormon ABA erlaubt eine Anpassung der Pflanze an abiotischen Stress wie Kälte, Hitze und Trockenheit. Dementsprechend sind für mehrere CPKs Funktionen in der ABA-Signaltransduktion beschrieben worden. So wurden unter anderem gezeigt, dass CPK4 und CPK11 die bZip Transkriptionsfaktoren ABF1 und ABF4 phosphorylieren und als positive Regulatoren der ABA induzierten Gen-Expression wirken (Zhu et al., 2007). Die nahe miteinander verwandten Proteine CPK21 und CPK23 sind von zentraler Bedeutung für die Regulation von Ionenkanälen, die bei der Schließung der Spaltöffnungen unter Trockenstress beteiligt sind (Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011). Darüber hinaus deutet die Mutante *gca2* im Landsberg Hintergrund, die eine Punktmutation in der 5'UTR des CPK23 Gens trägt, auf eine weitreichendere Funktion von CPK23 hin. Diese Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp in zentralen physiologischen ABA Reaktionen (Korte, 2009). Um diesen Phänotyp zu erklären, ist ein detailliertes Wissen über die genaue Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion notwendig.

Ein gängiger Ansatz zur Identifikation der Funktion eines Gens ist die Analyse von *loss of function* Allelen. Eine gute Quelle dieser Allele stellt das SALK Institut mit seiner T-DNA *knockout* Kollektion dar. Durch die zufällige Integration von T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltem Gentransfer sind für einige Gene entsprechende Linien verfügbar. Da dieser Gentransfer allerdings nicht gerichtet ist, ist die Verfügbarkeit passender Linien begrenzt. Eine zusätzliche Beschränkung bei der Analyse von KO Linien ist das Ausbleiben möglicher Phänotypen durch funktionelle Redundanz unterschiedlicher Gene, insbesondere innerhalb größeren Gen-Familien. Für CPK21 und CPK23 wurden entsprechende KO Allele bereits früher analysiert (Ma und Wu, 2007; Korte, 2009; Franz et al., 2011), allerdings keine oder nur schwache ABA abhängige Phänotypen beobachtet. Da CPK23 und CPK21 ein hohes Maß an Aminosäure Sequenz Homologie besitzen (81,9%) ist die Vermutung naheliegend, dass beide Proteine redundante Funktionen

besitzen könnten. In diesem Fall würde der Verlust der Funktion eines Gens durch das andere kompensiert. Basierend auf Sequenzanalysen ist CPK15 ein weiterer Kandidat mit eventuell redundanter Funktion. Die Aminosäure Sequenz Homologie zu CPK23 beträgt 74,9%, zu CPK21 sogar 79,6%. CPK15 wurde in der Literatur bisher nicht weiter beschrieben. Es ist daher unklar in welchen Prozessen und Signalwegen die Kinase beteiligt ist. Auch für CPK15 ist eine T-DNA Insertionslinie verfügbar.

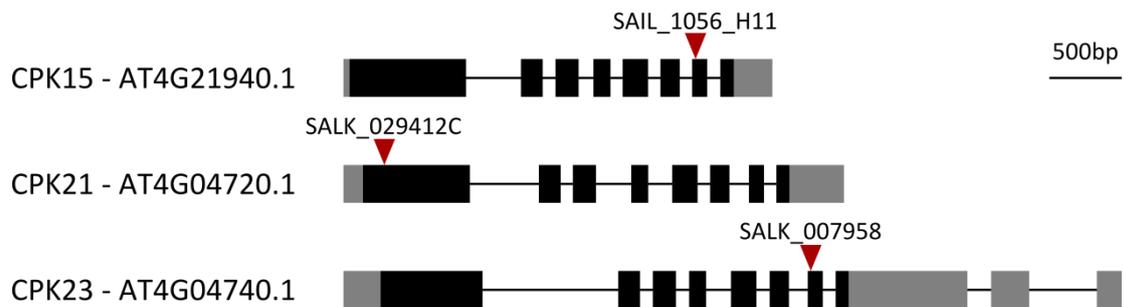


Abbildung 3.1 Genmodelle von CPK15, CPK21 und CPK23

Intron – Exon Struktur von CPK15, CPK21 und CPK23. Graue Bereiche stellen den nicht translatierten Bereich da, schwarze Bereiche den ORF. Rote Dreiecke geben den Insertionsort der T-DNA in den verwendeten Linien an. *cpk15* stammt aus der Syngenta Arabidopsis Insertion *library*, bei *cpk21* und *cpk23* handelt es sich um T-DNA Insertionslinien des SALK Instituts.

Abbildung 3.1 zeigt die Genmodelle der drei genannten Kinasen und die Position der T-DNA Insertionsstellen. Um dem Problem der möglichen Redundanz zu begegnen, wurden Kreuzungen der unterschiedlichen CPK T-DNA Linien erstellt. Abbildung 3.2 zeigt die Genomorganisation der Zielgene auf Chromosom IV.

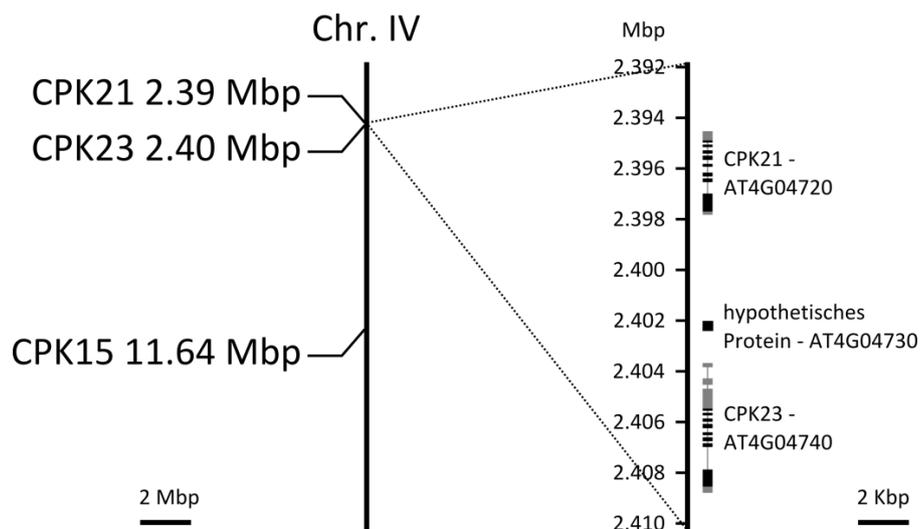


Abbildung 3.2 Genomorganisation von CPK15, CPK21 und CPK23

Position von CPK15, CPK21 und CPK23 auf Arabidopsis Chromosom IV. CPK21 und CPK23 liegen unmittelbar nebeneinander. Der Abstand beträgt ungefähr 6Kbp. Dazwischen befindet sich ein kleines hypothetisches Protein. CPK15 befindet sich über 9 Mbp entfernt und segregiert damit unabhängig.

Da CPK21 und CPK23 in unmittelbarer Nähe liegen, wurde nicht versucht durch Kreuzung eine entsprechende Doppel KO Linie zu erzeugen. Die erwartete Rekombinationsfrequenz liegt deutlich unter 0,1%. CPK15 befindet sich hingegen in einer Entfernung von ca. 50 cM, sodass *cpk15cpk21* und *cpk15cpk23* Linien erfolgreich erzeugt werden konnten. Mit Primern (GC 38+39, GC 75-78), die die Insertionsstellen flankieren, wurden homozygote Linien selektiert, die anschließend in physiologischen Assays auf einen ABA abhängigen Phänotyp untersucht werden sollten.

3.1.1. Physiologische Untersuchungen von CPK *knockout* Pflanzen

ABA ist der Botenstoff, der der Pflanze ungünstige Wachstumsbedingungen signalisiert, wie etwa begrenzte Wasserverfügbarkeit, hohe Salzkonzentrationen oder niedrige Temperaturen. Als Konsequenz wird das vegetative Wachstum reduziert, Keimung unterbunden und die Spaltöffnungen der Blätter geschlossen. Diese physiologischen Anpassungen können gut quantitativ gemessen und ausgewertet werden. Um eine mögliche Funktion von CPK15, CPK21 und CPK23 in der ABA Signaltransduktion zu untersuchen, wurden die erzeugten Linien entsprechend auf Keimungsrate, Wurzelwachstum und Blattoberflächentemperaturen in Abhängigkeit von ABA untersucht.

3.1.1.1 Keimungsversuche

Die untersuchten CPK T-DNA Linien zeigten ein zum Teil gegensätzliches Bild. Während *cpk15* im Vergleich zum Col-0 Wildtyp über weite Teile des gemessenen Konzentrationsbereich ein leicht insensitives Verhalten zeigte (6-14% höhere Keimungsraten bis 1 μ M ABA) verhielten sich *cpk21* und *cpk23* hypersensitiv. Insbesondere bei einer Konzentration von 0,3 μ M ABA wurde dieser Effekt deutlich. Bei dieser Konzentration lag die Keimungsrate von *cpk21* (45,8 % +/- 4,7%) und *cpk23* (34,9% +/- 5,9%) deutlich unter dem des Wildtyp (66,9% +/- 5,7%). Für *cpk23* wurde ein ähnliches Ergebnis bereits früher beobachtet (Korte, 2009). Der gegensätzliche Effekt der einzelnen CPK T-DNA Linien gestaltet die Interpretation der Daten der Doppel-Mutanten *cpk15cpk21* und *cpk15cpk23* schwierig. Grundsätzlich zeigten beide Linien ebenfalls ein hypersensitives Verhalten auf ABA. Das leicht insensitive Verhalten der *cpk15* Linie wurde anscheinend durch den Verlust der CPK21 bzw. CPK23 Gen-Funktion überlagert. Die Mutante *cpk15cpk21* zeigte den deutlichsten Phänotyp, der untersuchten Linien. Über den ganzen Konzentrationsbereich war die Keimungsrate deutlich reduziert, erreichte allerdings auch auf MS Medium ohne ABA nur 70% (+/- 2,2%). Die Linie *cpk15cpk21* hat womöglich einen generellen Keimungsdefekt. Interessanterweise wurde die *cpk15* Linie von Syngenta in einem T-DNA Insertions *screen* isoliert, der die Zielsetzung hatte Gene zu identifizieren, die für die Samen Entwicklung relevant sind (McElver et al., 2001). Auch wenn für *cpk15* in dieser Arbeit kein erkennbarer Defekt im Keimverhalten erkennbar war, könnte die deutlich

reduzierte Keimungsrate der *cpk15cpk21* Doppel KO Mutante erklärt werden, sollten CPK15 und CPK21 eine redundante oder synergistische Funktion in der Keimung besitzen.

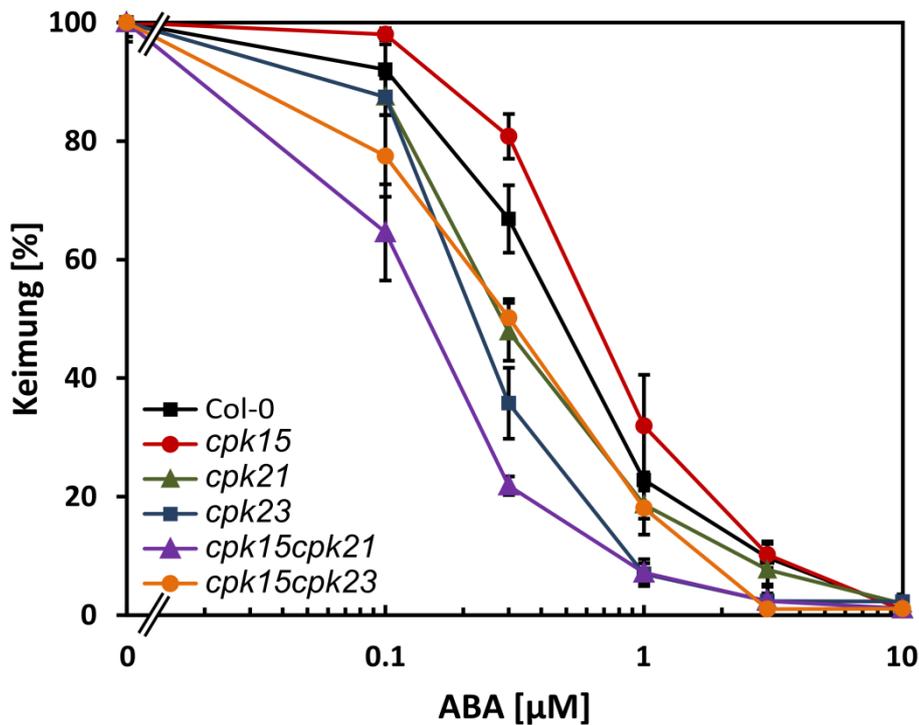


Abbildung 3.3 Keimungsrate von CPK KO Linien in Abhängigkeit von ABA

Gemessene Keimungsraten auf MS-Medium mit ansteigenden ABA Konzentrationen nach 3 Tagen bei 22°C unter Dauerlicht. Zuvor wurden die Samen 2 Tage bei 4°C stratifiziert. Keimungsraten sind als %-Wert der Keimungsrate auf MS ohne ABA angegeben. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von jeweils 3 Platten mit $n \geq 23$ Samen.

3.1.1.2 Wurzelwachstumsversuche

Im Wurzelwachstum verhielten sich alle untersuchten Linien ähnlich. Die Linie *cpk15cpk23* zeigte zwar eine geringfügig höhere Wachstumsinhibition, dieser Effekt ist aber nicht statistisch signifikant. Die Phänotypen im Keimverhalten konnten im Wurzelwachstum nicht bestätigt werden. Das ist grundsätzlich nicht ungewöhnlich, da nur wenige Mutanten der ABA Signaltransduktion in allen typischen physiologischen Antworten einen Phänotyp zeigen. Dies ist der Fall bei Mutanten, die sehr weit oben in der Signalkaskade angesiedelt sind, zum Beispiel bei den ABA Co-Rezeptor Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* (Meyer et al., 1994; Leung, 1997; Rodriguez et al., 1998). Auch die Mutante *gca2* hat einen pleiotropen Phänotyp. Allerdings handelt es sich bei diesen Mutanten nicht um T-DNA knock-out Linien, sondern um EMS gain of function Mutanten. Die beobachteten Ergebnisse im Wurzelwachstum decken sich mit früheren Experimenten mit *cpk23* (Korte, 2009).

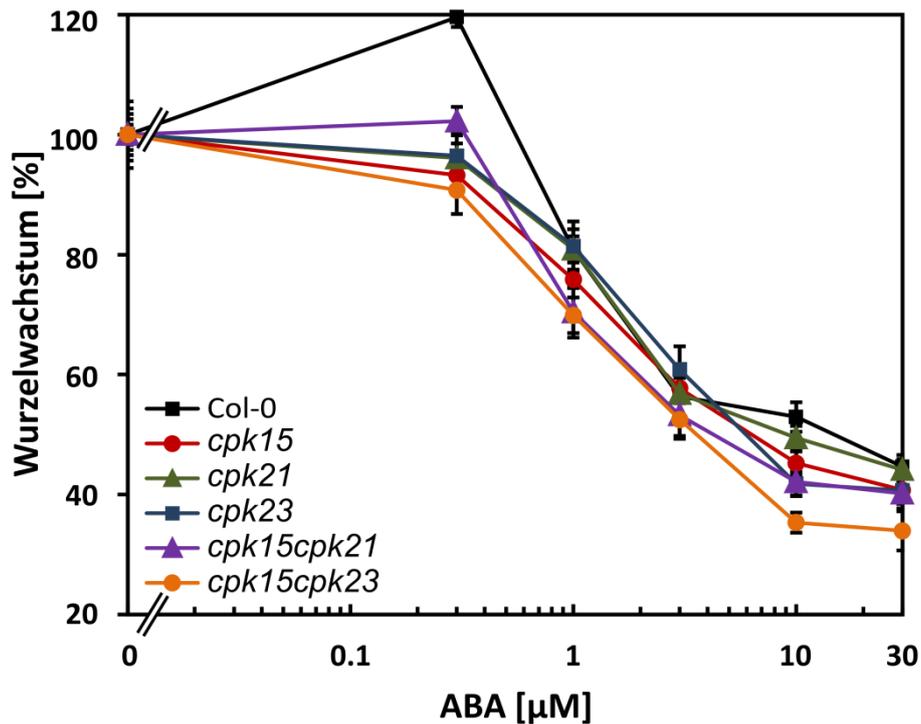


Abbildung 3.4 Wurzelwachstum von CPK KO Linien in Abhängigkeit von ABA

Gemessenes Wurzelwachstum auf MS Medium mit steigenden ABA Konzentrationen nach 4 Tagen bei 22°C unter Dauerlicht. Die Keimlinge wurden zunächst auf MS-Medium ausgebracht und nach 5 Tagen umgesetzt. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert des gemessenen Wurzelwachstums von $n \geq 13$ Keimlingen.

3.1.1.3 Bestimmung der Blatttemperatur mittels Infrarotthermographie

Neben einer Inhibierung von Wurzelwachstum und Keimung führt ABA zur Schließung der Spaltöffnungen. Leidet die Pflanze unter Trockenstress kann so der Wasserverlust minimiert werden. Eine indirekte Folge davon ist eine leichte Zunahme der Blatt-Oberflächentemperatur, da Transpiration und Verdunstungskälte abnehmen. Mit einer Thermo-Kamera können nicht nur diese geringfügigen Temperaturänderungen gemessen werden, sondern sogar Unterschiede in der ABA-Sensitivität verschiedener Mutanten dargestellt werden (Merlot et al., 2002; Demmel, 2010). Neben den CPK T-DNA Linien wurde die Mutante *snrk2de* als positiv Kontrolle untersucht. Diese wurde bereits früher mittels Infrarotthermographie untersucht und verhält sich komplett insensitiv gegenüber ABA (Merlot et al., 2002). Um den ABA induzierten Stomataschluss zu untersuchen, wurden etwa vier Wochen alten Pflanzen mit 50 µM ABA beziehungsweise Wasser besprüht und die Blattoberflächentemperaturen nach 2 ½ h mit der Thermokamera gemessen (Abb. 3.5). Die Temperatur der *snrk2de* Mutante war dabei deutlich niedriger als die des Wildtyps ($\Delta T 1,2^\circ\text{C}$) sowohl mit ABA als auch unter Kontrollbedingungen. ABA führte bei dieser Mutante zu keiner erkennbaren Veränderung der Blatttemperatur (siehe Bilder). Der beobachtete Effekt und die gemessenen Werte entsprachen dabei den Erwartungen und Veröffentlichungen in der Literatur (Mustilli et al., 2002).

Die untersuchten CPK T-DNA Linien zeigten eine leichte Erhöhung der Blatttemperaturen durch ABA Applikation (etwa 0,5-0,6°C). Dabei waren aber keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp zuerkennen, mit Ausnahme der Linie *cpk15cpk21*. Diese hatte nach ABA Applikation eine etwas niedrigere Blatt Temperatur als der Wildtyp (ΔT 0,4°C) und zeigte auch im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit H₂O kaum eine messbare ABA Reaktion.

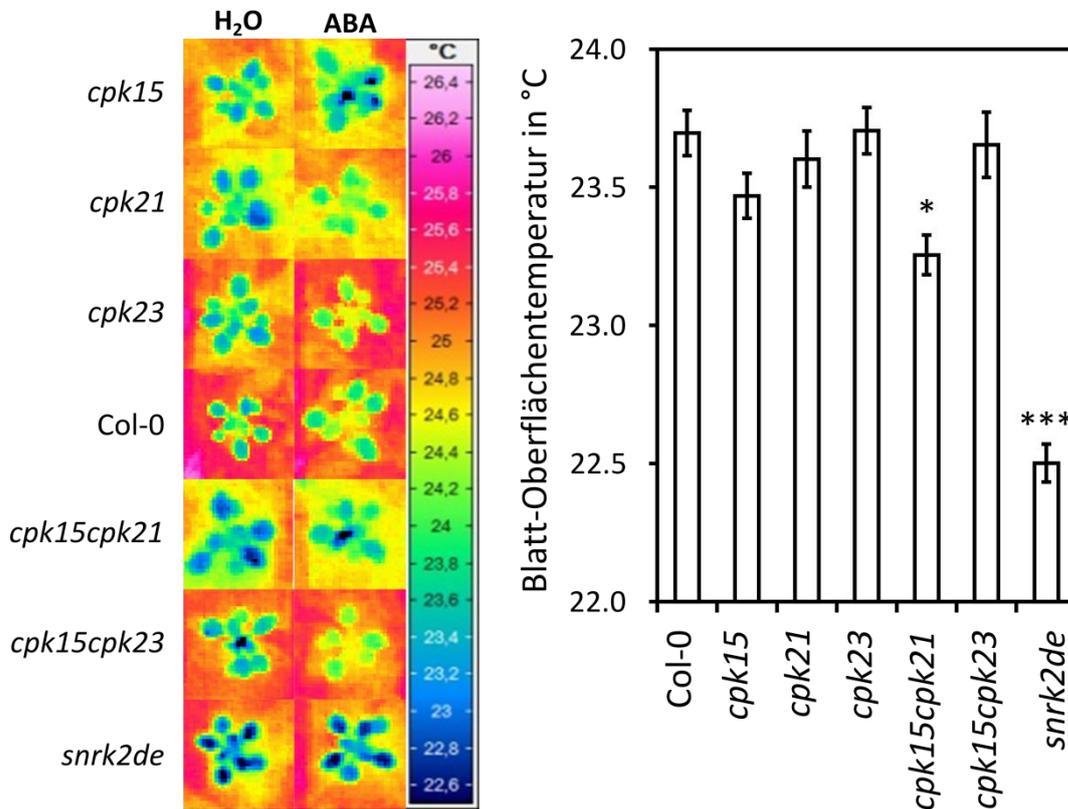


Abbildung 3.5 Blatt-Oberflächentemperatur von CPK KO Pflanzen in Abhängigkeit von ABA

Thermokamera Aufnahmen von Col-0, CPK T-DNA und *snrk2de* Pflanzen. 4 Wochen alte Pflanzen wurden mit 50 μ M ABA beziehungsweise Wasser besprüht und nach 2 ½ Stunden fotografiert. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte von 3 unterschiedlichen Pflanzen nach ABA Applikation. $P < 0,05$.

Da CPK21 und CPK23 in der Regulation der Stomata-Apertur, durch Phosphorylierung der Anionen Kanäle SLAC1 und SLAH3, beteiligt sind, wäre ein Effekt auf die Blatttemperatur nicht überraschend. Zumindest für eine KO Linie von CPK23 im Landsberg Hintergrund sowie für die Mutante *gca2* konnten Abweichungen der Blatttemperatur nach ABA Applikation gemessen werden (Demmel, 2010). In dieser Arbeit und im Columbia Hintergrund waren entsprechende Änderungen allerdings nicht zu beobachten. Für CPK15 ist keine Funktion in der Regulation der Stomata publiziert. Der Phänotyp der Mutante *cpk15cpk21* könnte jedoch auf eine solche hindeuten. Möglichweise besitzen CPK21 und CPK15 teilweise redundante Funktion. Der verwendete Assay ist in seiner Sensitivität

allerdings begrenzt. Die Veränderung der Blatttemperatur der Pflanzen durch ABA Applikation ist in der Summe zu gering. Das komplett insensitive Verhalten der *snrk2de* Mutante und der entsprechend deutliche Phänotyp lassen sich mit den Thermokamera Aufnahmen sichtbar machen, für die eher geringen Veränderungen der Linie *cpk15cpk21* wäre eine direkte Beobachtung der Stomataapertur sicherlich ratsam.

3.1.2. CPKs im transienten Reportersystem

Die durchgeführten physiologischen Untersuchungen können Schlüsse zulassen über die generelle Beteiligung eines Gens in der ABA Signaltransduktion. Darüber hinaus ermöglichen sie den konkreten Effekt einer Mutation auf den Phänotyp einer Pflanze zu studieren. Limitierend ist dagegen oft die Verfügbarkeit entsprechender Linien. Zwar gibt es neben T-DNA Insertions-Kollektionen Ansätze zum gerichteten Gen-*Knockout* (siehe Kapitel 3.2), ein Erfolg ist aber nicht garantiert. Zudem sind Pflanzen-Transformations Ansätze und Selektion bis hin zu stabilen homozygoten Linien zeitaufwändig. Gleiches gilt auch für das Einbringen von Transgenen und die Erstellung von Über-Expressions Linien.

Eine Alternative zu diesen Methoden stellen transiente Expressionsverfahren dar. Sie erlauben die schnelle und unkomplizierte Analyse der Funktion eines Gens in Signaltransduktionswegen. Zum Beispiel erlaubt die Expression in Mesophyll Protoplasten Veränderungen in der ABA abhängigen Genexpression sichtbar zu machen, die nicht zwingend zu einem makroskopisch sichtbarem oder physiologisch messbarem Phänotyp führen müssen. Dementsprechend wurden die zuvor untersuchten CPKs transient in Protoplasten überexprimiert (Yoo et al., 2007). Hierfür wurden Konstrukte verwendet, in denen die c-terminale, Ca^{2+} bindende, regulatorische Domäne entfernt ist, wodurch man konstitutiv aktive Versionen der entsprechenden Kinasen erhält (Boudsocq et al., 2010)(Abb. 3.6). Zur Visualisierung möglicher Effekte wurde der Promotor des RD29B Gens mit der kodierenden Sequenz der Glühwürmchen *Photinus pyralis* Luciferase fusioniert (Hoffmann, 2001). RD29B ist ein gängiger Reporter für die ABA induzierte Genexpression. Er besitzt drei ABRE Binde-Motive (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994) und wird stark durch ABA induziert (Uno et al., 2000; Christmann et al., 2005). Neben den oben genannten CPKs wurden CPK4 und CPK11 untersucht.

CPK4 und CPK11 sind, basierend auf den Phänotypen entsprechender KO Pflanzen, als positive Regulatoren der ABA Signaltransduktion beschrieben worden (Zhu et al., 2007). Deswegen sollte überprüft werden, ob diese Ergebnisse aus der Literatur auch im Protoplasten System dargestellt werden können. Da außerdem gezeigt wurde, dass CPK4 und CPK11 den bZip Transkriptionsfaktor ABF4 phosphorylieren (Zhu et al., 2007), wurden ABF4 beziehungsweise ABF2 co-exprimiert.

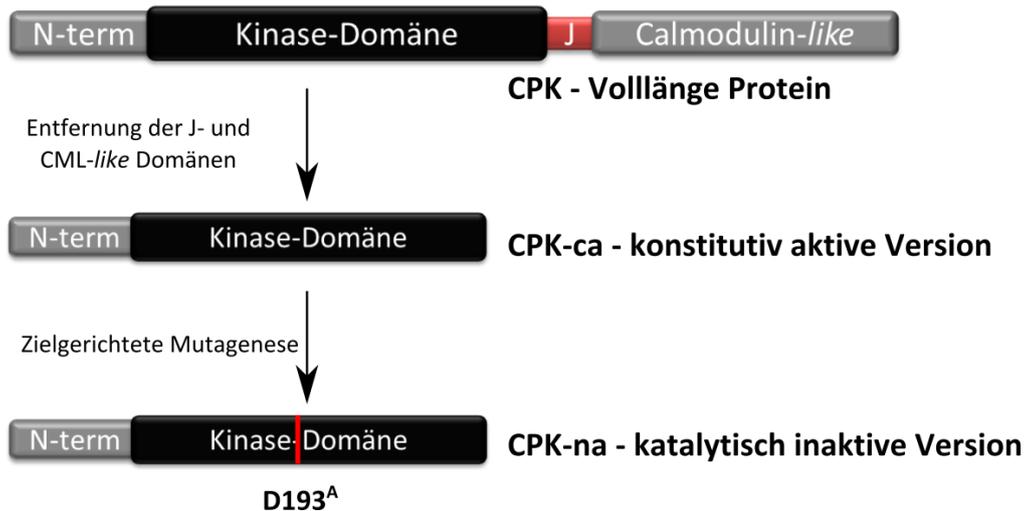


Abbildung 3.6 Herstellung konstitutiv aktiver (-ca) und inaktiver (-na) CPK Versionen

Schematischer Aufbau einer CPK, mit N-Terminus, Kinase, *junction* und Calmodulin-like Domänen. Durch Entfernen der J-, und CML-like Domänen erhält man einen konstitutiv aktiven Kinase (-ca). Durch Mutation eines konservierten Aspartats durch gezielte Mutagenese lassen sich katalytisch inaktive (-na) Versionen zur Kontrolle erstellen. Hier gezeigt ist die entsprechende Substitution im CPK23 Protein, Aspartat 193 zu Alanin.

Dabei zeigte sich, dass CPK4 und CPK11 auch im transienten Protoplasten Assay als positive Regulatoren der ABA Signaltransduktion wirken, dabei war es nicht relevant, ob ABF2 (Abb. 3.7 A) oder ABF4 (Abb. 3.7 B) co-exprimiert wurden. CPK4 induzierte RD29B ca. 9x ohne ABA im Vergleich zur Expression von ABF4 allein, mit ABA etwa 3x so stark (Abb. 3.7 B). CPK11 induzierte geringfügig stärker, die Ergebnisse waren allerdings durchaus vergleichbar. Im Vergleich dazu induzierte CPK23 deutlich stärker bei Co-Expression mit ABF4 (29x ohne ABA bzw. 6x mit ABA) und auch mit ABF2 (Abb. 3.7 A). CPK21 hatte nur bei Verwendung von ABF4 einen geringen Effekt auf die RD29B Induktion (3x ohne ABA und 1,5x mit ABA). Bei Co-Expression mit ABF2 führte CPK21 zwar zu einer doppelten so hohen Induktion ohne ABA, hatte aber keinen Effekt mit ABA. CPK15 hingegen scheint keinen Effekt auf die ABA abhängige Genexpression zu nehmen. Bei Co-Expression mit ABF2 waren geringfügig höhere Werte zu beobachten, diese liegen wahrscheinlich in der normalen Schwankungsbreite dieses Assays. Bei Co-Expression mit ABF4 war überhaupt kein Effekt messbar.

Zusammen mit den zuvor durchgeführten Keimungsversuchen deutet die transiente Expression in Protoplasten auf eine Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion hin, die über die bisher postulierte Rolle in der Regulation von Anionen-Kanälen hinaus geht und einen deutlichen Einfluss auf die ABA induzierte Genexpression hat. Für CPK21 fanden sich ebenfalls Indizien für eine weiterreichende Funktion. So konnte ein Einfluss auf die Keimung in Anwesenheit von ABA gezeigt werden und auch geringe Unterschiede in der RD29B Genregulation beobachtet werden, wenn gleich diese nicht annähernd vergleichbar zu den durch CPK23 hervorgerufenen Effekten waren.

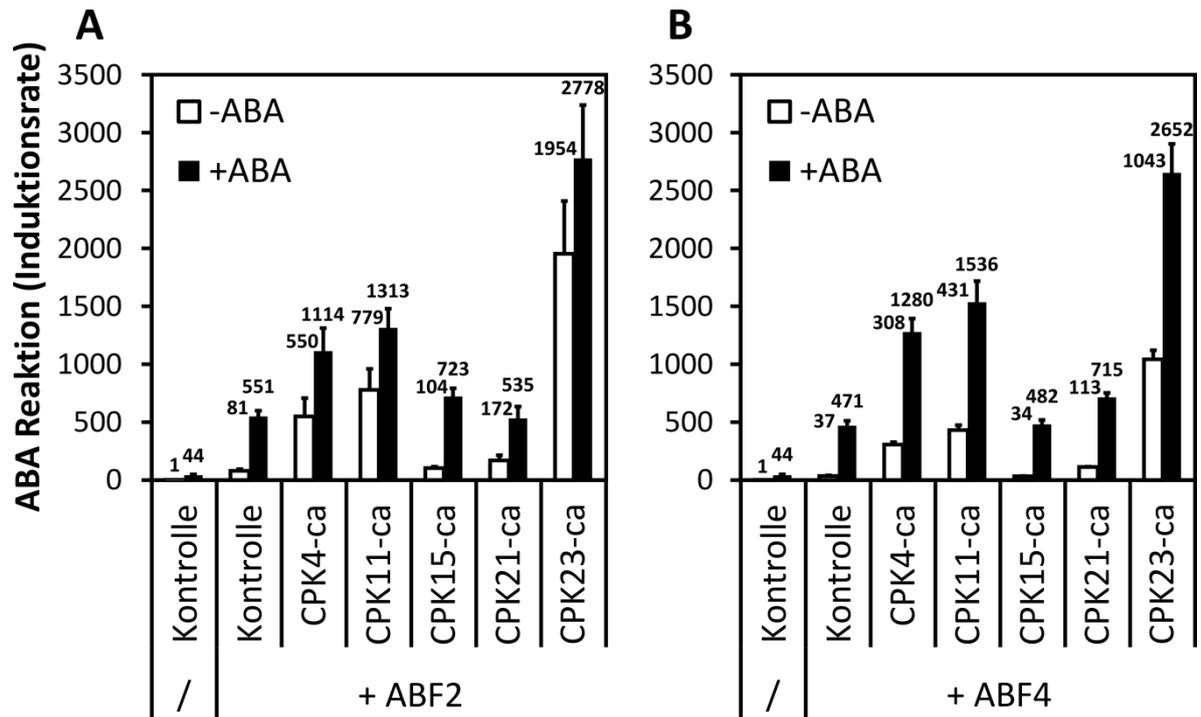


Abbildung 3.7 Einfluss von CPKs auf die Genexpression im transienten Reportersystem

Regulation von RD29B::Luc in Col-0 Protoplasten durch verkürzte konstitutiv aktive (-ca) Versionen verschiedener CPKs. Dafür wurden die einzelnen CPKs mit den Transkriptionsfaktoren ABF2 (A) oder ABF4 (B) co-exprimiert. Die Zahlen über den Balken geben die Induktionszahlen im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle an. Die Ansätze wurden nach der Transfektion geteilt und mit 3 μ M ABA bzw. Puffer induziert. Pro Ansatz wurden 3 μ g ABF2/4 und 3 μ g CPK-ca DNA verwendet. n=4.

Mögliche Redundanz zwischen CPK21 und CPK23 kann auch weiterhin nicht ausgeschlossen werden, da keine entsprechende Doppel KO Mutante zur Analyse zur Verfügung steht. Für CPK15 scheint eine Funktion in der ABA Signaltransduktion eher unwahrscheinlich. Die T-DNA Linie *cpk15* und die Kreuzungen mit *cpk21* bzw. *cpk23* zeigten nur leichte Veränderung des Phänotyp. Auch im Protoplasten-Assay konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden

3.2. Ansätze zum gerichteten Gen-*knockout*

Da sich CPK21 und CPK23 in unmittelbarer Nähe auf Arabidopsis Chromosom IV befinden (s. Abb. 3.2) kann eine Doppel KO Mutante durch Kreuzung nur schwerlich erzeugt werden. Um dennoch der Frage nachzugehen, ob CPK21 und CPK23 redundante Funktion besitzen, wurden Ansätze zum gerichteten CPK23 Gen-*knockout* versucht.

Lange Zeit war es in Pflanzen nicht möglich Gene gezielt auszuschalten, um ihre Funktion zu studieren. Gen-*knockout* Ansätze waren begrenzt auf nicht gerichtete Verfahren wie T-DNA oder Transposon Insertionen (Ostergaard und Yanofsky, 2004). Mit der Entdeckung der RNA Interferenz ergab sich eine erste Möglichkeit einzelne Gene gezielt auszuschalten. Dabei können unterschiedliche Verfahren genutzt werden. Erste Versuche wurden mit geringem Erfolg mit *antisense*-Konstrukten unternommen. In aktuelleren Arbeiten werden *hairpin* und artifizielle micro RNA (amiRNA) Konstrukte verwendet (Hilson et al., 2004; Schwab et al., 2006). Insbesondere amiRNA scheint ein geeignetes Werkzeug für das *silencen* einzelner Gene in Pflanzen zu sein. Die *mismatch* Toleranz pflanzlicher miRNAs ist deutlich geringer als im tierischen System, wodurch diese deutlich spezifischer sind (Schwab et al., 2005; Lim et al., 2005). Dadurch werden unerwünschte Effekte auf nicht Ziel-Gene unwahrscheinlicher. Ein generelles Problem von allen RNAi Verfahren ist ein in der Regel nur partielles *silencing*. Zudem sind die Effekte nicht immer über mehrere Generationen stabil.

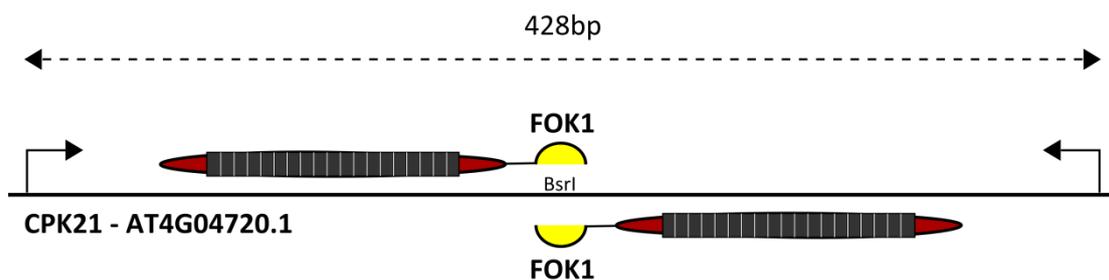
In den letzten Jahren wurden eine Reihe neuer Verfahren entwickelt, die eine sehr gute Alternative zu RNA Interferenz darstellen. Mit Zink Finger Nukleasen (ZFN), *transcription activator-like effector* Nukleasen (TALEN) und *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) lassen sich grundsätzlich nach dem gleichen Prinzip Gen-*knockouts* erzeugen (Townsend et al., 2009; Christian et al., 2013; Xing et al., 2014). Eine Nuklease wird durch eine zweite DNA-bindende Komponente zielgerichtet an ihren Bestimmungsort gebracht und erzeugt dort einen Doppelstrangbruch. Dieser kann auf zwei unterschiedliche Arten repariert werden. Entweder durch homologe Rekombination, oder sofern keine homologen Sequenzen vorhanden sind durch *non homologous end joining* (NHEJ) (Puchta und Fauser, 2014). Dabei entstehen oft kleine Deletionen oder Insertionen, die womöglich zu einem *frame shift* und damit verbunden einem verfrühten Stop-Codon in der codierenden Sequenz eines Gens führen.

ZFN und TALEN sind sich sehr ähnlich. Die DNA-bindende Komponente ist jeweils ein Protein. Bei ZFN basiert die DNA-Bindedomäne auf Zink Finger Transkriptionsfaktoren, bei TALEN auf *Xanthomonas* Effektor Proteinen. Als Nuklease kommt jeweils FOK1 zum Einsatz. Da FOK1 nur als Dimer aktiv ist, bestehen ZFN und TALEN immer aus Paaren, die in unmittelbarer Nähe binden müssen, damit die beiden FOK1 Monomere miteinander interagieren können und einen Doppelstrangbruch erzeugen.

Da die Bindungsparameter von Zink-Finger Transkriptionsfaktoren nicht so gut nachvollziehbar sind wie die von TALEs, sind Erstere in der Flexibilität ihrer Zielsequenzen etwas stärker begrenzt. Grundsätzlich wurden aber schon mit beiden Verfahren stabile Mutationen in Pflanzen erzeugt (Townsend et al., 2009; Li et al., 2012). Die neueste Methode macht sich die Verwendung von CRISPR/CAS9 zu Nutze (Horvath und Barrangou, 2010). Dabei wird ein RNA Einzelstrang verwendet, um die CAS9 Nuklease an ihren Bestimmungsort zu dirigieren. Das CRISPR/CAS9 System besitzt eine hohe Flexibilität, da die Länge der DNA-bindenden RNA Sequenz gerade einmal 20 Nukleotide beträgt (Jinek et al., 2012) und keine Paare benötigt werden, wie bei ZFN und TALEN. Diese hohe Flexibilität könnte allerdings auch ein Problem darstellen hinsichtlich der Spezifität des Systems und möglicher unerwünschter Nebeneffekte (Fu et al., 2013).

3.2.1. Gen-*knockout* mittels TAL Effektor Nukleasen

Zum Zeitpunkt der Planung dieses Projekts waren CRISPR/CAS9 noch nicht verfügbar. Deswegen wurden zum gerichteten Gen-*knockout* TALEN verwendet, mit dem Ziel eine CPK21/CPK23 Doppel KO Mutante zu erhalten. Hierfür wurde von der Gruppe von Prof. Lahaye ein TALEN Paar entworfen und bereitgestellt. Abbildung 3.8 zeigt schematisch die beiden verwendeten TALEN mit ihrer Zielsequenz in Exon 1 von CPK21. Zwischen den Bindestellen der beiden TALEN befindet sich die Restriktionsschnittstelle BsrI. Für eine Selektion erfolgreicher Mutagenese, wurde ein 428bp Fragment (GC 40+41) amplifiziert. Kommt es in Folge eines Doppelstrang-Bruchs und der Reparatur durch NHEJ zu einer Zerstörung der Schnittstelle, lässt sich dieses Fragment nicht mehr schneiden. Ansonsten entstehen zwei Fragmente mit 265bp und 163bp (PCR Selektion siehe Anhang).



Ziel - Sequenz TCGATTTGCAAGCATAAGTGTACCAGTACCAATCTCTTTACACATATACGTA

Abbildung 3.8 Gerichteter Gen-*knockout* von CPK21 mit TAL Effektor Nukleasen

Schematische Übersicht von TALEN mit DNA Bindedomäne und fusionierter FOK1 Nuklease. Darunter abgebildet sind die vorhergesagten Bindesequenzen der TALEN (in rot) in Exon1 von CPK21 und der Bereich dazwischen in schwarz. In blauer Schrift markiert ist die Restriktionsschnittstelle BsrI, die eine Selektion auf erfolgreiche Mutagenese ermöglicht. Dafür wird mittels PCR ein 428bp Fragment amplifiziert und anschließend mit BsrI verdaut.

Die TALEN Konstrukte wurden sowohl in den Col-0 Wildtyp Hintergrund sowie in die *cpk23* Mutante eingebracht. Die primären Transformanten wurden auf Ammonium-Glufosinat (BASTA) Resistenz

gescreent. Anschließend wurde in der T_1 zunächst 24 Pflanzen auf eine erfolgreiche Mutagenese getestet. Allerdings konnte kein unverdautes PCR Produkt nach dem Kontrollverdau detektiert werden. Die TALEN befinden sich unter der Kontrolle des starken konstitutiv aktiven 35S Promotors. Da die Expressionsstärke eines Transgens allerdings auch maßgeblich durch seinen Integrationsort bestimmt wird, wurden anschließend von 15 weiteren Linien zunächst die Expression der TALEN mittels quantitativer Real-Time PCR überprüft. Mit den Primern GC 1+2 wurde ein Fragment der FOK1 Nuklease amplifiziert, zur Normalisierung wurde ein Fragment von UBI10 amplifiziert (GC 3+4). Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis der Realtime PCR. Die analysierten Linien zeigten sehr deutliche Expressionsunterschiede mit relativen Schwankungen über einen Bereich von 10^4 . Bei einer BASTA resistenten Linie (23.4) und folgerichtig auch in der Col-0 Wildtyp Kontrolle war kein FOK1 Transkript nachweisbar. Für die weitere Analyse wurden die Linien mit der stärksten TALEN Expression in beiden genetischen Hintergründen ausgewählt. Von den Linien *wt2* und 23.5 wurden jeweils 96 Pflanzen der T_2 ausgebracht und wie zuvor mittels PCR und Restriktionsverdau analysiert. Es konnte allerdings auch in diesem Fall kein unverdautes Amplifikat nachgewiesen werden.

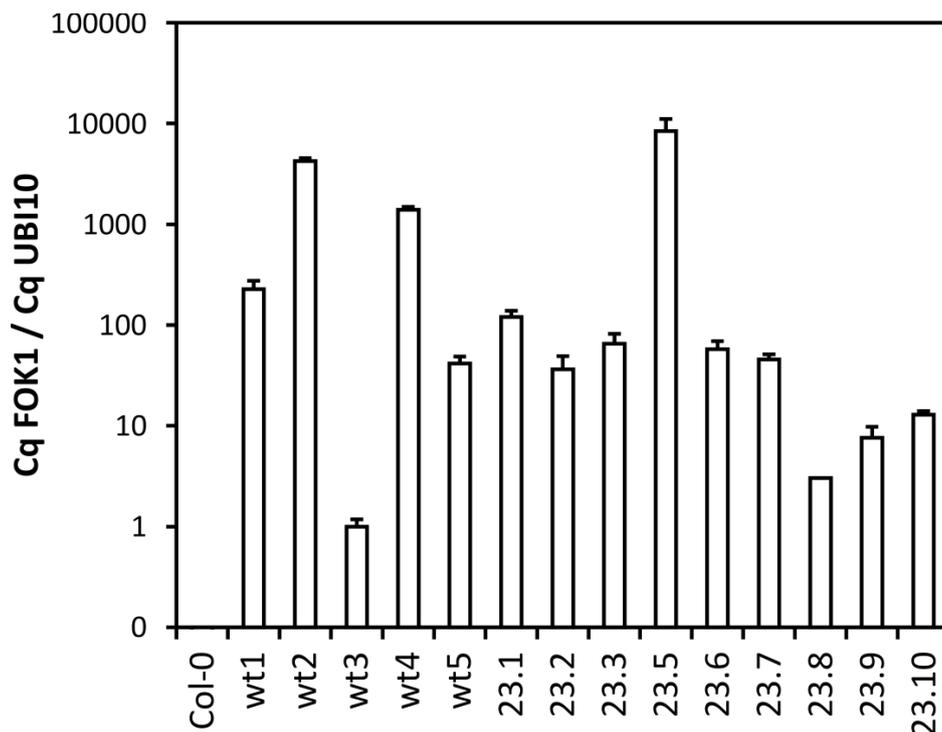


Abbildung 3.9 TALEN Expressionsstärke transgener Linien

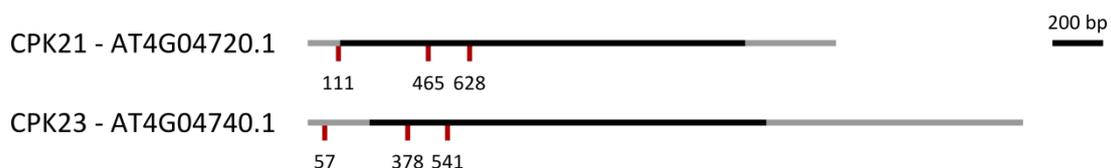
Q-PCR Analyse transgener TALEN Linien. Die beiden TALEN Konstrukte wurden mittels 35S Promotor in Col-0 Wildtyp bzw. *cpk23* Hintergrund überexprimiert. Um die Expression zu überprüfen wurde ein Fragment der FOK1 Nuklease amplifiziert und mit der Amplifikatstärke eines Fragments des UBI10 Gens normalisiert. In Col-0 Wildtyp konnte folgerichtig kein FOK1 Transkript nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke der Linie mit dem schwächsten Signal (*wt3*) wurde daher auf 1 gesetzt. $n=3$.

Da für TALEN Mutationsfrequenzen in somatischen Zellen von bis zu 70% gezeigt wurden (Christian et al., 2013), muss davon ausgegangen werden, dass die beiden verwendeten TALEN nicht oder nur

mit sehr niedriger Affinität an die Zielsequenz binden. Die DNA-bindende Domäne von TALEN besteht aus einer variablen Anzahl Wiederholungen von 34 Aminosäuren. Dabei sind die beiden sehr variablen Aminosäuren 12 und 13 jeder Wiederholung für die DNA Bindung verantwortlich (Boch et al., 2009). Sie bestimmen welche Base gebunden wird. Dabei bindet jedes 34 AS Segment genau ein Nukleotid. Obwohl diese DNA Bindung so gut verstanden ist und sich damit TALEN entwerfen lassen, die praktisch jede gewünschte Sequenz anvisieren, lässt sich in der Praxis schlecht voraussagen, welche Sequenzen effektiv und mit hoher Affinität gebunden werden (Christian et al., 2010). Um eine höhere Zuverlässigkeit der entworfenen TALEN zu erreichen, ist weitere Forschung in diesem Bereich notwendig. Da das verwendete Paar nicht oder nur mit sehr niedriger Frequenz die Zielsequenz binden und mutieren konnte, wurde der Ansatz aufgegeben und stattdessen eine alternative Methode gewählt.

3.2.2. Gen-*knockout* mittels artifizierender micro RNA

Artifizielle micro RNA wurde in Pflanze bereits erfolgreich zum *knockout* unterschiedlicher Gene eingesetzt (Schwab et al., 2006). Mit Hilfe des Web MicroRNA Designer (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) lassen sich schnell und einfach Konstrukte zum *silencen* einzelner oder mehrerer Gene in *Arabidopsis* entwerfen. Abbildung 3.10 zeigt drei entworfene Konstrukte, die gegen CPK21 und CPK23 gerichtet sind. Mit den Primern GC 5-16 und 34+35 wurde auf Basis des Vektors pRS300 Derivate der natürlichen pflanzlichen miRNA 319a entworfen (Klonierungsschema siehe Web MicroRNA Designer).

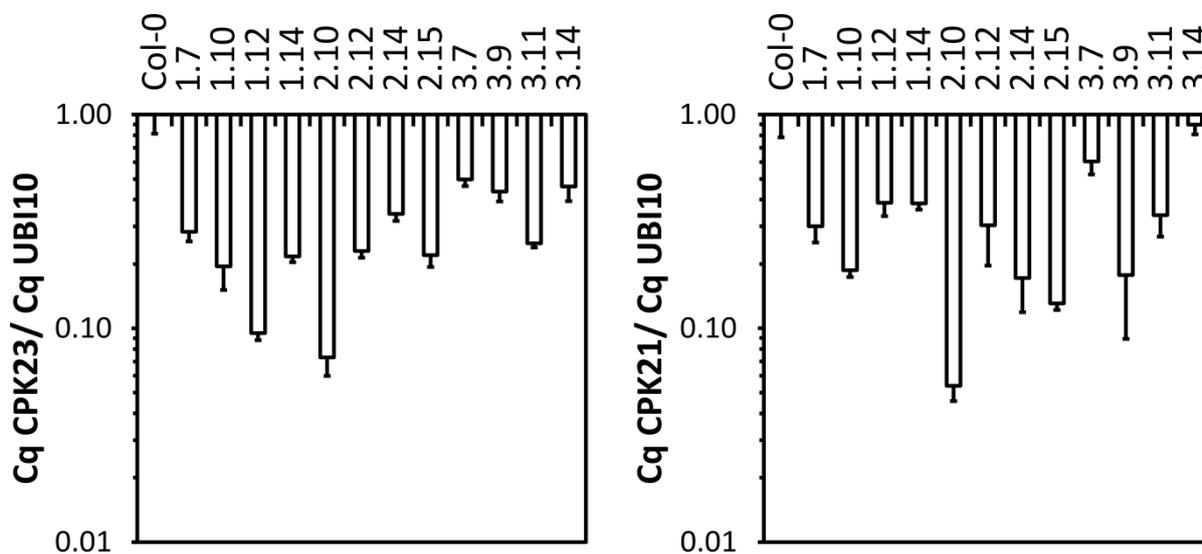


CPK21 5' -> 3' / 111-131	AAGTCTCCTCCTTTACTAATG
CPK23 5' -> 3' / 57-77	AAGTCTCCTCCTTTACTAATG
amiRNA-1 (rev. compl.)	GAGTCTCATCCTTTACTAATA
CPK21 5' -> 3' / 465-485	AAGAGGAAGCTAATTAGTAAG
CPK23 5' -> 3' / 378-398	AAGAGGAAGCTAATTAGTGAG
amiRNA-2 (rev. compl.)	TAGCGGAAGCTAATTAGTAAA
CPK21 5' -> 3' / 628-648	TTGATAGGATTATAGCTCAAG
CPK23 5' -> 3' / 541-561	TTGATAGGATTATAGCTCAAG
amiRNA-3 (rev. compl.)	TCGGTAGGATTATAGCTCAAA

Abbildung 3.10 Silencing von CPK21 und CPK23 mittels amiRNA

Schematische Übersicht der Zielsequenzen der entworfenen amiRNA gegen CPK21 und CPK23. Graue Bereiche in der Genstruktur stellen die 5' und 3' nicht translatierten Bereiche dar, schwarze Bereiche repräsentieren den codierenden Bereich. Rote Striche zeigen die Bindestellen der amiRNAs mit Koordinaten. Darunter abgebildet sind die Sequenzen. Rot markiert sind *missmatches*.

Die erstellten Konstrukte wurden anschließend in Col-0 Wildtyp transformiert und auf Kanamycin Resistenz selektiert. Anschließend wurde die Funktionalität der amiRNA Konstrukte mittels Q-PCR überprüft. Hierfür wurden jeweils 4 Linien pro Konstrukt in der T₁ Generation analysiert. Die Expressionsstärke von CPK23 wurde mit den Primern GC 48+49, die von CPK21 mit den Primern GC 46+47 bestimmt und mit UBI10 als *house-keeping* Gen normalisiert. Abbildung 3.11 zeigt das Ergebnis der Q-PCR Analyse. Die Expressionsstärke von Col-0 ist dabei auf 1 gesetzt. Grundsätzlich sind die entworfenen Konstrukte funktionell. Mit allen drei ließ sich die Expressionsstärke der Zielgene signifikant reduzieren. Allerdings zeigt sich ein grundsätzliches Problem aller RNA Interferenz Techniken, bei keiner Linie ist der Gen-*knockout* komplett. Der stärkste Effekt ist bei Verwendung von amiRNA 2 Linie #10 (2.10) zu beobachten. Die Expression von CPK23 beträgt noch 7,3% +/- 1,3%, die von CPK21 5,4% +/- 0,8%. Alle anderen Linien zeigen mehr als 20% der Expressionsstärke einer oder beider CPKs.

**Abbildung 3.11 Effekt verschiedener amiRNA Konstrukte auf die CPK21/CPK23 Genexpression**

Q-PCR Analyse primärer amiRNA Transformanden (T₁). Die Expressionsstärke von CPK21 und CPK23 sind mit der Expressionsstärke von UBI10 normalisiert. Der Wert für Col-0 ist auf 1 gesetzt. Die erste Ziffer der transgenen Linien gibt das verwendete amiRNA Konstrukt an. n=3.

Grundsätzlich ist der Ansatz mit amiRNA vielversprechend. Der Gen-*knockout* von CPK21 und CPK23 ist zwar nicht komplett, der vorhandene Effekt ließe sich aber wahrscheinlich noch verstärken, bei gleichzeitiger Verwendung mehrere amiRNA Konstrukte. Bringt man die verwendeten Konstrukte in eine der vorhandenen T-DNA *knockout* Linien ein (Abb. 3.1), müsste man außerdem nur noch ein

Transkript *silencen*. Selbst eine Komplementation ist bei amiRNA möglich, durch Verwendung eines Transgens mit stillen Mutationen (Palatnik et al., 2003).

3.3. Natürliche Diversität des CPK23 Locus

Der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* kommt verteilt über weite Gebiete der nördlichen Hemisphäre in verschiedensten Habitaten und Lebensräumen vor. Dabei findet man die Spezies in ariden Regionen Zentralasiens, in Hochgebirgslagen der Alpen und des Kaukasus sowie in humiden Lagen in weiten Teilen der gemäßigten Zonen (Hoffmann, 2002). Einhergehend mit der Fülle unterschiedlicher Lebensräume ist eine sehr hohe Variabilität des Phänotyps der Pflanze. Sowohl in äußerem Erscheinungsbild, Blüh- und Keimungsverhalten, sowie Anpassung an Umweltbedingungen und Krankheitsresistenz unterscheiden sich verschiedene Ökotypen deutlich (Alonso-Blanco et al., 1999; Stahl et al., 1999; Johanson et al., 2000; Alonso-Blanco et al., 2003; Hannah et al., 2006).

Durch die Sequenzierung des *Arabidopsis* Ökotypus Columbia-0 im Jahr 2000 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) und darauffolgend einer Reihe weiterer *Arabidopsis* Ökotypen, wurde die Basis für die Untersuchung der genetischen Grundlage dieser Variabilität gelegt.

Im Jahr 2008 wurde schließlich mit dem 1001 Genomes Project (<http://www.1001genomes.org>) ein gemeinsamer Ansatz mehrerer Organisationen unternommen, um die Variabilität des *Arabidopsis* Genoms in 1001 Ökotypen zu bestimmen. Die Zielmarke der 1001 *Arabidopsis* Linien ist mittlerweile mehr als erreicht. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand September 2014) sind bereits über 1100 *Arabidopsis* Linien sequenziert. Die Auswertung der gewonnenen Daten hat hingegen erst begonnen und stellt eine wertvolle Quelle an Information für die ganze Forschungsgemeinschaft dar.

Analysiert man die vorhandenen Sequenz-Daten für den CPK23 Locus fallen zwei Dinge auf. Zum einen besitzt der CPK23 Locus eine deutlich höhere Frequenz an *single* Nukleotid Polymorphismen (SNP) als die durchschnittlich zu erwartenden 6 SNPs/kb (Nordborg et al., 2005). Zum anderen ist die Sequenzinformation für viele Ökotypen sehr fragmentarisch oder fehlt zum Teil komplett. Letzteres mag technisch bedingt sein und Resultat der hohen Variabilität, wodurch eine genaue Quantifizierung der SNP Frequenz am CPK23 Locus erschwert wird.

Eine Häufung von SNPs und solche mit besonders gravierenden Effekten, wie zum Beispiel verfrühten Stop-Codons oder Veränderungen von Intron-Exon Grenzen, wurde vor allem bei Genen beobachtet, die für die Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt wichtig sind (Clark et al., 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist CPK23 ein Mediator der ABA abhängigen Genexpression. Es stellt sich also die Frage, ob die beobachtete Sequenz-Variabilität mit einem funktionellen Unterschied einhergeht. Sollte dies der Fall sein, ist sie womöglich das Ergebnis natürlicher Selektion am CPK23 Locus.

3.3.1. Funktionelle Analyse von CPK23 unterschiedlicher Arabidopsis Ökotypen

Um verschiedene CPK23 Allele auf funktionelle Unterschiede zu überprüfen, wurde das bereits beschriebene Protoplastensystem verwendet (Kapitel 3.1.2). Auf der Basis der vorhandenen Sequenzinformation des 1001 Genomes Project wurden mit den Ökotypen Ler-0, Bur-0 und Tsu-1 solche mit deutlichen Unterschieden zum Referenz Genom Col-0 ausgewählt. Die CPK23 Sequenz von Ler-0 (im weiteren GCA2) wurde bereits während der Arbeiten an der Mutante *gca2* sequenziert und kloniert (Korte, 2009). Die codierenden Sequenzen der anderen beiden Ökotypen wurden zunächst aus cDNA amplifiziert (GC 89+90) und anschließend in einen pSK Vektor hinter einen 35S Promotor kloniert (GC 56+57). Vergleicht man die in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen (siehe Anhang) mit denen des 1001 Genom Projects, ergeben sich deutliche Abweichungen. Gleiches gilt für die Ler-0 Sequenz von Korte (Korte, 2009). Dennoch besitzen alle drei Ökotypen eine große Anzahl an SNPs und weichen deutlich von der Referenzsequenz Col-0 ab.

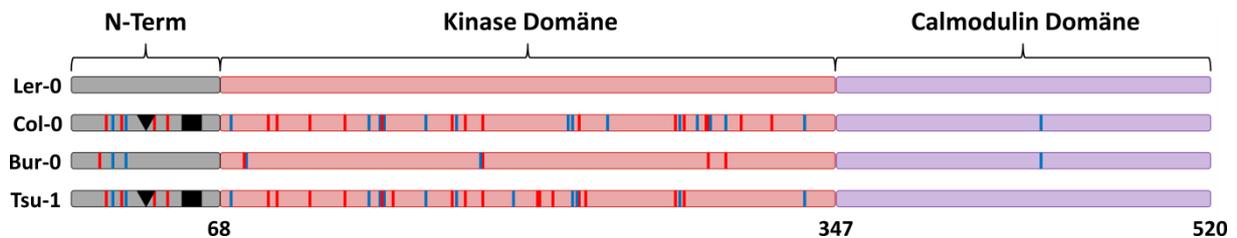


Abbildung 3.12 Schematischer CPK23 Aminosäure-Sequenzvergleich unterschiedlicher *Arabidopsis thaliana* Ökotypen

Proteinstruktur von CPK23 bestehend aus N-Terminus (grau, AS 1-68), Serin/ Threonin Kinasedomäne (rot, AS 69-347) und regulatorischer Calmodulindomäne inklusive *junction* Domäne (lila, AS 348-520). Unterschiede in der primären Proteinstruktur von Col-0, Bur-0 und Tsu-1 im Vergleich zu Ler-0 sind dargestellt. Schwarze Dreiecke symbolisieren Insertionen, schwarze Vierecke Deletionen in der primären Proteinstruktur. Striche geben veränderte Aminosäure an, wobei blau ähnliche Aminosäuren dargestellt sind, rot hingegen Aminosäuren mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften.

Abbildung 3.12 zeigt Abweichungen der primären Proteinstruktur von Col-0, Bur-0 und Tsu-1 zur Ler-0 Sequenz. Die größten Unterschiede sind im N-Terminus zu finden. Col-0 und Tsu-1 besitzen dort eine 8 AS lange Insertion und eine 9 AS lange Deletion. In der Kinasedomäne finden sich etliche SNPs die zu Veränderungen der primären Proteinstruktur führen, und noch weitere stille Mutationen (Nukleotid-Sequenzen siehe Anhang). Die regulatorische Calmodulindomäne ist hingegen stark konserviert und zeigt so gut wie keine Unterschiede. In der Summe ist die Variabilität über die CPK23 Sequenz enorm. Auf Aminosäure Ebene beträgt die Homologie zwischen den Ökotypen Ler-0 und Col-0 gerade einmal 89,6%. Im Vergleich dazu sind die zuvor ebenfalls untersuchten CPKs 15 und 21 gut konserviert. In den drei ausgewählten Ökotypen finden sich in der Summe gerade einmal drei

SNPs für CPK21 und vier SNPs für CPK15, die zu zwei beziehungsweise vier Aminosäure Substitutionen führen.

Für die Expression in Protoplasten wurden wie zuvor (Abb. 3.6) verkürzte konstitutiv aktive Versionen von CPK23 verwendet. Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis des Vergleichs in Protoplasten. Während CPK23-ca aus Col-0, wie zuvor gezeigt, RD29B stark induzierte, hatte GCA2-ca einen negativen Effekt (bis zu 50% Reduktion) auf die Reporteraktivität. CPK23-ca aus Bur-0 ähnelte in seiner Sequenz stark GCA2, verhielt sich im transienten Assay aber vergleichbar zu Col-0. Die Titration über einen Bereich von 100 ng bis 10 µg Effektor DNA in Anwesenheit von ABA (A) zeigte keine nennenswerten Unterschiede. Ohne ABA (B, weiße Balken) war die Induktion reproduzierbar nur etwa halb so stark. Um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte Kinase spezifisch sind, wurde eine katalytisch inaktive Version von CPK23 (CPK23-na, s. Abb. 3.6) aus Col-0 exprimiert (A). Dafür wurde durch *site directed mutagenesis* Aspartat 193 im *catalytic loop* der Kinase zu Alanin mutiert.

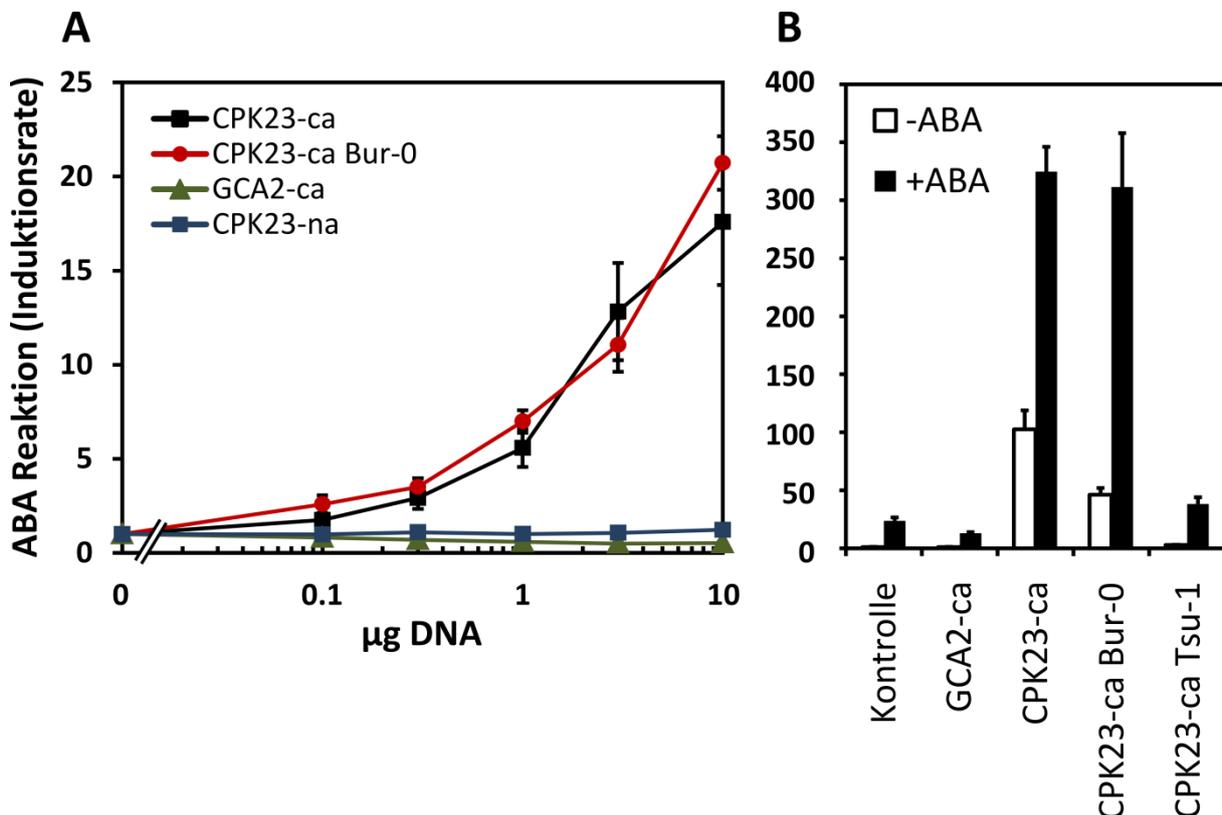


Abbildung 3.13 Transiente Expression von CPK23-ca verschiedener Arabidopsis Ökotypen

Regulation von RD29B::Luc in Col-0 Protoplasten durch CPK23-ca Versionen der Ökotypen Ler-0 (GCA2-ca), Bur-0 und Tsu-1. Titration (A) von CPK23-ca der Ökotypen Col-0 und Bur-0 sowie GCA2 und einer katalytisch inaktiven Version von Col-0 (CPK23-na). Die Protoplasten wurden nach der Transfektion mit 3 µM ABA induziert. Punktmessungen (B) aller analysierten Ökotypen. Es wurden jeweils 3 µg CPK23 Effektor DNA verwendet und die Protoplasten mit und ohne 3 µM ABA für 16 h inkubiert. n=9 (A), n=6 (B)

CPK23-ca aus *Tsu-1*, das in seiner Sequenz Col-0 ähnelt, induzierte RD29B bei der verwendeten Effektor Menge von 3 μg nur schwach (B), ohne ABA um 2,7 fache, mit ABA etwa um den Faktor 1,5. Daher wurde auf eine Titration verzichtet.

Da die Expression von GCA2-ca sogar eine Reduktion der Reporteraktivität zur Folge hatte, wurde dieser Effekt genauer untersucht. Dafür wurde oben beschriebene Mutation von D193 zu Alanin auch in GCA2 eingefügt, um zu untersuchen, ob der Effekt eine aktive Kinase erfordert. Abbildung 3.14 A vergleicht die Werte von oben, mit denen für eine inaktive Kinase von GCA2 (GCA2-na). Wie man sieht, reduzierte GCA2-ca die Reporteraktivität kontinuierlich bis zu einer Menge von 3 μg Effektor DNA auf 50%, während GCA2-na mit leichten Schwankungen über den Konzentrationsbereich keinen Effekt hatte. Ohne ABA war kein Effekt von GCA2-ca zu beobachten. Deswegen wurde die Aktivität von GCA2-ca in *aba2* Protoplasten in Abhängigkeit von unterschiedlichen ABA Konzentrationen untersucht (3.14 B). *aba2* Pflanzen besitzen nur geringe Mengen endogener ABA, da die Konversion von Xanthoxin zu Abscisin Aldehyde, einem Vorläufer von ABA, durch eine EMS induzierte Mutation gestört ist (Gonzalez-Guzman et al., 2002). Wie man in Abbildung 3.14 B sehen kann, war der Effekt von GCA2-ca ABA abhängig. Der negative Effekt von GCA2-ca war begrenzt auf einen Bereich von 1-10 μM . Für gewöhnlich wurden in dieser Arbeit 3 μM ABA verwendet, da dies weitgehend physiologischen Konzentrationen unter Stressbedingungen entspricht. Unter diesen Bedingungen führt GCA2 reproduzierbar zu einer reduzierten Reporteraktivität.

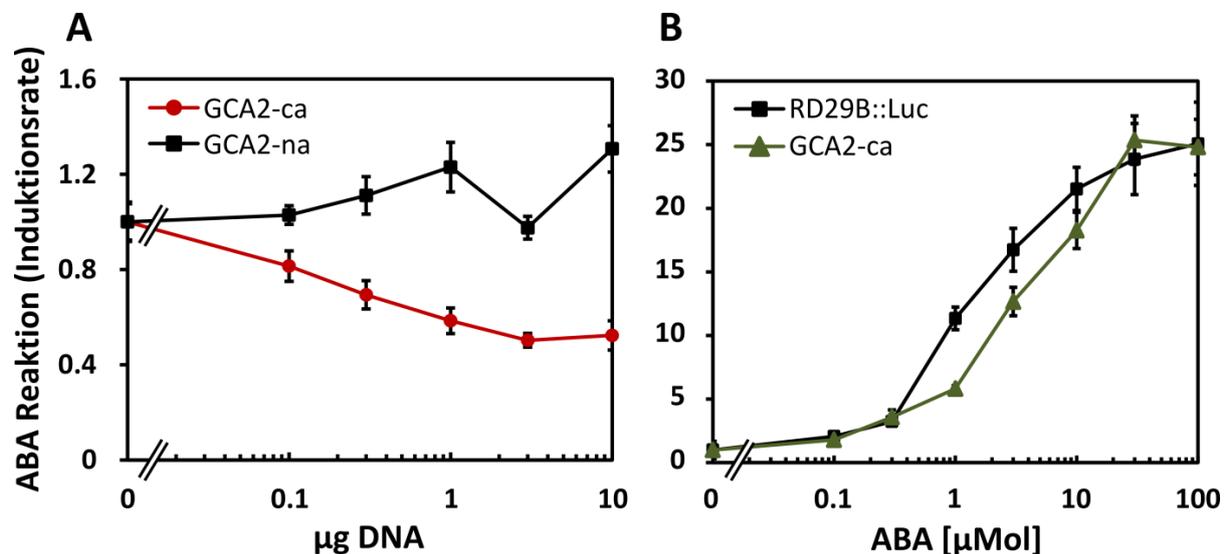


Abbildung 3.14 Transiente Expression von GCA2-ca in Abhängigkeit von DNA Menge und ABA
Regulation von RD29B::Luc durch eine konstitutiv aktive Version (GCA2-ca) und eine inaktive Kinase Version von GCA2 (GCA2-na) in Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen Effektor DNA in Anwesenheit von 3 μM ABA in Col-0 Protoplasten (A). Untersuchung der ABA Abhängigkeit des Effekts von GCA2-ca (B) in *aba2* Protoplasten bei Verwendung von 3 μg Effektor DNA. n=9 (A), n=6 (B)

Der CPK23 Locus ist höchst variabel in verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich die verschiedenen Allele auch in ihrer *in vivo* Aktivität deutlich unterscheiden. Während das Allel aus Tsu-1 praktisch inaktiv zu sein scheint, codieren die Allele in Bur-0 und Col-0 starke positive Regulatoren der ABA Antwort. GCA2, das entsprechende Ler-0 Protein hatte stattdessen den gegenteiligen Effekt.

3.3.2. Bestimmung essentieller Unterschiede der CPK23 Proteinstruktur

Die Unterschiede in der Proteinsequenz der untersuchten Ökotypen sind enorm. Dabei drängt sich die Frage auf, welche der zahlreichen Unterschiede für die veränderte Funktionalität verantwortlich sind. Durch Bestimmung dieser Unterschiede ließe sich zusammen mit Kristall-Strukturinformation des Proteins, womöglich Schlüsse über Mechanismus, Funktion und regulatorische Domänen von CPK23 ziehen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden jeweils Ler-0 mit Col-0 und Bur-0 verglichen.

3.3.2.1 Vergleich der Ökotypen Columbia und Landsberg erecta

Vergleicht man die Sequenzen aus den Ökotypen Col-0 und Ler-0, fällt auf, dass die Polymorphismen sehr ungleichmäßig über die einzelnen Domänen verteilt sind (Abb. 3.15). Während die Calmodulindomäne nur eine einzige AS Substitution aufweist, besitzt die Kinasedomäne eine Vielzahl (29 – Übereinstimmung von 89%). Dabei ist es schwierig ohne detaillierte Strukturinformationen vorauszusagen, welche AS Substitution für einen funktionellen Unterschied verantwortlich sein könnte. Allerdings ist es wahrscheinlicher, wenn gleich nicht zwingend, dass dafür Aminosäuren verantwortlich sind, die sich deutlich in ihrer Größe oder den chemischen Eigenschaften unterscheiden (rote Markierungen in Abb. 3.15).

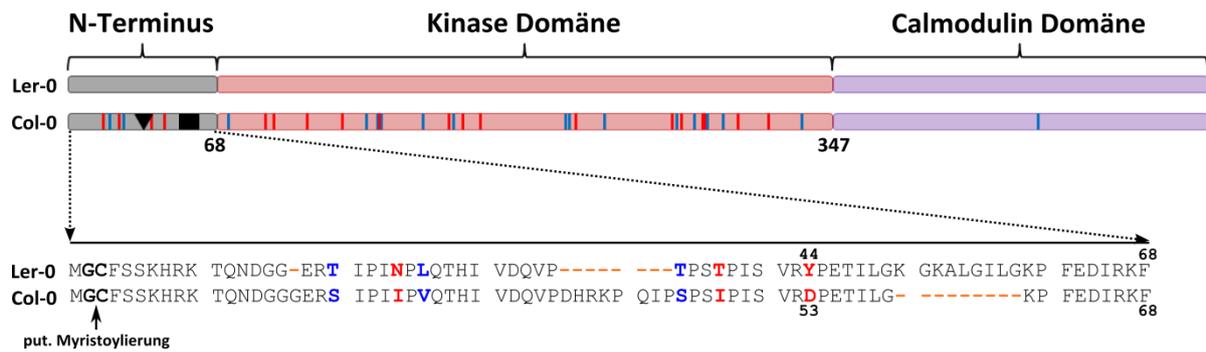


Abbildung 3.15 Aminosäure alignment des N-Terminus von CPK23 Ler-0/Col-0

Aminosäuresequenzen der N-Termini (AA 1-68) von CPK23 aus Ler-0 und Col-0. Deletionen in der Sequenz sind durch orangefarbene Striche gekennzeichnet. Aminosäureveränderungen sind fett hervorgehoben. Vermutlich gravierende Substitutionen mit AS, die in ihrer Größe oder ihren chemischen Eigenschaften deutlich abweichen, sind in rot markiert, ähnliche Aminosäuren in blau. Am unmittelbaren N-terminalen Ende befindet sich eine putative Myristoylierungsstelle, die eine Verankerung in der Membran erlaubt. Der im Weiteren untersuchte Polymorphismus an Y44 ist gekennzeichnet.

Die gravierendsten Unterschiede finden sich allerdings im N-Terminus, neben einer Reihe an einzelnen Aminosäuresubstitutionen findet sich dort auch eine 8 AS lange Insertion und eine 9 AS lange Deletion. Damit beträgt die Übereinstimmung zwischen den Col-0 und Ler-0 N-Termini gerade einmal 68,8% und liegt deutlich unter dem durchschnittlichen Gesamtunterschied von 89%. Abbildung 3.15 zeigt ein *alignment* der N-Terminus Sequenzen aus Ler-0/Col-0. Dabei sind die wesentlichen Unterschiede hervorgehoben. Grundsätzlich ist der N-Terminus zwischen einzelnen CPKs wenig konserviert, und es sind keine Strukturinformationen vorhanden. In erster Linie werden ihm zwei Funktionen zugeordnet. Zum einen haben die meisten CPKs an ihrem unmittelbaren N-terminalen Ende eine vorausgesagte Myristoylierungsstelle, die für eine Verankerung an der Plasmamembran verantwortlich ist (Boudsocq und Sheen, 2012). Für GCA2 wurde zuvor bereits eine Lokalisation an der Membran gezeigt (Korte, 2009). Zum anderen wird angenommen, dass der N-terminus von CPKs für Interaktion mit anderen Proteinen und ihre Substratspezifität wichtig ist. So wurde für CPK1 aus *Nicotiana tabacum* gezeigt, dass der N-terminus für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RSG und die *in vivo* Funktion von NtCPK1 notwendig ist. Durch einen *domain-swap* der N-terminalen Domänen zwischen NtCPK1 und AtCPK9 war es möglich, die *in vivo* Funktion auf die Arabidopsis CPK zu übertragen (Ito et al., 2010).

Daher ist die Hypothese naheliegend, dass Änderungen im N-terminus, durch die eventuell Interaktionen mit Zielproteinen verloren gegangen sind, zwischen Col-0 und Ler-0 zu dem beobachteten Funktionsunterschied führen. Deswegen wurden entsprechend der N-Terminus zwischen Ler-0 und Col-0 ausgetauscht und chimäre Proteine erzeugt, die Bestandteile beider Ökotypen besitzen. Abbildung 3.16 zeigt schematisch die erzeugten Konstrukte. Dabei wurde unter

Verwendung der Restriktionsschnittstelle BstBI die N-terminale Domäne ausgetauscht. Außerdem wurden Konstrukte hergestellt, bei denen zusätzlich Teile der sehr variablen Kinasedomäne ausgetauscht wurden. Dies geschah mittels *overlap extension* PCR (GC 83-86).

Entgegen der Erwartungen zeigten die erzeugten Fusionsproteine kein verändertes Verhalten im Protoplasten Reportersystem. Die Col-0 Kinasen mit Ler-0 N-Terminus blieben aktiv, während die GCA2 Proteine auch mit erheblichem Anteil Col-0 inaktiv blieben. Der N-Terminus scheint für die *in vivo* Funktion von CPK23 entweder keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu besitzen. Die Unterschiede zwischen Ler-0 und Col-0 können damit zumindest nicht erklärt werden. Eine weitere mögliche Erklärung für den funktionellen Unterschied, ist der Verlust oder die Veränderung von regulatorischen Stellen im CPK23 Protein. Proteine werden vielfältig post-translational modifiziert. Insbesondere bei Proteinen in Signaltransduktionswegen, deren Aktivität situationsbezogen verändert werden soll, ist das üblich. Die mit Abstand häufigste Modifikation ist die reversible Phosphorylierung.

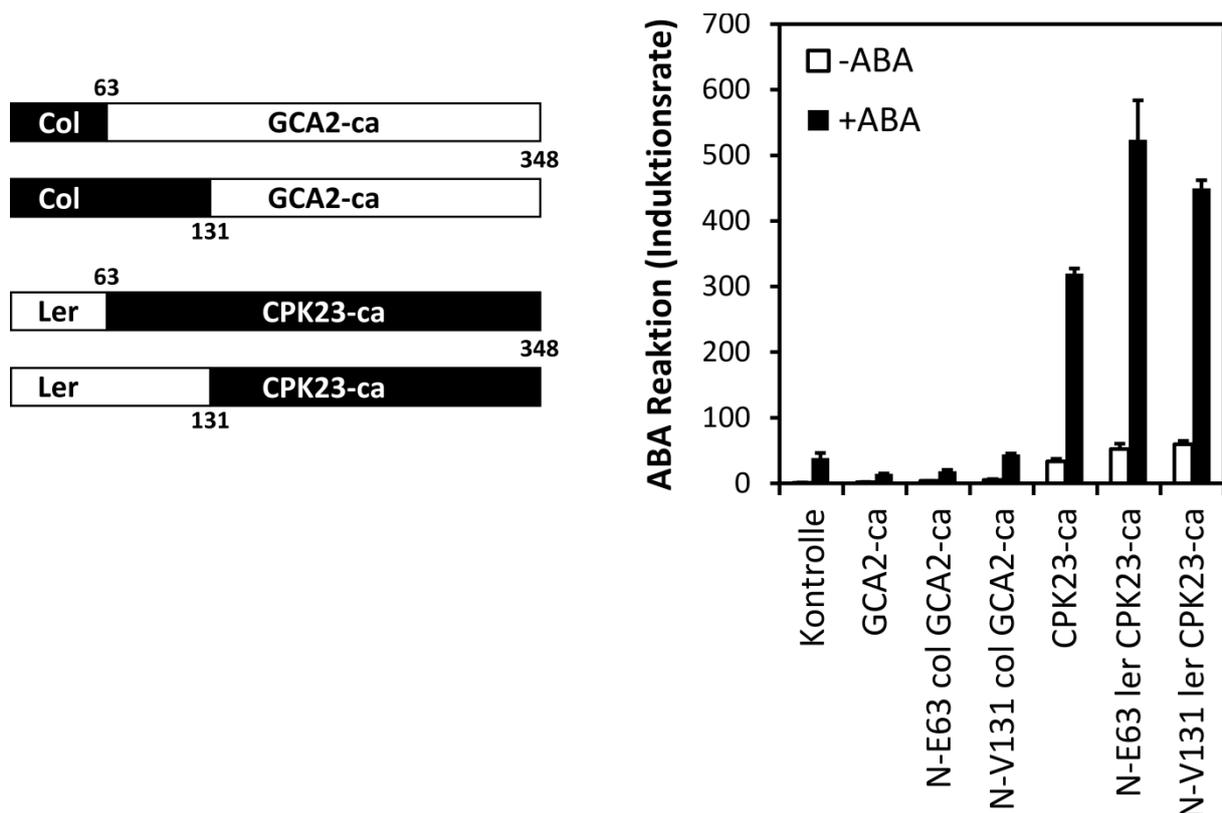


Abbildung 3.16 Konstruktion und Expression von Ler-0/ Col-0 CPK23 Chimären Proteinen

Unterschiedliche Fusionsproteine zwischen Ler-0 und Col-0 wurden erzeugt, in dem mittels Restriktionsverdau oder *overlap extension* PCR der N-Terminus (AS 1-63) beziehungsweise zusätzlich Teile der Kinasedomäne (AS 1-131) ausgetauscht wurden. Anschließend wurden die Fusionsproteine in Col-0 Protoplasten exprimiert. Dafür wurden jeweils 3 µg Effektor DNA verwendet und eine Hälfte der Ansätze mit 3 µM ABA induziert. n=3.

Dafür kommen in Pflanzen in erster Linie die OH-Gruppen der Aminosäuren Serin und Threonin in Frage. Es wurde aber auch schon die Phosphorylierung von Tyrosin in Pflanzen gezeigt (Oh et al., 2009). Obwohl bisher wenige Beispiele für Tyrosin Phosphorylierung in Pflanzen beschrieben wurden, ist nach neueren Erkenntnissen davon auszugehen, dass Tyrosin Phosphorylierung in Pflanzen nicht so ungewöhnlich ist, wie bisher angenommen (Mithoe und Menke, 2011). So wurde zum Beispiel für CPK4 und CPK34 gezeigt, dass sie Tyrosin Kinase Aktivität besitzen und an einem Tyrosin Rest im N-Terminus autophosphoryliert werden (Oh et al., 2012). GCA2 besitzt im N-Terminus einen Tyrosin Rest an Position 44 (Abb. 3.15), in CPK23 befindet sich an entsprechender Stelle ein Aspartat. Deshalb wurde untersucht, ob womöglich durch Tyrosin Phosphorylierung an dieser Stelle eine Regulation ausschließlich des Ler-0 Proteins stattfindet. Um eine mögliche Phosphorylierung an Y44 zu imitieren, wurde die Position in GCA2 zu Aspartat (GC 32+33) mutiert, um die negative Ladung einer möglichen Phosphorylierung zu imitieren, beziehungsweise als Kontrolle zu Phenylalanin (GC 96+97). In CPK23 wurde die entsprechende Stelle zu Tyrosin mutiert (GC 63+64).

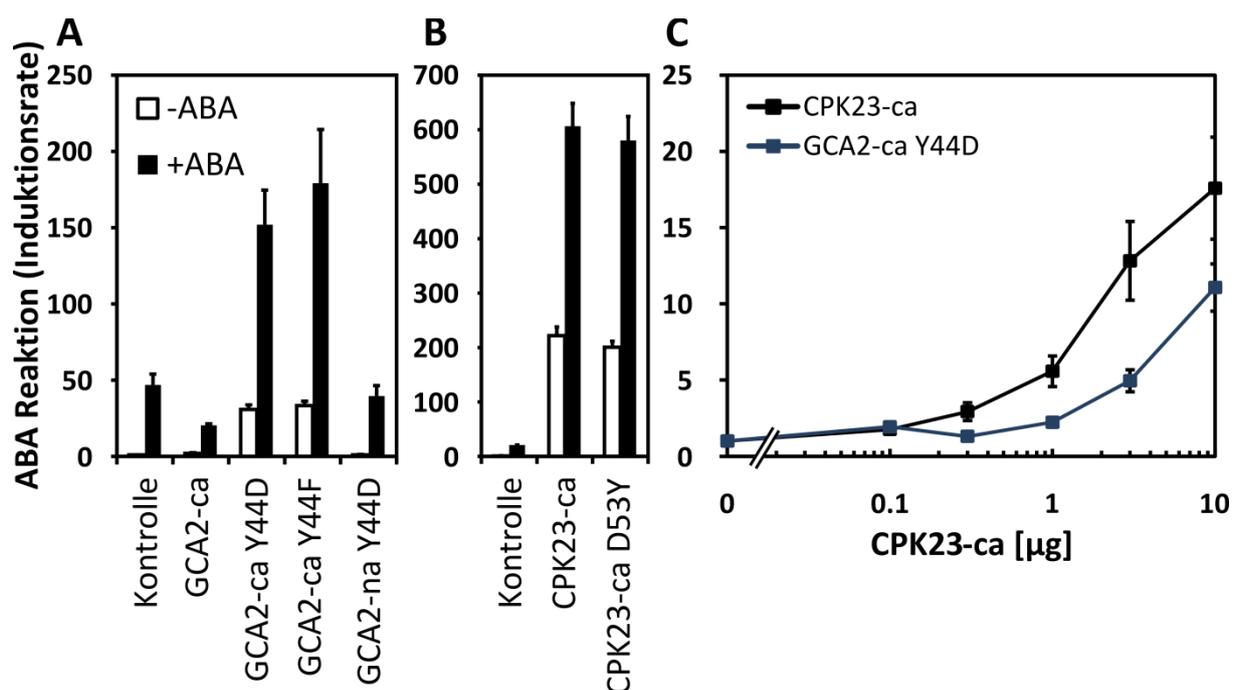


Abbildung 3.17 Transiente Expression von GCA2 Y44 phosphosite Mutationen

Regulation von RD29B::Luc durch GCA2-ca, GCA2-ca Y44^{D/F} und durch eine katalytisch inaktive Version GCA2-na Y44^D (A). Die entsprechende Position in CPK23, D53 wurde zu Tyrosin mutiert und in Protoplasten exprimiert (B). Die Ansätze bei A+B wurden jeweils geteilt und eine Hälfte mit 3 µM ABA induziert. Vergleich der Induktionsstärken (C) zwischen GCA2-ca Y44^D und CPK23-ca durch Transfektion von DNA Mengen von 1-10 µg in Anwesenheit von 3 µM ABA. n=3 (A+B), n=9 (C).

Abbildung 3.17 zeigt den Einfluss dieser Mutationen an der putativen Phosphorylierung Stelle (im Weiteren als *phosphosite* Mutationen bezeichnet) auf den Effekt von GCA2 auf die RD29B Induktion. Sowohl Austausch durch Aspartat als auch Phenylalanin führte zu einer Umkehrung der Funktion von

GCA2 hin zu einem positiven Regulator (3.17 A). Dieser Effekt war ebenfalls Kinase abhängig, wie man an der Expression einer nicht aktiven Version von GCA2 Y44D sehen konnte. Die Mutation der entsprechenden Stelle in CPK23 zu Tyrosin hatte hingegen keinen Effekt auf die CPK23-ca Aktivität (B). Der quantitative Vergleich der Induktionsstärken (C) zeigte, dass GCA2 durch die eingefügten Mutationen nur etwa ein Drittel der Aktivierungsstärke von CPK23 erreicht. Tyrosin 44 scheint eine wichtige Aminosäure für die Funktion von GCA2 zu sein, da durch Mutagenese zumindest eine partielle Aktivierung erreicht wurde. Der genaue Mechanismus ist allerdings unklar. Da der Austausch mit Aspartat und Phenylalanin den gleichen Effekt hatte, scheint eine Phosphorylierung eher unwahrscheinlich. Auch Versuche mit anti Tyrosin Antikörpern, eine Phosphorylierung an dieser Stelle nachzuweisen, verliefen erfolglos (Pleißner, unveröffentlicht).

Neben der Möglichkeit einer Tyrosin Modifikation sind in erster Linie Phosphorylierungen an Serin und Threonin Resten zu erwarten. GCA2 wurde bereits früher auf mögliche Autophosphorylierung mittels massenspektrometrischer Analyse untersucht. Dabei wurden in der Summe 33 mögliche Autophosphorylierungsstellen gefunden (Wellmann, 2013). Interessant erscheint dabei in erster Linie Serin 218, das sich im aktiven Zentrum der Kinase befindet. Dieser Bereich ist sehr gut konserviert zwischen CPKs, CIPKs und SnRK2 Kinasen. Serin 218 gehört zum Magnesium *binding loop* der Kinase (Nolen et al., 2004). Unmittelbar davor befindet sich das Aminosäure-Motiv DFG. Es wäre denkbar, dass die Kinase Aktivität von GCA2/CPK23 durch eine Phosphorylierung an dieser Stelle reguliert wird. Um den Effekt einer Autophosphorylierung zu untersuchen, wurden Mutationen in GCA2 und CPK23 mittels SDM zu Alanin beziehungsweise Aspartat erzeugt. Wie man in Abbildung 3.18 (A) sehen kann, führte ein Austausch von Serin 218 durch Alanin ebenfalls zu einer Aktivierung von GCA2, während eine Substitution mit Aspartat keinen Effekt hatte. Für CPK23 hatte die Mutation zu Alanin hingegen nur einen geringen Effekt (Reduktion der Induktionsstärke um etwa 1/3), während ein Aspartat an Position 218 zur totalen Inaktivierung führte. Abbildung 3.18 B zeigt den quantitativen Vergleich der Induktionsstärken von GCA2-ca S218^A und CPK23-ca. Wie zuvor bereits für GCA2-ca Y44^D (vgl. Abb. 3.17 C) gezeigt wurde, ist die Aktivierung nur partiell. Um vergleichbare Induktionsraten zu erreichen, wurde ungefähr die zehnfache Effektor DNA Menge benötigt. Serin 218 ist offensichtlich wichtig für die Aktivität der Kinase. Die Substitution mit Alanin in GCA2 legt nahe, dass GCA2 an dieser Stelle durch Autophosphorylierung inaktiviert wird. Für CPK23 wurden keine Autophosphorylierungsstellen bestimmt.

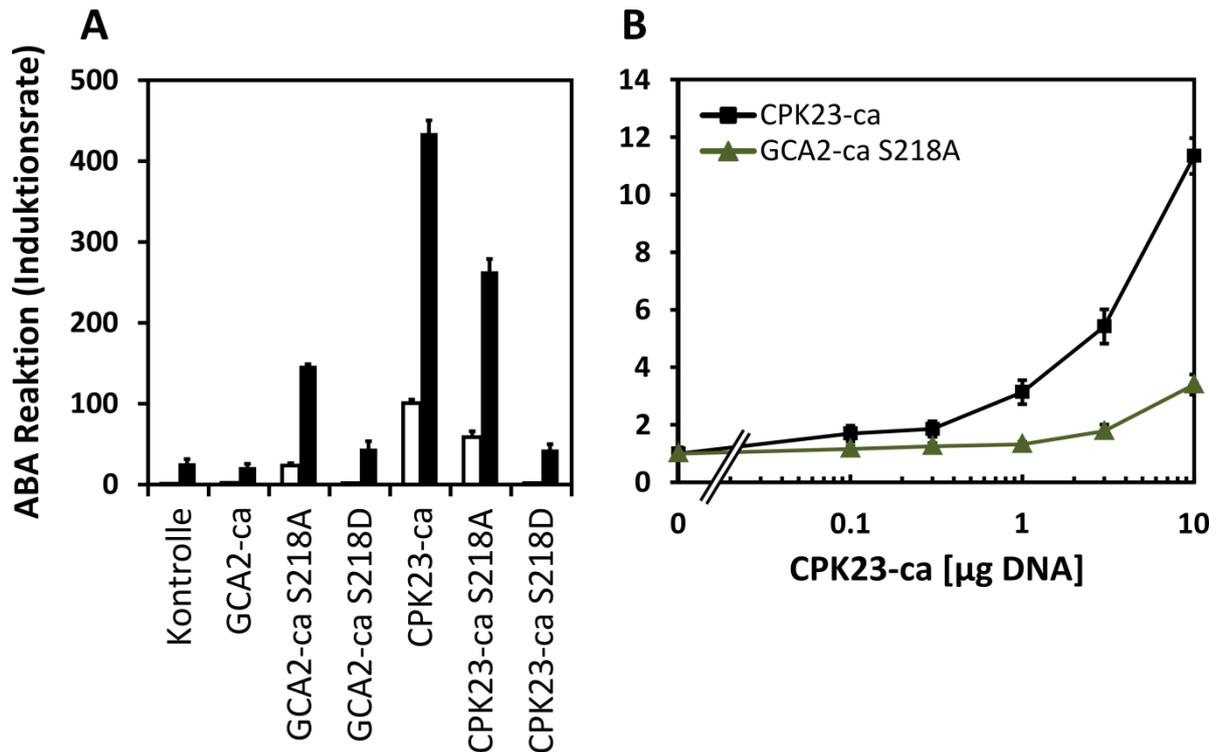


Abbildung 3.18 Transiente Expression von GCA2/CPK23 S218 *phosphosite* Mutationen

Regulation von RD29B::Luc durch GCA2-ca S218^{A/D} und CPK23-ca S218^{A/D} in Col-0 Protoplasten (A). Pro Ansatz wurden 3 μg Effektor-DNA verwendet, die Ansätze wurden nach der Transfektion geteilt und eine Hälfte mit 3 μM ABA induziert. Quantitativer Vergleich der Induktionsstärken (B) von GCA2-ca S218^A und CPK23-ca. Alle Ansätze wurden mit 3 μM ABA induziert. n=3 (A), n=4 (B).

Es wäre allerdings anzunehmen, dass die Autophosphorylierung an S218 in CPK23 unterbleibt. Auch wenn mit Serin 218 ein möglicher regulatorischer Unterschied gefunden werden konnte, bleibt die Frage offen, wodurch diese Autophosphorylierung reguliert wird, und welche strukturellen Unterschiede dies in CPK23 verhindern.

3.3.2.2 Vergleich der Ökotypen Landsberg und Burren

Da der Austausch des N-Terminus zwischen Ler-0 und Col-0 nicht den erhofften Effekt hatte, muss wohl davon ausgegangen werden, dass sich der relevante Unterschied in der Kinasedomäne befindet. Dabei gestaltet sich die Suche schwierig, schlicht auf Grund der großen Anzahl an Aminosäuresubstitutionen zwischen den Ökotypen Ler-0 und Col-0 (29 in der Kinasedomäne). Vergleicht man hingegen CPK23 in Ler-0 mit Bur-0, gibt es wesentlich weniger mögliche Kandidaten. CPK23-ca Bur-0 besitzt im transienten Assay vergleichbare Aktivität zu CPK23-ca aus Col-0 (Abb. 3.13 A) ist in seiner Sequenz allerdings wesentlich ähnlicher zu Ler-0 und besitzt über die ganze Proteinsequenz gerade einmal zehn AS Substitutionen (Abb. 3.19). Grenzt man die Analyse weiter auf die Kinasedomäne ein, gibt es gerade einmal sechs Unterschiede in der Proteinsequenz.

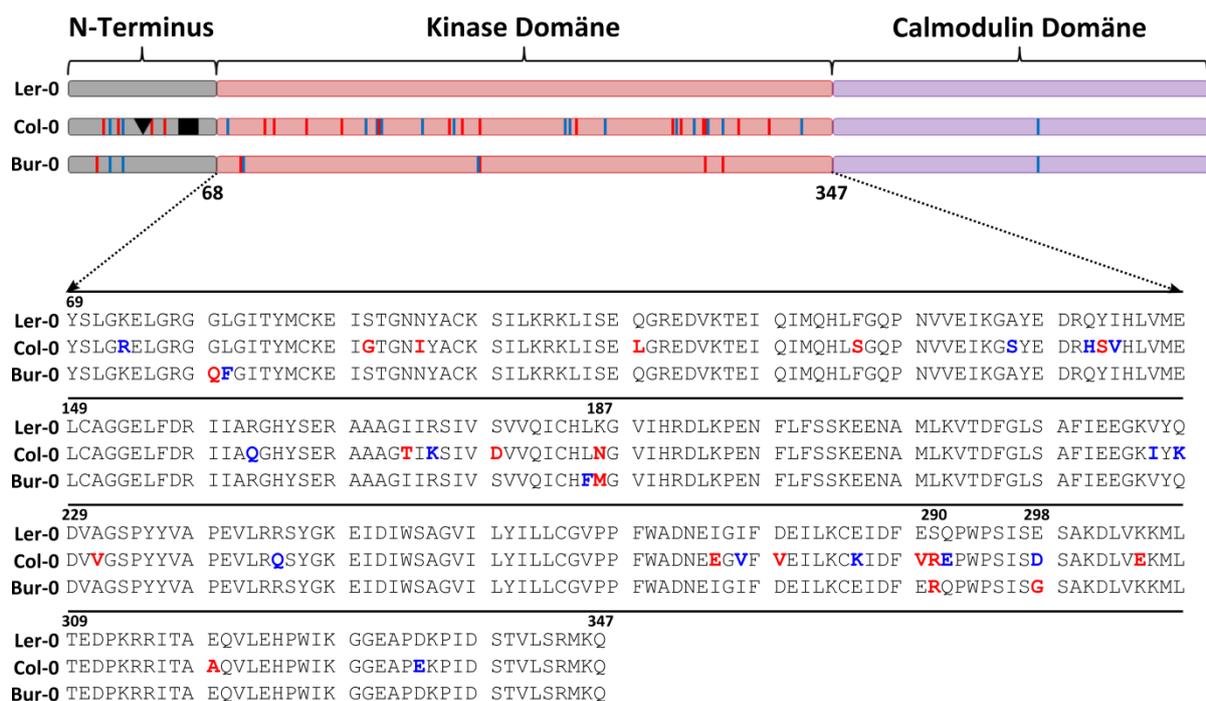


Abbildung 3.19 Aminosäure alignment der Kinasedomäne von CPK23 aus Ler-0/Col-0/Bur-0

Aminosäuresequenzen der Kinasedomäne (AA 69-347) von CPK23 aus Ler-0/Col-0 und Bur-0. Aminosäure Veränderungen sind fett hervorgehoben. Vermeintlich gravierende Substitutionen mit AS, die in ihrer Größe oder ihren chemischen Eigenschaften deutlich abweichen, sind in rot markiert, ähnliche Aminosäuren in blau. Putativ entscheidende Unterschiede sind mit ihrer Position markiert.

Desweiteren wurde angenommen, dass der relevante Unterschied zwischen Bur-0, auch in Col-0 von der Ler-0 Sequenz abweichen müsse. Unter diesen Gesichtspunkten findet man drei mögliche Kandidaten in der Ler-0 Sequenz, die in Abbildung 3.19 mit ihren Koordinaten hervorgehoben sind. Anstelle von Lysin 187 befindet sich in Bur-0 ein Methionin und in Col-0 ein Asparagin. Chemisch gesehen unterscheiden sich Asparagin und Methionin zwar, beide Aminosäuren stellen aber auch eine deutliche Abweichung zum basischen Lysin dar. Ein weiterer möglicher Kandidat ist Serin 290, das sowohl in Bur-0 als auch Col-0 durch ein Asparagin ersetzt ist. Die dritte gemeinsame Abweichung findet sich an Position 298. In Ler-0 befindet sich dort ein Glutamat, in Bur-0 ein Glycin und in Col-0 ein Aspartat. Da sich Aspartat und Glutamat ähneln und sich nur durch ihre Größe unterscheiden, wurde dieser Kandidat allerdings verworfen. Die anderen beiden Stellen wurden jeweils in Ler-0 und Bur-0 mittels SDM mutiert und auch Doppelmutanten erstellt, für den Fall, dass beide Stellen kooperativ für den Unterschied verantwortlich sind.

Die eingebrachten Mutationen hatten in GCA2 keinen Effekt (Abb. 3.20) sowohl K187^N, S290^R als auch eine Kombination beider Stellen. Die Aktivität von Bur-0 wurde hingegen durch die Mutation von Arginin 290 zu Serin deutlich, um etwa 50%, mit und ohne ABA reduziert. Die eingebrachte Mutation an Methionin 187 war hingegen ohne Effekt.

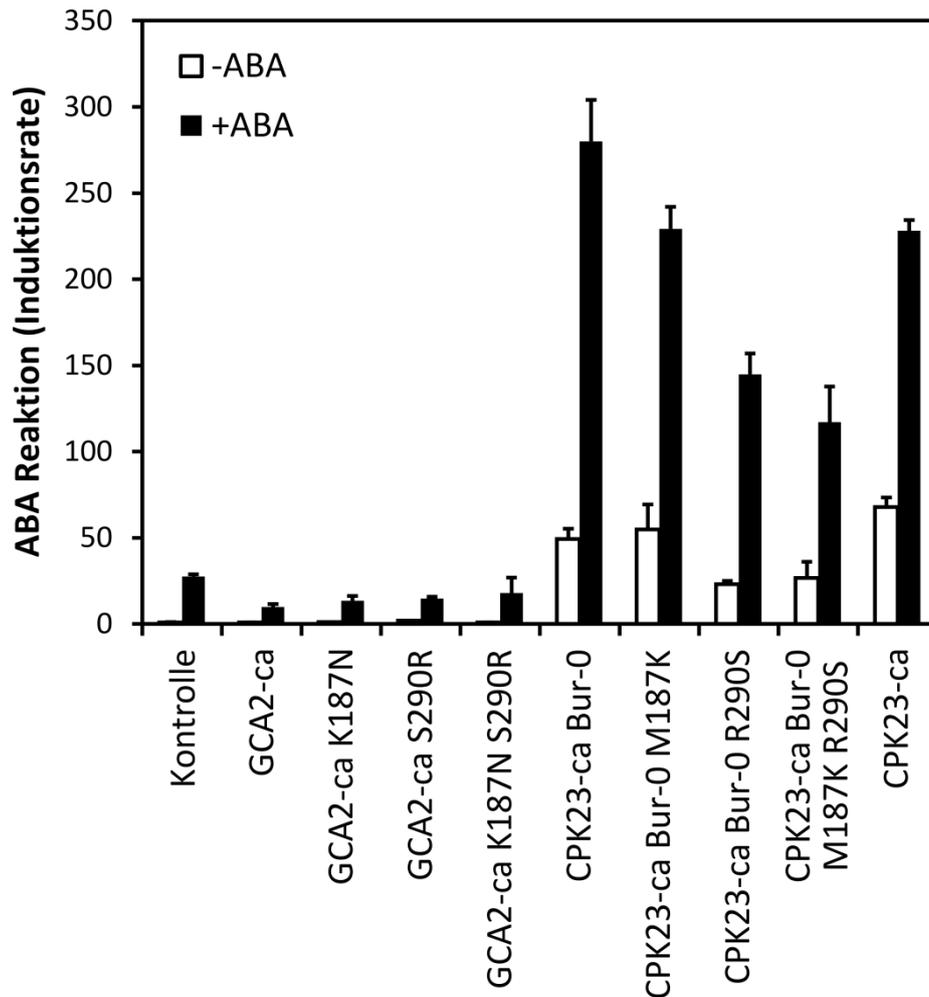


Abbildung 3.20 Transiente Expression von GCA2/CPK23 Bur-0 Punktmutationen

Regulation von RD29B::Luc durch verschiedene mutierte GCA2-ca/CPK23-ca Bur-0 Versionen in Col-0 Protoplasten. Die angegebenen AS-Substitutionen wurden mittels SDM erzeugt und jeweils 3 µg Effektor-DNA für die Protoplasten Transfektion verwendet. Die Ansätze wurden geteilt und eine Hälfte mit 3 µM ABA induziert. n=3.

Serin 290 stellt einen potenziell wichtigen strukturellen Unterschied zwischen Ler-0 und Bur-0/Col-0 dar. Es ist selbstverständlich nicht auszuschließen, dass Serin 290 auch eine mögliche Phosphorylierungsstelle in Ler-0 ist, auch wenn sie in bisherigen Studien nicht als solche beschrieben wurde. Neben Serin 290 wurden mit Serin 218 und Tyrosin 44 zwei weitere wichtige Stellen identifiziert, die für die Aktivität von CPK23 *in vivo* relevant sind. Allen Stellen gemeinsam ist, dass keine allein den zuvor beobachteten Unterschied (Abb. 3.13) erklären kann. Das ist allerdings auch nicht sonderlich überraschend. Die Tatsache, dass mehrere Unterschiede an ganz unterschiedlichen Positionen des Proteins die Aktivität beeinflussen, lässt einen komplexeren Mechanismus als einen singulären Polymorphismus, der die Aktivität bestimmt, vermuten.

3.4. Funktion von CPK23 in der Abscisinsäure Signaltransduktion

CPK23 ist ein positiver Regulator der Abscisinsäure Signaltransduktion, während GCA2, das entsprechende Protein in Landsberg, die Signaltransduktion negativ beeinflusst. Im vorherigen Kapitel wurde versucht, durch gezielte Mutagenese und Vergleich der Proteinsequenzen unterschiedlicher Ökotypen diesen funktionellen Unterschied aufzuklären. Um die generelle Wirkungsweise von CPK23 zu verstehen, ist es darüber hinaus unerlässlich Interaktionen und mögliche Regulation zentraler Komponenten der ABA Signaltransduktion zu untersuchen. Es ist durchaus denkbar, dass sich die beobachteten funktionellen Unterschiede auch in verändertem Verhalten zu diesen Kern-Komponenten der ABA Signalkette widerspiegeln.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde CPK23/GCA2 mit verschiedenen zentralen Signalkomponenten in Protoplasten co-exprimiert und Interaktionen mittels *yeast two hybrid* untersucht. Die meisten Experimente wurden sowohl mit GCA2 als auch CPK23 durchgeführt. Da der Effekt von CPK23 jedoch wesentlich eindrücklicher und besser zu quantifizieren ist, liegt der Focus dieses Kapitels hauptsächlich auf dem Col-0 Protein.

3.4.1. Regulation und Interaktion mit Protein Phosphatasen vom Typ2C

In der Literatur ist CPK23 als Regulator der Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 beschrieben (Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeiten wurde auch eine Interaktion zwischen CPK23 und ABI1 in *Xenopus* Oocyten mittels BIFC gezeigt. ABI1 gehört zur Familie der Protein Phosphatasen vom Typ2C (PP2C). PP2Cs bilden zusammen mit RCAR Proteinen den ABA-Rezeptor und sind zentrale negative Regulatoren der ABA Signaltransduktion. Für eine ganze Reihe unterschiedlicher Komponenten der Signalkaskade wurden Interaktionen mit PP2Cs gezeigt, neben RCARs (Ma et al., 2009; Fuchs et al., 2014) wurden Interaktionen mit CIPKs (Guo et al., 2002; Ohta et al., 2003), SnRK2s und CPKs, sowie ABF Transkriptionsfaktoren gezeigt (Umezawa et al., 2009; Lynch et al., 2012). Die Interaktion mit CPK23 wurde analog zu der mit SnRK2 Kinasen interpretiert und postuliert, dass PP2Cs CPK23 in Abwesenheit von ABA inhibieren (Geiger et al., 2010).

3.4.1.1 *Yeast-two-hybrid* Interaktionsstudie von CPK23 mit PP2CA

In vorhergehenden Arbeiten am Lehrstuhl für Botanik wurde die Interaktion zwischen GCA2 und den *clade A* PP2Cs systematisch mittels Y2H untersucht (Fuchs, 2013). Dabei konnten Interaktionen mit mehreren Mitgliedern dieser Familie bestätigt werden. Die stärkste Interaktion wurde mit PP2CA beobachtet. Um zu überprüfen, ob auch das Col-0 Protein mit PP2CA interagiert, wurde diese Interaktion mittels Y2H überprüft. Dafür wurden GAL4 AD Fusion von PP2CA mit BD Fusion von

GCA2/CPK23 verwendet. GCA2 interagiert mit PP2CA, allerdings nur eine katalytisch aktive Version, eine inaktive Kinase zeigt keine Interaktion. Bereits für andere CPKs wurde im Y2H gezeigt, dass die Kinasefunktion für den Nachweis von Interaktionen wichtig ist (Uno et al., 2009), umso bemerkenswerter ist, dass das Col-0 unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität mit PP2CA interagiert (Abb. 3.21). Man könnte daraus den Schluss ziehen, dass die Interaktion zwischen CPK23-ca und PP2CA stärker ist als die mit GCA2-ca. Der verwendete Histidin Wachstumsassay ist allerdings nicht quantitativ. Grundsätzlich kann zumindest davon ausgegangen werden, dass sich die Proteine in beiden Ökotypen nicht nennenswert in ihrem Interaktionsverhalten zu PP2Cs unterscheiden.

BD/AD		-L/ -W	-L/ -W/ -H
/	PP2CA		
GCA2-ca	/		
GCA2-ca	PP2CA		
GCA2-na	PP2CA		
CPK23-ca	PP2CA		
CPK23-na	PP2CA		
CPK23-ca	/		

Abbildung 3.21 Y2H Interaktionsstudie zwischen GCA2/CPK23 und PP2CA

Hefekulturen wurden in einer Verdünnungsreihe auf selektivem Nährmedium aufgetropft und für 4 Tage bei 30°C inkubiert. Wachstum auf -L/ -W Medium dient als Kontrolle der positiven Doppel-Transformation, während Wachstum auf -L/ -W/ -H positive Interaktionen anzeigt. GCA2/CPK23-ca und -na wurden mit der GAL4 DNA Bindedomäne fusioniert, PP2CA mit der Aktivator Domäne. Als Negativkontrolle wurden Hefen mit Leervektoren verwendet.

3.4.1.2 Co-Expression von CPK23 mit PP2Cs im Protoplastensystem

PP2Cs sind starke negative Regulatoren der ABA Antwort, entsprechend lässt sich dieser Effekt auch auf die RD29B Induktion im Protoplastensystem darstellen (Fujii et al., 2009). CPK23 hingegen ist ein starker positiver Regulator der ABA Antwort (Abb. 3.13). Führt die beobachtete Interaktion zu einer Regulation einer der beiden Bindungspartner, sollte sich dies bei Co-Expression beider Komponenten im Protoplastensystem darstellen lassen. Um dies zu überprüfen, wurde CPK23 mit ansteigenden Mengen PP2CA oder AHG1 in Protoplasten exprimiert. AHG1 war eine der wenigen PP2Cs, die im Y2H System keine Interaktion mit CPK23 zeigten (Fuchs, 2013). Grundsätzlich sind beide Phosphatasen starke negative Regulatoren, wobei PP2CA einen stärkeren Effekt zeigte und nur 300 ng Effektor DNA für eine fast 90% Inhibition ausreichend waren, während von AHG1 mehr als die 3-fache Menge an DNA für einen vergleichbaren Effekt nötig waren (schwarze Linien Abb. 3.22 A+B). Vergleicht man

den Effekt der beiden Phosphatasen auf die CPK23-ca Induktion, ergeben sich hingegen deutliche Unterschiede (Abb. 3.22 A+B, rote Kurven). PP2CA ist in der Lage die CPK23 Induktion weitgehend komplett aufzuheben, während AHG1 auch bei hohen Konzentrationen nur eine Inhibierung von 33% (+/- 13%) erreichte. In Abbildung 3.22 A+B sind die Kontrollen ohne PP2C jeweils auf 100% gesetzt, die Abbildungen C+D zeigen hingegen die gemessenen absoluten Werte, wobei deutlich wird, dass die Induktionswerte in Abwesenheit von PP2Cs durch Expression von CPK23-ca etwa 4-fach höher lagen. Das bedeutet, dass etwa 75% der ABA Induktion der roten Kurven durch ektopische CPK23 Expression zu Stande kamen, während die übrigen 25% von endogenen Komponenten abhängig waren. Bedenkt man den Effekt der PP2Cs auf die grundsätzliche RD29B Reporteraktivität (schwarze Balken in C+D), war der Effekt von AHG1 auf die CPK23 Induktion eher marginal. Um dies deutlich zu machen, wurden in Abbildung 3.22 (C+D) die theoretisch zu erwartende Werte dargestellt (nicht ausgefüllte rote Balken), unter der Annahme, dass CPK23 komplett unabhängig von PP2CA/AHG1 ist und nur endogene Signalkomponenten reguliert werden.

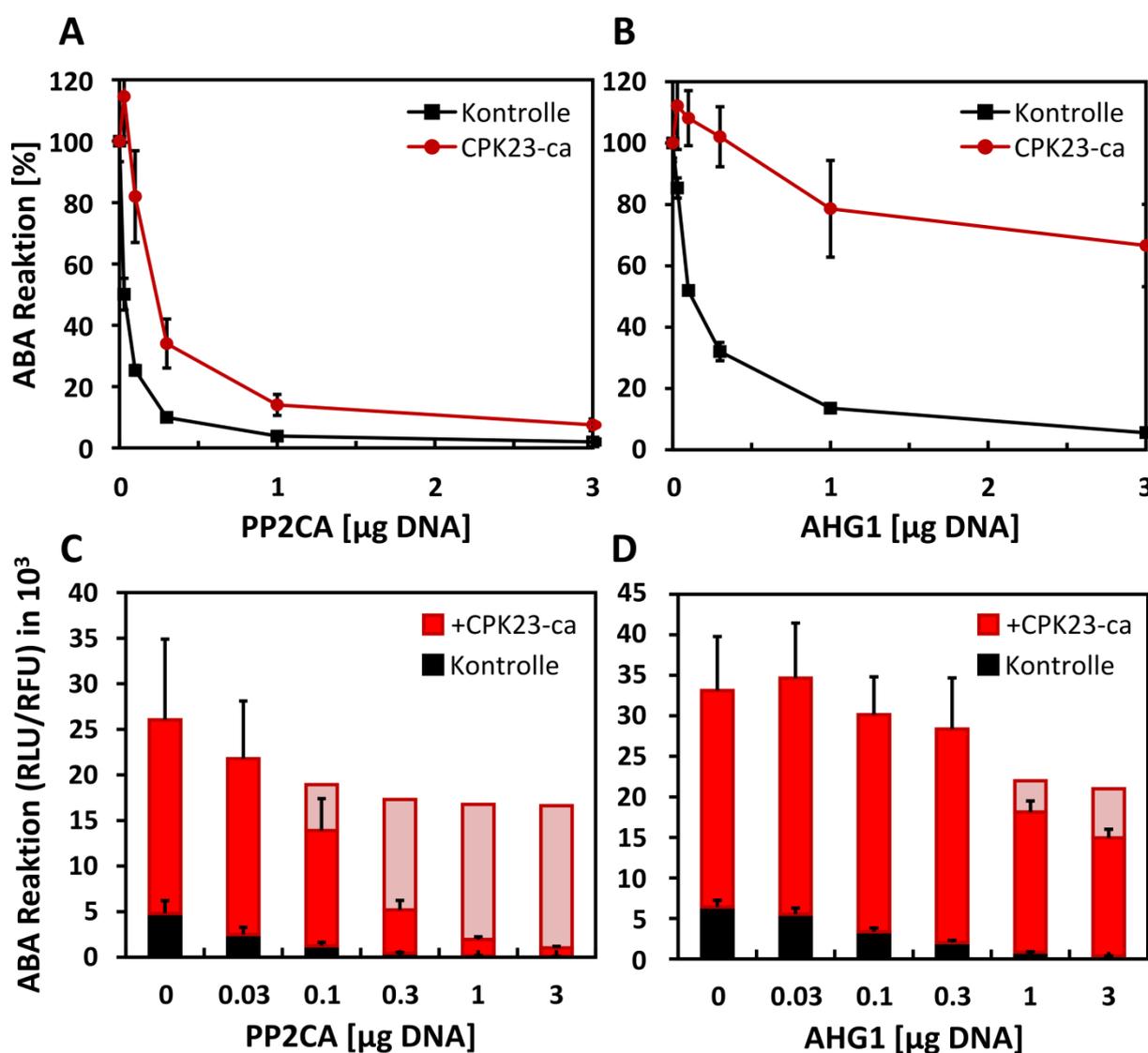


Abbildung 3.22 Transiente Co-Expression von CPK23 mit PP2Cs

Negative Regulation von RD29B::Luc durch PP2CA (A) und AHG1 (B) in Col-0 Protoplasten. Ansteigende Mengen DNA der beiden PP2Cs wurden allein (schwarze Linien) oder mit 3 µg CPK23-ca DNA transfiziert (rote Linien). Die Kontrollen ohne PP2Cs wurden dabei jeweils auf 100% gesetzt. Darunter abgebildet (C+D) sind die gemessenen absoluten Werte. Die roten nicht ausgefüllten Balken geben errechnete, theoretisch zu erwartende Werte an, für den Fall, dass PPC2A/AHG1 nur endogene Signalkomponenten negativ regulieren aber keinen Einfluss auf die CPK23 Induktion haben. Alle Proben wurden mit 3 µM ABA induziert. n=5.

Wie man sieht, sind die Effekte der beiden Interaktionspartner CPK23 und PP2CA voneinander abhängig, während das bei AHG1 und CPK23, die im Y2H nicht miteinander interagierten, kaum der Fall zu sein scheint. Es ist davon auszugehen, dass dem Befund eine Regulation zwischen CPK23 und PP2CA zu Grunde liegt, wobei sich allein aus den vorliegenden Daten nicht genau sagen lässt in welcher Richtung.

3.4.2. Regulation und Interaktion mit bZip Transkriptionsfaktoren

Nach der Identifikation von CPK23 als positivem Regulator, ist ein nächster Schritt nach möglichen untergeordneten Komponenten in der Signaltransduktion zu suchen, die von der Kinase durch Phosphorylierung reguliert werden. Für einen wesentlichen Teil der ABA abhängigen Genexpression sind bZip Transkriptionsfaktoren verantwortlich (Yoshida et al., 2010). Im Wesentlichen sind das die Transkriptionsfaktoren ABI5 und ABF1-4, die durch ABA abhängige Phosphorylierung durch SnRK2 Kinasen reguliert werden (Kobayashi et al., 2005; Fujita et al., 2009; Sirichandra et al., 2010). Daneben wurde allerdings auch die Phosphorylierung von ABFs durch CPKs gezeigt (Zhu et al., 2007; Zhao et al., 2011a). Auch für GCA2 wurde bereits früher Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ABF1 gezeigt und potentielle Ziel-Stellen durch MS-Analyse bestimmt (Wellmann, 2013).

3.4.2.1 Co-Expression von CPK23 mit ABFs im Protoplastensystem

Um eine mögliche Regulation der Transkriptionsfaktoren durch CPK23 zu untersuchen, wurden diese in Protoplasten co-exprimiert. Zum Vergleich wurden entsprechende Ansätze auch mit den SnRK2 Kinasen D/E/I durchgeführt, die als Regulatoren verschiedener ABFs beschrieben wurden. Da sich die SnRK2 Induktion wesentlich besser in entsprechenden KO-Protoplasten darstellen lässt, wurden für diese Experimente *snrk2de* oder *snrk2di* Pflanzen verwendet.

ABI5 und ABF1-4 führten bei Expression in Protoplasten zu einer Induktion von RD29B (Abb. 3.23 + 3.24). Diese Induktionsraten waren zwischen den einzelnen Transkriptionsfaktoren recht vergleichbar und lagen ohne ABA zwischen 4-11x Induktion, mit ABA 4-25x. Nur die ABI5 Induktion fiel dabei etwas geringer aus.

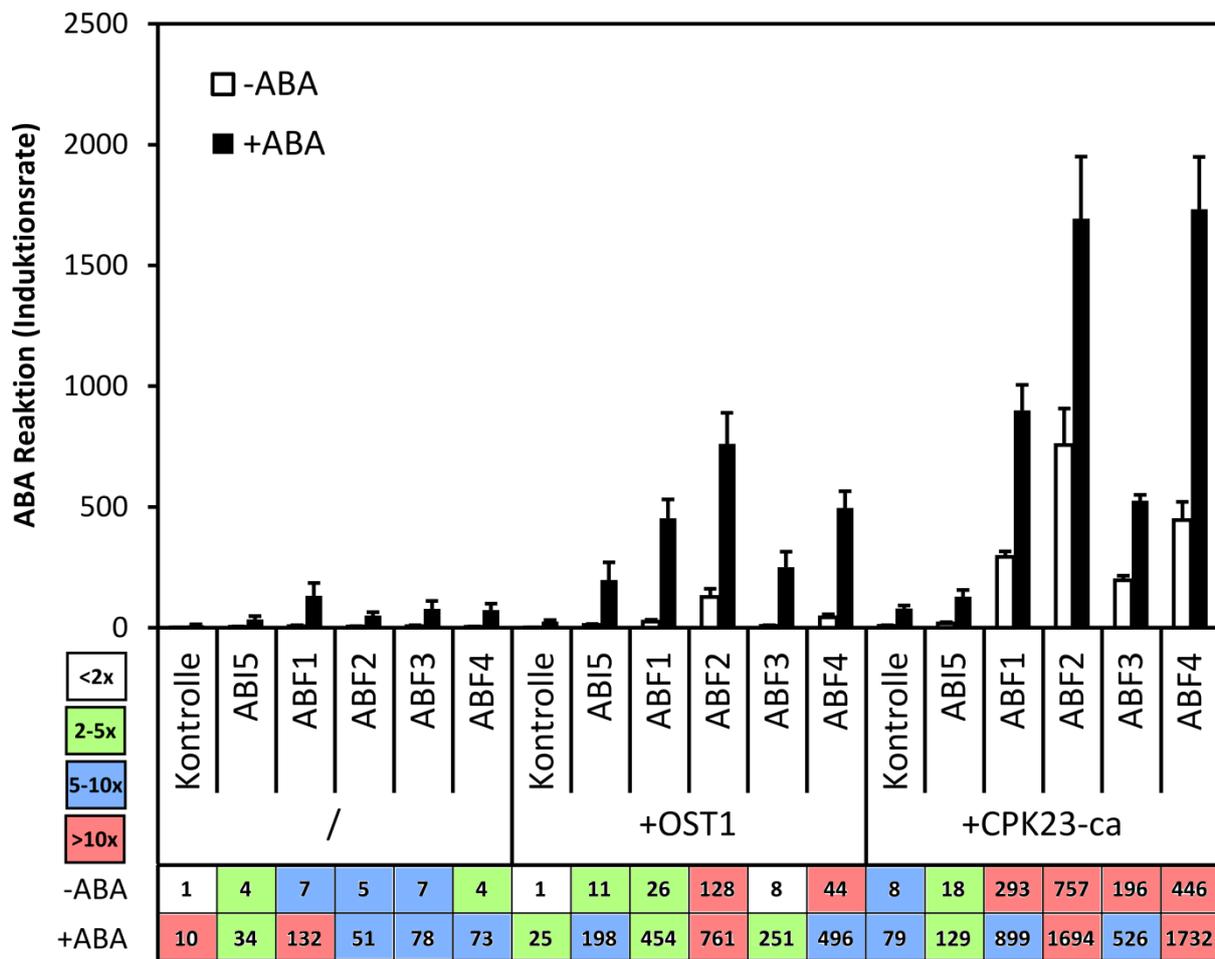


Abbildung 3.23 Transiente Co-Expression von CPK23 und OST1 mit ABFs

Regulation von RD29B::Luc durch ABI5 und ABF1-4 allein und zusammen mit den Kinasen CPK23 und OST1. Jeweils 3 µg DNA der verschiedenen Effektoren wurden für die Transfektion von *snrk2de* Protoplasten verwendet. Die Ansätze wurden nach der Transfektion geteilt, eine Hälfte mit 3 µM ABA induziert und nach 6h gemessen. Unter dem Diagramm angegeben sind die Induktionszahlen in Relation zum nicht induzierten Reporterkonstrukt. Der Farbcode gibt die Induktion im Vergleich zur jeweils entsprechenden Kontrolle an. Grün eingefärbt sind schwache Induktionen (2-5x), blau mittelstarke Induktionen (5-10x) und rot eingefärbt starke Induktion (>10x). Weiße Felder geben an, dass keine nennenswerte Induktion gemessen werden konnte. n=6.

Alle drei SnRK2 Kinasen hatten allein nur einen geringen Effekt auf die Reporteraktivität (bis maximal 5x mit ABA), während CPK23, wie bereits früher gezeigt, sowohl mit als auch ohne ABA, zu einer starken Induktion führte (8x mit und ohne ABA). Bei Co-Expression der verschiedenen SnRK2s mit ABFs zeigten sich starke Effekte mit einer klaren Präferenz für ABF2 und ABF4. Insbesondere SnRK2.2 (SnRK2D) und 2.3 (SnRK2I) scheinen recht spezifisch diese beiden Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, so lagen die Induktionsraten mit ABA um das 6-8x (ABF2) und um das 23-29x (ABF4) höher als bei Expression der Transkriptionsfaktoren allein (Abb. 3.24). Die Induktion von ABI5, ABF1 und ABF3 war dagegen eher marginal. OST1 (SnRK2E) zeigte ebenfalls eine Präferenz für ABF2 und ABF4, induzierte aber auch die anderen ABFs deutlich, wenn gleich in etwas geringerem Maße (Abb. 3.23).

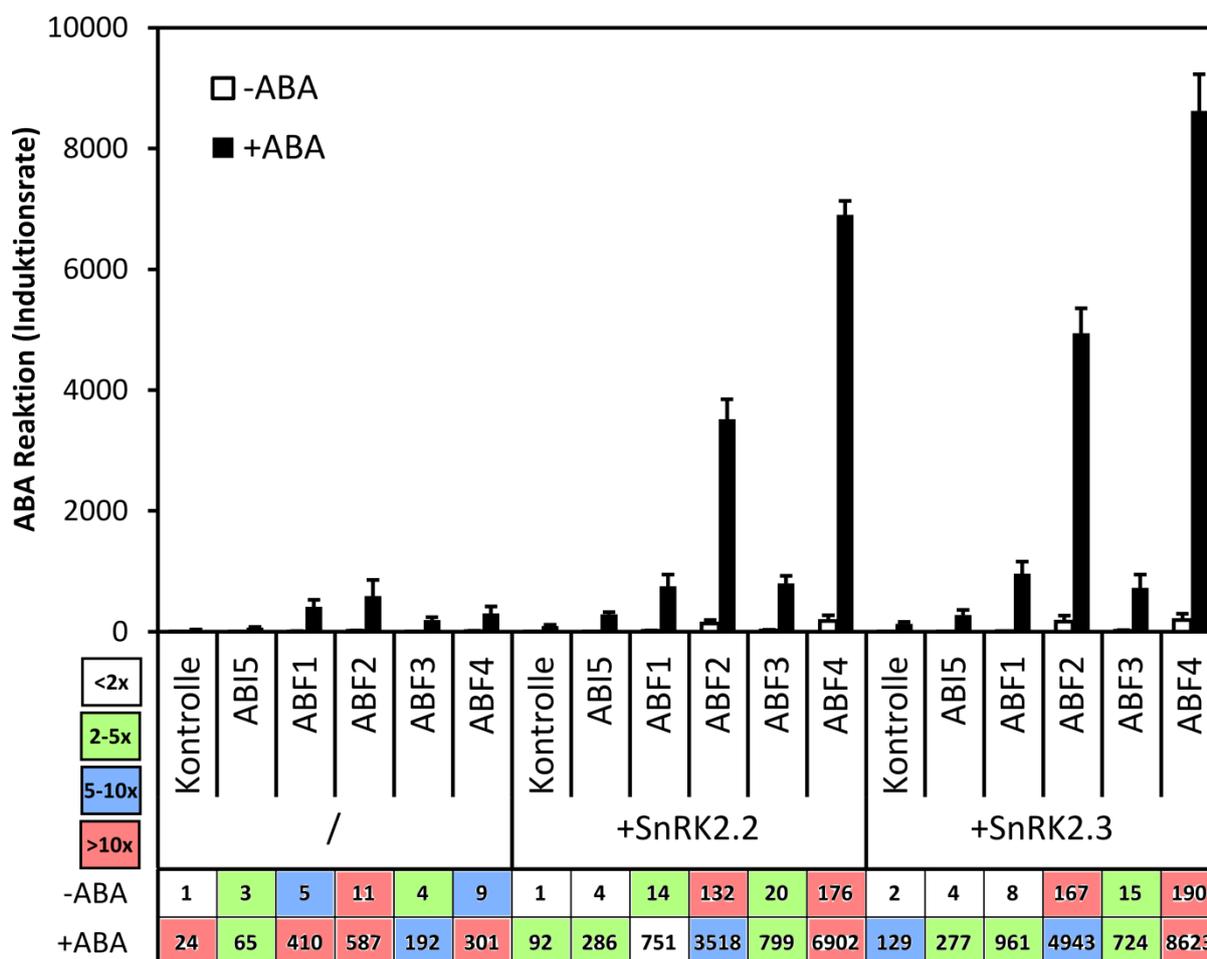


Abbildung 3.24 Transiente Co-Expression von SnRK 2.2 und 2.3 mit ABFs

Regulation von RD29B::Luc durch ABI5 und ABF1-4 allein und zusammen mit den Kinasen SnRK2.2 und 2.3. Jeweils 3 μ g DNA der verschiedenen Effektoren wurden für die Transfektion von *snrk2di* Protoplasten verwendet. Die Ansätze wurden nach der Transfektion geteilt, eine Hälfte mit 3 μ M ABA induziert und nach 6h gemessen. Unter dem Diagramm angegeben sind die Induktionszahlen in Relation zum nicht induzierten Reporterkonstrukt. Der Farbcode gibt die Induktion im Vergleich zur jeweils entsprechenden Kontrolle an. Grün eingefärbt sind schwache Induktionen (2-5x), blau mittel starke Induktionen (5-10x) und rot eingefärbt starke Induktion (>10x). Weiße Felder geben an, dass keine nennenswerte Induktion gemessen werden konnte. n=4.

Allen SnRK2s gemeinsam war ihre starke ABA Abhängigkeit. Im Gegensatz dazu induzierte CPK23 bereits ohne ABA alle Transkriptionsfaktoren mit Ausnahme von ABI5 stark (Abb. 3.23). Mit ABA kam es jedoch noch einmal zu einem zusätzlichen Effekt. Auch CPK23 induzierte präferenziell ABF2 und ABF4, hatte aber auch deutliche Einflüsse auf ABF1 und ABF3. Nur ABI5 zeigte kaum spezifische Aktivierung durch CPK23. Die gemessenen Werte entsprachen weitgehend den additiven Werten der unabhängigen Expression beider Faktoren.

Die Co-Expression der ABF Transkriptionsfaktoren mit SnRK2s und CPK23 zeigte teils eine sehr deutliche spezifische Aktivierung. Für SnRK2s wurde eine direkte Phosphorylierung und Regulation bereits gezeigt, für CPK23 wäre dies anzunehmen, wenn gleich auch nicht ausgeschlossen werden

kann, dass andere Komponenten zwischengeschaltet sind, die dann in der Folge zu einer Aktivierung einzelner ABFs führen.

3.4.2.2 *Yeast-two-hybrid* Interaktionsstudie von CPK23 mit ABFs

Einen starken Hinweis auf eine direkte Regulation der ABFs durch CPK23 würde sich durch den Nachweis einer Interaktion der Proteine ergeben. Deswegen wurden mittels Y2H untersucht, ob eine Interaktion zwischen CPK23/GCA2 und ABF Transkriptionsfaktoren gefunden werden kann. Dafür wurde CPK23/GCA2 als verkürzte konstitutiv aktive Version (-ca) sowie als Volllänge Protein mit GAL4 BD fusioniert. ABI5 und ABF 1-4 wurden mit der GAL AD fusioniert. Zusätzlich zur Kontrolle wurde OST1 auf eine Interaktion mit ABFs untersucht, da diese Interaktionen in der Literatur bereits beschrieben sind (Sirichandra et al., 2010; Lynch et al., 2012).

Im Y2H Assay konnte allerdings keine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 3.25). Auf - HIS Platten konnten lediglich Konstrukte mit AD-ABF3 wachsen, die allerdings auch schon in der Negativ-Kontrolle mit Leervektor Wachstum zeigten. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass AD-ABF3 autoaktivierend ist. Für alle anderen untersuchten Kombinationen konnte keine positive Interaktion gefunden werden, auch nicht für die bereits publizierten ABF-OST1 Kombinationen. Deswegen kann eine Interaktion zwischen CPK23 und ABFs auch nicht ausgeschlossen werden. Falsch negative und falsch positive Ergebnisse sind im Y2H nicht unüblich. Zumindest für andere CPKs wurde eine direkte Interaktion mit ABFs gezeigt (Lynch et al., 2012; Lu et al., 2013).

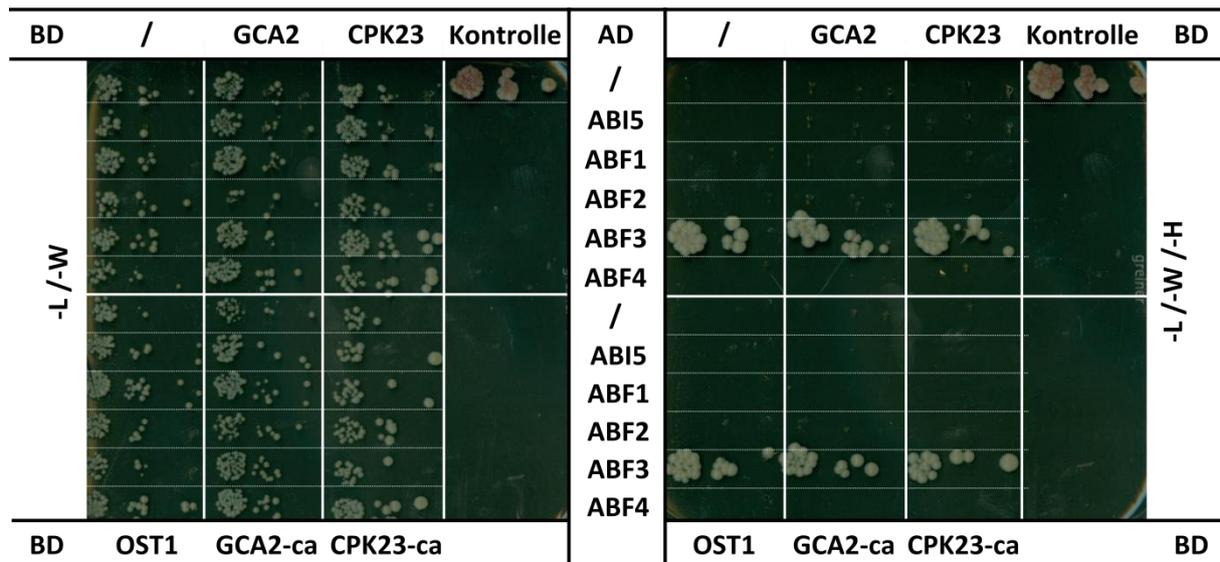


Abbildung 3.25 Y2H Interaktionsstudie zwischen GCA2/CPK23/OST1 und ABFs

Hefekulturen wurden in einer Verdünnungsreihe auf selektivem Nährmedium auf getropft und für 4 Tage bei 30°C inkubiert. Wachstum auf -L/ -W Medium dient als Kontrolle der positiven Doppel-Transformation, während Wachstum auf -L/ -W/ -H positive Interaktionen anzeigt. GCA2/CPK23/OST1 wurden mit der GAL4 DNA Bindedomäne fusioniert, die Transkriptionsfaktoren ABI5 und ABF1-4 mit der Aktivator-domäne. Als Negativkontrolle wurden Hefen mit Leervektoren verwendet. Als Positivkontrolle wurden PP2CA und RCAR3 Konstrukte verwendet.

3.4.3. Analyse der putativen CPK23 - OST1 Interaktion

Neben ABF Transkriptionsfaktoren und PP2Cs sind zwei weitere Komponenten notwendig, um den minimalen ABA Kern-Signalweg zu bilden (Fujii et al., 2009), zum einen der eigentliche ABA Rezeptor, ein Protein der RCAR Familie (Ma et al., 2009), zum anderen sind SnRK2 Kinasen zentraler Bestandteil der ABA Signaltransduktion (Fujii et al., 2011) insbesondere die Kinasen 2.2 (D)/2.3 (I) und 2.6 (E), die für einen wesentlichen Bestandteil der ABA abhängigen Genexpression verantwortlich sind (Fujii und Zhu, 2009; Fujita et al., 2009). SnRK2.6, das prominenteste Mitglied dieser Familie, auch bekannt unter der Bezeichnung *open stomata 1* (OST1), ist essentiell für den Schluss der Stomata unter Trockenstress (Mustilli et al., 2002). Das liegt an der Rolle von OST1 in der Regulation von Ionenkanälen (Geiger et al., 2009; Sato et al., 2009). Daneben wurde allerdings auch eine direkte Interaktion und Phosphorylierung von ABF Transkriptionsfaktoren gezeigt (Sirichandra et al., 2010).

3.4.3.1 Analyse putativer OST1 Phosphorylierungsstellen durch zielgerichtete Mutagenese

Auf Grund der zentralen Stellung von OST1 in der ABA Signaltransduktion ist eine Untersuchung auf mögliche Interaktionen mit CPK23 naheliegend. In einer früheren Arbeit wurde das für GCA2 gemacht. Zwar konnte keine direkte Interaktion mittels Y2H gefunden werden, GCA2 wird aber von OST1 *in vitro* phosphoryliert (Wellmann, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch mittels MS-Analyse die OST1 Phosphorylierungsstellen im GCA2 Protein bestimmt. Für OST1 wurden drei

spezifische Stellen mit hoher Sicherheit bestimmt. Dies sind Threonin 213 im aktiven Zentrum der Kinase, Threonin 317, sowie Serin 339 oder Threonin 340 (Abb. 3.26). Bei den letzteren beiden konnte die Phosphorylierungsstelle auf Grund der unmittelbaren Nähe nicht zweifelsfrei geklärt werden. Die Phosphorylierung an den Threoninen 213 und 317 konnte hingegen auch *in vivo* bestätigt werden (Liese, unveröffentlicht).

Um den Effekt der Phosphorylierung auf CPK23 zu untersuchen, wurde CPK23 an den beiden Stellen mittels SDM zu Alanin beziehungsweise Aspartat mutiert und die erzeugten Proteinvarianten in Protoplasten exprimiert. Mutation von Threonin 317 führt sowohl bei Substitution mit Alanin als auch Aspartat zu einer deutlichen Reduktion der CPK23 Aktivierungsstärke (Abb. 3.27). Der Vergleich der Aktivierungsstärke von CPK23-ca T317^D mit dem Wildtyp Protein zeigt, dass etwa die 3-fache Menge an Effektor DNA benötigt wird, um vergleichbare Effekte zu erzielen (Abb 3.27 B).

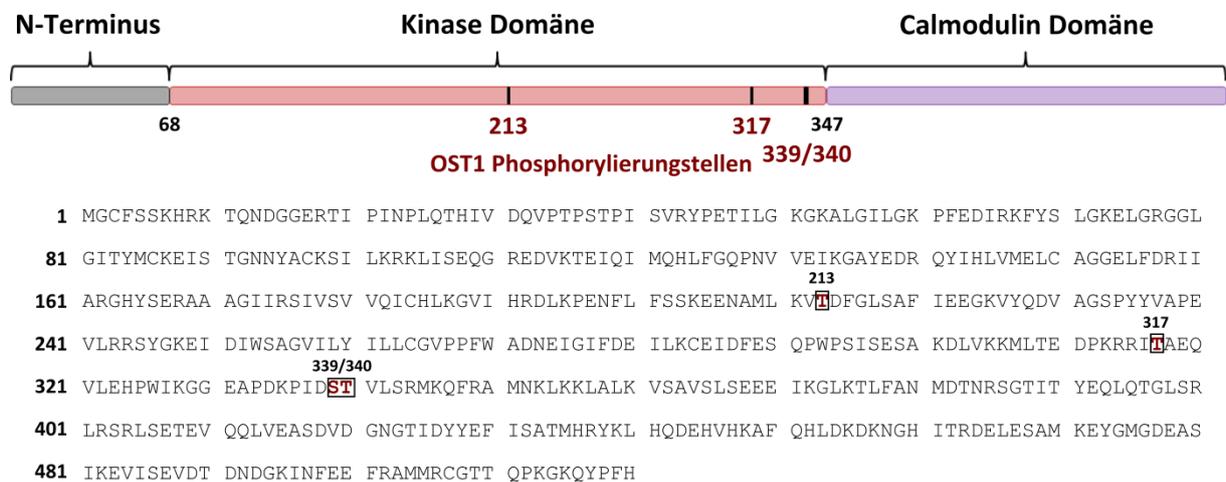


Abbildung 3.26 OST1 Phosphorylierungsstellen im GCA2 Protein

Schematische Abbildung der GCA2/CPK23 Proteinstruktur mit Proteindomänen und *in vitro* ermittelten (Wellmann, 2013) OST1 Phosphorylierungsstellen. Die Positionen 213 und 317 wurden darüber hinaus auch *in vivo* bestätigt (Liese, unveröffentlicht). Unter der schematischen Abbildung ist die Proteinsequenz von GCA2 angegeben, die entsprechenden Stellen sind hervorgehoben.

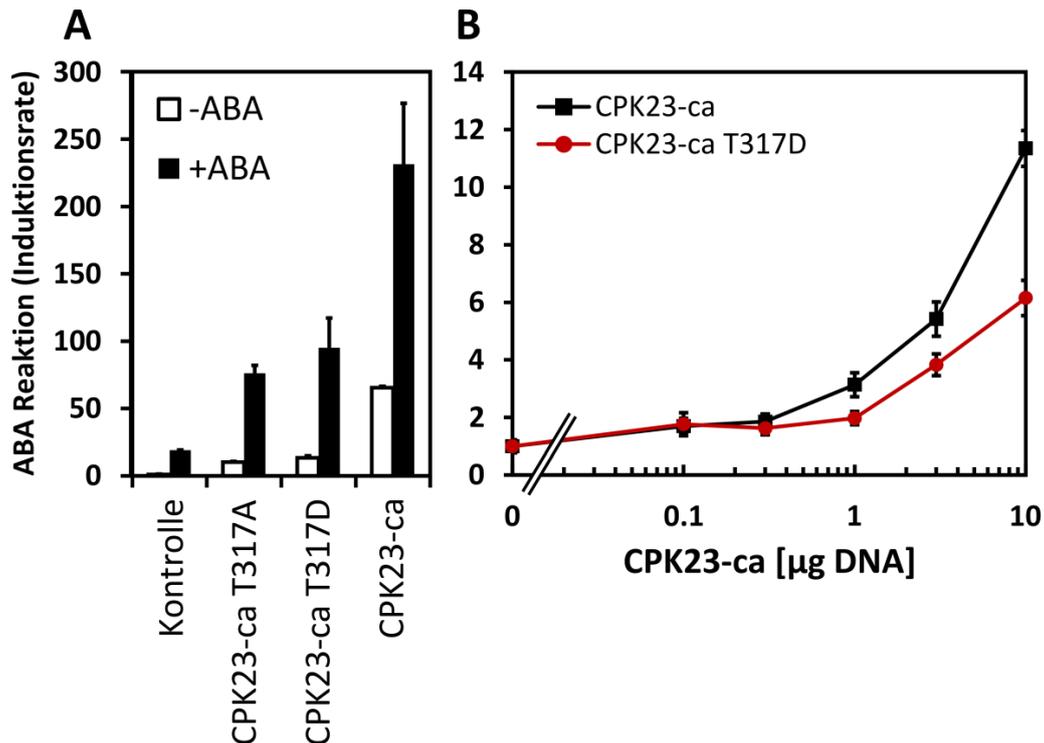


Abbildung 3.27 Transiente Expression von CPK23-ca T317 *phosphosite* Mutationen

Regulation von RD29B::Luc durch CPK23-ca T317^{A/D} in Col-0 Protoplasten. 3 μg Effektor DNA wurden für die Transfektion verwendet, die Ansätze geteilt und eine Hälfte mit 3 μM ABA induziert (**A**). Quantitativer Vergleich (**B**) der Induktionsstärken von CPK23-ca und CPK23-ca T317^D in Anwesenheit von 3 μM ABA. n=2 (**A**), n=4 (**B**).

Signifikante Unterschiede zwischen T317^A und T317^D waren nicht zu beobachten. Weshalb in Frage gestellt werden kann, ob der beobachtete Effekt der Aspartat Substitution eine Phosphorylierung an dieser Stelle effektiv imitieren konnte, oder ob der Verlust der freien -OH Gruppe des Threonins den beobachteten Effekt hervorrief.

Auf Grund seiner disponierten Lage im aktiven Zentrum der Kinase ist Threonin 213 ein plausiblerer Aminosäure Rest für eine mögliche Regulation der Kinase Aktivität. Neben einer Substitutionen mit Alanin und Aspartat wurde auch eine Version mit Cystein an Position 213 erzeugt. Cystein ist genauso wie Threonin eine polare Aminosäure, besitzt aber eine sehr reaktive, nicht phosphorylierbare -SH Gruppe, und wurde verwendet, um ein nicht phosphoryliertes Threonin zu imitieren. Alanin, dass klassischerweise als nicht phosphorylierbare Kontrolle verwendet wird, ist hingegen eine polare Aminosäure, die zudem auch um eine $-\text{CH}_2\text{O}$ Gruppe kleiner als Threonin ist. Da die Phosphorylierungsstellen ursprünglich für GCA2 bestimmt wurden, wurden die entsprechenden Mutationen auch in GCA2-ca eingebracht.

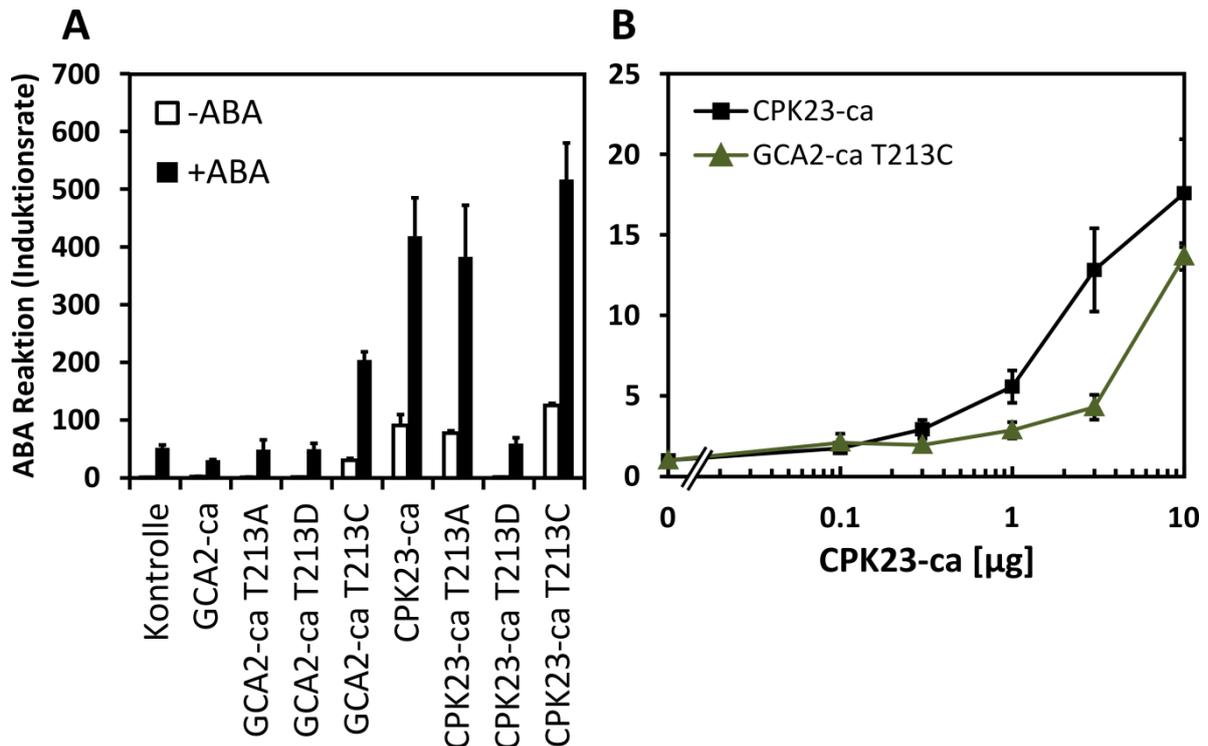


Abbildung 3.28 Transiente Expression von GCA2/CPK23 T213 *phosphosite* Mutationen

Regulation von RD29B::Luc durch GCA2/CPK23-ca T213^{A/D/C} in Col-0 Protoplasten. 3 μ g Effektor DNA wurden für die Transfektion verwendet, die Ansätze geteilt und eine Hälfte mit 3 μ M ABA induziert (A). Quantitativer Vergleich (B) der Induktionsstärken von CPK23-ca und GCA2-ca T213^C in Anwesenheit von 3 μ M ABA. n=3 (A), n=9 (B).

Die Expression in Protoplasten zeigte, dass CPK23-ca seine Aktivität komplett bei Substitution von T213 durch Aspartat verliert (Abb. 3.28 A). CPK23-ca T213^{A/C} zeigten hingegen vergleichbare Aktivität zum Wildtyp. Für GCA2-ca ergab sich ein anderes Bild. Während keine nennenswerten Effekte für T213^{A/D} zu beobachten waren, führte die Substitution mit Cystein zu einer partiellen Aktivierung von GCA2-ca. Der quantitative Vergleich (Abb. 3.28 B) mit CPK23-ca zeigte, dass wieder in etwa die 3-fache DNA Menge benötigt wird um eine vergleichbare Induktion zu erreichen, entsprechend zu dem, was für GCA2-ca Y44^D beobachtet wurde (Abb. 3.17).

Threonin 213 scheint zum einen eine wichtige Stelle in der Proteinstruktur zu sein, über welche die Kinase Aktivität von CPK23 reguliert wird. GCA2 wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an dieser Stelle durch OST1 phosphoryliert. Im Gegensatz zu den hergestellten *phosphosite* Mutationen an Threonin 317 zeigten die verschiedenen Versionen spezifische Effekte. Zum anderen scheint Threonin 213 ein relevanter regulatorischer Unterschied zwischen GCA2 und CPK23 zu sein. Die Daten in Abb. 3.28 legen nahe, dass CPK23 nicht oder nur begrenzt phosphoryliert vorliegt, während das Ler-0 Protein womöglich durch Phosphorylierung an T213 effektiv inaktiviert wird. Cystein an dieser Position stellt die Aktivität teilweise wieder her, vielleicht da es dem nicht phosphorylierten Serin nahe kommt.

3.4.3.2 Co-Expression von OST1 und CPK23 im Protoplastensystem

Die Analyse von *phosphosite* Mutationen an Threonin 213 legt eine Regulation von GCA2 durch OST1 *in vivo* nahe. Deswegen wurde überlegt, ob diese Regulation auch im transienten Reporterassay dargestellt werden kann. Voraussetzung dafür wäre allerdings ein spezifischer *readout* für CPK23/GCA2. Der in dieser Arbeit verwendete gängige RD29B::Luc Reporter, wird sowohl durch OST1 als auch CPK23 reguliert. Co-Expression von OST1 mit GCA2/CPK23 bei Verwendung von RD29B::Luc ergab daher keine klaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt), da zwischen den einzelnen Effekten der beiden Kinasen nicht unterschieden werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch an artifiziellen ABA Reportern gearbeitet, die ursprünglich in erster Linie für den Einsatz in Hefe gedacht waren (siehe Kapitel 3.5). Strukturell ähneln die erzeugten Konstrukte denen anderer Gruppen (Uno et al., 2000; Whalley et al., 2011), und bestehen aus mehreren ABRE Elementen gefolgt von einem Minimalpromotor, der -46 Region des 35S Promotors. Dafür wurden Oligonukleotide (GC 50-53), mit entsprechenden komplementären Sequenzen *upstream* des Minimalpromotors eingefügt. Abbildung 3.29 zeigt den schematischen Aufbau des Reporters und die *forward* Sequenz der eingefügten Oligos mit den ABRE Elementen. In dieser Arbeit wurden Konstrukte mit variabler ABRE Anzahl hergestellt. Eine Anzahl von acht Wiederholungen erwies sich dabei als günstig. Verwendet man diesen künstlichen Promotor in Columbia-0 Protoplasten ergeben sich ein paar Unterschiede zu RD29B::Luc. Wie man in Abb. 3.29 sehen kann, führte weder ABA noch die Expression von positiven Regulatoren der ABA Signaltransduktion allein, wie OST1 oder RCAR1, zu einer Induktion des Reporters. Erst bei Überexpression eines Transkriptionsfaktors (hier ABI5) wurde der Reporter induziert und konnte in der Folge deutlich durch ABA reguliert werden. Das bedeutet, dass dieser artifizielle Reporter zur Auswertung der Aktivität und Regulation spezifischer Transkriptionsfaktoren verwendet werden kann, da die endogen vorhandenen TFs nur minimal mit dem gemessenen Signaloutput interferieren.

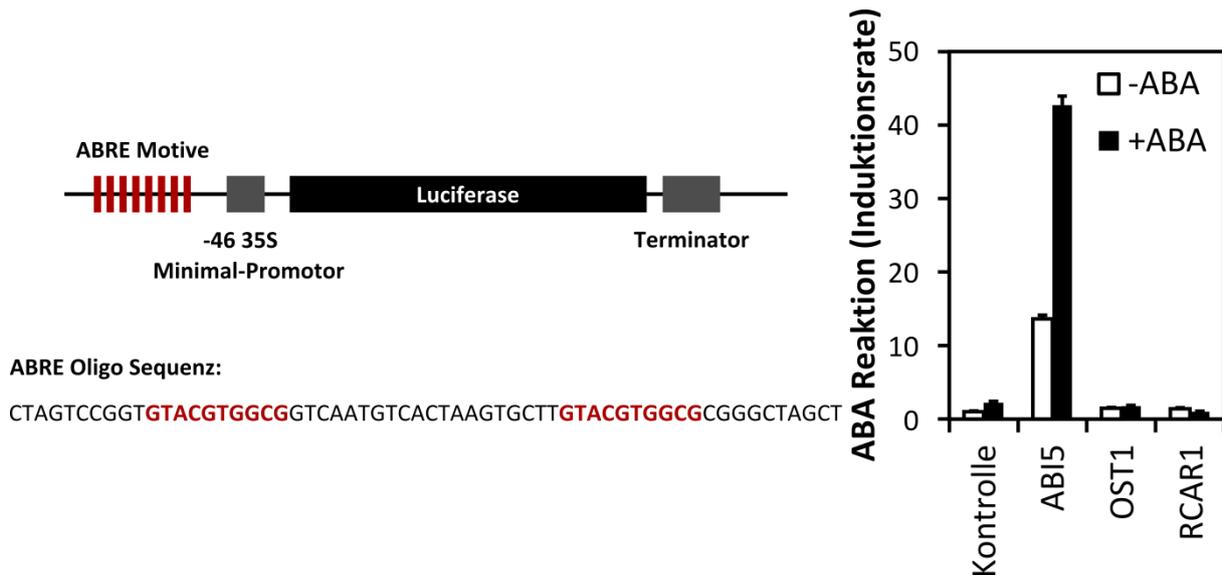


Abbildung 3.29 Schematischer Aufbau und Funktion eines künstlichen ABRE Reporterkonstrukts

Struktur eines künstlichen ABA Reporterkonstrukts, bestehend aus ABRE Elementen, -46 35S Minimalpromotor, Luciferase CDS und Nos Terminator. Die ABRE Sequenzen wurden durch Oligo-Nukleotid Ligation *upstream* des Minimalpromotors als Tandem-*repeats* eingefügt. Unter dem Konstrukt abgebildet befindet sich die Sequenz der verwendeten Oligos. Die ABRE Bindesequenzen sind rot hervorgehoben. Um das Konstrukt zu testen, wurde es zusammen mit 3 µg ABI5/OST1/RCAR1 Effektor DNA in Col-0 Protoplasten transfiziert. Die Ansätze wurden geteilt und jeweils eine Hälfte mit 3 µM ABA induziert. n=3.

In Abbildung 3.23 wurde die Spezifität von OST1 und CPK23 für verschiedene Transkriptionsfaktoren unter Verwendung von RD29B::Luc verglichen. Da OST1 zu einer Aktivierung aller untersuchter TFs führte, kann auch mit Hilfe dieses künstlichen Reporterkonstrukts kein spezifischer CPK23 *readout* gefunden werden, wodurch eine Regulation von CPK23 durch OST1 gezeigt werden könnte.

Anders verhält es sich in umgekehrter Richtung, da CPK23 scheinbar keinen oder nur einen sehr marginalen Effekt auf die Aktivität von ABI5 hatte. Induziert man den hergestellten 8xA ABRE Reporter mit ABI5, kann man die ABI5 Transaktivierungsstärke durch OST1 spezifisch verstärken, während CPK23 zu einer leichten Abschwächung der Signalintensität führte (Abb. 3.30 A). In einer vorhergehenden Arbeit (Wellmann, 2013) wurde neben der Phosphorylierung von GCA2 durch OST1 auch gezeigt, dass GCA2 in der Lage ist OST1 zu phosphorylieren und über einen möglichen gegenseitigen Regulationsmechanismus spekuliert. Der hergestellte 8xA ABRE Reporter erlaubt nun, dieser Frage nachzugehen. Induzierte man 8xA ABRE -46 35S::Luc mit ABI5 und OST1 war bei Co-Expression durch CPK23-ca eine Dosis abhängige Inhibierung zu beobachten (Abb. 3.30 B). Bei Verwendung von gleichen Mengen Effektor DNA war diese Inhibierung beinahe komplett (90%). Dieser Effekt kommt höchst wahrscheinlich nicht durch einen reinen Bindungseffekt zu Stande, da die Kinase Aktivität für diese Inhibierung maßgeblich war. Eine katalytisch inaktive Version reduzierte die Induktion nur um etwa 33%. Neben der möglichen Regulation von GCA2/CPK23 durch OST1,

unterstützen diese Ergebnisse Spekulationen über eine möglichen gegenseitigen Regulations-/Feedbackmechanismus.

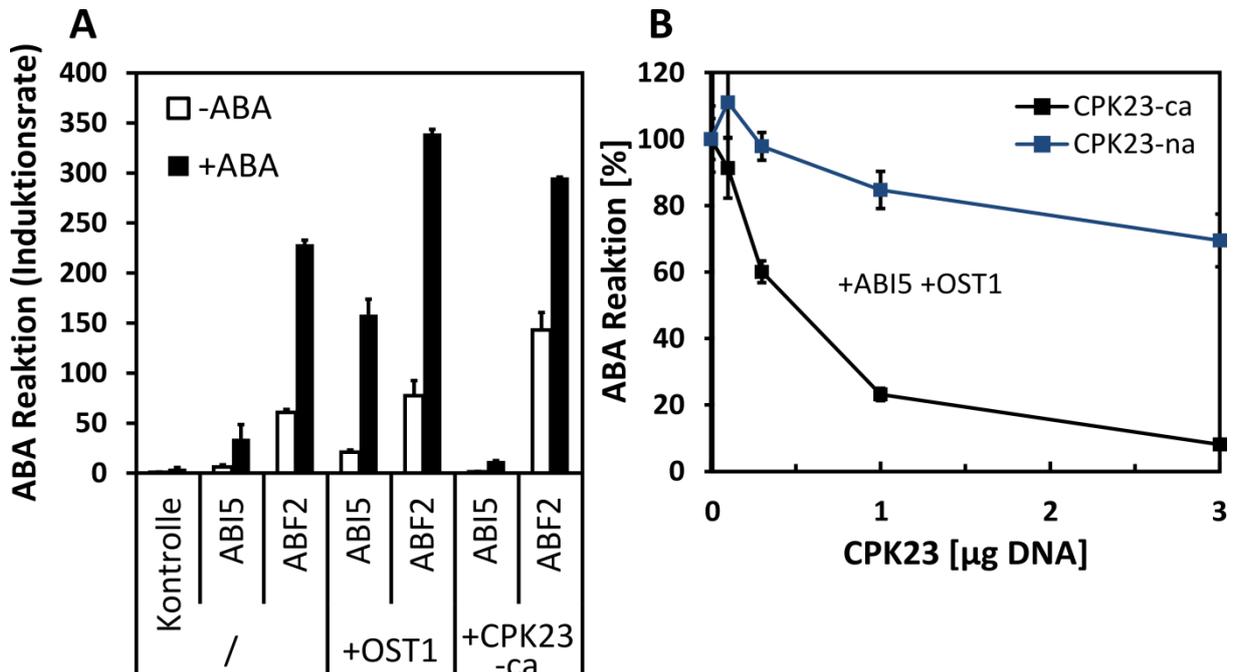


Abbildung 3.30 Transiente Co-Expression von OST1 und CPK23

Regulation von 8xA ABRE -46 35S::Luc durch ABI5 und ABF2 allein oder zusammen mit OST1/CPK23-ca (A) in *snrk2de* Protoplasten. Es wurden jeweils 3 μg Effektor-DNA verwendet, die Ansätze wurden geteilt und eine Hälfte mit 3 μM ABA induziert. Reporterinduktion (B) durch ABI5 und OST1 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mengen CPK23-ca/-na Effektor DNA in Anwesenheit von 3 μM ABA. Die Werte der Kontrollen ohne CPK23 wurden auf 100% gesetzt. Für die Transfektion wurden jeweils 3 μg DNA der übrigen Effektoren (A+B) verwendet. n=2 (A), n=5 (B).

In diesem Kapitel konnte durch Untersuchung direkter physischer Interaktion sowie der Co-Expression in Protoplasten gezeigt werden, dass CPK23 mit vielen der zentralen ABA Signaltransduktions-Komponenten interagiert. Die Interaktion mit PP2Cs scheint gesichert, während der genau Regulationsmechanismus und die Richtung der Regulation unklar sind. Alle untersuchten, in der ABA Signaltransduktion beteiligten bZip Transkriptionsfaktoren, sind Ziel der Regulation von CPK23. Eine direkte Interaktion konnte hingegen leider nicht gezeigt werden. Auch mit der Proteinkinase OST1 scheint CPK23 zu interagieren, neben einer Regulation von CPK23 durch OST1, konnten auch Hinweise für eine gegenseitige Regulation gefunden werden.

3.5. Entwicklung eines heterologen Hefe-Reportersystems

Im vorherigen Kapitel wurde die Funktion von CPK23 in der Abscisinsäure Signaltransduktion mittels transienter Expression *in vivo* untersucht. Reporterassays in Protoplasten sind für die Aufklärung von Signaltransduktionswegen gut geeignet, besitzen allerdings auch Limitationen. So sind beobachtete Effekte nicht immer zweifelsfrei zu interpretieren, zum Beispiel, ob die beobachteten Effekte auf bZip TFs direkte oder indirekte Effekte sind. Das hängt in erster Linie damit zusammen, dass alle endogenen Komponenten der Signalkaskade im homologen System anwesend sind. KO Pflanzen können nur bedingt Abhilfe schaffen, da die zentralen Komponenten der ABA Signaltransduktion von Proteinfamilien aus mehreren Mitgliedern mit teilweise deutlich überlappender Funktion bestehen. *In Vitro* Methoden auf der anderen Seite haben mit Sicherheit ihre Berechtigung, können allerdings etliche zelluläre Bedingungen wie Kompartimentierung, zelluläre Lokalisation oder posttranslationale Modifikationen nicht abbilden.

Alternativ zum Protoplasten-System, aber dennoch *in vivo*, wurde deshalb versucht die ABA Signalkaskade in einem heterologen Expressionssystem nachzubauen. Naheliegender ist hierfür die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, die für ähnliche Ansätze zum Beispiel *yeast one* und *two hybrid* zur Detektion von Protein-Protein Interaktion verwendet wird.

3.5.1. Transkriptionelle Regulation in Hefe durch HD-Zip Transkriptionsfaktoren

Ein erster Schritt ist die Auswahl eines geeigneten Reportersystems. Ein kompletter pflanzlicher Promotor, wie RD29B, ist dabei weniger geeignet, da kaum vorherzusehen ist, inwieweit dieser durch endogene Hefe Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Hirt et al., 1990). Deswegen wurde die Konstruktion artifizierlicher Promotor Reporter Konstrukte in Betracht gezogen, die aus cis Regulatorischen Elementen für TFs der ABA Signaltransduktion und einem Minimalpromotor bestehen.

Ein solches Konstrukt wurde in einer früheren Arbeit für den Homöo-Domäne TF HB6 hergestellt und in Arabidopsis Protoplasten verwendet (Hoffmann, 2001; Himmelbach et al., 2002). Abbildung 3.31 zeigt schematisch dieses Reporterkonstrukt. *Upstream* der -46 Region des 35S Minimalpromotors befinden sich vier Bindeelemente (im Weiteren 4xA HBBE) für den TF HB6. Zur Kontrolle wurde auch eine Version mit mutierter Bindesequenz erstellt (im weiteren 4xB HBBE). *Downstream* folgt die codierende Sequenz der *Photinus pyralis* Luciferase und der Nos Terminator. Um zu testen, ob die bestehenden Konstrukte auch in Hefe verwendet werden können, wurden diese ins Genom des Hefestamms BMA64-1A integriert (Baudin-Baillieu et al., 1997).

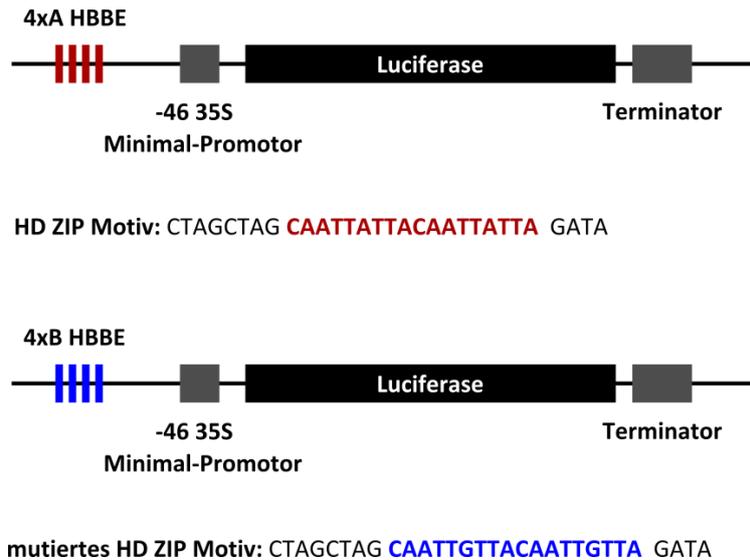


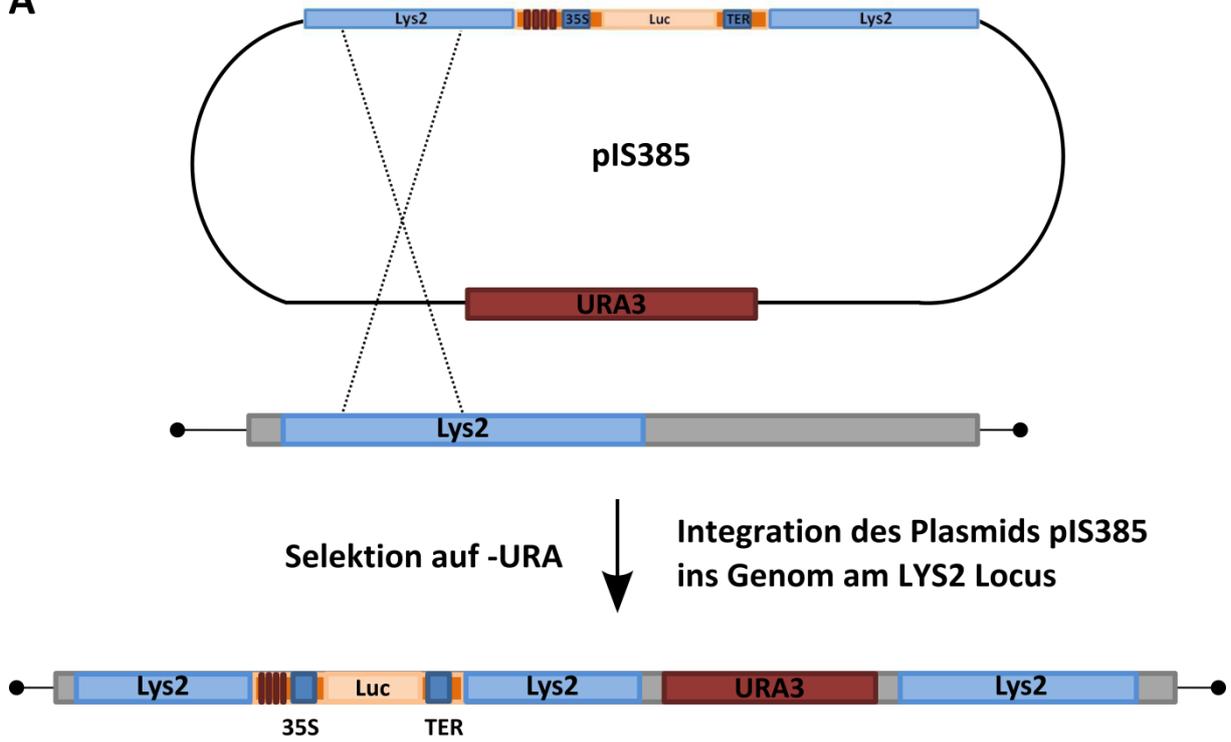
Abbildung 3.31 Schematische Aufbau artifizierender HBBE Reporterkonstrukte

Struktur eines künstlichen ABA Reporterkonstrukts, bestehend aus HD-ZIP Bindeelementen (HBBE), -46 35S Minimalpromotor, Luciferase CDS und Nos Terminator. Die HBBE Sequenzen wurden durch Oligo-Nukleotid Ligation *upstream* des Minimalpromotors als Tandem-*repeats* eingefügt. Unter dem Konstrukt abgebildet befindet sich die Sequenz der verwendeten Oligos. Die HD-Zip Bindemotive sind farblich hervorgehoben, neben dem korrekten Bindemotiv (4xA) wurde ein mutiertes Motiv zur Kontrolle (4xB) hergestellt (Hoffmann, 2001).

Abbildung 3.32 zeigt schematisch, wie dabei vorgegangen wurde. Die Reporterkonstrukte wurden über die Schnittstellen NotI/SalI in die *multiple cloning site* des Desintegrator Vektors pIS385 eingefügt (Sadowski et al., 2007).

Links und rechts flankierend zur MCS befinden sich Sequenzen des *lys2* Gens. Diese homologen Sequenzen ermöglichen die Integration ins Genom durch homologe Rekombination. Da der Vektor pIS385 in Hefe nicht selbstreplizierend ist, kann auf eine erfolgreiche Integration mit Hilfe des URA3 Markers selektiert werden. Dabei wird der *lys2* Locus dupliziert. Durch ein zweites Rekombinationsereignis zwischen den homologen, duplizierten Sequenzen kommt es zur Exzision des Plasmid-Rückgrats. Dabei bleibt entweder der *lys2* Locus des Hefe Wildtyps oder der vom Plasmid abstammende mit integriertem Reporterkonstrukt übrig. Die Selektion auf Exzision des Plasmids erfolgte mittels 5-FOA, einem kompetitiven Inhibitor der Pyrimidin Biosynthese, der für Uracil autotrophe Zellen toxisch ist (Boeke et al., 1987). Bleibt der Reporter im Genom zurück, sind die Hefekolonien in der Folge Lysin heterotroph. Die erfolgreiche Integration ins Genom wurde mittels PCR (GC 54+55) und Replikaplatting auf -LYS Medium überprüft.

A



B

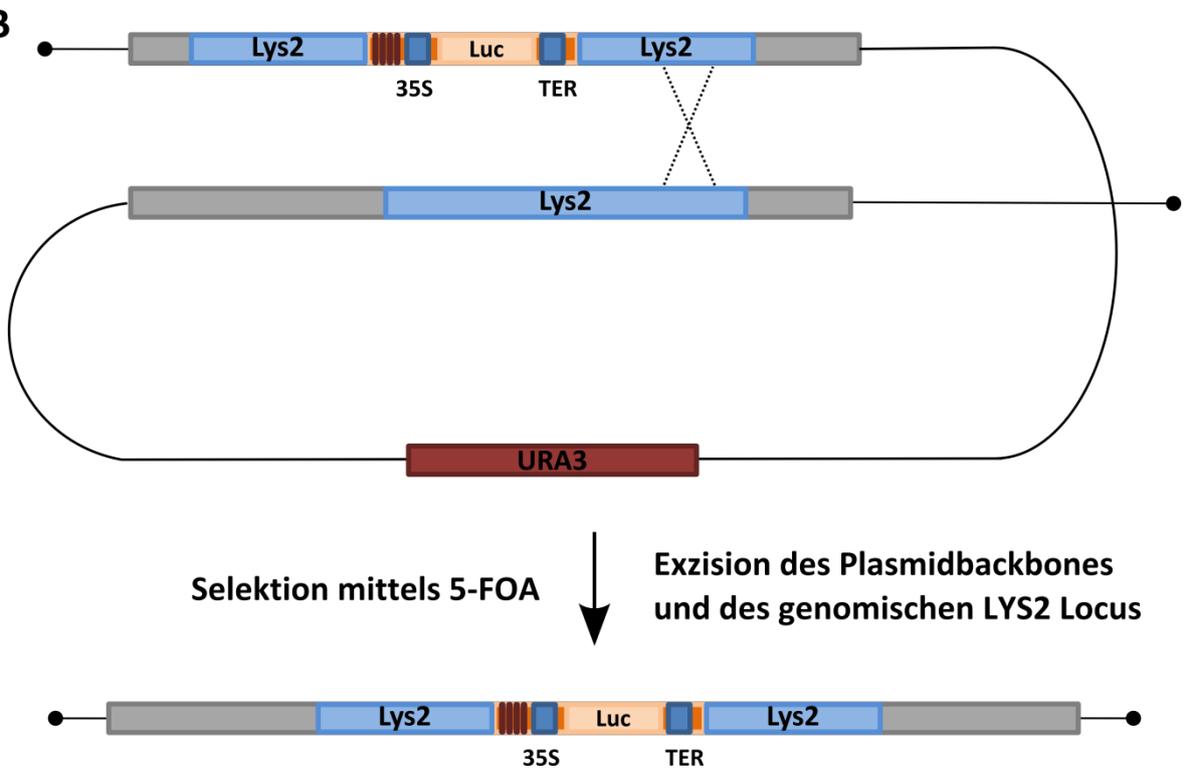


Abbildung 3.32 Schematische Darstellung der Integration eines Reporterkonstrukts ins Hefe-Genom

Integration des 4x HBBE -46 35S::Luc ins Genom des Hefestamms BMA 64-1A mittels homologer Rekombination. Das Reporterkonstrukt wurde zunächst in den in Hefe nicht selbst replizierenden Vektor pLS385 inseriert. Nach der Hefetransformation erfolgte durch Ausplattieren auf -URA eine Selektion auf erfolgreiche Integration ins Hefegenom (A). Durch homologe Sequenzen auf dem Vektor integriert das Konstrukt am *lys2* Locus, der dabei dupliziert wird. In einem zweiten Schritt (B) wurde mit 5-FOA auf den Verlust des Plasmid-backbones und gegen den URA3 Marker selektiert. Einer der beiden *lys2* Loci ging dabei verloren, zu 50% erhält man einen Stamm mit stabil integriertem Reporterkonstrukt der nun Lysin heterotroph war.

Um Funktion und Regulation des Konstrukts zu testen, wurden anschließend verschiedene HD-Zip Transkriptionsfaktoren in Hefe unter Kontrolle des starken, konstitutiv aktiven ADH Promotors exprimiert. Neben HB6 wurden mit HB7, 12 und 16 drei weitere Klasse 1 HD-Zip Transkriptionsfaktoren ausgewählt, die *in planta* in der Lage waren, ein vergleichbares Konstrukt zu regulieren (Henriksson et al., 2005). HB16 ist eng mit HB6 verwandt und besitzt eine Aminosäuresequenz Identität von 81,3%. Für HB5 und HB12 wurden Funktionen in der ABA Signaltransduktion postuliert (Johannesson et al., 2003; Olsson et al., 2004).

In Hefe waren alle getesteten HD-Zip Transkriptionsfaktoren in der Lage den 4xA HBBE Reporter zu induzieren (Abb. 3.33 A). Das 4xB Kontrollkonstrukt wurde hingegen nicht induziert, die gemessenen Werte von 5-10 RLU/s*10⁶ cfu entsprachen der Hintergrund Aktivität des Reporters in Hefe ohne ektopische Expression von Transkriptionsfaktoren. Vergleicht man die Induktionsstärken, ergeben sich allerdings deutliche Unterschiede. Während HB7 und HB16 nur zu einer geringen Induktion führten, induziert HB6, vor allem aber HB5 den Reporter deutlich. *In Planta* waren zuvor keine großen Unterschiede beobachtet worden (Henriksson et al., 2005). Grundsätzlich funktioniert das Reporterkonstrukt wie erhofft, die Hintergrund Aktivität war zu vernachlässigen gering und es konnten spezifische Aktivierungen mit allen HD-Zip Transkriptionsfaktoren gemessen werden, auch wenn sich eine Regulation von HB6 und HB5 auf Grund der höheren Signalstärke besser untersuchen lassen sollte.

HB6 wurde als Interaktionspartner der Protein Phosphatase ABI1 beschrieben (Himmelbach et al., 2002). Des Weiteren wurde für HB6 eine Rolle als negativer Regulator der ABA Antwort postuliert und angenommen, dass HB6 durch Dephosphorylierung durch ABI1 aktiviert wird. Diese postulierte Regulation wurde zuvor in Protoplasten untersucht, konnte aber nicht bewiesen werden (Hoffmann, 2001). Ansonsten sind für HB6 keine direkten Interaktionen oder Verknüpfung zu anderen ABA Signaltransduktionskomponenten bekannt. Um eine mögliche Regulation von HB6 zu untersuchen wurde in Hefe ABI1 und OST1 co-exprimiert, allerdings konnten dabei keine Effekte beobachtet werden (Abb. 3.33 B).

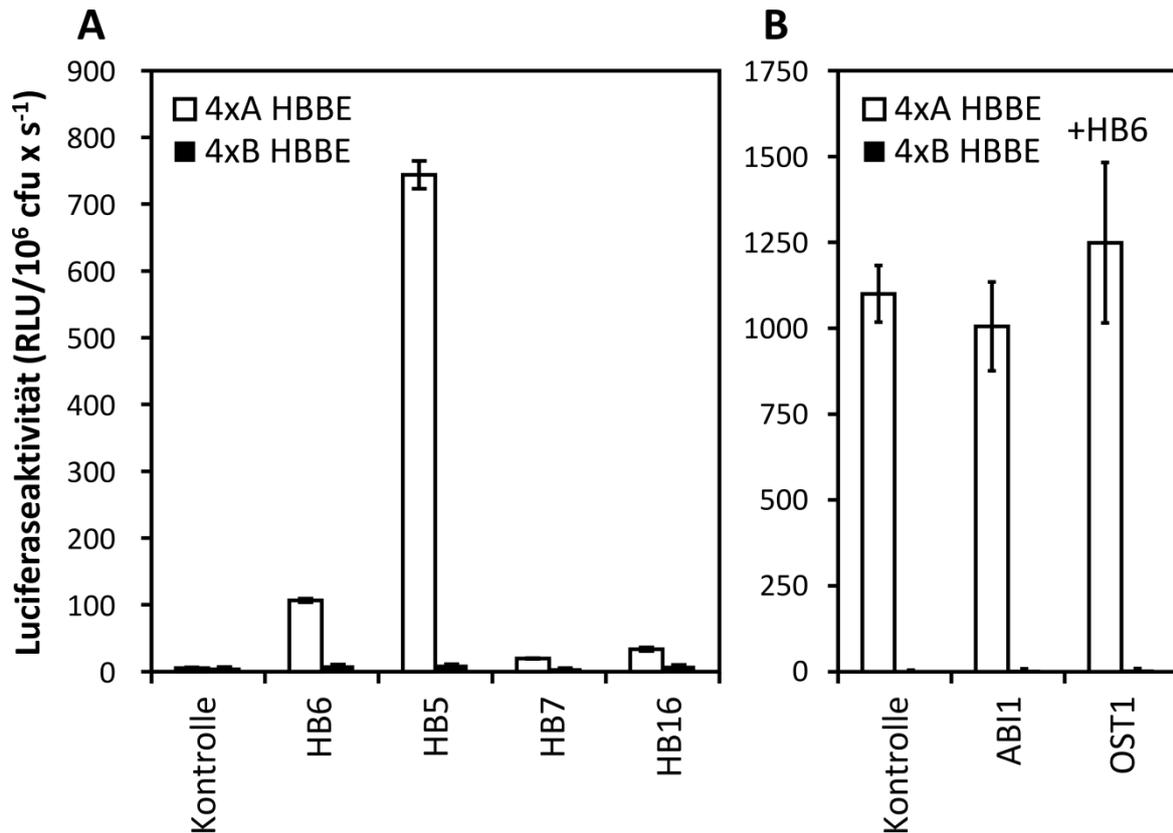


Abbildung 3.33 Transkriptionelle Regulation durch HD-Zip Transkriptionsfaktoren in Hefe

HB5, 6, 7 und 16 wurden konstitutiv unter der Kontrolle des ADH Promotors in Hefe-Reporterstämmen exprimiert, die entweder das 4xA oder 4xB Reporterkonstrukt stabil integriert im Genom tragen (A). Die Luciferase Aktivität wurde *in vivo* bestimmt und auf die Zellzahl bezogen. Zusätzlich zu HB6 wurde ABI1 oder OST1 unter der Kontrolle des GAL1 Promotors co-exprimiert (B). n=12 (A), n=8(B).

Die heterologe Expression in Hefe eignet sich in erster Linie, um bekannte Interaktionen und Regulationen zu bestätigen. Die postulierte Rolle von HD-Zip Transkriptionsfaktoren in der ABA Signaltransduktion gründet sich allerdings in erster Linie auf die Beschreibung der Phänotypen von KO und Überexpressions-Linien. Direkte Interaktionen und eine genaue Positionierung in der ABA Signaltransduktion sind weitgehend unbekannt. Insofern fehlen geeignete Kandidaten zur Analyse, die durchgeführten Messungen zeigen allerdings, dass das System prinzipiell funktioniert und dienen als *proof-of-concept*.

3.5.2. Konstruktion eines ABRE/ABF Reportersystems

Von zentraler Bedeutung für die ABA Signaltransduktion und für die in dieser Arbeit untersuchte Proteinkinase CPK23, ist die Regulation der Genexpression über ABRE und ABF Transkriptionsfaktoren. Deswegen wurde versucht, entsprechend zu dem gut funktionierendem HD-Zip Reporterkonstrukt, ein vergleichbares für ABFs herzustellen. Die Klonierungsstrategie und der schematische Aufbau sind dabei identisch (Hoffmann, 2001). Oligo Nukleotide (GC 50-53) mit ABRE

Bindesequenzen wurden *upstream* über die Restriktionsschnittstelle SpeI in einen pSK Vector mit CaMV 35S Minimalpromotor, Luciferase und Nos Terminator ligiert. Jedes Oligonukleotid besitzt zwei ABRE Bindesequenzen. Durch Wiederholung der Oligo Ligation wurden bis zu acht Wiederholungen des cis regulatorischen Elements eingefügt, so wie eine Version mit mutierter Bindesequenz. Der so erzeugte Reporter ist in Protoplasten eine Alternative zum üblicherweise verwendeten Reporter RD29B::Luc (siehe Kapitel 3.4.3.2).

Für die Verwendung in Hefe wurden die erzeugten Reporter 2xA/B ABRE -46 35S::Luc allein oder zusammen mit ABF2 transformiert (Abb. 3.34). Allerdings konnte keine Aktivierung durch ABF2 gemessen werden. Das Konstrukt mit der ABRE Bindesequenz (2xA) zeigte dabei eine drei bis vierfach höhere Aktivität als das Konstrukt mit mutierter Bindesequenz (2xB). In dieser Form ist das erzeugte Reporterkonstrukt allerdings nicht für die Verwendung in Hefe geeignet. Neben der fehlenden Induktion durch ABF2 zeigte das 2xA Konstrukt auch eine höhere Hintergrund Aktivität als das mutierte Kontrollkonstrukt. bZip Transkriptionsfaktoren kommen auch in Hefe vor, es wäre durchaus denkbar, dass die ABRE Sequenz von Hefe TFs erkannt wird, diese daran binden und zu der erhöhten Induktion im Vergleich zum 2xB Konstrukt führen.

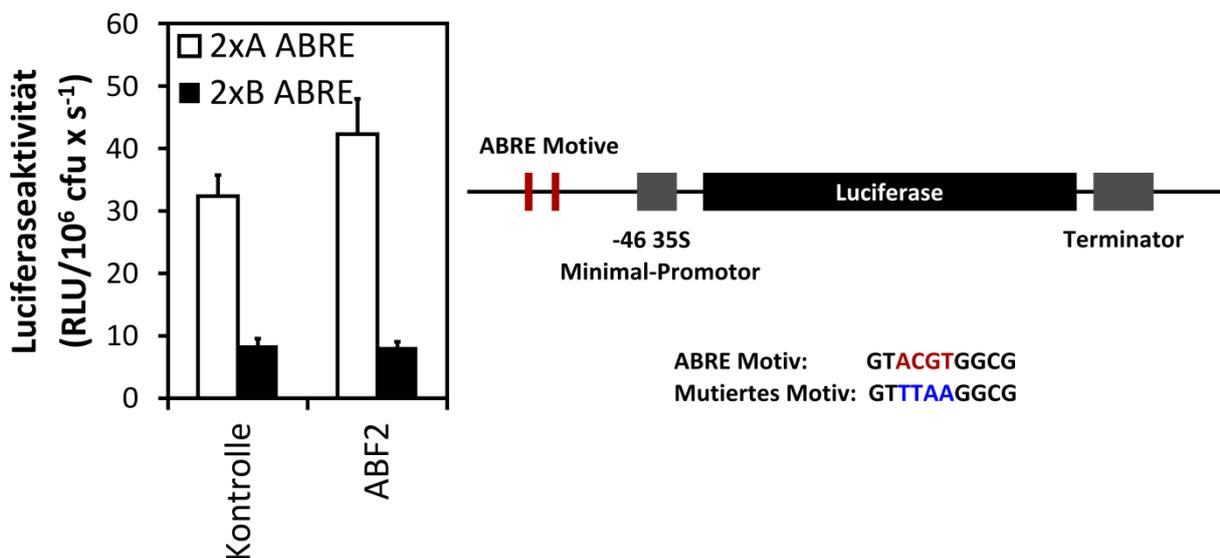


Abbildung 3.34 Schematischer Aufbau und Test eines artifiziellen ABRE Reporterkonstrukts in Hefe
Struktur eines künstlichen ABA Reporterkonstrukts, bestehend aus ABRE Elementen, -46 35S Minimalpromotor, Luciferase CDS und Nos Terminator. Die ABRE Sequenzen (2xA) beziehungsweise eine mutierte Bindesequenz (2xB) wurden durch Oligo-Nukleotid Ligation *upstream* des Minimalpromotors als Tandem-*repeats* eingefügt. Um die Konstrukte zu testen, wurden sie in Hefe transformiert und ABF2 unter der Kontrolle des ADH Promotors exprimiert. n=6.

4. Diskussion

Unter Trockenstress wird in der Pflanze sowohl die ABA Biosynthese als auch deren Mobilisierung aus zellulären Reserven induziert. ABA signalisiert der Pflanze ungünstige Wachstumsbedingungen und führt unmittelbar zur Schließung der Spaltöffnungen. Daran beteiligt ist die Calcium abhängige Proteinkinase CPK23. Sie aktiviert die Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 (Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011), dadurch kommt es zunächst zu einem Austritt von Anionen (Cl^- und NO_3^-) und die Plasmamembran wird depolarisiert. In Folge dessen kommt es zu einem Austritt von K^+ Ionen und Wasser, was einen Verlust des Turgors in den Schließzellpaaren der Spaltöffnungen zur Folge hat. Die Stomata schließen sich. Neben der Regulation der Spaltöffnungen führt ABA auch zu einer Inhibierung von vegetativem Wachstum und Keimung. Hierfür muss Einfluss auf die Genexpression genommen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CPK23 tatsächlich ein Regulator der ABA abhängigen Genexpression ist. Neben der Aufklärung der genauen Funktion von CPK23 und ihren Interaktionen mit den zentralen Kernkomponenten der ABA Signaltransduktion, drängen sich dabei zwei Fragen auf. Ist CPK23 auch ein geeigneter Kandidat um Konzentrationsschwankungen des sekundären Botenstoffs Ca^{2+} in die ABA Signaltransduktion zu integrieren oder ist die Kinase Teil eines Ca^{2+} unabhängigen Signalweges? Wenn CPK23 einen deutlichen Einfluss auf die ABA abhängige Genexpression nimmt, wieso ist dann kein nennenswerter Phänotyp von CPK23 KO Pflanzen zu beobachten? Darüber hinaus zeigte sich in dieser Arbeit bei Vergleich der CPK23 Sequenz verschiedener Arabidopsis Ökotypen ein sehr hohes Maß an genetischer Variabilität, die mit deutlichen Unterschieden in der Funktionalität des Proteins einhergeht. Dabei kommt man nicht umher die Frage zu stellen, ob dieser Variabilität eine natürliche Selektion zu Grunde liegt, CPK23 womöglich ein Locus ist, der die ABA Sensitivität der Spezies Arabidopsis mitbestimmt. Zu guter Letzt bleibt zu verstehen, wie einige Unterschiede in den Sequenzen der verschiedenen Ökotypen eine veränderte Funktionalität des Proteins herbeiführen. Diese Fragen sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1. Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion

4.1.1. Genereller Effekt auf die ABA abhängige Genexpression

Um die Funktion von CPK23 in der ABA abhängigen Genexpression zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verkürzte, konstitutiv aktive Versionen der Kinase hergestellt (Abb. 3.6) und transient in Protoplasten exprimiert. Dabei wurde der Effekt von CPK23 auf die Induktion eines ABA induzierbaren Reportersystems (RD29B::Luc) mit denen von CPK4 und CPK11 verglichen (Abb. 3.7), die als positive Regulatoren der ABA Signaltransduktion beschrieben sind (Zhu et al., 2007). Alle drei

CPKs führten zu einer deutlichen Induktion des Reporters, allerdings übertraf CPK23 den Effekt der beiden anderen Kinasen deutlich. Es ist daher naheliegend auch für CPK23 eine Rolle als positiver Regulator der ABA Signaltransduktion anzunehmen. Damit nicht ganz in Einklang zu bringen, sind die Ergebnisse der durchgeführten physiologischen Untersuchungen von CPK23 KO Pflanzen. Zwar war ein weitgehendes Ausbleiben von ABA abhängigen Phänotypen zu beobachten, allerdings waren CPK23 KO Pflanzen leicht ABA hypersensitiv (bei KO eines positiven Regulators würde man ein insensitives Verhalten erwarten) in ihrem Keimungsverhalten (Abb. 3.3). Überexpression und KO von CPK4 und CPK11 hingegen führt, in Übereinstimmung mit der postulierten Funktion als positive Regulatoren, zu ABA Hyper- beziehungsweise Insensitivität (Song, 2005). Auch die Analyse des CPK23 Proteins aus verschiedenen Arabidopsis Ökotypen (Abb. 3.13) im transienten Protoplastenassay ergab kein völlig eindeutiges Ergebnis. CPK23 aus Bur-0 induzierte RD29B::Luc stark, vergleichbar zu dem Col-0 Protein. CPK23 aus Tsu-1 hatte hingegen nur einen geringen Effekt und das Ler-0 Protein (GCA2) führte sogar zu einer 50% Repression des Reporters. Die Proteine aus Col-0 und Ler-0 unterscheiden sich deutlich und besitzen nur eine AS Identität von 89,6%. Allerdings stellt sich die Frage, ob das Protein dadurch neofunktionalisiert werden kann und aus einem positiven ein negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion wird.

Naheliegend wäre über einen dominant negativen Effekt bei Überexpression von GCA2 durch Verdrängung von anderen, positiv regulierenden Komponenten in der Signaltransduktion zu spekulieren. Allerdings war der Effekt von GCA2 von der Kinasefunktion abhängig, da nur eine katalytisch aktive Version (-ca) reprimierend wirkte (Abb. 3.14), während eine katalytisch inaktive Version keinen Effekt zeigte (-na). Zudem war der Effekt begrenzt auf ABA Konzentrationen zwischen 1-10 μM . Zwei Ergebnisse, die man bei einem dominant negativen Effekt von GCA2 nicht unbedingt erwarten würde. Eine Erklärung dafür könnte das Interaktionsverhalten von GCA2 mit PP2Cs und Ergebnisse aus Y2H Experimenten liefern. Generell ist die Interaktion zwischen PP2Cs und CPKs gut dokumentiert. So wurde mit verschiedenen Methoden (Y2H, BiFC, Co-Immunopräzipitation) und für eine Reihe verschiedener CPKs, darunter CPK4, CPK11, CPK12, CPK21 und CPK23, Interaktionen mit PP2Cs gezeigt (Geiger et al., 2010; Lynch et al., 2012; Lu et al., 2013; Fuchs, 2013)(Liese, unveröffentlicht). PP2Cs interagieren aber nicht nur mit CPKs, sondern auch mit einer Reihe weiterer Kinasen wie SnRK2s und CIPKs (Fuchs, 2013). PP2Cs stellen wahrscheinlich eine gemeinsame Komponente verschiedener Signalwege dar. GCA2 interagierte im Y2H Assay mit PP2CA (Abb. 3.21), und in schwächerem Umfang auch mit anderen PP2Cs (Fuchs, 2013), allerdings ausschließlich eine katalytisch aktive Version. Die Interaktionsstellen zwischen PP2Cs und CPKs wurden zwar nicht auf molekularer Ebene bestimmt, es ist allerdings denkbar, dass sie diese mit RCARs und SnRK2s Kinasen gemein haben. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass durch Expression von RCARs oder SnRK2s die GCA2 Interaktion mit PP2Cs im Y3H unterdrückt werden kann (Fuchs, 2013). Umgekehrt

war GCA2 dazu nur begrenzt und nur in hohen Mengen in der Lage. Wenn gleich die Ergebnisse dieser Y2H und Y3H Experimente in erster Linie qualitativ sind, scheint die Interaktion von GCA2 mit PP2Cs schwächer zu sein als mit anderen Kinasen oder RCARs. Folgendes Modell (Abb. 4.1) wäre daher denkbar, um den gemessenen reprimierenden Effekt von GCA2-ca in Abhängigkeit der ABA Konzentration zu erklären:

In Abwesenheit von ABA (niedrige endogene ABA Level in *aba2*) inhibieren PP2Cs eine Reihe an positiven Regulatoren der ABA Signaltransduktion, wie SnRK2s, CPK4 und CPK11. GCA2 Überexpression führt zur Bindung freier PP2Cs, überschüssige GCA2 Moleküle haben allerdings keinen Effekt auf die ABA abhängige Genexpression. In Anwesenheit von niedrigen bis mittleren ABA Konzentrationen (1-10 μM) beginnen RCARs mit PP2Cs Komplexe mit hoher Affinität zu bilden, wodurch Proteinkinasen aus dem Komplex mit PP2Cs verdrängt und aktiviert werden.

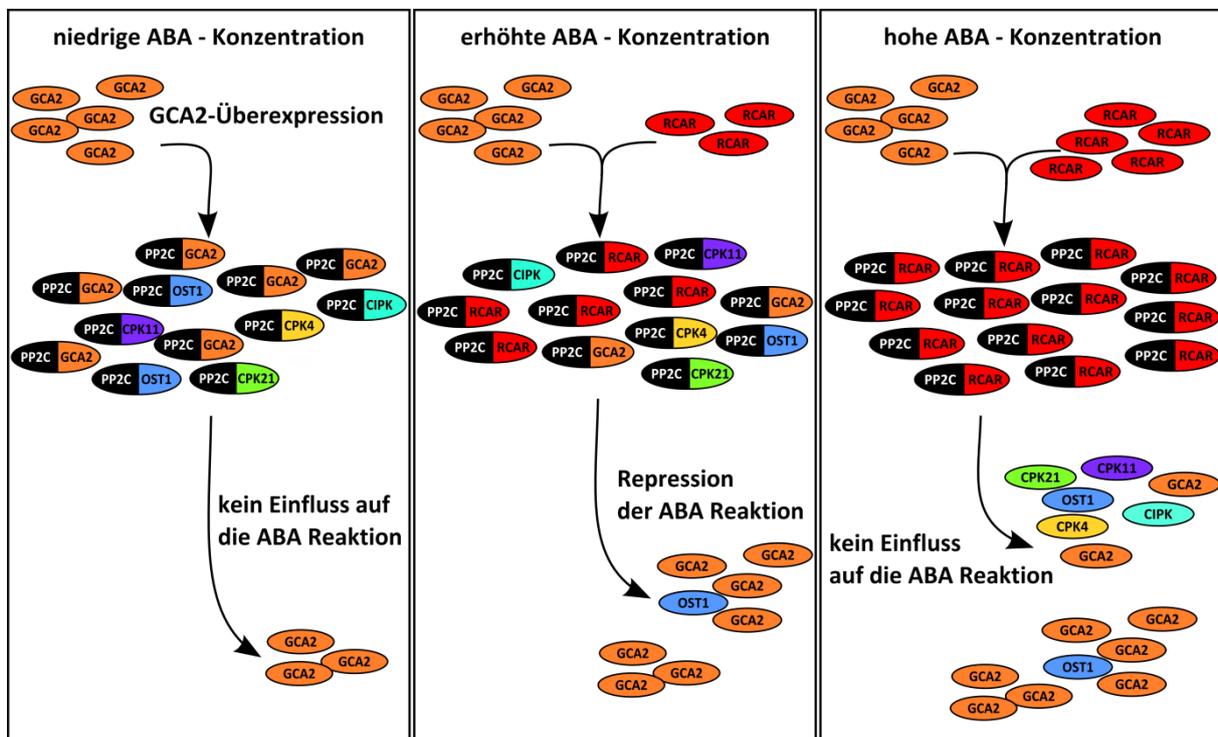


Abbildung 4.1 Modell des ABA abhängigen GCA2 Effekts

Postuliertes Modell für einen dominant negativen Effekt von GCA2 in Abhängigkeit der ABA Konzentration. GCA2 hat selbst keinen Effekt auf die ABA abhängige Genexpression, kann aber mit anderen Signalwegen interferieren, indem es mit PP2Cs Komplexe bildet. Bei niedrigen ABA Konzentrationen bindet GCA2 freie PP2Cs. Bei ansteigenden ABA Konzentrationen konkurrieren RCARs mit Proteinkinasen um die PP2Cs, dabei werden als erstes in der Genregulation inaktive GCA2 Moleküle freigesetzt, anstatt positiv regulierenden Kinasen wie OST1 oder CPK4/11, da ihre Bindung mit PP2Cs schwächer ist. Bei sehr hohen ABA Konzentrationen verdrängen RCARs weitgehend alle Proteinkinasen, GCA2 Überexpression hat keinen Effekt mehr.

Durch die vergleichsweise schwache Bindung von GCA2 an PP2Cs werden allerdings in erster Linie in der Genregulation inaktive GCA2 Moleküle freigesetzt, in der Folge ist die ABA Induktion verzögert.

Bei sehr hohen ABA Konzentrationen (>10 μM) werden schließlich weitgehend alle PP2Cs *in vivo* durch RCARs gebunden und inhibiert, wodurch alle nachgeordneten Kinasen aktiviert werden. Überexpression von GCA2-ca bliebe in diesem Fall wieder ohne Effekt.

Das vorgestellte Modell geht von einer Reihe ähnlicher aber nicht redundanter Signalwege aus, mit PP2Cs als konvergierendem Punkt. Durch Überexpression oder KO einzelner Komponenten, könnten andere Signalwege beeinflusst werden, indem Komponenten verdrängt werden oder die fehlenden ersetzen. Eine vergleichbare Situation gibt es bei MAP Kinase Kaskaden in Hefe. Verschiedene Stimuli, wie Pheromone, Nährstoffmangel oder osmotischer Stress, lösen Signalkaskaden aus, in deren Verlauf MAP Kinase Kinase Kinasen, MAP Kinase Kinasen und diese wiederum Map Kinasen phosphorylieren, die dann untergeordnete Komponenten wie Transkriptionsfaktoren und Ionenkanäle regulieren. Daran beteiligt sind außerdem GTP-bindende und eine Reihe an *scaffold* Proteinen. Etliche dieser Komponenten besitzen die verschiedenen MAPK Signalwege gemeinsam und der Verlust spezifischer Komponenten einzelner Signalwege kann in Hefe zur fälschlichen Aktivierung anderer Signalwege führen (Chen und Thorner, 2007).

4.1.2. Verhältnis zu den Kernkomponenten der ABA Signaltransduktion

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Interaktion zwischen CPK23 und PP2Cs gut dokumentiert und konnte auch in dieser Arbeit mittels Y2H bestätigt werden (Abb. 3.21). Die Bedeutung dieser Interaktion ist allerdings nicht ganz klar und kann diskutiert werden. In *Xenopus* Oocyten führt CPK23 bei Co-Expression mit SLAC1 zu Aktivierung des Ionenkanals und einem Austritt von Anionen. Diese Anionenkanal Aktivierung kann durch Co-Expression von ABI1 und ABI2 unterdrückt werden (Geiger et al., 2010). Daraus schlossen Geiger et. al dass die beiden PP2Cs CPK23 inhibieren, vergleichbar zur SnRK2 Kinase OST1. Allerdings wäre es auch denkbar, dass SLAC1 von ABI1 dephosphoryliert wird und Kinase und Phosphatase in der Regulation des Kanals antagonistische Funktion besitzen. Unabhängig davon könnten PP2Cs auch durch die Interaktion mit CPK23 reguliert werden. So wurde für CPK12 eine Rolle als positiver Regulator von ABI2 postuliert (Zhao et al., 2011a). CPK23 ist *in vitro* in der Lage verschiedene PP2Cs zu phosphorylieren (Wellmann, 2013)(Pleißner, unveröffentlicht), dabei konnte allerdings kein Effekt auf die Phosphatase Aktivität festgestellt werden.

In dieser Arbeit wurde CPK23 mit den Phosphatasen PP2CA und AHG1 in Protoplasten co-exprimiert (Abb. 3.22). Dabei zeigte sich eine starke Abhängigkeit des induzierenden CPK23 Effekts von PP2CA aber nur eine schwache von AHG1. Erwähnenswert ist dabei, dass PP2CA im Y2H Assay mit CPK23 interagiert, AHG1 allerdings nicht (Fuchs, 2013). Für verschiedene PP2Cs wurde außerdem gezeigt, dass sie mit bZip TFs interagieren (Lynch et al., 2012). Eine naheliegende Schlussfolgerung wäre daher die Annahme, dass CPK23 und PP2Cs in der Regulation dieser TFs antagonistisch wirken und

jeweils gegensätzliche Reaktionen katalysieren. Mit diesem Modell ließe sich der moderate Effekt von AHG1 bei hohen Konzentrationen auf die CPK23 abhängige Reporterinduktion erklären, obwohl zwischen beiden Proteinen keine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Fuchs, 2013). PP2CA ist grundsätzlich ein stärkerer Inhibitor der ABA abhängigen Genexpression als AHG1, so war unter Kontrollbedingungen in Protoplasten nur etwa 1/3 der DNA Menge nötig, um eine vergleichbar starke Repression zu erreichen. Der Effekt auf die CPK23 Induktion war allerdings unverhältnismäßig stärker (Abb. 3.22). In diesem Fall wurde nur etwa 1/10-1/30 der von AHG1 verwendeten DNA Menge für einen vergleichbaren Effekt benötigt. Da für PP2CA eine direkte Interaktion mit CPK23 gezeigt werden konnte, kann man spekulieren, dass PP2CA nicht nur mit CPK23 um Substrate konkurriert, sondern die Kinase wahrscheinlich auch direkt inhibiert. Erwähnenswert ist zudem, dass auch im *Xenopus* Oocyten System die Anionenflüsse nur durch PP2Cs unterdrückt werden konnten, die auch mit CPK23 interagieren, während HAB1, die keine Interaktion mit CPK23 zeigte, dazu nicht in der Lage war (Geiger et al., 2010). Wenn es sich zwischen Interaktions- und Regulationsverhalten nicht um zufällige Koinzidenz handelt, dann kann davon ausgehen werden, dass einige PP2Cs in der Lage sind CPK23 direkt zu inhibieren. Abbildung 4.2 fasst das diskutierte Verhältnis zwischen CPK23 und PP2Cs zusammen.

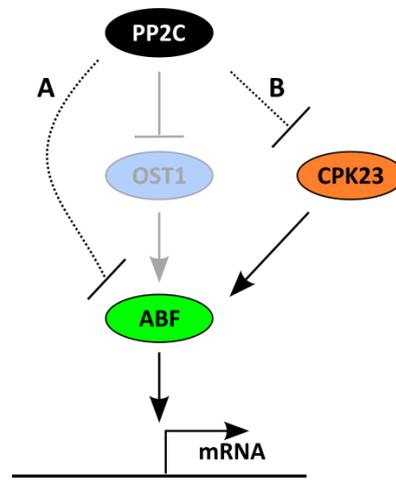


Abbildung 4.2 Postuliertes Modell der Interaktion zwischen CPK23 und PP2Cs

CPK23 und PP2Cs haben antagonistische Wirkung auf die ABA abhängige Genexpression. Dabei wirken die PP2Cs wahrscheinlich auf zwei unterschiedliche Arten CPK23 entgegen. Zum einen (A) könnten sie mit der Kinase um ABF TFs konkurrieren und diese durch Dephosphorylierung deaktivieren. Zum anderen (B) scheinen einige PP2Cs in der Lage zu sein, CPK23 direkt zu inhibieren, vergleichbar zur Regulation der SnRK2 Kinase OST1.

Im Gegensatz zu PP2Cs scheint das Verhältnis zwischen CPK23 und bZip TFs eindeutig. CPK23 zeigte in dieser Arbeit eine variable Aktivierung von ABF1-4 bei Co-Expression in Protoplasten, während für ABI5 kein oder nur ein sehr geringer Effekt zu beobachten war (Abb. 3.23). Dies legt eine direkte Interaktion und Regulation der TFs durch CPK23 nahe, so wie das zuvor für andere CPKs gezeigt

wurde (Choi et al., 2005; Zhu et al., 2007; Lynch et al., 2012). Allerdings konnte in dieser Arbeit keine Interaktion im Y2H gezeigt werden (Abb. 3.25), womöglich aufgrund einer technischen Beschränkung des Assays. Deswegen bleibt zu zeigen, dass die Regulation der bZip TFs wirklich durch direkte Interaktion und nicht indirekt durch die Regulation anderer Komponenten der Signaltransduktion erfolgt. Zumindest *in vitro* konnte eine direkte Phosphorylierung aller untersuchten TFs gezeigt werden (Pleißner, unveröffentlicht). Der Nachweis einer direkten Interaktion, vorzugsweise *in vivo*, zum Beispiel mittels ratiometrischem BIFC (Grefen und Blatt, 2012), würde weitere Argumente für eine direkte Regulation liefern. Hilfreich könnte in diesem Zusammenhang auch das entwickelte Hefe ABRE/ABF Reportersystem sein (Abb. 3.34). Zwar konnte dieses nicht spezifisch durch ABFs aktiviert werden, denkbar wäre allerdings, dass ABFs im nicht phosphoryliertem Zustand inaktiv sind und daher die Co-Expression einer aktiven, regulierenden Kinase notwendig ist.

Zuletzt wurde das Verhältnis zwischen CPK23 und der SnRK2 Kinase OST1 untersucht. Da parallel zu dieser Arbeit eine Phosphorylierung von GCA2 durch OST1 an den Threoninen 213 und 317 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte (Wellmann, 2013)(Liese, unveröffentlicht), wurden in dieser Arbeit durch *site directed mutagenesis phosphosite* Mutationen dieser Stellen erzeugt und die mutierten CPK23/GCA2 Versionen in Protoplasten untersucht. T213 befindet sich im Aktiven Zentrum der Kinase unmittelbar vor dem konservierten Aminosäuremotiv DFG und dem *activation loop* der Kinase (Abb. 4.3).

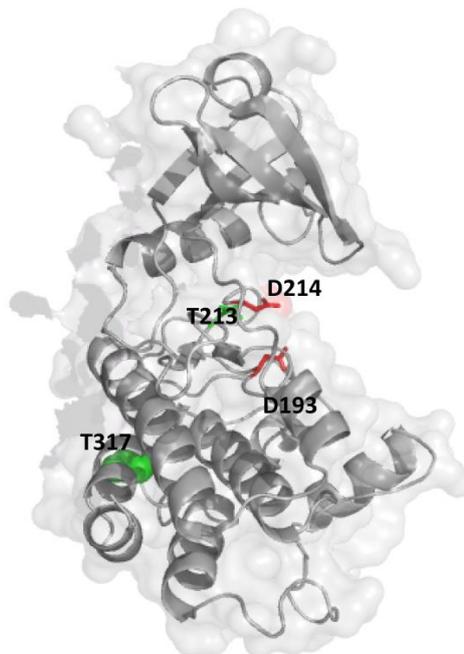


Abbildung 4.3 Strukturmodell der Kinase-Domäne von GCA2

Mit Hilfe von Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>, Biasini et al., 2014) vorausgesagte Struktur der Kinase-Domäne von GCA2 basierend auf der Kristallstruktur von CpCDPK3 aus *Cryptosporidium parvum* (PDB ID:3LIJ). Die Kinasedomäne ist in grau dargestellt. Die beiden kritischen Aspartat-Reste (193 und 214) im aktiven Zentrum sind durch rote *sticks* und die OST1 Phosphorylierungsstelle an T213 durch grüne *sticks* markiert. T317 befindet sich distal vom aktiven Zentrum und ist durch grüne Kugeln dargestellt.

Eine Phosphorylierung an dieser Stelle könnte leicht Einfluss auf ATP, Mg²⁺ Bindung oder die Positionierung des *activation loops* nehmen und somit die Aktivität der Kinase beeinflussen. Für eine Reihe an Kinasen, zum Beispiel SNF1 aus Hefe und OST1 sowie CIPK24 aus Arabidopsis wurde gezeigt, dass ihre Aktivität durch Phosphorylierung im dahinter befindlichen *activation loop* gesteuert wird (McCartney und Schmidt, 2001; Guo et al., 2001; Vlad et al., 2010). Threonin 317 befindet sich hingegen distal vom aktiven Zentrum und man sollte für diesen Bereich der Kinase eher eine Funktion in der Bindung und Orientierung von Substraten vermuten oder für intramolekulare Interaktionen innerhalb des Proteins. Die Mutation dieser Aminosäure führte zu einer deutlichen Abnahme der *in vivo* Aktivität von CPK23 (Abb. 3.27). Klare Schlüsse über den Effekt einer Phosphorylierung lassen sich allerdings nicht ziehen, da sowohl die Substitution mit Alanin als auch Aspartat den gleichen Effekt zeigte. Im Gegensatz dazu ergab die Mutation von T213 sehr deutliche spezifische Effekte. Wie gezeigt werden konnte, ist das Col-0 Protein bei Substitution von Threonin 213 mit Aspartat *in vivo* komplett inaktiv. Dies legt nahe, dass CPK23 durch OST1 inaktiviert werden kann. Dies müsste dann konsequenterweise ausschließlich oder zumindest vornehmlich mit dem *in vivo* inaktiven Ler-0 Protein (GCA2) geschehen. In Übereinstimmung damit zeigte GCA2 bei Substitution von T213 mit Cystein, einer Mutation um die unphosphorylierte -OH Gruppe zu imitieren, eine induzierende Wirkung wenn gleich diese schwächer ausfiel als mit dem Col-0 Protein. Damit schwer in Einklang zu bringen sind allerdings die Befunde mit den hergestellten T213^A Versionen in CPK23 und GCA2, die weder zu einer Inaktivierung beziehungsweise Aktivierung führten. Geht man davon aus, dass die negative Ladung der Phosphatgruppe ursächlich für die Inaktivierung ist, sollte konsequenterweise GCA2 T213^A aktiv sein. Ist hingegen die freie -OH Gruppe an dieser Stelle für die Aktivität des Proteins von Nöten, sollte CPK23 T213^A keine Aktivität zeigen.

Dies ließe sich eventuell durch einen mehrstufigen Kontrollmechanismus erklärt, bei dem die Phosphorylierung an Threonin 213 die Trans- oder Autophosphorylierung an einer weiteren Stelle auslöst und so die Aktivität von CPK23 bestimmt. Zweistufige Aktivierungsmechanismen wurden für verschiedene Kinasen gezeigt, unter anderem für die MAP-Kinase ERK2, für die Tyrosin-Rezeptor-Kinase IGF, für SnRK2.10 und für OST1 in Arabidopsis, sowie für SNF1 in Hefe (Favelyukis et al., 2001; Prowse et al., 2001; McCartney und Schmidt, 2001; Vlad et al., 2010). Im Fall von SNF1 wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem die Kinase durch Phosphorylierung in Kombination mit einer

Konformationsänderung ausgelöst durch Interaktion mit SNF4 aktiviert wird. Bei den Kinasen SnRK2.6 und 2.10 in Arabidopsis wurde hingegen gezeigt, dass zwei Serine im *activation loop* phosphoryliert werden und für die Aktivität der Kinasen notwendig sind. Zumindest für SnRK2.10 scheint es sich dabei um eine sequentielle Reaktion zu handeln. Für die Aktivität von OST1 (SnRK2.6) ist die Phosphorylierung der beiden Serine 171 und 175 wichtig. Interessanterweise führte die Substitution der beiden Stellen mit Aspartat nicht zu konstitutiv aktiven Kinasen, sondern zu katalytisch inaktiven Versionen (Belin et al., 2006; Vlad et al., 2010). Die Phosphorylierung ließ sich also an diesen Stellen nicht imitieren. Überträgt man das auf CPK23, könnte es sich bei der Phosphorylierung durch OST1 ebenfalls um einen Aktivierungsmechanismus handeln, der durch Phosphomimik nicht imitiert werden kann und in Folge dessen zu Inaktivität von CPK23 T213^D führt.

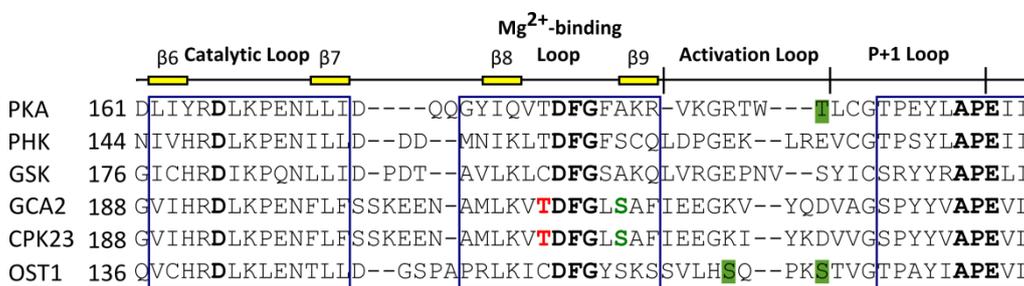


Abbildung 4.4 Alignment des aktiven Zentrums verschiedener Kinasen mit GCA2/CPK23

Alignment des aktiven Zentrums verschiedener Proteinkinasen mit GCA2/CPK23 und OST1, basierend auf Kristallstrukturen von PKA, PHK und GSK. Über der Sequenz abgebildet ist die Sekundär-Struktur des aktiven Zentrums von PKA. Konservierte Bereiche sind durch blaue Kästen markiert. Für die katalytische Aktivität der Kinasen ist ein konserviertes Aspartat im *catalytic loop* essentiell. Im Mg²⁺ *binding loop* befindet sich das konservierte Aminosäuremotiv DFG. Die OST1 Phosphorylierungsstelle an T213 ist in GCA2 und CPK23 rot markiert, die Autophosphorylierungsstelle an S218 grün. Der Bereich zwischen den konservierten Motiven DFG und APE ist das *activation Segment* der Kinasen. Er beinhaltet den *activation loop*. Phosphorylierungen in diesem Bereich sind für die Aktivität einiger Kinasen wichtig und führen zu Konformationsänderungen. Bestätigte Phosphorylierungsstellen sind grün unterlegt. Abbildung nach (Nolen et al., 2004). Kristallstrukturen von PKA, PHK und GSK wurden publiziert von (Zheng et al., 1993), (Lowe et al., 1997) und (Dajani et al., 2003).

Denkt man bei CPK23 an einen zweistufigen Mechanismus wäre es durchaus möglich, dass sich die beiden Proteine in Col-0 und Ler-0 darin auf Grund der weitreichenden Änderungen in der Aminosäuresequenz unterscheiden. Denkbar wäre auch eine Verknüpfung der OST1 Phosphorylierung an Threonin 213 mit Serin 218, das als Autophosphorylierungsstelle in GCA2 bestimmt wurde und sich in unmittelbarer Nähe im Mg²⁺ *binding loop* der Kinase befindet. Basierend auf Kristallstrukturen verschiedener Kinasen (Abb. 4.4) sollte S218 Teil eines β-Strang (β9) des Mg²⁺ *binding loops* sein, der mit einem β-Strang (β6) des *catalytic loops* über Wasserstoffbrückenbindungen interagiert. Durch Vergleich der Strukturen aktiver und inaktiver Kinasen wurde gezeigt, dass die Interaktion dieser beiden Bereiche für die Aktivität verschiedener

Kinasen wichtig ist (Nolen et al., 2004). Eine Phosphorylierung an dieser Stelle könnte GCA2/CPK23 daher inaktiveren, Mutation von S218 zu Aspartat in CPK23 führte folgerichtig zu Inaktivität, während Alanin an dieser Stelle in GCA2 zumindest zu einer schwachen Aktivierung führte (Abb. 3.18).

Es ist schwer auf Basis der vorhandenen Informationen ein plausibles Modell zu entwickeln, das erklären kann, wie die Aktivität von CPK23/GCA2 reguliert wird. Dafür fehlen eine Reihe essentieller Informationen. OST1 abhängige und Autophosphorylierungsstellen wurden ausschließlich für GCA2 bestimmt. So wäre es erstens wichtig diese Information auch für das Col-0 Protein zu haben, um zu sehen ob es nennenswerte Unterschiede gibt. Zweitens dürfte der Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Aktivitäten der verschiedenen CPK23/GCA2 *phosphosite* Mutanten aufschlussreich sein. Drittens wären Kristallstrukturen außerordentlich hilfreich, um die Abläufe auf molekularer Ebene im aktiven Zentrum der Kinase und den Effekt der Mutationen an Position 213 zu verstehen.

Noch komplexer wird das Verhältnis zwischen CPK23 und OST1 durch die Beobachtung, dass GCA2 auch OST1 *in vitro* phosphorylieren kann (Wellmann, 2013). Deswegen wurde bereits früher spekuliert, dass sich die beiden Kinasen eventuell gegenseitig regulieren. In dieser Arbeit konnte unter Verwendung des 8xA ABRE::Luc Reporters und ABI5 ein negativer Effekt von CPK23 auf die OST1 Induktion *in vivo* beobachtet werden (Abb. 3.30). Dieser Effekt war weitgehend Kinase spezifisch und führte zur beinahe kompletten Aufhebung der OST1 Induktion bei gleichen Mengen der beiden Kinasen. Allerdings ist nicht ganz klar wodurch dieser Effekt hervorgerufen wird. Denkbar wären unterschiedliche Modelle (Abb. 4.4).

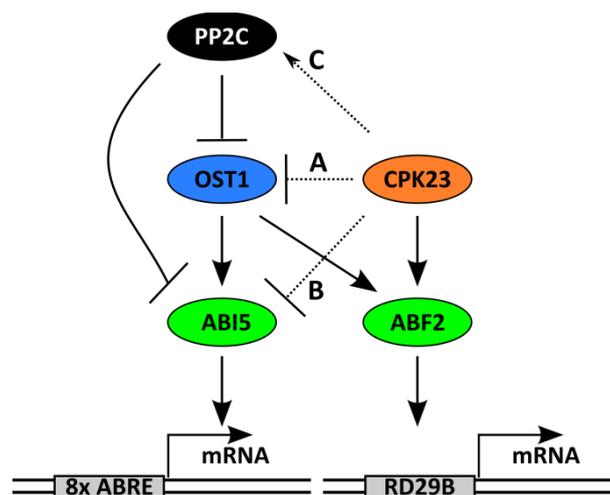


Abbildung 4.5 Mögliche Mechanismen der Repression von OST1 durch CPK23

CPK23 und OST1 induzieren beide den komplexen Reporter RD29B durch Aktivierung verschiedener ABFs. Allerdings ist CPK23 in der Lage die Induktion eines artifiziellen Reporters (8xA ABRE mit 35S Minimalpromotor) durch ABI5 und OST1 zu unterdrücken. Denkbar sind verschiedene Mechanismen. Entweder durch direkte Inhibition von OST1 (A) durch Inhibition von ABI5 (B) oder indirekt durch Regulation eines weiteren Faktors, zum Beispiel PP2Cs (C), die anschließend OST1 oder ABI5 inhibieren.

CPK23 könnte zunächst OST1 durch Phosphorylierung inaktivieren, dafür wäre eine Analyse der entsprechenden Phosphorylierungsstellen interessant. Ungünstigerweise war die Phosphorylierung *in vitro* nur schwach ausgeprägt, weshalb die Stellen bisher nicht bestimmt werden konnten. Denkbar wäre allerdings auch, dass CPK23 den TF ABI5 negativ reguliert und inaktiviert. CPK23 phosphoryliert ABI5 tatsächlich auch *in vitro* (Pleißner, unveröffentlicht). Während andere ABFs, wie in dieser Arbeit gezeigt, positiv reguliert werden, könnte der Effekt auf ABI5 gegenteilig sein. Ein Vergleich der Phosphorylierungsstellen der verschiedenen bZip TFs könnte darüber Aufschluss geben. Drittens wäre denkbar, dass CPK23 einen indirekten negativen Effekt auf OST1 oder ABI5 ausübt durch Interaktion mit einem dritten Partner. Denkbar wären zum Beispiel PP2Cs. Wenngleich das bevorzugte Modell in dieser Arbeit eher von einer Inhibition von CPK23 durch PP2Cs ausgeht, wäre es auch denkbar, dass PP2Cs durch CPK23 positiv reguliert werden, wie spekuliert wurde für CPK12 und ABI2 (Zhao et al., 2011a). In diesem Fall hätte die Kinase positiv und negativ regulatorische Wirkung zugleich und es würde zu einer Repression des 8xA ABRE Reporters kommen, da ABI5 nicht oder kaum von CPK23 induziert wird, während der komplexere Promotor RD29B vornehmlich induziert wird (Abb.3.23).

Die genaue Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion bietet mit Sicherheit Raum zur Spekulation. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und anderer (Geiger et al., 2010; Wellmann, 2013)(Pleißner, unveröffentlicht) wird allerdings folgendes Modell für die Rolle von CPK23 in der ABA Signaltransduktion vorgeschlagen (Abb. 4.6). CPK23 unterliegt ähnlich der Kinase OST1 der Regulation und Inhibition durch PP2Cs. Unter Stress Bedingungen und unter Anwesenheit von ABA bilden RCARs Komplexe mit PP2Cs. Dadurch werden die nachgeordneten Kinasen OST1 und CPK23 von der Inhibition befreit und aktiviert. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung oder Inaktivierung von Anionenkanälen und bZip TFs. Die beiden Kinasen OST1 und CPK23 besitzen demnach eine sehr ähnliche Funktion, allerdings kommt es zwischen beiden, wie beobachtet, unter unbestimmten Bedingungen zur gegenseitigen Regulation. Der Mechanismus und die Richtung dieser Regulation bleiben unklar, denkbar wäre eine Kreuzinhibierung zwischen beiden Signalwegen oder ein Feedbackmechanismus in der ABA Signaltransduktion.

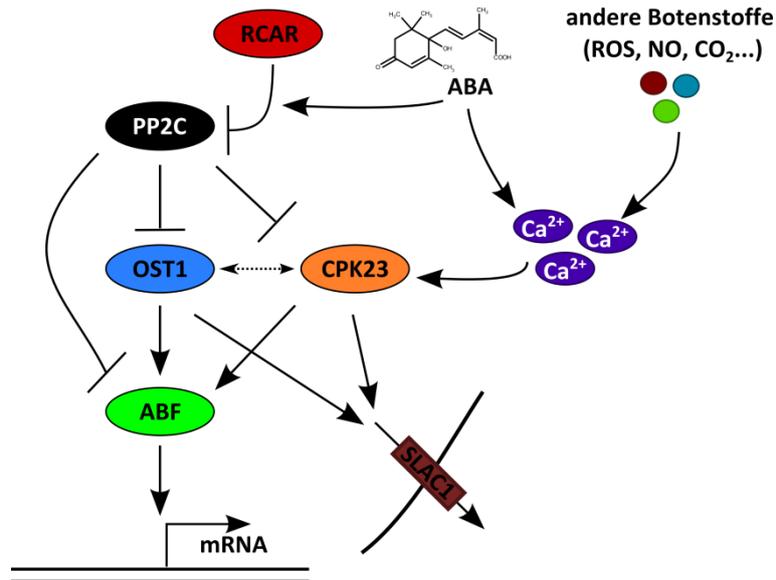


Abbildung 4.6 Angenommene Funktion von CPK23 in der ABA Signaltransduktion

CPK23 ist ein positiver Regulator der ABA Signaltransduktion. In Abwesenheit von ABA wird die Kinase durch PP2Cs inhibiert. Durch die Bindung von RCARs an PP2Cs bei ansteigenden ABA Konzentrationen wird die Kinase von dieser Inhibition befreit und phosphoryliert untergeordnete Komponenten. Dazu gehören der Anionenkanal SLAC1 sowie bZip TFs. Damit wirken CPK23 und OST1 wahrscheinlich synergistisch, allerdings scheint es zwischen beiden Kinasen auch zur gegenseitigen Regulation zu kommen. Der genaue Mechanismus ist dabei noch unklar. Zusätzlich erlaubt CPK23 potenziell die Integration von Ca²⁺ Signalen in die ABA Signaltransduktion. Ca²⁺ ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff dessen Konzentration von einer ganzen Reihe Signale beeinflusst wird unter anderem ROS, NO, CO₂ und auch ABA.

4.2. Integration von Ca^{2+} Signalen in die ABA Signaltransduktion durch CPK23

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CPK23 eine wichtige Funktion in der ABA Signaltransduktion besitzt und mit etlichen der Kernkomponenten der Signaltransduktion in Verbindung steht. Dabei ist CPK23 nicht nur ein Regulator von Ionenkanälen sondern auch der ABA abhängigen Genexpression. Unklar bleibt, ob die Kinase auch als Übersetzer von Schwankungen zellulärer Ca^{2+} Konzentrationen und Integrator in die ABA Signaltransduktion in Frage kommt. Zwar konnte sowohl Ca^{2+} Bindung an CPK23 mittels isothermaler Titrations Kalorimetrie (ITC) als auch eine schwache (2-3x) Ca^{2+} abhängige Aktivierung der Kinase *in vitro* gezeigt werden, allerdings befanden sich die nötige Konzentrationen im hohen Nano- bis Micro-molaren Bereich (Abb. 4.7) (Geiger et al., 2010; Wellmann, 2013). CPK23 sowie eine Reihe anderer CPKs (Boudsocq et al., 2012) zeigen eine verhältnismäßig hohe basale Aktivität, aber eine geringe Ca^{2+} Abhängigkeit. Ob diese Ca^{2+} Abhängigkeit *in vivo* überhaupt relevant ist, kann zumindest in Frage gestellt werden.

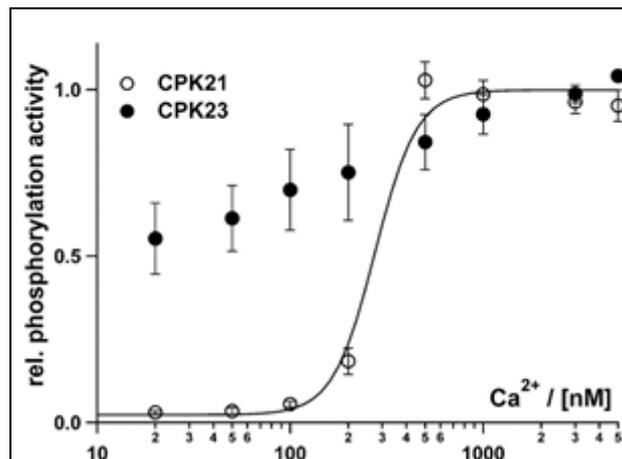


Abbildung 4.7 Ca^{2+} Regulation von CPK21 und CPK23

In vitro Phosphorylierung des SLAC1 N-Terminus durch CPK21 und CPK23 in Abhängigkeit der Ca^{2+} Konzentration. Die maximale Aktivität ist jeweils auf 1 gesetzt. CPK23 besitzt eine höhere basale Aktivität, zeigt allerdings nur leichte Aktivierung durch Ca^{2+} , während CPK21 eine niedrige basale Aktivität hat und stark durch Ca^{2+} induziert wird. Abbildung aus (Geiger et al., 2010), siehe auch (Wellmann, 2013).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Protoplasten-Reporterassays können darauf keine Antwort geben, da durchgehend konstitutiv aktive Kinaseversionen verwendet wurden, bei denen die Calmodulin Domänen entfernt wurden (Abb. 3.6). Dies ist für die Untersuchungen in Protoplasten üblich, da selbst sehr stark Ca^{2+} abhängige CPKs, wie CPK5, in ihrer nativen Form im transienten Assay inaktiv sind und auch durch die Verwendung von Ca^{2+} Ionophoren nur partiell aktiviert werden können (Boudsocq et al., 2010). Vielmehr zeigen die durchgeführten Assays das Potenzial von CPK23,

nach einer möglichen *in vivo* Aktivierung. Dennoch gibt es eine ganze Reihe an Argumenten, die eine *in vivo* Relevanz der CPK23 Ca^{2+} Abhängigkeit vermuten lassen.

Das wahrscheinlich stärkste kommt von der Beobachtung der veränderten Ca^{2+} Signatur in Schließzellen der Mutante *gca2* nach ABA Applikation (Abb. 4.8) (Allen et al., 2001). Ca^{2+} ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, gleichzeitig ist es in hohen Konzentrationen für die Zelle toxisch. Deswegen muss die zelluläre Ca^{2+} Konzentration strikt reguliert werden. Daran beteiligt sind eine Reihe von Im- und Exportproteinen. Es ist davon auszugehen, dass der Einstrom von Ca^{2+} in Reaktion auf einen bestimmten Impuls aus Zellkompartimenten oder dem extrazellulären Raum nicht völlig unkontrolliert geschieht, sondern durch Feedbackmechanismen reguliert wird (Brandman und Meyer, 2008). Ein Beispiel dafür ist der IP_3 Rezeptor, der durch IP_3 und Ca^{2+} aktiviert wird, gleichzeitig aber auch durch den Einstrom von Ca^{2+} ins Cytoplasma und die Erhöhung der Konzentration wieder inaktiviert wird (Taylor und Laude, 2002). Neben dem Einstrom von Ca^{2+} muss auch der Export reguliert werden, um die Ca^{2+} Homöostase wiederherzustellen und zum Ruhezustand zurückzukehren. Daran beteiligt sind CPKs, so wurde zum Beispiel gezeigt, dass CPK1 die Ca^{2+} ATPase ACA2 durch Phosphorylierung negativ reguliert (Hwang et al., 2000).

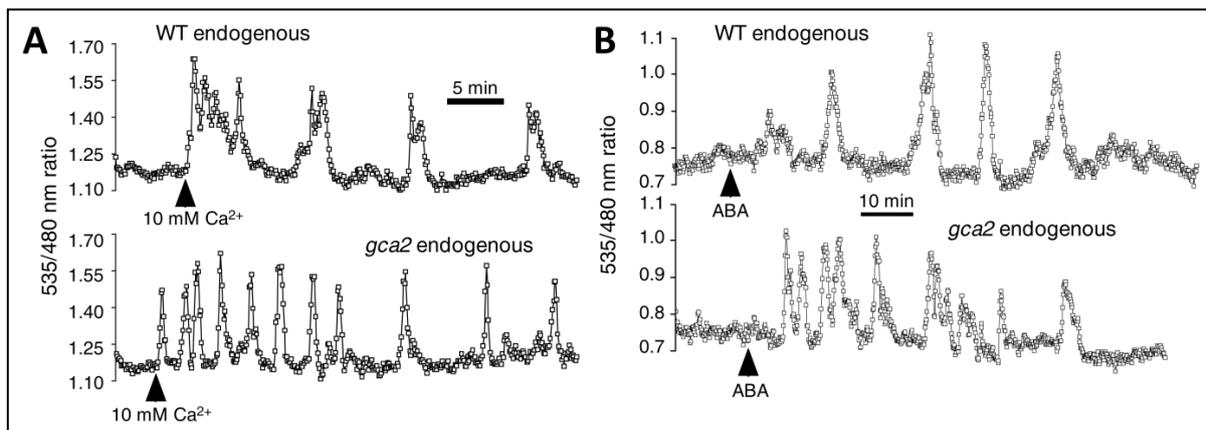


Abbildung 4.8 Ca^{2+} Signatur der *gca2* Mutante nach Ca^{2+} oder ABA Applikation

Ca^{2+} Oszillationen in Schließzellen von Ler-0 und *gca2* Pflanzen ausgelöst durch extern appliziertes Ca^{2+} (A) oder durch Applikation von 5 μM ABA (B) gemessen unter Verwendung von Cameleon Ca^{2+} Sensoren. Die Frequenz der Oszillationen ist in der *gca2* Mutante deutlich erhöht. Abbildung aus (Allen et al., 2001).

Es ist nicht bekannt, dass CPK23 neben seiner Rolle in der Regulation der Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 auch Calciumkanäle kontrolliert. Da die Ca^{2+} Signatur in den Schließzellen der *gca2* Mutante allerdings verändert ist, sollte das Protein entweder direkt oder indirekt auf die Erhöhung der zellulären Ca^{2+} Konzentrationen reagieren, und entweder Ca^{2+} Import/Export oder sogar beides beeinflussen.

Ein möglicher Mechanismus wäre zum Beispiel die Wahrnehmung der Ca^{2+} Konzentration durch eine andere CPK mit höherer Ca^{2+} Abhängigkeit, die CPK23 reguliert und in Folge dessen es durch einen Feedbackmechanismus zur Wiederherstellung der Ca^{2+} Homöostase kommt. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die stark Ca^{2+} abhängige Kinase CPK11, die wenig Ca^{2+} abhängige Kinase CPK24 phosphoryliert. Beide Proteine bilden wahrscheinlich eine Signalkaskade und sind in der Inhibition von K^+ Kanälen und der Regulation des Pollenschlauch Wachstums involviert (Zhao et al., 2013). Alternativ wäre auch denkbar, dass sich CPK23 nach einmalig erfolgter Ca^{2+} Bindung durch Autophosphorylierung selbst reguliert. Für GCA2 wurde eine ganze Reihe an Autophosphorylierungsstellen identifiziert, einige davon befinden sich auch in der inhibierenden *junction* Domäne (Wellmann, 2013). Es wäre denkbar, dass eine Phosphorylierung an diesen Stellen notwendig ist, um CPK23 in seine aktive Form zu überführen, beziehungsweise in dieser zu halten (Abb. 4.9). So wäre es denkbar, dass es für CPK23 ähnlich der humanen CamKII unterschiedliche Aktivitätsstufen gibt (Schulman et al., 1992), und das eine einmal durch Autophosphorylierung voll aktivierte Kinase auch ohne Ca^{2+} in einem teilweise aktiven Zustand verbleibt.

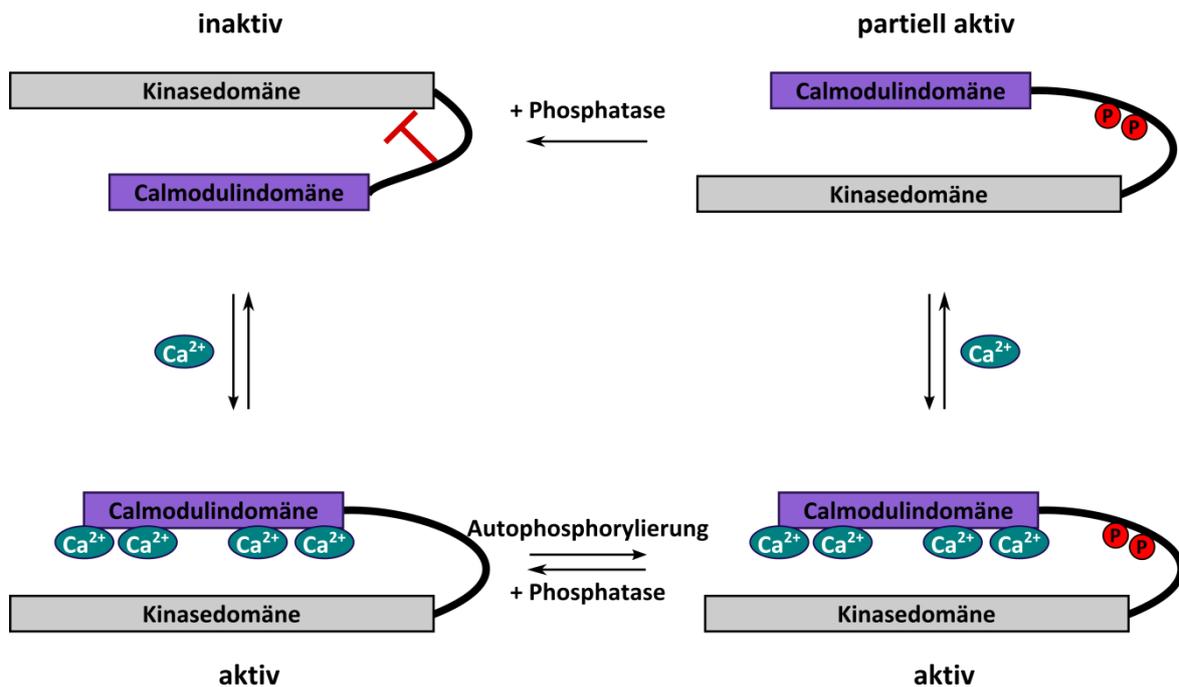


Abbildung 4.9 Mögliches Modell der Aktivierung von CPK23 durch Ca^{2+} und Autophosphorylierung
 Im inaktiven Zustand inhibiert die *junction* Domäne durch einen Pseudosubstratmechanismus die Kinasedomäne. Durch Bindung von Ca^{2+} an die Calmodulindomäne kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung von CPK23 und die Kinase wird aktiv und phosphoryliert sich im Bereich der *junction* Domäne selbst. Diese Phosphorylierungen könnten die Kinase auch in der Abwesenheit von Ca^{2+} in einer aktiven Konformation halten. Durch die Wirkung von Phosphatasen könnte die Kinase wieder in den inaktiven Zustand zurückversetzt werden. Das Modell wurde ableitet von dem publizierten Mechanismus der humanen CamKII (Schulman et al., 1992).

Dafür müsste freilich die Ca^{2+} Konzentration in der Zelle zumindest kurzzeitig ausreichend ansteigen um CPK23 zu aktivieren. Für eine Aktivierung von CPK23 *in vitro* waren zumindest hohe nanomolare Konzentrationen nötig (Geiger et al., 2010), die deutlich über den normalen Konzentrationen (< 100 nM) im Cytoplasma während des Ruhezustand liegen. Anzumerken gibt es dabei allerdings, dass die meisten *in vitro* Methoden mit rekombinant in *E. coli* gereinigtem Protein und artifiziellen Substraten, wie Syntide2 oder Casein, durchgeführt wurden. Dabei wurde gezeigt, dass die Wahl des Substrats die Ca^{2+} Abhängigkeit deutlich verändern kann (Boudsocq et al., 2012). Deswegen könnte CPK23 bei Verwendung der passenden endogenen Substrate weit niedrigere Ca^{2+} Konzentrationen für eine deutliche Aktivierung benötigen. Selbst wenn die gemessenen Werte der Realität *in vivo* entsprechen, ist es denkbar, dass die Ca^{2+} Konzentrationen lokal und temporär ausreichend sind. CPK23 befindet sich an der Plasmamembran, wahrscheinlich ähnlich wie CPK21 lokal konzentriert in sogenannten Nanodomänen mit anderen Proteinen (Demir et al., 2013). Über die Plasmamembran strömt Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum ins Cytosol ein. Dabei dürften temporal und lokal begrenzt Konzentrationen bis in den micro-molaren Bereich zu Stande kommen (Brandman und Meyer, 2008), und damit ausreichend für eine Aktivierung von CPK23.

Schlussendlich kommt ein letztes Argument für eine relevante *in vivo* Ca^{2+} Regulation aus dem CPK23 Sequenz Vergleich der verschiedenen Arabidopsis Ökotypen. Während sich im N-Terminus und der Kinase-Domäne eine Vielzahl an AS Substitutionen finden, die weit über dem liegen was statistisch zu erwarten wäre, ist die Calmodulin Domäne erstaunlich gut konserviert (Abb. 3.12). Beim Vergleich der sehr diversen Ökotypen Col-0, Ler-0, Bur-0 und Tsu-1 fand sich gerade einmal eine einzige variable Aminosäure an Position 442, bei der es sich entweder um ein Glutamin oder Histidin handelt. Diese außerordentlich niedrige Mutationsrate könnte Folge einer Selektion gegen Mutationen in dieser Domäne sein, eines *selective sweep*, und legt nahe, dass die Calmodulin Domäne für die Funktion und *in vivo* Ca^{2+} Regulation der Kinase wichtig ist, da man ansonsten eine höhere Anzahl an Mutationen auch in dieser Domäne erwarten würde.

Alles in allem sprechen einige Argumente dafür, dass CPK23 das Potenzial hat Schwankungen zellulärer Ca^{2+} Konzentrationen in konkrete zelluläre Antworten zu übersetzen. Geht man allein auf Basis der gemessenen *in vitro* Affinitäten davon aus, dass CPK23 nicht Ca^{2+} reguliert ist, wäre in der Konsequenz wahrscheinlich die Mehrheit der CPK Genfamilie nicht Ca^{2+} reguliert, da etliche Mitglieder eine ähnliche oder schwächere Ca^{2+} Abhängigkeit *in vitro* als CPK23 zeigen (Boudsocq et al., 2012).

4.3. Funktionelle Redundanz zu CPK23

CPK23 erwies sich im transienten Reporterassay als sehr starker positiver Regulator der ABA abhängigen Genexpression und übertraf die Effekte der beiden Kinasen CPK4 und CPK11 deutlich (Abb. 3.7). Bei der physiologischen Analyse einer T-DNA KO Linie (Abb. 3.1) konnten hingegen keine wesentlichen Phänotypen festgestellt werden, einzig im Keimungsverhalten zeigte die Linie *cpk23* ein leicht hypersensitives Verhalten gegenüber ABA (Abb. 3.3). Diese Beobachtung steht nicht nur im Widerspruch zu der postulierten Rolle von CPK23 als positivem Regulator der ABA Signaltransduktion, der gemessene Effekt ist auch sehr gering verglichen mit den Keimungsphänotypen anderer ABA hypersensitiver Mutanten, wie zum Beispiel PP2C KO Mutanten (Rubio et al., 2009). Soweit CPK23 eine Funktion in der ABA Signaltransduktion hat, muss wohl davon ausgegangen werden, dass das weitgehende Ausbleiben sichtbarer Phänotypen auf funktionelle Redundanz zurückzuführen ist. Alle Kernkomponenten der ABA Signaltransduktion werden von Proteinfamilien gebildet, deren Mitglieder teilweise redundante Funktionen besitzen. Dies wurde durch die Analyse von Doppel- und Mehrfach KO Mutanten sowohl für RCARs (Park et al., 2009; Fuchs et al., 2014), PP2Cs (Rubio et al., 2009) als auch SnRK2 Kinasen (Fujii und Zhu, 2009) und bZip TFs gezeigt (Yoshida et al., 2010). Der KO einzelner Mitglieder dieser Familien führt nur im Einzelfall zu starken Phänotypen, wie beispielsweise bei der SnRK2 Kinase OST1, die für die Regulation der Schließzellen unerlässlich ist (Mustilli et al., 2002). Doppel- und Mehrfach KO Pflanzen zeigen aber in der Regel wesentlich gravierendere Phänotypen.

Auf der Suche nach Proteinen mit redundanter Funktion zu CPK23, ist der nahe liegende und beste Kandidat CPK21. Zum einen da für CPK21 und CPK23 bereits eine redundante Funktionen in der Aktivierung der Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 gezeigt wurde (Geiger et al., 2010; Geiger et al., 2011), zudem ist CPK21 mit 81,9% Aminosäureidentität die CPK mit der höchsten Übereinstimmung zu CPK23. Allerdings zeigte CPK21 keinen nennenswerten Effekt auf die RD29B Expression im transienten Protoplasten Reportersystem (Abb. 3.7). Die Analyse transgener Doppel KO Linien war zudem nicht möglich, da sich CPK21 und CPK23 ungünstigerweise in unmittelbarer Nähe auf Chromosom IV (Abb. 3.2) befinden. In dieser Arbeit konnten mittels amiRNA Pflanzen mit deutlich reduzierter Expression beider CPKs, hergestellt werden (Abb. 3.11), deren zukünftige Analyse Aufschluss darüber geben könnte, ob die beiden Proteine auch in der Regulation der Genexpression redundante Funktion besitzen. Ausgehend von der Sequenzähnlichkeit ist der nächst beste Kandidat CPK15, deren Übereinstimmung mit CPK23 auf Aminosäure Basis 74,9% entspricht. Allerdings konnten in dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Beteiligung von CPK15 in der ABA Signaltransduktion gefunden werden und auch die mittels Kreuzung erstellte Linie *cpk15cpk23* lieferte keinen Hinweis auf redundante Funktionen zwischen diesen beiden CPKs.

CPK23 und CPK21 befinden sich nicht nur in unmittelbarer Nähe auf Chromosom IV, sie bilden mit CPK22, CPK27 und CPK31 einen Gencluster (Abb. 4.10). Alle 5 Gene befinden sich in unmittelbarer Nähe in selber Orientierung und besitzen hohe AS Sequenzidentität (zu CPK23: CPK22 – 64,2%, CPK27 – 62,1%, CPK31 – 62,5%), weshalb gemutmaßt werden kann, dass diese womöglich durch mehrfache Genduplikation entstanden sind (Cheng et al., 2002). Weder für CPK22, noch für CPK27 oder CPK31 sind Funktionen in biologischen Prozessen beschrieben worden. Durch ihrer Lage und die verhältnismäßig hohe Übereinstimmung zu CPK23 (nach CPK21 und CPK15 sind diese drei CPKs die am engsten verwandten Homologen) bieten sie sich als Kandidaten für eine weitere Analyse an. Da KO Allele dieser Gene allerdings ebenfalls stark gekoppelt mit CPK23 vererbt werden, müssten dafür gerichtete Gen-KO Ansätze in Betracht gezogen werden. Dafür anbieten würden sich TALEN oder CRISPR, mit denen nicht nur einzelne Gene sondern auch ganze Gencluster deletiert werden können (Xiao et al., 2013).

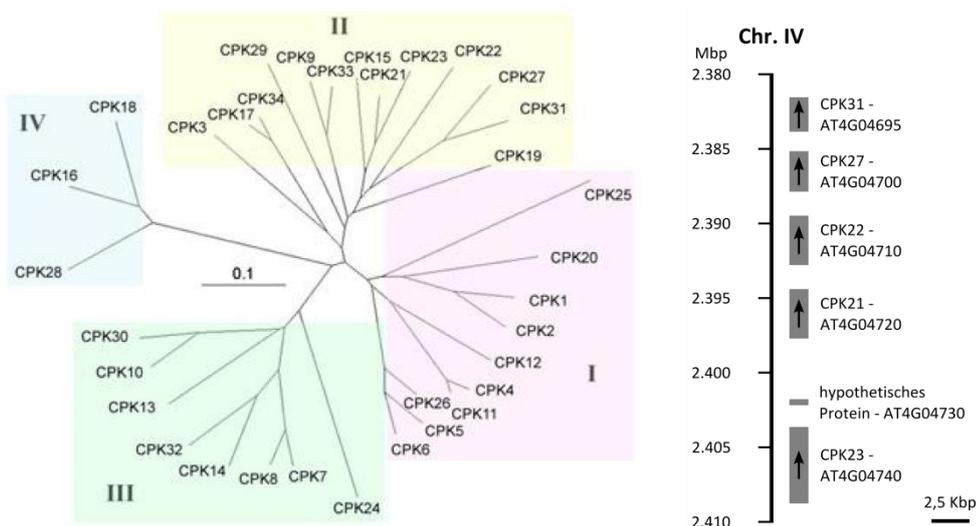


Abbildung 4.10 CPK Proteinfamilie und Gencluster auf Chr. IV

Die CPK23 Genfamilie besteht aus 34 Mitgliedern und unterteilt sich basierend auf Sequenzähnlichkeit in 4 Untergruppen. Auf Chromosom IV befinden sich 5 Mitglieder von Untergruppe II (CPK23, CPK21, CPK22, CPK27 und CPK31) in unmittelbarer Nähe in einem Gencluster. Alle CPKs befinden sich in selber Orientierung, besitzen hohe Sequenzidentität und sind wahrscheinlich durch Genduplikationen entstanden. Phylogenetischer Stammbaum aus (Cheng et al., 2002).

Sequenzidentität kann ein Hinweis auf redundante Funktion sein. So besitzen zum Beispiel CPK4 und CPK11, die eine redundante Funktion in der Regulation von ABF4 zu haben scheinen (Zhu et al., 2007), eine Übereinstimmung auf AS Ebene von 95%. Auch CPK17 und CPK34, beide beteiligt an der Regulation des polaren Wachstums von Pollenschläuchen (Myers et al., 2009), haben eine sehr hohe AS Identität (93%). Auf der anderen Seite ist Sequenzübereinstimmung offensichtlich keine Voraussetzung für die Beteiligung einzelner CPKs an gleichen Signalwegen. So wurde zum Beispiel

gezeigt, dass verschiedene CPKs die denselben bZip TF phosphorylieren, eine eher niedrige AS Identität haben und sich in unterschiedlichen Untergruppen befinden. Während CPK23 zu Untergruppe II gehört, fallen CPK4 und CPK11 in Gruppe I und CPK32 gehört Gruppe III an. Insofern könnte auch die Kombination von KO Allelen dieser CPKs aufschlussreich sein.

Erweitert man die Suche nach redundanten Proteinen über die Familie der CPKs hinaus, sind insbesondere SnRK2 Kinasen, allen voran OST1, Kandidaten mit potenziell redundanter Funktion. Sie bilden zusammen mit CPKs eine Kinase Superfamilie (Hrabak et al., 2003). OST1 und CPK23 scheinen sowohl in der Regulation von Anionenkanälen als auch bZip TFs sehr ähnliche Funktion zu besitzen, es gibt jedoch auch ein paar Unterschiede. Sowohl OST1 als auch CPK23 aktivieren den Anionenkanal SLAC1, allerdings scheinen die Kinasen dabei andere AS Reste zu modifizieren (Geiger et al., 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Kinasen bZip TFs aktivieren und beide eine Präferenz für ABF2 und ABF4 haben. Deutliche Unterschiede waren in der Regulation des TFs ABI5 zu sehen (Abb. 3.23). Für OST1 und eine Reihe weiterer SnRK2s konnte gezeigt werden, dass sie ABF2 an verschiedenen R-X-X-S/T Aminosäure Motiven phosphorylieren (Furihata et al., 2006), einem Motiv das auch bereits als CPK Phosphorylierungsstelle identifiziert wurde (Klimecka und Muszynska, 2007). In der Tat phosphoryliert CPK23 auch ABF1-4 und ABI5 *in vitro* (Pleißner, unveröffentlicht).

Vergleicht man die beiden Kinasen, stellt sich die Frage, ob es sich dabei um zwei weitgehend redundante, synergistisch wirkende Kinasen in der ABA Signaltransduktion handelt, oder eher um zwei sehr ähnliche, aber zum Teil gegenläufige Regulatoren. Wenn letzteres der Fall ist, wie wird dann Spezifität sichergestellt? In der MAP-Kinase Signaltransduktion in Hefe wird dieses Problem über drei unterschiedliche Verfahren gelöst: Feedback Kontrolle, gegenseitige Inhibierung und mit Hilfe von *scaffold* Proteinen durch Bildung verschiedener Proteinkomplexe (Chen und Thorner, 2007). Zum Beispiel führt die MAP Kinase HOG1, involviert in der Reaktion auf osmotischen Stress, durch Phosphorylierung des Membran gebundenen Rezeptors SHO1 zu einem negativen Feedback durch Inaktivierung des Rezeptors. SHO1 ist auch involviert in der Signalkaskade an der die MAP-Kinase KSS1 beteiligt ist, und in deren Folge es durch Nährstoffmangel zu filamentösem Wachstum kommt (Zou et al., 2008). In der ABA Signaltransduktion könnte CPK23 zum Beispiel über die Phosphorylierung von PP2Cs zu einem positiven oder negativen Feedback beitragen. Eine andere Möglichkeit um Spezifität sicherzustellen, ist die direkte Inhibierung anderer Signalwege. So führt zum Beispiel die MAP-Kinase FUS3 durch Phosphorylierung des TF TEC1 zu dessen Abbau. TEC1 ist eigentlich beteiligt in der Signaltransduktion als Reaktion auf osmotischen Stress und unterliegt dort der Kontrolle durch die MAPK HOG1 (Bao et al., 2004). Gleichzeitig führt FUS3 auch über einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Inaktivierung der MAPK KSS1 (Sabbagh, JR et al., 2001). FUS3 ist in erster Linie für die Aktivierung des Signalweges wichtig, der zum *mating* führt und inaktiviert

gleichzeitig andere Signalwege. Wie in dieser Arbeit gezeigt und bereits diskutiert wurde, gibt es deutliche Hinweise auf eine gegenseitige Regulation zwischen OST1 und CPK23. Überträgt man die Erkenntnisse durch die Untersuchung von MAP-Kinase Wegen in Hefe auf die ABA Signaltransduktion, so wäre es denkbar, dass durch gegenseitig Phosphorylierung oder Modifikation von untergeordneten Komponenten, zum Beispiel ABI5, die Spezifität des Signal-Outputs erreicht wird.

4.4. Genetische Variabilität am CPK23 Locus

Natürliche Variabilität findet sich zwischen den verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen in einer Vielzahl unterschiedlicher Merkmale. Neben ihrem äußeren Erscheinungsbild unterscheiden sie sich vor allem in ihrer Resistenz gegenüber Pathogenen und ihrer Toleranz gegenüber abiotischem Stress (Koornneef et al., 2004; Lefebvre et al., 2009). Dabei ist es durchaus denkbar, dass die beobachteten Unterschiede Anpassungen an bestimmte Lebensräume und Umgebungen reflektieren. Grundlage dieser phänotypischen Variabilität sind zum Teil recht gravierende Veränderungen auf genetischer Ebene zwischen den verschiedenen Ökotypen. Insbesondere bei Genen, die für Wechselwirkungen mit der Umwelt relevant sind, wurde durch die Analyse der Genomsequenzen verschiedener Ökotypen ein sehr hohes Maß an genetischer Variabilität gefunden (Clark et al., 2007).

Die Analyse natürlicher Variabilität innerhalb der Spezies *Arabidopsis* stellt neben der Analyse von künstlich erzeugten Mutanten eine Möglichkeit dar, Gene zu identifizieren, die für die Ausprägung relevanter Merkmale verantwortlich sind. Dies erfordert zunächst die phänotypische Identifizierung von Unterschieden bei interessanten Merkmalen. Als nächstes müssen die genetischen Grundlagen bestimmt werden, die für die beobachtete Variabilität verantwortlich sind und abschließend die molekularen Mechanismen dieser genetischen Variabilität aufgeklärt werden. Mittels QTL- (*quantitative trait locus*) Mapping können die genetischen Grundlagen beobachteter Variabilität bestimmt werden. Dabei macht man sich insbesondere eine wachsende Anzahl an *Arabidopsis recombinant inbred lines* (RIL) zu Nutze (<http://arabidopsis.info/>), Kreuzungen zwischen *Arabidopsis* Ökotypen, die für jeden Abschnitt des Genoms homozygot für einen der beiden Ausgangstypen sind. Da viele Merkmale von einer ganzen Reihe an Genen beeinflusst werden, ist das Resultat eines QTL-Mappings in der Regel auch die Identifizierung einer ganzen Reihe längerer chromosomaler Abschnitte (QTL) mit unterschiedlich starkem Einfluss auf das untersuchte Merkmal. Keimung ist zum Beispiel ein komplexer Prozess, der von etlichen Genen anscheinend weitgehend unabhängig voneinander beeinflusst wird. So wurden bisher 11 DOG (delay of germination) QTL bestimmt, die die Samenruhe beeinflussen (Bentsink et al., 2010). Einzelne Merkmale können aber auch von wenigen QTL mit starken Effekten bestimmt werden, wie am Beispiel der QTL für die Kontrolle der Blütezeit gezeigt wurde, bei denen es sich um die beiden QTL Gene FLC und FRI handelt (Strange et al., 2011; Deng et al., 2011).

Verschiedene *Arabidopsis* Ökotypen unterschieden sich auch deutlich in ihrer Resistenz gegenüber Trocken- und Salzstress (Quesada et al., 2002; Granier et al., 2006). Dabei erfüllt CPK23 zwei wichtige Bedingungen für einen möglichen QTL. Zum einen ist CPK23, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ein

Regulator der ABA Signaltransduktion, die zur Anpassung an Trocken- und Salzstress führt. Zum anderen findet sich am CPK23 Locus ein hohes Maß an genetischer Variabilität, verbunden mit einem funktionellen Unterschied in der *in vivo* Aktivität des Proteins. In dieser Arbeit wurden die drei sehr variablen Ökotypen Ler-0, Bur-0 und Tsu-1 mit Col-0 verglichen (s. Kapitel 3.3). Wie bereits zuvor erwähnt, besitzt CPK23 ein deutlich höheres Maß an Sequenzvariabilität als andere CPKs, beispielsweise CPK15 oder CPK21. Dabei überwiegt die Anzahl der nicht synonymen (K_a) im Vergleich zu synonymen SNPs (K_s) leicht. Bei 92 gefundenen SNPs zwischen den vier Ökotypen kommt es zu einem Austausch von 47 AS. Ein Verhältnis von nicht synonymen zu synonymen SNPs von >1 spricht dabei für eine beschleunigte evolutionäre Anpassung (Clark et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls damit begonnen, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die für die Aktivitätsunterschiede der verschiedenen CPK23 Allele verantwortlich sind. Offen bleibt die Frage, ob der CPK23 Locus auch die ABA Sensitivität der gesamten Pflanze und Unterschiede in der ABA Sensitivität verschiedener Ökotypen bestimmen kann. Ein Hinweis darauf kommt aus der Kreuzung der Ökotypen Ler-0 und Col-0 und der Analyse der F₂ Population (Korte, 2009). Der Ökotyp Ler-0 verhält sich deutlich sensibler als Col-0 in der Inhibition des Wurzelwachstums durch ABA. Keimlinge in der F₂ Population zeigten einen ABA sensiblen (wie Ler-0), insensiblen (wie Col-0) oder intermediären Phänotyp. Interessanterweise konnte dabei eine statistisch signifikante Kopplung des CPK23 Locus mit der ABA Sensitivität in der F₂ Generation festgestellt werden. Dies legt nahe, dass CPK23 zumindest mit einem QTL gekoppelt ist, der die ABA Sensitivität beeinflusst. In einem QTL-Mapping einer Ler-0 x Col-4 RIL Population auf Keimung unter Salzstress wurde zudem ein QTL mit geringerem Effekt auf Chromosom IV in der Nähe von CPK23 gefunden (Quesada et al., 2002). Salzstress und ABA-Sensitivität können allerdings nicht einfach gleich gesetzt werden, zudem scheint die Adaption auf Salzstress auch von einer ganzen Reihe unterschiedlicher genetischer Faktoren beeinflusst zu werden. So konnten durch die Analyse von Sha x Ler-0 und Sha x Col-0 RIL Linien 22 QTL, die Keimung unter Salzstress beeinflussen, mit zum Teil starken epistatischen Effekten bestimmt werden (Galpaz und Reymond, 2010). Die überwiegende Mehrheit ermittelter QTL wurde bisher allerdings nicht kloniert. Eine Ausnahme bildet RAS1, ein QTL auf Chromosom I, der die ABA und Salzsensitivität zwischen den Ökotypen Ler-0 und Sha beeinflusst und bei dem es durch ein frühzeitiges Stop-Codon zu einem verkürzten Protein in Sha kommt (Ren et al., 2010).

Die geringe Anzahl klonierter QTL hängt mit der begrenzten Genauigkeit zusammen, mit der QTL durch die Analyse von RIL Linien bestimmt werden können. QTL sind zumeist größere chromosomale Abschnitte, die mehrere hundert ORFs beinhalten können. Um den entscheidenden genetischen Polymorphismus zu bestimmen ist eine Feinkartierung notwendig, entsprechend der Klonierung chemisch induzierter Mutationen. NIL (*near isogenic lines*) bieten sich zur Bestätigung des QTL und

für die Rückkreuzung zur Feinkartierung an (El-Din El-Assal et al., 2001; Bentsink et al., 2003). Diese Linien entsprechen beinahe komplett einem der beiden entsprechenden Wildtypen und sind nur für einen kleinen Bereich homozygot für den anderen. Die Verifizierung eines Kandidaten QTL Gens sollte anschließend durch Komplementation erfolgen. Dies kann zum Beispiel, wie für RAS1 gezeigt, mittels amiRNAs und quantitativem *knock-down* geschehen (Ren et al., 2010) oder durch Transgene Komplementation, den Transfer eines Alleles von einem Ausgangs Ökotyp in den anderen. Auf diese Art wurden verschiedene QTL Gene experimentell bestätigt, zum Beispiel der Photorezeptor PHYB zwischen den Ökotypen Ler-0 und Cvi-0 (Filiault et al., 2008) oder das Adenosine 5'-phosphosulfat-reductase Gen APR2, das am Sulfat Assimilationsweg beteiligt ist und verantwortlich ist für einen quantitativen Unterschied zwischen den Ökotypen Bay-0 und Sha (Loudet et al., 2007). Ein Problem bei diesem Ansatz sind allerdings Effekte die rein durch die Position des eingebrachten Transgens hervorgerufen werden, wodurch eine Verifizierung von QTL Genen mit geringem Effekt erschwert werden kann. Dies wird deutlich durch eine Arbeit, welche die Nachteile der RPM1 vermittelten Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* auf Samen- und Biomasseproduktion der Pflanze untersuchte und bei der im Vergleich der einzelnen transgenen Linien, deutliche Unterschiede bei diesen Parametern gemessen wurden (Tian et al., 2003).

Es ist durchaus denkbar, dass die vielfältigen Polymorphismen in der codierenden Sequenz des CPK23 Proteins und der beobachtete Funktionsunterschied *in vivo* zu einer veränderten ABA Sensitivität der Pflanze beitragen. Um dies experimentell zu bestätigen, wäre es sinnvoll eine transgene Komplementation zu versuchen. Alternativ könnte es auch interessant sein, zu untersuchen, ob in einer größeren Stichprobe an Arabidopsis Ökotypen eine Korrelation zwischen der *in vivo* Aktivität im Protoplasten Assay und der ABA Sensitivität der Pflanzen in physiologischen Assays besteht. Eine Korrelation zwischen Enzymaktivität und Phänotyp konnte zum Beispiel für einen QTL zwischen den Ökotypen Bay-0 und Sha im ATPS1 Gen gezeigt werden, das auch am Sulfat Assimilationsweg beteiligt ist (Koprivova et al., 2013). Für den QTL verantwortlich sind in diesem Fall allerdings keine codierenden Veränderungen, sondern regulatorische Unterschiede in nicht codierenden Bereichen des ATPS1 Gens. Dabei ist die Expression von ATPS1 in Bay-0 geringer als in Sha, damit korreliert sowohl die gemessenen Enzymaktivität *in vivo* als auch die Sulfat Konzentration. Im CPK23 Gen finden sich neben etlichen Polymorphismen in der codierenden Sequenz auch gravierende Unterschiede in der Promotor Sequenz zwischen den Ökotypen Ler-0 und Col-0 (Abb. 4.11 A). Dabei scheint es zu einer größeren Deletion und Insertion gekommen zu sein. Diese gravierenden Änderungen könnten leicht zu einer differentiellen Expression des CPK23 Gens führen, die ebenfalls das Potenzial haben könnte, zur natürlichen Variabilität der ABA Sensitivität beizutragen.

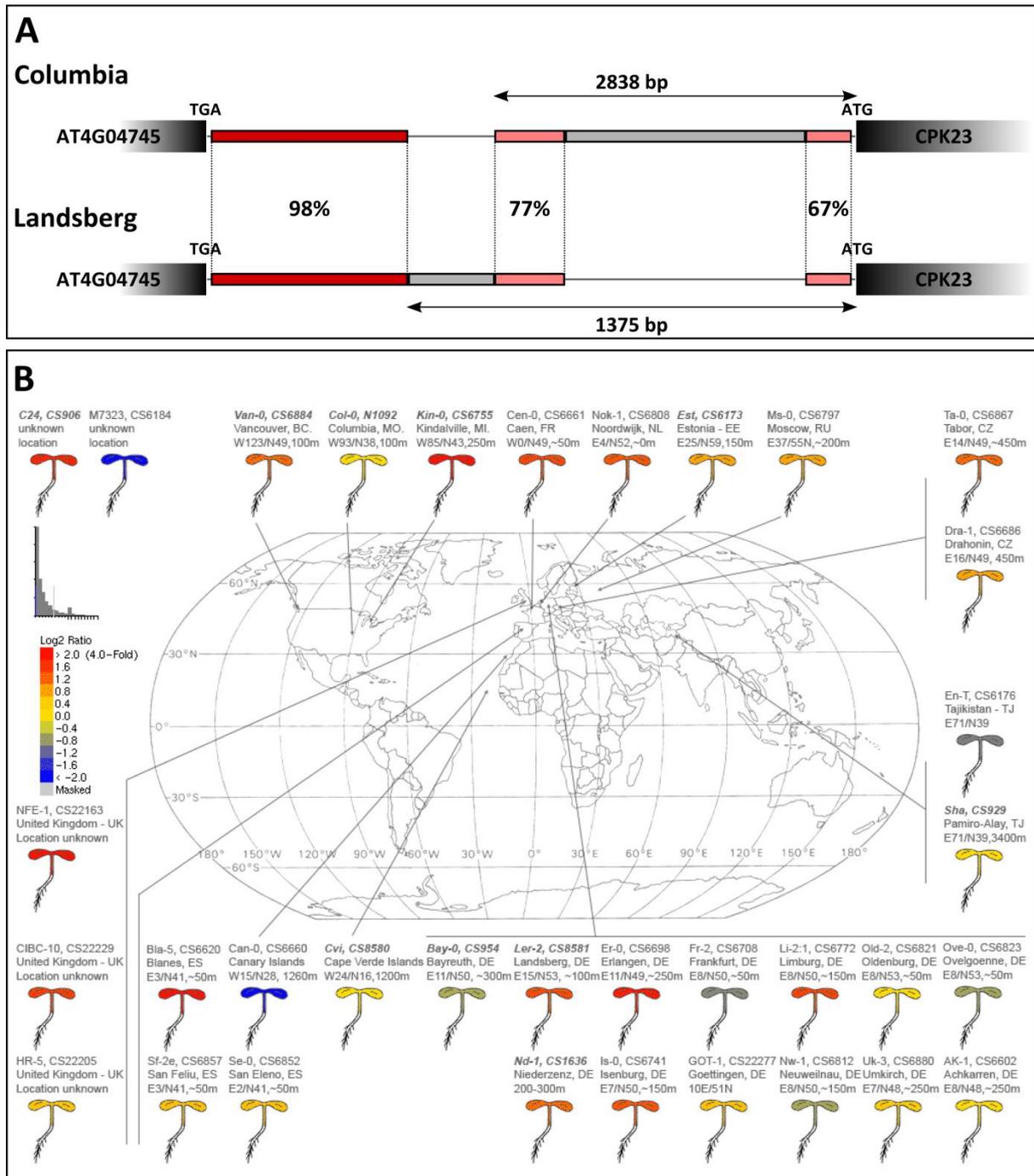


Abbildung 4.11 CPK23 Promotorvergleich zwischen Ler-0 und Col-0 sowie Ökotyp-Expressionsunterschiede

Vergleich der CPK23 Promotorstruktur zwischen den Ökotypen Col-0 und Ler-0 (A). Abgebildet ist der Bereich zwischen CPK23 und dem vorausgehenden Gen AT4G04745. Durch eine Deletion und Insertion ist es zum Austausch größerer Bereiche gekommen, die im anderen Ökotyp nicht vorhanden sind (graue Bereiche). Auch in seiner Länge unterscheidet sich der Abschnitt in den beiden Ökotypen deutlich. Stark konservierte Bereiche finden sich in erster Linie in der Nähe des *upstream* gelegenen Gens AT4G04745 (dunkelroter Bereich mit 98% Übereinstimmung). In Richtung des CPK23 Gens gibt es zwei kürzere Bereiche mit einigen Ähnlichkeiten (hellroter Bereich). Die Expressionsstärke des CPK23 Gens (B) variiert in verschiedenen Arabidopsis Ökotypen. Die abgebildeten Daten stammen aus dem eFP Browser (Winter et al., 2007), dabei wurden die

Voreinstellungen des Browsers verwendet und die CPK23 Expressionsstärke in Relation gesetzt zu dem Referenzgen AT3G27340.

Vergleicht man die vorhandenen Expressionsdaten des Arabidopsis eFP Browsers (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) für CPK23, findet man deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Ökotypen (Abb. 4.11 B). Dabei hat der Ökotyp Ler-2 eine etwa 2,7 fach höhere Expression als Col-0. Allerdings gibt dieser Datensatz nur die Expression unter Kontrollbedingungen wieder und ist nicht assoziiert mit abiotischem Stress oder ABA Applikation. Unter diesen Bedingungen könnten die Expressionsunterschiede noch wesentlich gravierender sein. So führte ABA Applikation in Ler-0 zu einer deutlichen Reduktion der CPK23 Expression (Korte, 2009) während in den Daten des eFP Browser kein entsprechender Effekt für Col-0 zu finden ist. Insofern könnte es auch sehr informativ sein, die Expressionsrate des CPK23 Gens auf eine Korrelation mit der ABA Sensitivität in verschiedenen Ökotypen zu untersuchen.

4.5. Grundlagen der funktionellen Variabilität von CPK23

Der CPK23 Locus zeigt in verschiedenen Arabidopsis Ökotypen ein hohes Maß an Diversität und auch die Proteine zeigen *in vivo* unterschiedliche Aktivität. Aber warum ist das so und welche Aminosäureveränderungen sind dafür ursächlich? Generell wäre denkbar, dass durch einzelne AS Substitutionen zum Beispiel ATP oder Mg^{2+} Bindung der Kinasen beeinflusst sind und damit ihre katalytische Aktivität grundsätzlich eingeschränkt ist. Vergleicht man die beiden Proteine aus Ler-0 und Col-0 allerdings *in vitro*, ergeben sich dabei keine nennenswerten Unterschiede (Pleißner, unveröffentlicht). Daher sollte man annehmen, dass die Kinasen entweder unterschiedliche Interaktionspartner aufweisen, manche Interaktionen könnten zum Beispiel nur in einzelnen Ökotypen vorkommen, oder mit den gleichen Proteinen interagieren, aber differenziell reguliert werden.

In dieser Arbeit wurde versucht die entscheidenden Veränderungen in der Aminosäuresequenz des CPK23 Proteins zu identifizieren, die für den beobachteten, funktionellen Unterschied verantwortlich sind. Dafür wurden die Proteine aus den beiden Ökotypen Col-0 und Bur-0, die beide vergleichbare, induzierende Aktivität *in vivo* zeigten, mit GCA2 aus Ler-0 verglichen, das einen gegensätzlichen, leicht reprimierenden Effekt hatte (Abb. 3.13). Vielversprechend schien in diesem Zusammenhang vor allem die Analyse des N-Terminus, der zwischen den Ökotypen Ler-0 und Col-0 die größten Abweichungen zeigt. Die AS Sequenz Identität beträgt in diesem Bereich nur 68,8% und beinhaltet eine acht beziehungsweise neun AS lange Deletion/ Insertion. Der N-Terminus ist grundsätzlich innerhalb der CPK Proteinfamilie der am wenigsten konservierte Bereich. Es wird angenommen, dass er wichtig für Interaktionen mit anderen Proteinen und die Substratspezifität von CPKs ist (Harper et al., 2004). So konnte für CPK1 aus *Nicotiana tabacum* durch einen *domain-swap* mit CPK9 aus Arabidopsis gezeigt werden, dass der N-Terminus für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RSG und die *in vivo* Funktion von NtCPK1 notwendig ist (Ito et al., 2010). Entsprechend zu dieser Arbeit wurden die N-Termini zwischen CPK23 aus Col-0 und GCA2 ausgetauscht, allerdings hatte dies keinen Effekt auf die *in vivo* Aktivität der beiden Proteine (Abb. 3.16). Man könnte daher meinen, dass die Unterschiede im N-Terminus nicht relevant für die Aktivität von CPK23 sind. Allerdings konnte mit Tyrosin 44 in GCA2 eine Aminosäure in diesem Bereich identifiziert werden, die maßgeblichen Einfluss auf die *in vivo* Aktivität hat. Tyrosin 44 wurde als putative Tyrosin Autophosphorylierungsstelle identifiziert, da für CPK4 und CPK34 Autophosphorylierung an einem Tyrosin Rest im N-Terminus gezeigt wurde (Oh et al., 2012). Wenngleich kein Hinweis auf eine Auto-Phosphorylierung an dieser Stelle gefunden werden konnte, hatte die Mutationen sowohl zu Aspartat als auch zu Phenylalanin eine partielle Aktivierung von GCA2 zu Folge (Abb. 3.17). Da beide Aminosäure-Substitutionen an dieser Stelle den gleichen Effekt hatten, muss davon ausgegangen

werden, dass es sich jeweils um eine *loss-of-function* Mutation handelt. Demnach wäre der Tyrosin-Rest an dieser Stelle für einen Mechanismus notwendig, der zur Inhibition von GCA2 führt. In CPK23 befindet sich an entsprechender Stelle ein Aspartat, eine Mutation zu Tyrosin an dieser Stelle hatte allerdings keinen Effekt (Abb. 3.17). Die unmittelbaren Aminosäuren um Tyrosin 44 (Aspartat 53 in Col-0) sind zwischen den beiden Ökotypen zwar konserviert, allerdings befindet sich der Bereich zwischen der bereits erwähnten 8 AS langen Deletion und der 9 AS langen Insertion im N-Terminus und könnte sich daher leicht in seiner räumlichen Orientierung unterscheiden.

Wenngleich es sich in GCA2 bei Tyrosin 44 wahrscheinlich nicht um eine Autophosphorylierungsstelle wie in CPK4 und CPK34 handelt, könnte diese Stelle Ziel einer Trans-Phosphorylierung sein, wofür allerdings weitere regulierende Tyrosin Kinasen in Arabidopsis identifiziert werden müssten, neben den Rezeptorkinasen BAK1 und BRI1 (Oh et al., 2009). Denkbar wäre auch, dass Tyrosin auf Grund seiner Größe mit seinem aromatischen Ring und der reaktiven -OH Gruppe am C3 Atom des Ringes, Teil eines Interaktionsbereichs an dieser Stelle des N-Terminus ist. Es ist durchaus vorstellbar, dass Tyrosin 44 nicht selbst modifiziert wird, sondern nur die Interaktion oder Modifikation benachbarter Aminosäuren und dadurch die Aktivität von GCA2 beeinflusst. In unmittelbarer Nähe von Tyrosin 44 befindet sich Serin 41 (Abb. 4.10), das als Autophosphorylierungsstelle in GCA2 identifiziert wurde (Wellmann, 2013). Diese Stelle könnte regulatorische Funktion besitzen, da für NtCDPK2 und NtCDPK3 gezeigt wurde, dass beide Kinasen durch Autophosphorylierung und darauffolgende Transphosphorylierung im N-Terminus reguliert werden (Witte et al., 2010). Denkbar wäre auch eine Regulation durch 14-3-3 Proteine, die in der ABA Signaltransduktion bisher nur als Interaktoren von bZip TFs identifiziert wurden (Schoonheim et al., 2007; Sirichandra et al., 2010). Allerdings wurde für CPK1 aus Arabidopsis gezeigt, dass die Aktivität der Kinase über die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen reguliert wird (Camoni et al., 1998). 14-3-3 Proteine binden präferenziell an Phospho-Serin und -Threonin und können Aktivität und Lokalisation von Zielproteinen beeinflussen sowie als *scaffold* Proteine dienen (van Hemert et al., 2001).

Neben Phosphorylierung können Proteine auch über andere Modifikationen posttranslational reguliert werden. Zum Beispiel über Acetylierung, SUMOylierung oder Ubiquitylierung an Lysinen. Acetylierung ist vor allem eine bekannte Modifikation bei Histon-Proteinen, wurde in Arabidopsis aber auch schon für eine ganze Reihe anderer Proteine gezeigt, zum Beispiel für die Ethylen Rezeptor Kinase ETR2 (Finkemeier et al., 2011). Ubiquitylierung und SUMOylierung beeinflussen unmittelbar die Stabilität von Zielproteinen. Die E3-Ubiquitin Ligase KEG modifiziert zum Beispiel ABI5 und markiert den TF damit für den Abbau durch das 26S Proteasom (Stone et al., 2006). Ein weiteres Zielprotein von KEG ist die Ca^{2+} regulierte Kinase CIPK26, die mit den PP2Cs ABI1 und ABI2 interagiert (Lyzenga et al., 2013). Auch SUMOylierung ist Bestandteil der ABA-Signaltransduktion (Lois et al.,

der CAM Domäne und anderen Teilen des Proteins, wahrscheinlich der Kinasedomäne bestimmt wird.

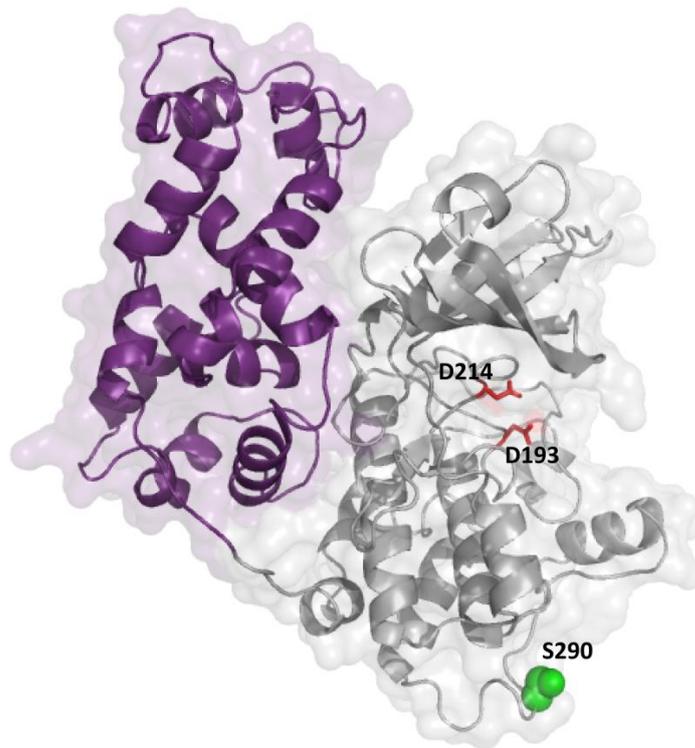


Abbildung 4.13 Strukturmodell von GCA2 und Position von S290

Mit Hilfe von Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>, Biasini et al., 2014) vorausgesagte Struktur von GCA2 im aktiven Zustand basierend auf der Kristallstruktur von CpCDPK3 (PDB:3LIJ). Die Kinasedomäne ist in grau dargestellt, die Calmodulin-Domäne in lila. Die beiden kritischen Aspartat-Reste (193 und 214) im aktiven Zentrum sind durch rote *sticks* markiert. Serin 290 (grüne Kugeln) befindet sich auf der Oberfläche des Proteins, und könnte Teil eines *docking* Motivs der Kinase sein.

Ein relevanter Unterschied in der Kinasedomäne konnte durch den Vergleich der Ler-0 und Bur-0 Proteine bestimmt werden. Arginin 290 in Bur-0 führte bei Mutation zu einem Ler-0 entsprechenden Serin zu einem partiellen Aktivitätsverlust um etwa 50% (Abb. 3.20). Denkbar wäre eine kooperative Wirkung des N-Terminus zusammen mit dieser Stelle in der Kinasedomäne. Basierend auf einem vorausgesagten Modell von GCA2 befindet sich Serin 290 wahrscheinlich exponiert auf der Oberfläche von GCA2, distal des aktiven Zentrums (Abb. 4.13). Anzunehmen wäre eine Funktion in der Substratbindung, eventuell handelt es sich um ein *docking* Motiv. Solche Motive wurden bei einer ganzen Reihe an Kinasen identifiziert, zum Beispiel bei GSK3 und MAP-Kinasen (Biondi und Nebreda, 2003). Verschiedene MAP-Kinasen unterscheiden sich in erster Linie in den Aminosäuren auf ihrer Oberfläche, dabei können bereits kleine Veränderungen die Funktion und Spezifität der Kinasen stark beeinflussen wie für die MAP-Kinasen HOG1 und FUS3 in Hefe gezeigt wurde (Mody et al., 2009). Zwar konnte die Struktur des N-Terminus von GCA2, wie bereits erwähnt, nicht

vorausgesagt werden, es ist allerdings anzunehmen, dass auch der N-Terminus frei zugänglich ist. Somit könnte der N-Terminus zusammen mit dem Bereich um AS 290 die Interaktionen ermöglichen, die zur Regulation von GCA2/CPK23 führen, oder die Bindung von untergeordneten Komponenten vermitteln, durch die CPK23 die ABA Signaltransduktion reguliert.

5. Anhang

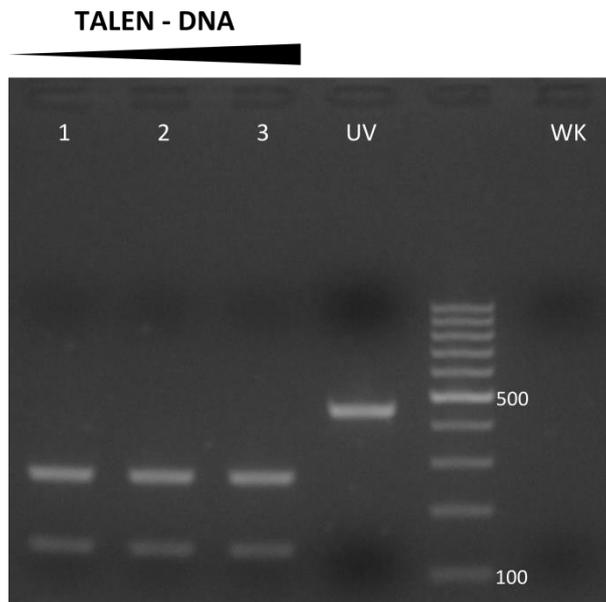


Abbildung 5.1 TALEN Expression in Protoplasten und Verifizierung mittels Restriktionsverdau

Col-0 Protoplasten wurden mit ansteigenden Mengen ($1\mu\text{g}$ (1), $3\mu\text{g}$ (2), $10\mu\text{g}$ (3)) 35S::TALEN DNA transfiziert. Nach 16h Inkubation wurde DNA aus den Protoplasten präpariert und ein genomischer Bereich von CPK21 amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym BsrI verdaut. Dabei erhält man im nicht mutagenisierten Zustand zwei Banden bei 265bp und 163bp. Wurde die Schnittstelle durch die TALEN Aktivität zerstört kann das PCR Produkt nicht verdaut werden. Spur 4 (UV) zeigt die nicht verdaute Kontrolle. WK = Wasserkontrolle, verwendete DNA Ladder = GeneRuler 100bp DNA Ladder von Thermo Fisher.

CPK23 Nukleotidsequenzen

Nukleotidsequenzen von CPK23 aus unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen und aus *Arabidopsis lyrata*. Rot markiert ist die Sequenz des N-Terminus, schwarz die der Kinase Domäne und blau die CAM und Junction Domänen. Sequenzen für Ler-0 stammen aus (Korte, 2009). Die Sequenzen der Ökotypen Bur-0 und Tsu-1 wurden zum Teil in dieser Arbeit sequenziert (N-Terminus und Kinase Domäne) oder stammen aus der Datenbank (CAM Domäne) des 1001 genomes project (<http://signal.salk.edu/atg1001/index.php>). Col-0 Sequenzen stammen von www.arabidopsis.org, die Sequenzen für *A. lyrata* wurden über NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bezogen.

CPK23 Ler-0 (GCA2)

```

ATGGGTTGCTTCAGCAGTAAACACCGGAAAACCTCAAACGACGGCGGCGAAAGAACAATTCCGATCAATCCAC
TCCAAACCCATATCGTTGATCAAGTCCCAACTCCATCGACACCCATCTCAGTTCGATATCCAGAGACAATTTAG
GTAAGGGGAAAGCATTAGGGATTTAGGTAAACCCTTCGAAGACATCAGGAAATTTTACAGCTTGGGGAAAG
AATTAGGTCGAGGTGGTTTAGGGATTACGTATATGTGTAAAGAGATTCGACTGGGAACAATTACGCTTGCAA
ATCGATTCTCAAGAGGAAGCTAATTAGTGAGCAGGGTAGAGAAGATGTGAAGACAGAGATTCAGATAATGCA
GCATTTGTTTGGACAACCAAACGTTGTTGAGATCAAAGGTGCTTATGAGGATAGACAATATATACATTTGGTTA
TGGAGTTGTGTGCTGGTGGTGAGTTGTTTGATAGGATTATAGCTCGGGGTCATTACTCTGAGAGAGCTGCTGC
TGGTATCATTAGGTCTATTGTGAGTGTTGTTTCAGATTTGTCATTTGAAGGGTGTGATTCATCGAGATCTCAAGC
CTGAGAATTTCTTGTCTCGAGTAAGGAGGAGAATGCAATGCTTAAAGTAACCGATTCGGGTTGTCCGCGTTC
ATCGAAGAAGGAAAAGTTTACCAGGATGTGGCTGGGAGTCCTTACTACGTTGCTCCTGAAGTATTAAGGCGAA
GTTACGGAAAAGAAATCGACATTTGGAGTGCAGGTGTTATTTTATACATCCTACTCTGCGGTGTACCTCCTTTT
GGGCCGACAATGAGATAGGAATATTCGATGAGATTCTAAAATGCGAAATTGATTTTGAAAGCCAACCATGGCC
TTCTATATCTGAAAGCGCGAAAGATCTTGTTAAGAAGATGCTAACCGAAGACCCTAAGAGACGAATCACTGCT
GAACAGGTTCTTGAACATCCTTGATCAAAGGGGGAGAAGCACCGGACAAGCCTATTGATAGCACTGTGTTAT
CACGTATGAAGCAATTCCGAGCAATGAACAAGCTTAAGAAGCTAGCCCTAAAGGTTAGCGCGGTGAGTCTATC
CGAAGAAGAGATCAAAGGTCTTAAAACCTTGTTGCGAATATGGATACCAATAGAAGCGGGACAATCACTTAT
GAACAACCTCCAAACTGGGCTAAGTAGACTTAGATCTAGACTCTCTGAAACTGAAGTTCAGCAACTCGTTGAAG
CGTCTGATGTGGATGGTAATGGAACAATTGACTACTATGAGTTTATCTCTGCGACAATGCATAGATACAAATTA
CATCAAGATGAGCACGTACACAAAGCATTCCAACACTTAGATAAAGACAAAAATGGGCACATAACTAGGGATG
AGTTGGAAAGTGCCATGAAGGAATATGGAATGGGAGATGAAGCTAGCATCAAAGAAGTTATATCCGAAGTTG
ACACCGACAATGATGGAAAAATAAACTTTGAGGAATTCGTGCGATGATGAGATGTGGCACCACACAACCAAA
AGGGAAACAGTATCCATTCCACTGA

```

CPK23 Col-0

ATGGGTTGTTTCAGCAGTAAACACCGGAAAACCTCAAACGACGGCGGCGGAGAAAGATCAATTCCGATAATTC
CAGTTCAAACCCATATCGTTGATCAAGTCCCCGATCATCGTAAACCTCAAATCCCATCACCATCGATACCCATCT
CAGTTTCGAGATCCAGAGACGATTTTAGGTAACCATTCTGAAGACATCAGGAAATTTACAGCTTGGGGAGAGA
ATTAGGTCGAGGTGGTTTAGGGATTACGTATATGTGCAAAGAGATTGGGACTGGGAACATTTATGCTTGCAA
TCGATTCTCAAGAGGAAGCTAATTAGTGAGCTGGGTAGAGAAGATGTGAAGACAGAGATTGAGATCATGCAG
CATTTGTCTGGACAACCAAACGTTGTTGAGATCAAAGGTTCTTATGAAGACAGACATTCTGTACATTTGGTAAT
GGAATTATGTGCCGGTGGAGAGTTGTTTGATAGGATTATAGCTCAAGGTCATTACTIONCTGAGAGAGCTGCTGCT
GGTACCATTAAGTCAATTGTGGATGTTGTTTCAGATTTGTCATTTGAATGGTGTGATTTCAGATCTCAAGCC
TGAGAATTTCTTGTCTCGAGTAAGGAGGAGAATGCAATGCTTAAAGTAACCGATTTCCGGGTTGTCCGCGTTCA
TCGAAGAAGGAAAATTTACAAGGATGTGGTTGGGAGTCCTTACTACGTTGCTCCTGAAGTATTAAGGCAGAG
TTACGGAAAAGAAATCGACATTTGGAGTGCAGGTGTTATTTTATACATCCTACTCTGCGGTGTACCTCCTTTTTG
GGCCGACAATGAAGAAGGAGTATTCGTTGAAATCTAAAATGCAAATGATTTTGTACGTGAGCCATGGCCT
TCTATATCTGACAGCGCGAAAGATCTTGTGAGAAGATGCTAACCGAAGACCCTAAGAGACGAATCACTGCTG
CACAAGTCTTGAACATCCTTGATCAAAGGGGGAGAAGCACCGGAAAAGCCTATTGATAGCACTGTGTTATC
ACGTATGAAGCAATTCGAGCAATGAACAAGCTTAAGAAGCTAGCCCTAAAGGTTAGCGCGGTGAGTCTATCC
GAAGAAGAGATCAAAGGTCTTAAAACCTTGTGCGAATATGGATACCAATAGAAGCGGGACAATCACTTATG
AACAACCTCAAACCTGGGCTAAGTAGACTTAGATCTAGACTCTCTGAACTGAAGTTCAGCAACTCGTTGAAGC
GTCTGATGTGGATGGTAATGGAACAATTGACTACTATGAGTTTATCTCTGCGACAATGCATAGATACAAATTAC
ATCACGATGAGCACGTACACAAAGCATTCCAACACTTAGATAAAGACAAAAATGGGCACATAACTAGGGATGA
GTTGGAAAAGTGCCATGAAGGAATATGGAATGGGAGATGAAGCTAGCATCAAAGAAGTTATATCCGAAGTTGA
CACCGACAATGATGGAAAATAAACTTTGAGGAATTTCTGTCGATGATGAGATGTGGCACCACACAACCAAAA
GGGAAACAGTATCCATTCCACTGA

CPK23 Bur-0

ATGGGTTGCTTCAGCAGTAAACACCGGAAAACCTCAAAGCGACGGCGGAGAAAGATCAATTCCGATCAATCCA
GTCAAACCCATATCGTTGATCAAGTCCCACTCCATCGACACCCATCTCAGTTGATATCCAGAGACAATTTTA
GGTAAGGGGAAAGCATTAGGGATTTTAGGTAACCCTTCTGAAGACATAAGGAAATTTACAGCTTGGGGAAA
GAATTAGGTCGAGGTCAATTTGGGATTACGTATATGTGTAAGAGATTTGACTGGGAACAATTACGCTTGCA
AATCGATTCTCAAGAGGAAGCTAATTAGTGAGCAGGGTAGAGAAGATGTGAAGACAGAGATTGAGATAATGC
AGCATTTGTTTGGACAACCAAACGTTGTTGAGATCAAAGGTGCTTATGAGGATAGACAATATATACATTTGGTT
ATGGAGTTGTGTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CTGGTATCATTAGGTCTATTGTGAGTGTGTTTCAGATTTGTCATTTTATGGGTGTGATTTCAGATCTCAAGC
CTGAGAATTTCTTGTCTCGAGTAAGGAGGAGAATGCAATGCTTAAAGTAACCGATTTCCGGGTTGTCCGCGTTC
ATCGAAGAAGGAAAAGTTTACCAGGATGTGGCTGGGAGTCCTTACTACGTTGCTCCTGAAGTATTAAGGCGAA

GTTATGGAAAAGAAATCGACATTTGGAGTGCAGGTGTTATTTTATACATCCTACTCTGCGGTGTACCTCCTTTTT
GGGCCGACAATGAGATAGGAATATTCGATGAGATTCTAAAATGCGAAATTGATTTTGAACGCCAACCATGGCC
TTCTATATCTGGAAGCGCGAAAGATCTTGTTAAGAAGATGCTAACCGAAGACCCTAAGAGACGAATCACTGCT
GAACAGGTTCTTGAACATCCTTGGATCAAAGGGGGAGAAGCACCCGACAAGCCTATTGATAGCACTGTGTTAT
CACGTATGAAGCAATTCGAGCAATGAACAAGCTTAAGAAGCTAGCCCTAAAGGTTAGCGCGGTGAGTCTATC
CGAAGAAGAGATCAAAGGTCTTAAACCTTGTTTGCGAATATGGATACCAATAGAAGCGGGACAATCACTTAT
GAACAACCTCAAACCTGGGCTAAGTAGACTTAGATCTAGACTCTCTGAAACTGAAGTTCAGCAACTCGTTGAAG
CGTCTGATGTGGATGGTAATGGAACAATTGACTACTATGAGTTTATCTCTGCGACAATGCATAGATACAAATTA
CATCACGATGAGCACGTACACAAAGCATTCCAACACTTAGATAAAGACAAAAATGGGCACATAACTAGGGATG
AGTTGGAAAGTGCCATGAAGGAATATGGAATGGGAGATGAAGCTAGCATCAAAGAAGTTATATCCGAAGTTG
ACACCGACAATGATGGAAAAATAAACTTTGAGGAATTTCTGTCGATGATGAGATGTGGCACCACACAACCAA
AGGGAAACAGTATCCATTCCACTGA

CPK23 Tsu-1

ATGGGTTGCTTCAGCAGTAAACACCCGAAAACCTCAAACGACGGCGCGGAGAAAGATCAATTCCGATAATT
CCAGTTCAAACCCATATCGTTGATCAAGTCCCGATCATCGTAAACCTCAAATCCCATCACCATCGATACCCATC
TCAGTTCGAGATCCAGAGACGATTTTAGGTAACCATTGAAGACATCAGGAAATTTTACAGCTTGGGGAGAG
AATTAGGTCGAGGTGGTTTAGGGATTACGTATATGTGCAAAGAGATTGGGACTGGGAACATTTATGCTTGCAA
ATCGATTCTCAAGAGGAAGCTAATTAGTGAGCTGGGTAGAGAAGATGTGAAGACAGAGATTGAGATCATGCA
GCATTTGTCTGGACAACCAAACGTTGTTGAGATCAAAGGTTCTTATGAAGACAGACATTCTGTACATTTGGTAG
CGGAATTATGTGCCGGTGGAGAGTTGTTTGATAGGATTATAGCTCAAGGTCATTACTCTGAGAGAGCTGCTGC
TGGTACCATTAAGTCAATTGTGGATGTTGTTTCAGATTTGTCATTTGAATGGTGTGATTTCGAGATCTCAAGC
CTGAGAATTTCTTGCTTCGAGTAAAGAGGAGAATGCTATGCTTAAAGCTTGTGATTTCCGTTTGTCCGTCTTCA
TCGAAGAAGGAAAAGTTTACCGGGATATAGTTGGGAGTGCTTACTACGTTGCTCCAGAAGTATTAAGGCGAA
GTTACGAAAAGAAATCGACATTTGGAGTGCAGGTGTTATTTTATACATCCTACTCTGCGGTGTACCTCCTTTTT
GGGCCGACAATGAAGAAGGAGTATTCGTTGAAATTCTAAAATGCGAAATTGATTTTGAAGCCAACCATGGCC
TTCTATATCTGAAAGCGCGAAAGATCTTGTTAAGAAGATGCTAACCGAAGACCCTAAGAGACGAATCACTGCT
GAACAGGTTCTTGAACATCCTTGGATCAAAGGGGGAGAAGCACCCGAAAAGCCTATTGATAGCACTGTGTTAT
CACGTATGAAGCAATTCGAGCAATGAACAAGCTTAAGAAGCTAGCCCTAAAGGTTAGCGCGGTGAGTCTATC
CGAAGAAGAGATCAAAGGTCTTAAACCTTGTTTGCGAATATGGATACCAATAGAAGCGGGACAATCACTTAT
GAACAACCTCAAACCTGGGCTAAGTAGACTTAGATCTAGACTCTCTGAAACTGAAGTTCAGCAACTCGTTGAAG
CGTCTGATGTGGATGGTAATGGAACAATTGACTACTATGAGTTTATCTCTGCGACAATGCATAGATACAAATTA
CATCAAGATGAGCACGTACACAAAGCATTCCAACACTTAGATAAAGACAAAAATGGGCACATAACTAGGGATG
AGTTGGAAAGTGCCATGAAGGAATATGGAATGGGAGATGAAGCTAGCATCAAAGAAGTTATATCCGAAGTTG

ACACCGACAATGATGGAAAAATAAACTTTGAGGAATTCGTGCGATGATGAGATGTGGCACCACACAACCAA
AGGGAAACAGTATCCATTCCACTGA

CPK23 aus *Arabidopsis lyrata*

ATGGGTTGTTTCAGCAGTAAACACCGGACAACCTCAAACGACGGCGGAGAAAGATCAAATCCGATCAATCCA
GTTCAAACCCATGTCGTTAATCAAGTCCCTGAGCATCGTGAACCTCAAATCCCAACACCATCGGTACCCATCTCA
GTTTCGAGATCCAGCGACGATATTAGGTA AACATTGGAAGACATCAGGAGATTCTACAGCTTGGGGAAAGAA
TTAGGTCGAGGTCAATTTGGGATTACGTATATGTGTAAGAGATTGGGACTGGGAACAATTACGCTTGTAAT
CGATTCTCAAGAGGACGCTAATTAGTGAGAGAGAAGATGTGAAGACAGAGATTCTTAAGAGGAAGCTAGTTA
ATAAGTATGATAAAGAAAATTTGAAGAGAGAGATTGAGATAATGCAGCATTGTCTGGACAACCAAACATTGT
TGAGATTAAGGTGCTTATGAGGATAGACAGTCTGTGCATTTGGTAATGGAGTTGTGTGCTGGTGGTGAGTTG
TTGATAGGATTATAGCTCAAGGTCATTA CTCTGAGAGAGCTGCTGCTGGTATCATTAGGTCTATTGTCAATGT
TGTTGAGATTTGTCATTTGAAGGGTGTGATTCATCGAGATCTCAAGCCTGAGAATTTCTTGTTCGAGTAAAG
AGGAGAATGCAATGCTTAAAGTAACCGATTTCTGGGTTGTCCGCCTTCATCGAAGAAGGAAAAGTTTACCAGGA
TGAGTTGGGAGCCGTTACTACGTTGCTCCTGAAGTATTAAGGCGAAGTTACGGGAAAGAAATCGATATTTGG
AGTGCAGGTGTCATTTTATACATCCTACTCAGCGGTTTACCTCCTTTTTGGGCTGACAATGAGGATGGAATATTC
GTTGAGATTCTAAAAGGCGAAATTGATGTTGAAAGCCAACCATGGCCTTCTATATCTGAGAGCGCGAAAGATC
TTGTTAGAAAGATGCTAACCAAAGACCCGAAGAGACGAATCACGGCTGCACAGTTCTTGAACATCCTTGGAT
CAAAGGGGGGAGAAGCACCGGACAAGCCTATTGATAGCACTGTGTTATCCCGTATGAAGCAATTC **CGAGCAAT**
GAACAAGCTTAAGAAGCTAGCTCTAAAGATTAGCGCGGAGAGTCTATCAGAAGAGGAGATCAAAGGTCTTAA
AACCATGTTTGCGAATATGGATACCAATAGAAGCGGGACAATCACTTATGAACAACCTCAAACCTGGGCTAAGT
AGACTTAGGTATAGATTCTCTGAAACTGAAGTTAAGCAACTCATGGAAGCGGCTGATGTGGATGGTAATGGAA
CAATTGACTACTATGAGTTTATCTCTGCGACAATGCATAGATACAAATTAGATCGAGATGAGCATGTACACAAA
GCATTCCAACACTTTGATAAAGACAACAATGGGCACATAACTAGGGCTGAGTTGGAAAGTGTATGAAGGAAT
ATGGAATGGGAGATGAAGCTAGCATCAAAGAAGTTATATCCGAAGTTGATACCGACAATGATGGAAAAATAA
ACTTTGAGGAATTCGTGCGATGATGAGATGCGGCACCACACAACCAAAGGGAAAATGTTCCATTCCACTG
A

CPK23 Aminosäuresequenzen

Aminosäuresequenz von CPK23 aus unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen und aus *Arabidopsis lyrata*. Rot markiert ist die Sequenz des N-Terminus, schwarz die der Kinase Domäne und blau die CAM und Junction Domänen. Sequenzen für Ler-0 stammen aus (Korte, 2009). Die Sequenzen der Ökotypen Bur-0 und Tsu-1 wurden zum Teil in dieser Arbeit sequenziert (N-Terminus und Kinase Domäne) oder stammen aus der Datenbank (CAM Domäne) des 1001 genomes project (<http://signal.salk.edu/atg1001/index.php>). Col-0 Sequenzen stammen von www.arabidopsis.org, die Sequenzen für *A. lyrata* wurden über NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bezogen.

CPK23 Ler-0 (GCA2)

```
MGCFSSKHRKTQNDGGERTIPINPLQTHIVDQVPTPSTPISVRYPETILGKGGKALGILGKPFEDIRKFYSLGKELGRGGL
GITYMCKEISTGNINYACKSILKRKLISEQGREDVKTEIQIMQHFLGQPNVVEIKGAYEDRQYIHLVMELCAGGELFDRI
IARGHYSERAAAGIIRSIVSVVQICHLKGVHRDLKPENFLFSSKEENAMLKVTDFGLSAFIEEGKVYQDVAGSPYYVA
PEVLRRSYGKEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWADNEIGIFDEILKCEIDFESQPWPSISESAKDLVKKMLTEDPKRRITAE
QVLEHPWIKGGEAPDKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKLLALKVSAVLSLEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQT
GLSRLRSRLSETEVQQLVEASDVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLHQDEHVHKAHQHLDKDKNGHITRDELESAMKE
YGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH
```

CPK23 Col-0

```
MGCFSSKHRKTQNDGGGERSIPIPVQTHIVDQVDPDRKPKQIPSPSIPISVRDPETILGKPFEDIRKFYSLGRELGRGGL
GITYMCKEIGTGNINYACKSILKRKLISELQREDVKTEIQIMQHLSGQPNVVEIKGSYEDRHSVHLMELCAGGELFDRII
AQGHYSERAAAGTIKSIVDVVQICHLNGVIHRDLKPENFLFSSKEENAMLKVTDFGLSAFIEEGKIYKDVVGGSPYYVAP
EVLRSYSGKEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWADNEEGVFVEILKCKIDFVREPWPSISDSAKDLVEKMLTEDPKRRITA
AQVLEHPWIKGGEAPEKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKLLALKVSAVLSLEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQ
TGLSRLRSRLSETEVQQLVEASDVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLHHDEHVHKAHQHLDKDKNGHITRDELESAMK
EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH
```

CPK23 Bur-0

```
MGCFSSKHRKTQSDGGERSIPINPVQTHIVDQVPTPSTPISVRYPETILGKGGKALGILGKPFEDIRKFYSLGKELGRGQF
GITYMCKEISTGNINYACKSILKRKLISEQGREDVKTEIQIMQHFLGQPNVVEIKGAYEDRQYIHLVMELCAGGELFDRI
IARGHYSERAAAGIIRSIVSVVQICHFMGVIHRDLKPENFLFSSKEENAMLKVTDFGLSAFIEEGKVYQDVAGSPYYVA
PEVLRRSYGKEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWADNEIGIFDEILKCEIDFERQPWPSISGSAKDLVKKMLTEDPKRRITA
EQVLEHPWIKGGEAPDKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKLLALKVSAVLSLEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQ
```

TGLSRLRSRLSETEVQQLVEASDVDGNGTIDYEFISATMHRYKLHHDEHVHKAFQHLDKDKNGHITRDELESAMK
EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH

CPK23 Tsu-1

MGCFSSKHRKTQNDGGGERSIIPVQTHIVDQVPDHRKPQIPSPISVRDPETILGKPFEDIRKFYSLGRELGRGGL
GITYMCKEIGTGNIYACKSILKRKLISELGREDVKTEIQIMQHLSGQPNVVEIKGSYEDRHSVHLVAELCAGGELFDRII
AQGHYSERAAAGTIKSIVDVVQICHLNGVIHRDLKPENFLLSSKEENAMLKACDFGLSVFIEEGKVYRDIVGSAYYVA
PEVLRRSYGKEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWADNEEGVFVEILKCEIDFESQPWPSISESAKDLVKKMLTEDPKRRITA
EQVLEHPWIKGGEAPEKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKALKVSAVSLSEEEIKGLKTLFANMDTNRSGTITYEQLQ
TGLSRLRSRLSETEVQQLVEASDVDGNGTIDYEFISATMHRYKLHQDEHVHKAFQHLDKDKNGHITRDELESAMK
EYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKQYPFH

CPK23 aus *Arabidopsis lyrata*

MGCFSSKHRTTQNDGGERSNPINPVQTHVVNQVPEHREPQIPTSPISVRDPATILGKPLEDIRRFYSLGKELGRG
QFGITYMCKEIGTGNNYACKSILKRTLISEREDVKTEILKRKLVNKYDKENLKREIQIMQHLSGQPNIVEIKGAYEDRQS
VHLVMELCAGGELFDRIIAQGHYSERAAAGIIRSIVNVVQICHLKGVHRDLKPENFLFSSKEENAMLKVTDGFLSAFI
EEGKVYQDVVGSRYVVAPEVLRRSYGKEIDIWSAGVILYILLSGLPPFWADNEDGIFVEILKGEIDVESQPWPSISESA
KDLVRKMLTKDPKRRITAAQVLEHPWIKGGEAPDKPIDSTVLSRMKQFRAMNKLKALKISAESLSEEEIKGLKTMF
ANMDTNRSGTITYEQLKTGLSRLRYRFSETEVKQLMEAADV DNGTIDYEFISATMHRYKLDRDEHVHKAFQHFD
KDNNGHITRAELESVMKEYGMGDEASIKEVISEVDTDNDGKINFEEFRAMMRCGTTQPKGKMFPH

Verwendete Oligonukleotid Primer

#	Name	Sequenz
1	FOK1_qP_F	GGTGGATCAAGGAAACCAGA
2	FOK1_qP_R	TCAACGATCACACCGTAATCA
3	UBI10_01_fw	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG
4	UBI10_01_rev	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
5	triple_miR-s	GATTTGAGCTATAATCCTACCGATCTCTCTTTGTATTCC
6	triple_miR-a	GATCGGTAGGATTATAGCTCAAATCAAAGAGAATCAATGA
7	triple_miR*s	GATCAGTAGGATTATTGCTCAATTCACAGGTCGTGATATG
8	triple_miR*a	GAATTGAGCAATAATCCTACTGATCTACATATATATTCTT
9	double1_miR-s	GATATTAGTAAAGGATGAGACTCTCTCTTTGTATTCC
10	double1_miR-a	GAGAGTCTCATCCTTTACTAATATCAAAGAGAATCAATGA
11	double1_miR*s	GAGAATCTCATCCTTAACTAATTCACAGGTCGTGATATG
12	double1_miR*a	GAAATTAGTTAAGGATGAGATTCTCTACATATATATTCTT
13	double2_miR-s	GATTTACTAATTAGCTTCCGCTATCTCTTTGTATTCC
14	double2_miR-a	GATAGCGGAAGCTAATTAGTAAATCAAAGAGAATCAATGA
15	double2_miR*s	GATAACGGAAGCTAAATAGTAATTCACAGGTCGTGATATG
16	double2_miR*a	GAATTACTATTTAGCTTCCGTTATCTACATATATATTCTT
17	5'UTR_snRK2.2	GATGTGATTAGGAAGAGCAATAGAGG
18	3'UTR_snRK2.2	TGTATGTGAATCCAAAGCTTGATAGAG
19	5'UTR_snRK2.3	CTGCTGGGTATTAGATTCGAATTTT
20	3'UTR_snRK2.3	GTTAATTTGCTTTTGTGTGACATTGG
21	SnrK2.2_F_SpeI	GTTCACTAGTATGGATCCGGCGACTAATTCAC
22	SnrK2.2_R_SalI	GTTGTCGACTCAGAGAGCATAAACTATCTCTCC
23	SnrK2.3_F_SpeI	GTTCACTAGTATGGATCGAGCTCCGGTGAC
24	Bur-0_R290S_F	GATTTTGAAAGCCAACCATGGCCTTCTATATC
25	Bur-0_R290S_R	CCATGGTTGGCTTTCAAATCAATTTTCG
26	Ler-0_S290R_F	GATTTTGAAAGCCAACCATGGCCTTCTATATC
27	Ler-0_S290R_R	CCATGGTTGGCGTTCAAATCAATTTTCG
28	Bur-0_M187K_F	GTCATTTTAAGGGTGTGATTCATCGAGATC
29	Bur-0_M187K_R	GAATCACACCCTTAAAATGACAAATCTGAAC
30	Ler-0_K187N_F	GTCATTTGAATGGTGTGATTCATCGAGATC
31	Ler-0_K187N_R	GAATCACACCATTCAAATGACAAATCTGAAC
32	gca2_Y44D_F	CAGTTCGAGATCCAGAGACAATTTTAGG
33	gca2_Y44D_R	GTCTCTGGATCTCGAACTGAGATGGGTG

Anhang

34	pRS300_A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
35	pRS300_B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
36	5-UTR_cpk15	AACCGAGAACACAAGAAATTCT
37	3-UTR_cpk15	TTGGGCACACATGTATAACTCC
38	SAIL_1056H11_LP	AAGCCGTAAGTATTGCCATCC
39	SAIL_1056H11_RP	TTTGGTCTTTTGCCCACTTAG
40	TALCPK21_T1_F	GTTCGAATTCACCAATCCATCAGCAGATTC
41	TALCPK21_T1_R	GTTGAGCTCCAATAGACCTAATGATACCAGCAG
42	cpk4_F_BamHI	GATCGGATCCATGGAGAAACCAACCCTAGAAG
43	CPK4-vk_R_Ndel	GTTCCATATGTTACTGCTTAAGTCGCGACAAGAC
44	cpk11_F_BamHI	GATCGGATCCATGGAGACGAAGCCAAACC
45	CPK11-vk_R_Ndel	GTTCCATATGTTACTGCTTTAGACGAGATAAGACTGC
46	CPK21_qP_2F	GAACCCAGAGTAGAAGAGCTAAACC
47	CPK21_qP_2R	TCAAACACAGAGAAGATAGAACAACA
48	GCA2_qP_1F	GAGAATGCAATGCTTAAAGTAACC
49	GCA2_qP_1-1R	TAGTAAGGACTCCCAGCCACA
50	wt_ABRE_F	CTAGAGCTAGCCCGGCCACGTACAAGCACTTAGTGACATTGACCGCCACGTACACCGG A
51	wt_ABRE_R	CTAGTCCGGTGTACGTGGCGGTCAATGTCACTAAGTGCTTGTACGTGGCGCGGGCTAGC T
52	mt_ABRE_F	CTAGAGCTAGCCCGGCCACGTACAAGCACTTAGTGACATTGACCGCCACGTACACCGG A
53	mt_ABRE_R	CTAGTCCGGTGTTTAAGGCGGTCAATGTCACTAAGTGCTTGTTTAAGGCGCGGGCTAGCT
54	Lys2 Yip-In	CCGCACTTCTAACATAGTTGC
55	Lys2 Yip-Out	ATCTTACCTAATTGGACTGAACC
56	Gca2_F_EcoRI	GATCGAATTCATGGGTTGCTTCAGCAGTAAAC
57	Gca2-vk_R_Sall	GATCGTCGACTTATTGCTTCATACGTGATAACACAG
58	35S_Seq	CATTTGGAGAGGACAGGGTAC
59	NosT_Seq	CATCGCAAGACCGGCAAC
60	Gal1_Seq	CATAACCACTTTAACTAATACTTTCAAC
61	Cpk23_SDMF_D193A	GAATGGTGTGATTCATCGAGCTCTCAAGCCTGAGAATTC
62	Cpk23_SDMR_D193A	GAAATTCTCAGGCTTGAGAGCTCGATGAATCACACCATT
63	Cpk23_SDMF_D53Y	GATACCCATCTCAGTTCGATATCCAGAGACGATTTTAGG
64	Cpk23_SDMR_D53Y	CCTAAAATCGTCTCTGGATATCGAACTGAGATGGGTATC
65	pGAD_Seq_F	GGATGATGTATATACTATCTATTCGATG
66	pGAD_Seq_R	GTGCACGATGCACAGTTGAAG
67	pGBT_Seq_F	CGACATCATCATCGGAAGAGAG
68	pGBT_Seq_R	ACAGGAAAGAGTTACTCAAGAACAAG

69	cpk23c_T317A_F	ACCGAAGACCCTAAGAGACGAATCGTGCTGCAC
70	cpk23c_T317A_R	AGGATGTTCAAGAACTGTGCAGCAGCGATTCCG
71	cpk23c_T317D_F	ACCGAAGACCCTAAGAGACGAATCGATGCTGCAC
72	cpk23c_T317D_R	AGGATGTTCAAGAACTGTGCAGCATCGATTCCG
73	LB_SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
74	LB_Salk	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
75	SALK_029412_LP	GGAATTTTTCCGTTCCAGAAC
76	SALK_029412_RP	CTCAGGCTTGAGATCTCGATG
77	SALK_007958_LP	TTTGTGTGTTCTGTTGCAGG
78	SALK_007958_RP	CTTTCATTGCGAGAAGGACTG
79	cpk23c_S218A_F	GATTTCCGGTTGGCCCGTTCATCGAAGAAGG
80	cpk23c_S218A_R	GATGAACGCGCCAACCCGAAATCGTTACTTTAAG
81	cpk23c_S218D_F	GATTTCCGGTTGGACGCGTTCATCGAAGAAGG
82	cpk23c_S218D_R	GATGAACGCGTCCAACCCGAAATCGTTACTTTAAG
83	Cpk23_394F_1er	GAGATCAAAGGTGCTTATGAGGATAGAC
84	Cpk23_421R_1er	GTCTATCCTCATAAGCACCTTTGATCTC
85	Cpk23_394F_col	GAGATCAAAGGTCTTATGAAGACAGAC
86	Cpk23_421R_col	GTCTGTCTTCATAAGAACCTTTGATCTC
87	Gca2_S218A_F	GATTTCCGGTTGGCCCGTTCATCGAAGAAGG
88	Gca2_S218A_R	ATGAACGCGCCAACCCGAAATCGTTACTTTAAG
89	5'UTR_cpk23	CAAATGTGTTCTCAATCAAATTCC
90	3'UTR_cpk23	GTTGATGGCTTGGTTGATTCATC
91	HB5_F_BamHI	GTTCCGGATCCATGAAGAGATCACGTGGAAGCTC
92	HB5_R_XhoI	GTTCCCTCGAGTTACGAATCCACTGATCGGAG
93	HB7_F_BamHI	GTTCCGGATCCATGACAGAAGGTGGAGAATATTCTC
94	HB7_R_SalI	GTTTCGTCGACTCATGACAAAAATCCC GC
95	ADHP_Seq	TCCTCGTCATTGTTCTCGTTCC
96	Gca2 Y44F For	CCCATCTCAGTTCGATTTCCAGAGACAATTTTA
97	Gca2 Y44F rev	TAAAATTGTCTCTGGAAATCGAACTGAGATGGG

Tabelle 2 Verwendete Oligonukleotide

Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Strainlist #
pGAD424	167
pGBT9	170
psk empty	400
pSK35SGUS	883
pSKAscl-4635LUC	1293
pBridge gca2	2161
pBI221::35S::GCA2-VK	2454
pSK Ascl 4xA Hbbe -46 35S::Luc	2788
pSK pRD29B::LUC new	3041
p35S::OST1	3146
pBridge SnRK2.6/OST1	3214
p35S::CPK21-VK-_HA-Strep	3225
pBI221::p35S::ABI5	3346
pGAD 3g11410 PP2C (PP2CA)	3548
pGAD ABI5	3590
pGAD ABF1	3594
pBI221 35s ABF1	3598
pSK Ascl 4xB Hbbe -46 35S::Luc	3670
pBridge GCA2 vk	3858
pIS 385	4034
pGREG503-ADHP-HB6	4035
pGREG504-ABI1	4037
pGREG505-Ost1	4038
pSK Ascl 35S PP2CA	4063
pSK Ascl 35S RCAR1	4097
psk 35s ABF2 CDS	4502
psk 35s GCA2 vk SDM Y44D	4511
psk 35s GCA2 vk SDM Y44F	4515
p35S CPK23 Col VK	4565
pSK Ascl:35S:MCS+ empty	4628
pSK Ascl 35S AHG1 genom	4654
pSK_Ascl_35S_gca2VK_T214C	4759
pSK Ascl 8xA ABRE -46 35S::Luc	4893

Anhang

pSK Ascl 35S::cpk23-vk D53Y	4894
pSK Ascl 35S::cpk23-vk D193A	4895
pBI221:gca2-vk T214A	5009
pBI221:gca2-vk T214D	5010
pGREG503ADHP ABF2	5104
pSK 35S Ascl cpk23-vk (col) T218A	5105
pSK 35S Ascl cpk23-vk (col) T218D	5107
pSK 35S Ascl cpk23-vk (col) T213A	5187
pSK 35S Ascl cpk23-vk (col) T213D	5188
pSK 35S Ascl cpk23-vk (col) T213C	5193
pSK 35S Ascl cpk23-vk (col) T317A	5194
pSK 35S Ascl cpk23-vk (col) T317D	5195
pGAD ABF2	5228
pSK 35S ABF3	5230
pSK 35S ABF4	5233
pGAD ABF4	5234
pGAD ABF3	5235
psK Ascl 35S: gca2-vk T218A	5267
psK Ascl 35S: gca2-vk T218D	5268
pBI221 gca2-vk E63 col	5308
pSK 35S Ascl cpk23-vk E63 ler	5309
pSK 35S Ascl gca2-vk V131 col	5310
pSK 35S Ascl cpk23-vk V131 ler	5311
psk CPK23 vk tsu-1	5433
TALEN 49/50	5443
psk CPK23 vk bur	5514
pGREG503 pADH::HB5	5551
pGREG503 pADH::HB7	5552
pGREG503 pADH::HB16	5573
pSK Ascl 35S::SnrK2.2	5617
pSK Ascl 35S::SnrK2.3	5618
pSK Ascl 35S::cpk23-vk R290S Bur-0	5849
pSK Ascl 35S::cpk23-vk M187K Bur-0	5850
pBI221 35S::gca2-vk K187N	5851
pBI221 35S::gca2-vk S290R	5852
pRS300	5853
pSK Ascl 35S::cpk15-vk	5981

pART27 Ascl 35S::miR Triple	6119
pART27 Ascl 35S::miR Double1	6120
pART27 Ascl 35S::miR Double2	6121
pSK Ascl 35S::cpk23-vk Bur-0 M187K R290S	6275
pBI221 35S::gca2-vk K187N S290R	6276
pBridge_CPK23(col)_vk	6368
pBridge_CPK23(col)_fl	6370

Tabelle 3 Verwendete Plasmide

Literaturverzeichnis

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K.** (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9** (10): 1859–1868.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W., and Saltveit Jr, M.E.** (1992). *Ethylene in plant biology* (Academic Press).
- Abel, S., and Theologis, A.** (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J* **5** (3): 421–427.
- Acharya, B.R., Jeon, B.W., Zhang, W., and Assmann, S.M.** (2013). Open Stomata 1 (OST1) is limiting in abscisic acid responses of *Arabidopsis* guard cells. *New Phytol* **200** (4): 1049–1063.
- Adie, B.A.T., Perez-Perez, J., Perez-Perez, M.M., Godoy, M., Sanchez-Serrano, J.-J., Schmelz, E.A., and Solano, R.** (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19** (5): 1665–1681.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411** (6841): 1053–1057.
- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C.J., Blankestijn-de Vries, H., and Koornneef, M.** (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164** (2): 711–729.
- Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C.J., and Koornneef, M.** (1999). Natural allelic variation at seed size loci in relation to other life history traits of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (8): 4710–4717.
- Anderson, J.P., Badruzsafari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K.** (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16** (12): 3460–3479.
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G.A., and Rodriguez, P.L.** (2012). Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiol* **158** (2): 970–980.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A., and Chan, R.L.** (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science* **12** (9): 419–426.
- Bajguz, A., and Hayat, S.** (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **47** (1): 1–8.
- Bao, M.Z., Schwartz, M.A., Cantin, G.T., Yates, J.R.3., and Madhani, H.D.** (2004). Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119** (7): 991–1000.

- Barrero, J.M., Piqueras, P., Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., Rodriguez, P.L., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* **56** (418): 2071–2083.
- Batistic, O., and Kudla, J.** (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta* **1820** (8): 1283–1293.
- Baudin-Baillieu, A., Guillemet, E., Cullin, C., and Lacroute, F.** (1997). Construction of a yeast strain deleted for the TRP1 promoter and coding region that enhances the efficiency of the polymerase chain reaction-disruption method. *Yeast* **13** (4): 353–356.
- Belin, C., Franco, P.-O. de, Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.-M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S.** (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol* **141** (4): 1316–1327.
- Bentsink, L., Hanson, J., Hanhart, C.J., Blankestijn-de Vries, H., Coltrane, C., Keizer, P., El-Lithy, M., Alonso-Blanco, C., Andres, M.T. de, Reymond, M., van Eeuwijk, F., Smeekens, S., and Koornneef, M.** (2010). Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (9): 4264–4269.
- Bentsink, L., Yuan, K., Koornneef, M., and Vreugdenhil, D.** (2003). The genetics of phytate and phosphate accumulation in seeds and leaves of *Arabidopsis thaliana*, using natural variation. *Theor Appl Genet* **106** (7): 1234–1243.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., and Schwede, T.** (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42** (Web Server issue): W252–8.
- Billker, O., Lourido, S., and Sibley, L.D.** (2009). Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites. *Cell Host Microbe* **5** (6): 612–622.
- Biondi, R.M., and Nebreda, A.R.** (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* **372** (Pt 1): 1–13.
- Bishopp, A., Benkova, E., and Helariutta, Y.** (2011). Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots. *Curr Opin Plant Biol* **14** (1): 10–16.
- Bittner, F., Oreb, M., and Mendel, R.R.** (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276** (44): 40381–40384.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U.** (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326** (5959): 1509–1512.
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G.R.** (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**: 164–175.
- Bossis, G., and Melchior, F.** (2006). SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* **1**: 13.

Boudsocq, M., Droillard, M.-J., Regad, L., and Laurière, C. (2012). Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? *Biochem. J.* **447** (2): 291–299.

Boudsocq, M., and Sheen, J. (2012). CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci.*

Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., and Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* **464** (7287): 418–422.

Brandman, O., and Meyer, T. (2008). Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* **322** (5900): 390–395.

Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H., and Schroeder, J.I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (26): 10593–10598.

Bruzzone, S., Moreschi, I., Usai, C., Guida, L., Damonte, G., Salis, A., Scarfi, S., Millo, E., Flora, A. de, and Zocchi, E. (2007). Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (14): 5759–5764.

Bush, D.S., Biswas, A.K., and Jones, R.L. (1989). Gibberellic-acid-stimulated Ca(2+) accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca(2+) transport and steady-state levels. *Planta* **178** (3): 411–420.

Busk, P.K., and Pages, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* **37** (3): 425–435.

Camoni, L., Harper, J.F., and Palmgren, M.G. (1998). 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Lett* **430** (3): 381–384.

Campos, M.L., Kang, J.-H., and Howe, G.A. (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *J Chem Ecol* **40** (7): 657–675.

Cheng, S.-H., Willmann, M.R., Chen, H.-C., and Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* **129** (2): 469–485.

Cheng, X., Ruyter-Spira, C., and Bouwmeester, H. (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Front Plant Sci* **4**: 199.

Chen, R.E., and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773** (8): 1311–1340.

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* **275** (3): 1723–1730.

Choi, H.-i., Park, H.-J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.-Y., Seo, H.-H., Kim, Y.-W., Hwang, I., and Kim, S.Y. (2005). Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional

regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol* **139** (4): 1750–1761.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186** (2): 757–761.

Christian, M., Qi, Y., Zhang, Y., and Voytas, D.F. (2013). Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3 (Bethesda)* **3** (10): 1697–1705.

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

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

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

Christodoulou, J., Malmendal, A., Harper, J.F., and Chazin, W.J. (2004). Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279** (28): 29092–29100.

Clark, A.G., Glanowski, S., Nielsen, R., Thomas, P.D., Kejariwal, A., Todd, M.A., Tanenbaum, D.M., Civello, D., Lu, F., Murphy, B., Ferreira, S., Wang, G., Zheng, X., White, T.J., Sninsky, J.J., Adams, M.D., and Cargill, M. (2003). Inferring nonneutral evolution from human-chimp-mouse orthologous gene trios. *Science* **302** (5652): 1960–1963.

Clark, R.M., Schweikert, G., Toomajian, C., Ossowski, S., Zeller, G., Shinn, P., Warthmann, N., Hu, T.T., Fu, G., Hinds, D.A., Chen, H., Frazer, K.A., Huson, D.H., Scholkopf, B., Nordborg, M., Ratsch, G., Ecker, J.R., and Weigel, D. (2007). Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **317** (5836): 338–342.

Clarkson, D.T., Brownlee E, C., and Ayling, S.M. (1988). Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ratio imaging of fura-2. *Journal of Cell Science* **91** (1): 71–80.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16** (6): 735–743.

Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Yeo, M., Good, V.M., Thompson, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2003). Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J* **22** (3): 494–501.

Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105** (6): 721–732.

- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G., and Harper, J.F.** (2003). Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol* **132** (4): 1840–1848.
- D'Angelo, C., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schultke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R., and Kudla, J.** (2006). Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *Plant J* **48** (6): 857–872.
- Daniel Gietz, R., and Woods, R.A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In *Methods in Enzymology Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology - Part B*, Christine Guthrie and Gerald R. Fink, ed (Academic Press), pp. 87–96.
- Davies, P.J.** (2010). *Plant Hormones* (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J.** (1994). A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* **266** (5188): 1247–1250.
- Demir, F., Horntrich, C., Blachutzik, J.O., Scherzer, S., Reinders, Y., Kierszniowska, S., Schulze, W.X., Harms, G.S., Hedrich, R., Geiger, D., and Kreuzer, I.** (2013). Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Demmel, S.** (2010). *Perzeption der Abscisinsäure und die Funktion des Phytohormons bei abiotischem Stress*. Technische Universität München.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C.A., Taylor, J.M., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (16): 6680–6685.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., and Rohdich, F.** (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci* **61** (12): 1401–1426.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Raz, V., and Koornneef, M.** (2001). A QTL for flowering time in Arabidopsis reveals a novel allele of CRY2. *Nat Genet* **29** (4): 435–440.
- Favelyukis, S., Till, J.H., Hubbard, S.R., and Miller, W.T.** (2001). Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* **8** (12): 1058–1063.
- Filiault, D.L., Wessinger, C.A., Dinneny, J.R., Lutes, J., Borevitz, J.O., Weigel, D., Chory, J., and Maloof, J.N.** (2008). Amino acid polymorphisms in Arabidopsis phytochrome B cause differential responses to light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (8): 3157–3162.
- Finkelstein, R., Gampala, S.S.L., Lynch, T.J., Thomas, T.L., and Rock, C.D.** (2005). Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE(ABI)5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF)3. *Plant Mol Biol* **59** (2): 253–267.

Finkelstein, R.R., and Lynch, T.J. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12** (4): 599–609.

Finkemeier, I., Laxa, M., Miguet, L., Howden, A.J.M., and Sweetlove, L.J. (2011). Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in Arabidopsis. *Plant Physiol* **155** (4): 1779–1790.

Franz, S., Ehlert, B., Liese, A., Kurth, J., Cazale, A.-C., and Romeis, T. (2011). Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* **4** (1): 83–96.

Fuchs, S. (2013). Protein Phosphatases 2C of *Arabidopsis thaliana* in Stress Signaling. Technische Universität München.

Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., and Schweighofer, A. (2013). Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS Journal* **280** (2): 681–693.

Fuchs, S., Tischer, S.V., Wunschel, C., Christmann, A., and Grill, E. (2014). Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (15): 5741–5746.

Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.-K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462** (7273): 660–664.

Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.-K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **19** (2): 485–494.

Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.-K. (2011). Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (4): 1717–1722.

Fujii, H., and Zhu, J.-K. (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (20): 8380–8385.

Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* **124** (4): 509–525.

Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50** (12): 2123–2132.

Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103** (6): 1988–1993.

Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* **31** (9): 822–826.

Galpaz, N., and Reymond, M. (2010). Natural variation in *Arabidopsis thaliana* revealed a genetic network controlling germination under salt stress. *PLoS ONE* **5** (12): e15198.

Galvez-Valdivieso, G., Fryer, M.J., Lawson, T., Slattery, K., Truman, W., Smirnoff, N., Asami, T., Davies, W.J., Jones, A.M., Baker, N.R., and Mullineaux, P.M. (2009). The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *Plant Cell* **21** (7): 2143–2162.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50** (1): 151–158.

Gan, S., and Amasino, R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270** (5244): 1986–1988.

Gao, X., Chen, X., Lin, W., Chen, S., Lu, D., Niu, Y., Li, L., Cheng, C., McCormack, M., Sheen, J., Shan, L., and He, P. (2013). Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca²⁺(+)-dependent protein kinases. *PLoS Pathog* **9** (1): e1003127.

Garcia, M.E., Lynch, T., Peeters, J., Snowden, C., and Finkelstein, R. (2008). A small plant-specific protein family of ABI five binding proteins (AFPs) regulates stress response in germinating *Arabidopsis* seeds and seedlings. *Plant Mol Biol* **67** (6): 643–658.

Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A.S., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T., and Hedrich, R. (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* **4** (173): ra32.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A.S., Grill, E., Romeis, T., and Hedrich, R. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (17): 8023–8028.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., Romeis, T., and Hedrich, R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (50): 21425–21430.

Gonzalez-Guzman, M., Abia, D., Salinas, J., Serrano, R., and Rodriguez, P.L. (2004). Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiol* **135** (1): 325–333.

Gonzalez-Guzman, M., Apostolova, N., Belles, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., Serrano, R., and Rodriguez, P.L. (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14** (8): 1833–1846.

- Granier, C., Aguirrezabal, L., Chenu, K., Cookson, S.J., Dauzat, M., Hamard, P., Thioux, J.-J., Rolland, G., Bouchier-Combaud, S., Lebaudy, A., Muller, B., Simonneau, T., and Tardieu, F.** (2006). PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol* **169** (3): 623–635.
- Grefen, C., and Blatt, M.** (2012). A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). *Biotech* **53** (5).
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y.** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260** (6): 3440–3450.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., and Zhu, J.K.** (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13** (6): 1383–1400.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.-P., Gong, D., Halfter, U., and Zhu, J.-K.** (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **3** (2): 233–244.
- Hannah, M.A., Wiese, D., Freund, S., Fiehn, O., Heyer, A.G., and Hinch, D.K.** (2006). Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142** (1): 98–112.
- Han, W., Rong, H., Zhang, H., and Wang, M.-H.** (2009). Abscisic acid is a negative regulator of root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **378** (4): 695–700.
- Hao, Q., Yin, P., Li, W., Wang, L., Yan, C., Lin, Z., Wu, J.Z., Wang, J., Yan, S.F., and Yan, N.** (2011). The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins. *Mol Cell* **42** (5): 662–672.
- Harper, J.F., Breton, G., and Harmon, A.** (2004). Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 263–288.
- Harper, J.F., and Harmon, A.** (2005). Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6** (7): 555–566.
- Hartung, W.** (2010). The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. *Functional Plant Biol.* **37** (9): 806.
- Henriksson, E., Olsson, A.S.B., Johannesson, H., Johansson, H., Hanson, J., Engstrom, P., and Soderman, E.** (2005). Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol* **139** (1): 509–518.
- Hilson, P., Allemeersch, J., Altmann, T., Aubourg, S., Avon, A., Beynon, J., Bhalerao, R.P., Bitton, F., Caboche, M., Cannoot, B., Chardakov, V., Cognet-Holliger, C., Colot, V., Crowe, M., Darimont, C., Durinck, S., Eickhoff, H., Longevialle, A.F. de, Farmer, E.E., Grant, M., Kuiper, M.T.R., Lehrach, H., Leon, C., Leyva, A., Lundeberg, J., Lurin, C., Moreau, Y., Nietfeld, W., Paz-Ares, J., Reymond, P., Rouze, P., Sandberg, G., Segura, M.D., Serizet, C., Tabrett, A., Tacconnat, L., Thareau, V., van Hummelen, P., Vercruyssen, S., Vuylsteke, M., Weingartner, M., Weisbeek, P.J., Wirta, V., Wittink, F.R.A., Zabeau, M., and Small, I.** (2004). Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis*

functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* **14** (10B): 2176–2189.

Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B., and Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J* **21** (12): 3029–3038.

Hirt, H., Kogl, M., Murbacher, T., and Heberle-Bors, E. (1990). Evolutionary conservation of transcriptional machinery between yeast and plants as shown by the efficient expression from the CaMV 35S promoter and 35S terminator. *Curr Genet* **17** (6): 473–479.

Hoffmann, M.H. (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal of Biogeography* **29** (1): 125–134.

Hoffmann, T. (2001). Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. Technische Universität München **2001**.

Hooley, R. (1994). Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol* **26** (5): 1529–1555.

Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327** (5962): 167–170.

Hrabak, E.M., Chan, C.W.M., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.-K., and Harmon, A.C. (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132** (2): 666–680.

Huttly, A.K., and Baulcombe, D.C. (1989). A wheat alpha-Amy2 promoter is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. *EMBO J* **8** (7): 1907–1913.

Hwang, I., Sze, H., and Harper, J.F. (2000). A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (11): 6224–6229.

Iten, M., Hoffmann, T., and Grill, E. (1999). Receptors and signalling components of plant hormones. *J Recept Signal Transduct Res* **19** (1-4): 41–58.

Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S., and Takahashi, Y. (2010). Alteration of substrate specificity: the variable N-terminal domain of tobacco Ca(2+)-dependent protein kinase is important for substrate recognition. *Plant Cell* **22** (5): 1592–1604.

Jadhav, A.S., Taylor, D.C., Giblin, M., Ferrie, A.M.R., Ambrose, S.J., Ross, A.R.S., Nelson, K.M., Irina Zaharia, L., Sharma, N., Anderson, M., Fobert, P.R., and Abrams, S.R. (2008). Hormonal regulation of oil accumulation in Brassica seeds: metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'- and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of *B. napus*. *Phytochemistry* **69** (15): 2678–2688.

Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **7** (3): 106–111.

- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144** (4): 1425–1436.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6** (13): 3901–3907.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E.** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337** (6096): 816–821.
- Johannesson, H., Wang, Y., Hanson, J., and Engström, P.** (2003). The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *ATHB5* is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Mol. Biol.* **51** (5): 719–729.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., and Dean, C.** (2000). Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* **290** (5490): 344–347.
- Kang, J., Hwang, J.-U., Lee, M., Kim, Y.-Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (5): 2355–2360.
- Kepka, M., Benson, C.L., Gonugunta, V.K., Nelson, K.M., Christmann, A., Grill, E., and Abrams, S.R.** (2011). Action of natural abscisic acid precursors and catabolites on abscisic acid receptor complexes. *Plant Physiol* **157** (4): 2108–2119.
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., and Schroeder, J.I.** (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂ and Ca²⁺ Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61** (1): 561–591.
- Klimecka, M., and Muszynska, G.** (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol* **54** (2): 219–233.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., and Trewavas, A.J.** (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352** (6335): 524–526.
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., and Hattori, T.** (2005). Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J* **44** (6): 939–949.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., and Vreugdenhil, D.** (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 141–172.
- Koprivova, A., Giovannetti, M., Baraniecka, P., Lee, B.-R., Grondin, C., Loudet, O., and Kopriva, S.** (2013). Natural variation in the *ATPS1* isoform of ATP sulfurylase contributes to the control of sulfate levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **163** (3): 1133–1141.

- Korte, A.** (2009). Identifizierung und Charakterisierung des Abscisinsäure-Responseregulators GCA2 in *Arabidopsis thaliana*. Technische Universität München.
- Krebs, M., Held, K., Binder, A., Hashimoto, K., Den Herder, G., Parniske, M., Kudla, J., and Schumacher, K.** (2012). FRET-based genetically encoded sensors allow high-resolution live cell imaging of Ca(2)(+) dynamics. *Plant J* **69** (1): 181–192.
- Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K.** (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* **22** (3): 541–563.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., and Shinozaki, K.** (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (5): 2361–2366.
- Kuromori, T., Sugimoto, E., and Shinozaki, K.** (2011). Arabidopsis mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *Plant J* **67** (5): 885–894.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2004). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* **23** (7): 1647–1656.
- Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., Leung, J., and Genschik, P.** (2011). MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Dev Cell* **21** (6): 1116–1128.
- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.-Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I.-J., and Hwang, I.** (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126** (6): 1109–1120.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., and Luan, S.** (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (50): 21419–21424.
- Lefebvre, V., Kiani, S.P., and Durand-Tardif, M.** (2009). A focus on natural variation for abiotic constraints response in the model species *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci* **10** (8): 3547–3582.
- Leskinen, P., Virta, M., and Karp, M.** (2003). One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast* **20** (13): 1109–1113.
- Leung, J.** (1997). The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. *THE PLANT CELL ONLINE* **9** (5): 759–771.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F., and Giraudat, J.** (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264** (5164): 1448–1452.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., and Rohmer, M.** (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400** (3): 271–274.

- Li, H.-H., Hao, R.-L., Wu, S.-S., Guo, P.-C., Chen, C.-J., Pan, L.-P., and Ni, H.** (2011). Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochem Pharmacol* **82** (7): 701–712.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M.** (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433** (7027): 769–773.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P., and Yang, B.** (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* **30** (5): 390–392.
- Lois, L.M., Lima, C.D., and Chua, N.-H.** (2003). Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **15** (6): 1347–1359.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Kinoshita, N., and Chua, N.-H.** (2003). AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* **17** (3): 410–418.
- Loudet, O., Saliba-Colombani, V., Camilleri, C., Calenge, F., Gaudon, V., Koprivova, A., North, K.A., Kopriva, S., and Daniel-Vedele, F.** (2007). Natural variation for sulfate content in Arabidopsis thaliana is highly controlled by APR2. *Nat Genet* **39** (7): 896–900.
- Lowe, E.D., Noble, M.E., Skamnaki, V.T., Oikonomakos, N.G., Owen, D.J., and Johnson, L.N.** (1997). The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *EMBO J* **16** (22): 6646–6658.
- Luehrsen, K.R., Wet, J.R. de, and Walbot, V.** (1992). Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol* **216**: 397–414.
- Lu, S.X., and Hrabak, E.M.** (2002). An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* **128** (3): 1008–1021.
- Lu, Y., Chen, X., Wu, Y., Wang, Y., He, Y., and 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** (2): e57171.
- Lynch, T., Erickson, B.J., and Finkelstein, R.R.** (2012). Direct interactions of ABA-insensitive(ABI)-clade protein phosphatase(PP)2Cs with calcium-dependent protein kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response. *Plant Mol Biol* **80** (6): 647–658.
- Lyzenga, W.J., Liu, H., Schofield, A., Muise-Hennessey, A., and Stone, S.L.** (2013). Arabidopsis CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signalling network and is degraded by the ubiquitin-proteasome system. *J Exp Bot* **64** (10): 2779–2791.
- Martin, M.L., and Busconi, L.** (2000). Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J* **24** (4): 429–435.
- Ma, S.-Y., and Wu, W.-H.** (2007). AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. *Plant Mol. Biol.* **65** (4): 511–518.

- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324** (5930): 1064–1068.
- McCartney, R.R., and Schmidt, M.C.** (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* **276** (39): 36460–36466.
- McElver, J., Tzafrir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M.A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J.Z., Law, M., Meinke, D., and Patton, D.** (2001). Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159** (4): 1751–1763.
- Melcher, K., Ng, L.-M., Zhou, X.E., Soon, F.-F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park, S.-Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F.C., Jensen, D.R., Yong, E.-L., Volkman, B.F., Cutler, S.R., Zhu, J.-K., and Xu, H.E.** (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462** (7273): 602–608.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126** (5): 969–980.
- Merlot, S., Mustilli, A.-C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A., and Giraudat, J.** (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant J* **30** (5): 601–609.
- Meyer, K., Leube, M.P., and Grill, E.** (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264** (5164): 1452–1455.
- Mithoe, S.C., and Menke, F.L.H.** (2011). Phosphoproteomics perspective on plant signal transduction and tyrosine phosphorylation. *Phytochemistry* **72** (10): 997–1006.
- Miura, K., Lee, J., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Miura, T., and Hasegawa, P.M.** (2009). Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (13): 5418–5423.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y.** (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388** (6645): 882–887.
- Miyazono, K.-I., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.-J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K.-S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Tanokura, M.** (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462** (7273): 609–614.
- Mody, A., Weiner, J., and Ramanathan, S.** (2009). Modularity of MAP kinases allows deformation of their signalling pathways. *Nat Cell Biol* **11** (4): 484–491.
- Moes, D., Himmelbach, A., Korte, A., Haberer, G., and Grill, E.** (2008). Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **54** (5): 806–819.

- Monke, G., Altschmied, L., Tewes, A., Reidt, W., Mock, H.-P., Baumlein, H., and Conrad, U.** (2004). Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* **219** (1): 158–166.
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.-F., Andreoli, S., Tiriác, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I.** (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* **4** (10): e327.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15** (3): 473–497.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., and Wasternack, C.** (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* **140** (1): 249–262.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8** (19): 4321–4325.
- Müssig, C., and Altmann, T.** (1999). Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids. *Plant Physiology and Biochemistry* **37** (5): 363–372.
- Mustilli, A.-C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J.** (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14** (12): 3089–3099.
- Myers, C., Romanowsky, S.M., Barron, Y.D., Garg, S., Azuse, C.L., Curran, A., Davis, R.M., Hatton, J., Harmon, A.C., and Harper, J.F.** (2009). Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *Plant J* **59** (4): 528–539.
- Nakamura, S., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R.** (2001). Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant J* **26** (6): 627–635.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50** (7): 1345–1363.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006). Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **60** (1): 51–68.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165–185.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K., and 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. *Plant J* **34** (2): 137–148.

Negi, S., Ivanchenko, M.G., and Muday, G.K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **55** (2): 175–187.

Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126** (3): 467–475.

Ng, L.-M., Soon, F.-F., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Suino-Powell, K.M., Chalmers, M.J., Li, J., Yong, E.-L., Zhu, J.-K., Griffin, P.R., Melcher, K., and Xu, H.E. (2011). Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** (52): 21259–21264.

Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* **15** (5): 661–675.

Nordborg, M., Hu, T.T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., Bakker, E., Calabrese, P., Gladstone, J., Goyal, R., Jakobsson, M., Kim, S., Morozov, Y., Padhukasahasram, B., Plagnol, V., Rosenberg, N.A., Shah, C., Wall, J.D., Wang, J., Zhao, K., Kalbfleisch, T., Schulz, V., Kreitman, M., and Bergelson, J. (2005). The pattern of polymorphism in Arabidopsis thaliana. *PLoS Biol* **3** (7): e196.

North, H.M., Almeida, A. de, Boutin, J.-P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., and Marion-Poll, A. (2007). The Arabidopsis ABA-deficient mutant aba4 demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* **50** (5): 810–824.

Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T., and Smith, O.E. (1963). Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142** (3599): 1592–1593.

Oh, M.-H., Wang, X., Kota, U., Goshe, M.B., Clouse, S.D., and Huber, S.C. (2009). Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (2): 658–663.

Oh, M.-H., Wu, X., Kim, H.S., Harper, J.F., Zielinski, R., Clouse, S.D., and Huber, S.C. (2012). CDPKs are dual-specificity protein kinases and tyrosine autophosphorylation attenuates kinase activity. *FEBS Lett.*

Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., and Zhu, J.-K. (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (20): 11771–11776.

Olsson, A.S.B., Engstrom, P., and Soderman, E. (2004). The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **55** (5): 663–677.

Ostergaard, L., and Yanofsky, M.F. (2004). Establishing gene function by mutagenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **39** (5): 682–696.

Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., and Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425** (6955): 257–263.

- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, K.-N., Grant, J.J., Li, L., Hung, W., D'Angelo, C., Weinl, S., Kudla, J., and Luan, S.** (2004). The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16** (7): 1912–1924.
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.-F.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.-K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., and Cutler, S.R.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324** (5930): 1068–1071.
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406** (6797): 731–734.
- Priest, D.M., Ambrose, S.J., Vaistij, F.E., Elias, L., Higgins, G.S., Ross, A.R.S., Abrams, S.R., and Bowles, D.J.** (2006). Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **46** (3): 492–502.
- Prowse, C.N., Deal, M.S., and Lew, J.** (2001). The complete pathway for catalytic activation of the mitogen-activated protein kinase, ERK2. *J Biol Chem* **276** (44): 40817–40823.
- Puchta, H., and Fauser, F.** (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J* **78** (5): 727–741.
- Quesada, V., Garcia-Martinez, S., Piqueras, P., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2002). Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130** (2): 951–963.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., and Grill, E.** (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* **15** (7): 395–401.
- Reeves, W.M., Lynch, T.J., Mobin, R., and Finkelstein, R.R.** (2011). Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Mol Biol* **75** (4-5): 347–363.
- Ren, Z., Zheng, Z., Chinnusamy, V., Zhu, J., Cui, X., Iida, K., and Zhu, J.-K.** (2010). RAS1, a quantitative trait locus for salt tolerance and ABA sensitivity in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (12): 5669–5674.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumberras, V., Gonzalez-Guzman, M., Antoni, R., Rodriguez, P.L., and Baena-Gonzalez, E.** (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25** (10): 3871–3884.
- Rodriguez, P.L., Benning, G., and Grill, E.** (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Lett* **421** (3): 185–190.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Galle, A., Kim, T.-H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I., and Rodriguez, P.L.** (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* **150** (3): 1345–1355.

- Rushton, D.L., Tripathi, P., Rabara, R.C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A.K., Langum, T.J., Smidt, L., Boomsma, D.D., Emme, N.J., Chen, X., Finer, J.J., Shen, Q.J., and Rushton, P.J. (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnol J* **10** (1): 2–11.
- Ryan, C.A., and Pearce, G. (2003). Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 2**: 14577–14580.
- Sabbagh, W., JR, Flatauer, L.J., Bardwell, A.J., and Bardwell, L. (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8** (3): 683–691.
- Sadowski, I., Su, T.-C., and Parent, J. (2007). Disintegrator vectors for single-copy yeast chromosomal integration. *Yeast* **24** (5): 447–455.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., and Harper, J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**: S401-17.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.-Y., Marquez, J.A., Cutler, S.R., and Rodriguez, P.L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* **60** (4): 575–588.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., and Uozumi, N. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* **424** (3): 439–448.
- Schena, M., and Davis, R.W. (1992). HD-Zip proteins: members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (9): 3894–3898.
- Scherer, S., and Davis, R.W. (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (10): 4951–4955.
- Schoonheim, P.J., Sinnige, M.P., Casaretto, J.A., Veiga, H., Bunney, T.D., Quatrano, R.S., and Boer, A.H. de (2007). 14-3-3 adaptor proteins are intermediates in ABA signal transduction during barley seed germination. *Plant J* **49** (2): 289–301.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Waner, D. (2001). GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 627–658.
- Schulman, H., Hanson, P.I., and Meyer, T. (1992). Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase. *Cell Calcium* **13** (6-7): 401–411.
- Schulz, P., Herde, M., and Romeis, T. (2013). Calcium-Dependent Protein Kinases: Hubs in Plant Stress Signaling and Development. *PLANT PHYSIOLOGY* **163** (2): 523–530.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* **18** (5): 1121–1133.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* **8** (4): 517–527.

- Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I.** (1993). The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J* **12** (9): 3507–3517.
- Sheen, J.** (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274** (5294): 1900–1902.
- Shen, Q., Zhang, P., and Ho, T.H.** (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* **8** (7): 1107–1119.
- Shigaki, T., Rees, I., Nakhleh, L., and Hirschi, K.D.** (2006). Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. *J Mol Evol* **63** (6): 815–825.
- Sirichandra, C., Davanture, M., Turk, B.E., Zivy, M., Valot, B., Leung, J., and Merlot, S.** (2010). The Arabidopsis ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS ONE* **5** (11): e13935.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.-C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., and Kwak, J.M.** (2009). Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* **583** (18): 2982–2986.
- Soderman, E., Hjellstrom, M., Fahleson, J., and Engstrom, P.** (1999). The HD-Zip gene ATHB6 in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol Biol* **40** (6): 1073–1083.
- Song, C.-P.** (2005). Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-Type Transcriptional Repressor in Abscisic Acid and Drought Stress Responses. *THE PLANT CELL ONLINE* **17** (8): 2384–2396.
- Soon, F.-F., Ng, L.-M., Zhou, X.E., West, G.M., Kovach, A., Tan, M.H.E., Suino-Powell, K.M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M.J., Brunzelle, J.S., Zhang, H., Yang, H., Jiang, H., Li, J., Yong, E.-L., Cutler, S., Zhu, J.-K., Griffin, P.R., Melcher, K., and Xu, H.E.** (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* **335** (6064): 85–88.
- Stael, S., Bayer, R.G., Mehlmer, N., and Teige, M.** (2011). Protein N-acylation overrides differing targeting signals. *FEBS Lett* **585** (3): 517–522.
- Stahl, E.A., Dwyer, G., Mauricio, R., Kreitman, M., and Bergelson, J.** (1999). Dynamics of disease resistance polymorphism at the Rpm1 locus of Arabidopsis. *Nature* **400** (6745): 667–671.
- Stone, S.L., Williams, L.A., Farmer, L.M., Vierstra, R.D., and Callis, J.** (2006). KEEP ON GOING, a RING E3 Ligase Essential for Arabidopsis Growth and Development, Is Involved in Abscisic Acid Signaling. *THE PLANT CELL ONLINE* **18** (12): 3415–3428.
- Strange, A., Li, P., Lister, C., Anderson, J., Warthmann, N., Shindo, C., Irwin, J., Nordborg, M., and Dean, C.** (2011). Major-effect alleles at relatively few loci underlie distinct vernalization and flowering variation in Arabidopsis accessions. *PLoS ONE* **6** (5): e19949.
- Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A.C., and Harper, J.F.** (2000). Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 433–462.

- Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F.F., Christmann, A., and Grill, E.** (2010). Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* **61** (1): 25–35.
- Tan, B.-C., Joseph, L.M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K., and McCarty, D.R.** (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* **35** (1): 44–56.
- Taylor, C.W., and Laude, A.J.** (2002). IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium* **32** (5-6): 321–334.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408** (6814): 796–815.
- Tian, D., Traw, M.B., Chen, J.Q., Kreitman, M., and Bergelson, J.** (2003). Fitness costs of R-gene-mediated resistance in Arabidopsis thaliana. *Nature* **423** (6935): 74–77.
- Townsend, J.A., Wright, D.A., Winfrey, R.J., Fu, F., Maeder, M.L., Joung, J.K., and Voytas, D.F.** (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* **459** (7245): 442–445.
- Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16** (9): 2481–2498.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** (41): 17588–17593.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97** (21): 11632–11637.
- Uno, Y., Rodriguez Milla, M.A., Maher, E., and Cushman, J.C.** (2009). Identification of proteins that interact with catalytically active calcium-dependent protein kinases from Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* **281** (4): 375–390.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K.** (1993). An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5** (11): 1529–1539.
- van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., and van Heusden, G.P.** (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23** (10): 936–946.
- Verslues, P.E., and Bray, E.A.** (2006). Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot* **57** (1): 201–212.

- Vlad, F., Droillard, M.-J., Valot, B., Khafif, M., Rodrigues, A., Brault, M., Zivy, M., Rodriguez, P.L., Merlot, S., and Laurière, C.** (2010). Phospho-site mapping, genetic and in planta activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. *The Plant Journal* **63** (5): 778–790.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Lauriere, C., and Merlot, S.** (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* **21** (10): 3170–3184.
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., and Hetherington, A.M.** (1996). Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* **22**: 45–96.
- Wellmann, C.** (2013). Charakterisierung der calciumabhängigen Proteinkinase GCA2 aus *Arabidopsis thaliana*. Technische Universität München.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmülling, T.** (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98** (18): 10487–10492.
- Wernimont, A.K., Amani, M., Qiu, W., Pizarro, J.C., Artz, J.D., Lin, Y.-H., Lew, J., Hutchinson, A., and Hui, R.** (2011). Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins* **79** (3): 803–820.
- Whalley, H.J., Sargeant, A.W., Steele, J.F.C., Lacoere, T., Lamb, R., Saunders, N.J., Knight, H., and Knight, M.R.** (2011). Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in Arabidopsis. *Plant Cell* **23** (11): 4079–4095.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J.** (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* **2** (8): e718.
- Witte, C.-P., Keinath, N., Dubiella, U., Demouliere, R., Seal, A., and Romeis, T.** (2010). Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated in vivo as part of a kinase cascade that regulates stress response. *J Biol Chem* **285** (13): 9740–9748.
- Xiao, A., Wang, Z., Hu, Y., Wu, Y., Luo, Z., Yang, Z., Zu, Y., Li, W., Huang, P., Tong, X., Zhu, Z., Lin, S., and Zhang, B.** (2013). Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res* **41** (14): e141.
- Xie, T., Ren, R., Zhang, Y.-y., Pang, Y., Yan, C., Gong, X., He, Y., Li, W., Di Miao, Hao, Q., Deng, H., Wang, Z., Wu, J.-W., and Yan, N.** (2012). Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the Arabidopsis thaliana abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. *J Biol Chem* **287** (1): 794–802.
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., and Chen, Q.-J.** (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol* **14** (1): 327.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., and Zhu, J.-K.** (2002). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277** (10): 8588–8596.

- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehling, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C., and Zhong, Y.** (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* **9**: 550.
- Xu, Z.-J., Nakajima, M., Suzuki, Y., and Yamaguchi, I.** (2002). Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiol* **129** (3): 1285–1295.
- Xu, Z.-Y., Lee, K.H., Dong, T., Jeong, J.C., Jin, J.B., Kanno, Y., Kim, D.H., Kim, S.Y., Seo, M., Bressan, R.A., Yun, D.-J., and Hwang, I.** (2012). A vacuolar beta-glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **24** (5): 2184–2199.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and 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** (2): 251–264.
- Yang, Y., Sulpice, R., Himmelbach, A., Meinhard, M., Christmann, A., and Grill, E.** (2006). Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (15): 6061–6066.
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Di Wu, Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J., and Yan, N.** (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* **16** (12): 1230–1236.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J.** (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2** (7): 1565–1572.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., and Shinozaki, K.** (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **43** (12): 1473–1483.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2015). Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant Cell Environ* **38** (1): 35–49.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., and 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** (4): 672–685.
- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2006). CO(2) signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca(2+)-independent phase, and CO(2) insensitivity of the *gca2* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103** (19): 7506–7511.
- Zhang, X.S., and Choi, J.H.** (2001). Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *J Mol Evol* **53** (3): 214–224.

- Zhao, L.-N., Shen, L.-K., Zhang, W.-Z., Zhang, W., Wang, Y., and Wu, W.-H.** (2013). Ca²⁺-dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K⁺ channels in Arabidopsis pollen tubes. *Plant Cell* **25** (2): 649–661.
- Zhao, R., Sun, H.-L., Mei, C., Wang, X.-J., Yan, L., Liu, R., Zhang, X.-F., Wang, X.-F., and Zhang, D.-P.** (2011a). The Arabidopsis Ca(2+) -dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytol* **192** (1): 61–73.
- Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y.-F., Nakano, M., Abdelfattah, A.S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., and Campbell, R.E.** (2011b). An expanded palette of genetically encoded Ca(2+)(+) indicators. *Science* **333** (6051): 1888–1891.
- Zheng, J., Trafny, E.A., Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Eyck, L.F. ten, and Sowadski, J.M.** (1993). 2.2 A refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **49** (Pt 3): 362–365.
- Zheng, L.** (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research* **32** (14): e115.
- Zhou, R., Cutler, A.J., Ambrose, S.J., Galka, M.M., Nelson, K.M., Squires, T.M., Loewen, M.K., Jadhav, A.S., Ross, A.R.S., Taylor, D.C., and Abrams, S.R.** (2004). A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiol* **134** (1): 361–369.
- Zhu, S.-Y., Yu, X.-C., Wang, X.-J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.-C., Shang, Y., Du, S.-Y., Wang, X.-F., Wu, F.-Q., Xu, Y.-H., Zhang, X.-Y., and Zhang, D.-P.** (2007). Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* **19** (10): 3019–3036.
- Zou, J.-J., Wei, F.-J., Wang, C., Wu, J.-J., Ratnasekera, D., Liu, W.-X., and 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** (3): 1232–1243.
- Zou, X., Peng, T., and Pan, Z.** (2008). Modeling specificity in the yeast MAPK signaling networks. *J Theor Biol* **250** (1): 139–155.

Danksagung

Herausforderungen machen das Leben interessant, sie zu lösen bringt uns voran. Mein Dank gilt daher Prof. Dr. Erwin Grill für besondere und vielfältige Herausforderungen während meiner Promotion am Lehrstuhl für Botanik.

Ihm, Dr. Alexander Christmann und Dr. Farhah Assad gilt zudem mein Dank für kritisches Lesen von Teilen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Sophie, die mit mir trotz höchstem Zeitdruck den Kampf gegen den Fehler-teufel aufgenommen hat. Du hast es auch bald geschafft!

In erster Linie geht mein Dank an die Kollegen, die mit mir während der letzten Jahre hervorragend zusammengearbeitet und durch ihren Einsatz zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Den Gärtnern, Michael und Caro für die Mitarbeit an Suppressor Screens und insbesondere Lisa für die hervorragende Versorgung meiner Pflanzen. Meinen Büro-Kumpanen Chrisi und Korny, sowie Peppi und Beate für technische und organisatorische Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei alle denen bedanken, die eher indirekt durch ihre Anwesenheit einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. In erster Linie den Doktoranden des Lehrstuhls für Botanik, aber auch unsere diversen Anhängseln und jenen die mir am Lehrstuhl freundschaftlich verbunden sind (ich verzichte auf eine Auflistung der Namen, um niemand zu vergessen). Eine Promotion ist wie eine Achterbahnfahrt, es gibt Höhen und wahrscheinlich deutlich mehr Tiefen. Um die durchzustehen muss man sich vor allem in seinem privaten Umfeld wohl fühlen. Das war die letzten Jahre dank dieser hervorragenden Arbeitsgruppe und etlicher sozialer Events, auch über die Grenzen von Freising hinaus, definitiv der Fall.

Ansonsten möchte ich mich noch bei unserer Kicktipp Runde für zwei gesponserte Trikots bedanken. Und muss mich für das Punktsystem entschuldigen, das dieses Jahr, dank Korny erwiesenermaßen, nicht ganz optimal war. Zu guter Letzt gilt mein Dank unserer Pokerrunde für die Anschluss-Finanzierung während des Schreibens meiner Arbeit.