

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

## Signaltransduktion bei Trockenstress in *Arabidopsis thaliana*

Michał Jan Kępka

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. K. Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill  
2. apl. Prof. Dr. R. A. Torres Ruiz

Die Dissertation wurde am 29.05.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.07.2012 angenommen.

*für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>Zusammenfassung</b> .....	9
<b>Summary</b> .....	11
<b>1. Einleitung</b> .....	13
1.1. Abscisinsäure .....	13
1.1.1. Biosynthese und Abbau von Abscisinsäure .....	13
1.1.2. Abscisinsäure-Rezeptor .....	15
1.1.2.1. Bet v 1-Superfamilie.....	16
1.1.2.2. RCAR-Proteine als Interaktionspartner von PP2Cs .....	17
1.1.2.3. Struktur eines Rezeptors.....	19
1.1.3. Regulation der Schließzellen.....	21
1.1.4. Regulation der Genexpression.....	22
1.2. Trockentoleranz bei Pflanzen.....	25
1.2.1. Aquaporine .....	26
1.2.2. MSLs .....	27
1.2.3. Histidinkinasen .....	29
1.3. Zielsetzung der Arbeit .....	32
<b>2. Ergebnisse</b> .....	34
2.1. Osmotischer Stress.....	34
2.1.1. Etablierung und Durchführung eines Screens .....	34
2.1.1.1. Aktivierung des Reporters durch osmotischen Stress in der Kontrolllinie <i>pAtHB6::LUC</i> .....	34
2.1.1.2. Isolierung von Kandidaten und Bestätigung des erwarteten Phänotyps. ....	37
2.1.1.3. Histidinkinasen und MSL-Kanäle in <i>Arabidopsis thaliana</i> als mögliche Osmosensoren .....	40
2.1.2. Charakterisierung der <i>hrw2</i> -Mutante.....	47
2.1.2.1. Reporterexpression in Keimlingen .....	47
2.1.2.2. Reporterexpression in Protoplasten.....	48
2.1.2.3. Stomataöffnung.....	49
2.1.2.4. Keimung .....	51
2.1.2.5. Wurzelwachstum.....	53
2.1.3. Positionelle Klonierung von <i>hrw2</i> .....	54

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.3.1.	Physikalische und genetische Karte des Mutanten-Locus .....	54
2.1.3.2.	Identifizierung der Punktmutation via <i>whole genome sequencing strategy</i> .....	55
2.1.4.	Phänotypischer Vergleich zwischen <i>spirrig</i> - und <i>hrw2</i> -Mutante.....	57
2.2.	Biochemische Vorstufen und Katabolite der Abscisinsäure.....	59
2.2.1.	Physiologische Aktivität von ABA-Vorstufen und Kataboliten.....	59
2.2.1.1.	Regulation von Keimung, Wurzelwachstum und Spaltöffnungen .....	59
2.2.1.2.	Aktivität im transienten System.....	64
2.2.2.	<i>In vitro</i> Regulation des ABA-Rezeptorkomplexes .....	66
2.2.2.1.	Regulation von verschiedenen ABA-Rezeptoren .....	66
2.3.	Synthetische ABA-Derivate .....	71
2.3.1.	<i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> -Aktivität von ABA-Analogen .....	71
2.3.1.1.	Regulation von Keimung, Wurzelwachstum und Spaltöffnungen .....	71
2.3.1.2.	Aktivität von ABA-Analogen in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten.....	74
2.3.2.	<i>In vitro</i> Aktivität von ABA-Derivaten.....	75
2.3.2.1.	Regulation der ABA-Rezeptoren.....	75
2.4.	Aktivität von Fusicoccin bei der Regulation des ABA-Rezeptors .....	79
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>80</b>
3.1.	AHKs und MSLs als Kandidaten für Osmosensoren.....	80
3.2.	HRW2 ist ein WD40/BEACH-Domänen-Protein.....	84
3.3.	Aktivität der ABA-Vorstufen und ABA-Katabolite .....	97
3.4.	Aktivität der ABA-Analogen .....	102
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>105</b>
4.1.	Physiologische Methoden.....	105
4.1.1.	Pflanzenmaterial und Anzucht.....	105
4.1.2.	Sterilisation der <i>Arabidopsis</i> -Samen .....	105
4.1.3.	Osmotischer Stress an Keimlingen .....	106
4.1.4.	Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Keimlingen.....	106
4.1.5.	Keimungsversuche .....	107
4.1.6.	Wurzelwachstumsversuche.....	107
4.1.7.	Spaltöffnungsversuche .....	107
4.1.8.	Bestimmung der Spaltöffnungsweite .....	108
4.1.9.	Isolierung der <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten.....	108
4.1.10.	Transfektion der Protoplasten .....	109
4.1.11.	Messung der $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten .....	110
4.1.12.	Messung der Luciferase-Aktivität in Protoplasten.....	110
4.2.	Molekularbiologische Methoden.....	111

4.2.1.	<i>Escherichia coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung .....	111
4.2.2.	Herstellung kompetenter Zellen.....	112
4.2.3.	Transformation kompetenter Mikroorganismen mit Plasmid-DNA .....	112
4.2.4.	Methoden der DNA-Isolation .....	113
4.2.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	114
4.2.6.	Agarose-Elektrophorese .....	115
4.2.7.	Größenstandards .....	116
4.2.8.	DNA-Aufreinigung .....	116
4.2.9.	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen.....	116
4.2.10.	Dephosphorylierung geschnittener DNA.....	117
4.2.11.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	117
4.2.12.	DNA-Sequenzierung.....	117
4.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	117
4.3.1.	Proteinexpression.....	117
4.3.2.	Aufreinigung und Dialyse .....	118
4.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS).....	119
4.3.4.	Coomassie-Färbung.....	120
4.3.5.	Phosphatase-Aktivitätsassay .....	121
4.3.6.	Größenstandards .....	122
4.4.	Chemikalien und Gärete.....	122
4.4.1.	Geräte.....	122
4.4.2.	Chemikalien/Reagenzien.....	123
4.4.3.	Enzyme, Plasmide, Vektoren .....	124
4.5.	In silico Analyse.....	124
<b>5.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>125</b>
5.1.	Oligonukleotide .....	125
5.2.	Konstrukte.....	128
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>129</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>149</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>151</b>

### Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyssäure
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABI	Abscisinsäure-insensitiv
ABRE	<i>ABA-Response Element</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AHG	<i>ABA-Hypersensitive Germination</i>
Amp	Ampicillin
AREB	<i>ABA-Response Element Binding Protein</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CBL	<i>Calcineurin B-like Protein</i>
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	<i>Coupling Element</i>
CIPK	<i>CBL-Interacting Kinase</i>
Col	Ökotyp Columbia
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DRE	<i>Drought-Response Element</i>

DREB	<i>Drought-Response Element Binding Protein</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	und andere (lateinisch)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung $1g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GUS	$\beta$ -D-Glucuronidase
h	Stunde
HAB	<i>Hypersensitive to ABA</i>
HAI	<i>Highly ABA-induced</i>
HRW	<i>hypersensitive to restricted water supply</i>
Kan	Kanamycin
$K_d$	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Nährmedium
<i>Ler</i>	Ökotyp <i>Landsberg Erecta</i>
LUC	Luciferase
M	mol/l
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MPa	Megapascal
mQ	milliQ-destilliertes Wasser
MS	Massenspektrometrie bzw. Murashige&Skoog-Nährmedium
MUG/MUP	Methylumbelliferylglucuronid/-phosphat
OD	Optische Dichte
OST	<i>Open Stomata</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

PKA	Proteinkinase A
PP2C	Proteinphosphatase des Typs 2C
PR-10	<i>Pathogenesis-Related 10</i>
PYR1/PYL	<i>Pyrabactin-Resistant 1/Pyrabactin-Resistant Like</i>
RCAR	<i>Regulatory Component of ABA Receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SnRK	<i>Sucrose non-fermenting Related Kinase</i>
SOS	<i>Salt Overly Sensitive</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>
z.B.	zum Beispiel



### Zusammenfassung

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) steuert als zentraler Auslöser von pflanzlichen Schutzmechanismen die Anpassung an abiotischen Stress wie Trockenheit und Salinität. Darüber hinaus reguliert ABA das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze. Abiotischer Stress wird als extrazelluläres Signal durch bisher noch nicht identifizierte Sensoren wahrgenommen und führt über bislang unbekannte Signalkaskaden zur Aktivierung der ABA-Biosynthese. Durch diese Signalkette wird ein externes Signal in ein internes, chemisches Signal - die Abscisinsäure - umgewandelt. Die Signalkaskade von der Stress-Perzeption bis zur Aktivierung der ABA-Biosynthese wird in dieser Arbeit als frühe Stress-Signaltransduktion bezeichnet. Nach der Perzeption von ABA durch den ABA-Rezeptorkomplex schließen sich Signaltransduktionsprozesse an, die in den letzten Jahren aufgeklärt wurden. Diese Signalwege führen zum Stomataschluß und zur umfassenden Änderung der Genexpression. Am Lehrstuhl für Botanik wurde ein Reportersystem zur *in vivo*-Visualisierung der ABA-Aktivität in transgenen Pflanzen entwickelt. In der Reporterlinie *pAtHB6::LUC* führt dabei die durch Einwirkung von osmotischem Stress induzierte ABA-Bildung zu vermehrter Expression des Reportergens Luciferase. Die EMS-mutagenisierte Reporterlinie wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Suche nach Mutanten mit gestörter früher Stress-Signaltransduktion verwendet. Es wurde ein entsprechender Screen etabliert und mehrere Mutanten gefunden, die eine osmohypersensitive Aktivierung des Reporters zeigten. Da die Hypersensitivität jedoch sowohl auf Störungen der frühen Stress-Signaltransduktion als auch auf eine veränderte ABA-Signaltransduktion zurückgehen könnte, erfolgte eine Charakterisierung der gefundenen Mutanten mit Hilfe exogener ABA. Auf das Phytohormon reagierten allerdings alle gefundenen Mutanten hypersensitiv, womit für diese Linien eine Störung in der frühen Stress-Signaltransduktion ausgeschlossen werden konnte. Eine von Dr. A. Christmann in einem parallelen Screen isolierte und für diese Arbeit zur Verfügung gestellte Mutante, *hrw2*, zeigte dagegen bei Hypersensitivität gegenüber osmotischem Stress eine Wildtyp-ähnliche Aktivität des Reporters in Gegenwart von ABA. In *hrw2* ist damit die frühe Stress-Signaltransduktion von der Mutation betroffen. Die positionelle Klonierung führte zur Identifizierung einer Punktmutation im letzten Exon des Gens At1g03060, durch die ein Codon für Tryptophan zu einem STOP-Codon wird. Saedler et al. zeigten, dass Punktmutationen in diesem für ein ca. 400kDa großes, SPIRRIG genanntes Protein kodierendes Gen zu morphologischen Änderungen an den Trichomen führen. Der Trichom-Phänotyp ist ebenfalls in *hrw2* zu finden. In der F<sub>1</sub>-Generation aus Kreuzungen zwischen den SPIRRIG-Mutanten *spi-11* bzw. *spi-12* und *hrw2* wurde weder der Trichom-Phänotyp noch die hypersensitive Aktivierung des ABA-Reporters komplementiert was zeigt, dass *SPIRRIG* und *HRW2* allelisch sind. Die physiologische Analyse

## Zusammenfassung

---

der *hrw2*-Mutante zeigte außer der hypersensitiven ABA-Reporteraktivität keinen deutlichen, von osmotischem Stress bzw. ABA abhängigen Phänotyp. Die Funktion von HRW2 bei der frühen Stress-Signaltransduktion bleibt noch aufzuklären.

Ergänzend wurden Histidinkinasen und mechanosensitive Kanäle von *Arabidopsis thaliana* als mögliche primäre Signalelemente der Stress-Signaltransduktion in Betracht gezogen. Bei der Charakterisierung sowohl von *ahk*-Mutanten (*ahk1*, *ahk2*, *ahk3*, *cre1*) als auch von *msl*-Mutanten (*msl9-10*, *msl4-5-6* und *msl4-5-6-9-10*) ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine gestörte Stress-Signaltransduktion als Folge einer Dysfunktion der genannten Gene.

Die Entdeckung des ABA-Rezeptors führte zur Aufklärung des zentralen Mechanismus der ABA-Signaltransduktion, bei dem in Gegenwart von ABA die Blockade des Signalwegs durch Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2Cs) aufgehoben wird. Es wurde nachgewiesen, dass die als PP2C-Interaktionspartner identifizierten RCAR/PYR1/PYL-Proteine im Komplex mit Abscisinsäure die Phosphataseaktivität inhibieren, was zur Aktivierung von SnRK2-Kinasen führt und dadurch den ABA-abhängigen Signalweg in Gang setzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivierung der ABA-Antwort durch ABA-Vorstufen, ABA-Metaboliten und synthetische *S*- bzw. *R*-ABA-Analoga sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Frühere Untersuchungen zeigten zum Teil eine ausgeprägte ABA-ähnliche physiologische Aktivität der ABA-Vorstufen und ABA-Metabolite. Insofern war die Frage ungeklärt, inwieweit diese ABA-Katabolite als Signal fungieren. In dieser Arbeit konnte unter Verwendung von in der ABA-Biosynthese gestörten Mutanten gezeigt werden, dass die ABA-Vorstufen Xanthoxin, ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol *in vitro* in geringem Ausmaß die PP2C-Aktivität im Komplex mit RCAR-Proteinen zu hemmen vermögen, *in planta* aber zur aktiven Abscisinsäure konvertiert werden und dadurch die entsprechenden physiologischen Antworten auslösen. Die ABA-Metabolite zeigten dagegen keine physiologische Aktivität, regulierten aber *in vitro* moderat die PP2C ABI2 im Komplex mit RCAR1/3/11. Die mit ABA-Analogen durchgeführten Experimente ergaben, dass nur die jeweiligen *S*-Formen, nicht aber die *R*-Formen eine ABA-ähnliche Aktivität *in vivo* besaßen. *In vitro* waren die ABA-Analogen unterschiedlich aktiv, was für eine unterschiedliche Stereospezifität der untersuchten ABA-Rezeptorkomplexe spricht.

## Summary

The phytohormone abscisic acid (ABA) is a central regulator of protection mechanisms in plants, which controls drought and salt tolerance and in addition regulates growth and development. Abiotic stress is sensed as an extracellular signal by not yet identified sensors, thereby inducing ABA biosynthesis via an unknown signaling cascade.

The external signal is thus converted into an internal, chemical signal which is ABA. In this work, the signaling cascade which starts with stress perception and targets ABA biosynthesis is referred to as early stress signal transduction. After perception of ABA by the ABA receptor complex, an intricate signal transduction chain, which has been elucidated during the last years, is activated which triggers stomatal closure and a global change in gene expression. At the Institute of Botany, a reporter system was developed for *in vivo*-visualization of ABA action in transgenic plants. In the ABA reporter line *pAtHB6::LUC*, ABA formation induced by osmotic stress results in increased expression of the reporter gene luciferase. In this work, the EMS-mutagenized ABA reporter line was used to screen for mutants impaired in early stress signal transduction.

A screen was established for mutants, which respond to osmotic stress by a hypersensitive reporter response. In the performed screen, several mutants were found which showed a hypersensitive activation of the reporter in presence of osmotic stress. Since the hypersensitive response could be a result of both an impaired early stress signal transduction and an altered ABA signal transduction, a further characterization of the mutants was carried out using exogenous ABA. All the mutants recovered showed a hypersensitive response to the hormone which indicated that they were not impaired in early stress signal transduction. However, *hrw2* (*hypersensitive to restricted water supply2*), a mutant isolated by Dr. A. Christmann in a parallel screen showed a wild type ABA reporter response but hypersensitive reporter activation in the presence of osmotic stress. *hrw2* thus represents a mutant impaired in early stress signal transduction. Positional cloning complemented by whole-genome sequencing identified a point mutation in the last exon of the At1g03060 gene, which changes a codon for tryptophan to a STOP codon. Saedler et al. demonstrated that mutations in this gene which encodes a 400kDa protein they named SPIRRIG result in trichome morphological alterations. The trichome phenotype is found *hrw2* as well. In the F<sub>1</sub> generation of crosses between *hrw2* and *SPIRRIG* mutants *spi-11* or *spi-12* neither the trichome phenotype nor the osmotic stress hypersensitive reporter response were complemented which indicates allelism between *SPIRRIG* and *HRW2*. The physiological analysis of the *hrw2* mutant showed no mannitol- or ABA-dependent phenotype except the hypersensitive reporter activation by osmotic stress. *HRW2* function in early stress signal transduction remains to be elucidated.

## Summary

---

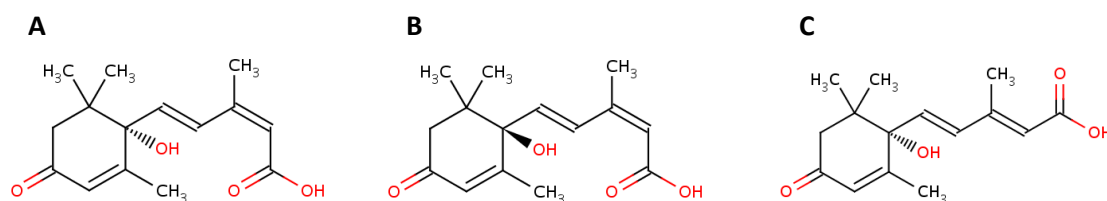
In addition, histidine kinases and mechanosensitive channels of *Arabidopsis thaliana* were tested as possible, primary signalling elements of stress signal transduction. However, the characterization of *ahk* mutants (*ahk1*, *ahk2*, *ahk3*, *cre1*) as well as of *msh* mutants (*msh9-10*, *msh4-5-6* und *msh4-5-6-9-10*) gave no indication of an impaired stress signal transduction to result from a dysfunction of the tested genes.

The discovery of the ABA receptor elucidated the core ABA signalling pathway, where in the presence of ABA the PP2C-dependent inhibition of the ABA signalling pathway is abolished. It was shown, that the RCAR/PYR1/PYL proteins identified as PP2C interaction partners inhibit the protein phosphatase in complex with abscisic acid thereby activating SnRK2 kinases and initiating the ABA-dependent signalling pathway. A further aim of this work was to test the ability of ABA precursors, ABA metabolites and synthetic *S* or *R* forms of ABA analogs to activate the ABA response *in vivo* and *in vitro*. Early reports showed a distinct physiological activity of ABA precursors and ABA metabolites. Thus, the question was still open as to what extent those compounds do act as a signal. Using ABA biosynthesis mutants it could be shown in this work, that ABA precursors such as xanthoxin, ABA alcohol and ABA aldehyde, are capable of inhibiting the protein phosphatase just to a slight extent *in vitro*, but are converted into active ABA *in planta* thereby triggering physiological responses. In contrast, ABA metabolites showed no physiological activity, but were able to moderately regulate ABI2 in complex with RCAR1/3/11 (PYL9/PYL8/PYR11). The experiments with ABA analogs demonstrated, that only *S* not *R* forms exhibited an ABA-like activity *in vivo*. *in vitro*, ABA analog activity varied, which argues for different stereospecificity of analyzed ABA receptor complexes.

## 1. Einleitung

### 1.1. Abscisinsäure

Das Phytohormon Abscisinsäure (Abb. 1-1) wurde als Abscisin II in den 60er Jahren entdeckt und anschließend Abscisinsäure genannt (Addicott et al, 1968; Ohkuma et al, 1963). ABA spielt eine sehr entscheidende Rolle nicht nur in der Adaptation der Pflanzen an biotischen und abiotischen Stress (Christmann et al, 2006; Wasilewska et al, 2008), sondern auch in der Entwicklung der Pflanze in Abwesenheit von Stress (Cheng et al, 2002). Trocken-, Salz- und Kältestress führen zur Erhöhung des ABA-Signals durch eine verstärkte ABA-Biosynthese und einen reduzierten ABA-Metabolismus. Dadurch ist ABA fähig viele Aspekte der Pflanzenentwicklung zu regulieren. Sie steuert den Turgor der Schließzellen, die Keimung, die Dormanz der Samen und das Wachstum (Finkelstein et al, 2002; Mishra et al, 2006; Schroeder et al, 2001a).



**Abbildung 1-1:** Strukturen der Abscisinsäure: (+) (S)-ABA (A), (-) (R)-ABA (B), *trans*-ABA (C).

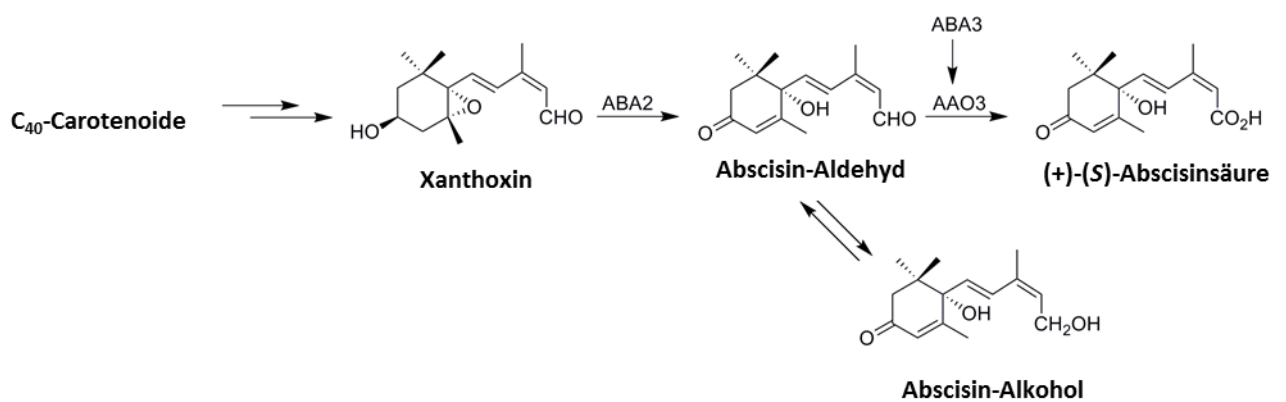
Interessanterweise tritt ABA nicht nur in Pflanzen auf, sondern ist auch in menschlichen Zellen zu finden. ABA wird in menschlichen Granulocytan gebildet, wo sie eine Cytokin-ähnliche Rolle spielt (Bruzzone et al, 2007).

#### 1.1.1. Biosynthese und Abbau von Abscisinsäure

Die ABA-Biosynthese findet hauptsächlich in den Schließzellen der Blätter, Zellen der Wurzeln und in den Parenchymzellen des Leitgewebes statt (Christmann et al, 2005; Nambara & Marion-Poll, 2005) und erfolgt ausgehend von C<sub>40</sub>-Epoxy-Carotinoiden bis zur Vorstufe Xanthoxin in Plastiden. Die Carotinoide werden über Isopentenylidiphosphat ausgehend von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat über den Methylerythritol-4-phosphat-Weg gebildet (Eisenreich et al,

## Einleitung

2004; Wasilewska et al, 2008). Zeaxanthin, Antheraxanthin und Violaxanthin werden durch die Zeaxanthin-Epoxidase ABA1 (Barrero et al, 2005) und Violaxanthin-Deepoxydase ineinander umgewandelt. *trans*-Violaxanthin bzw. *trans*-Neoxanthin wandelt sich zu 9'-*cis*-Violaxanthin oder 9'-*cis*-Neoxanthin um. Beide C<sub>40</sub>-Carotenoide werden von 9-*cis*-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase (NCED) (Schwartz et al, 2001) in *cis*-Xanthoxin (C<sub>15</sub>-Aldehyd) und eine C<sub>25</sub>-Verbindung gespalten, wobei für diese Reaktion Eisen und Sauerstoff benötigt werden (Schwartz et al, 1997). Anschließend wird *cis*-Xanthoxin ins Cytosol transportiert und durch die Alkohol-Dehydrogenase (ABA2) (Cheng et al, 2002; Gonzalez-Guzman et al, 2002) in Abscisin-Aldehyd umgewandelt, der anschließend durch die Abscisin-Aldehyd-Oxidase (AAO3) (Nambara & Marion-Poll, 2005; Seo et al, 2000) zur Abscinsäure konvertiert wird (Abb. 1-2).



**Abbildung 1-2:** ABA-Biosynthese (verändert nach Kepka et al., 2011).

Für die Funktionalität der Aldehyd-Oxydase (AAO3) ist ein Molybdän-Co-Faktor erforderlich, für dessen Synthese die Aktivität von ABA3 benötigt wird. Im kleinen Biosyntheseweg kann ABA-Aldehyd durch eine P450-Monooxygenase in Abscisin-Alkohol umgewandelt werden (Rock & Zeevaart, 1991).

Der ABA-Abbau erfolgt über eine Hydroxylierung der 7', 8' oder 9' Methyl-Gruppe (Abb. 1-3), wobei die entstehenden Produkte teilweise biologische Aktivität aufweisen können (Jadhav et al, 2008; Zhou et al, 2004). Die 8'-Hydroxylierung wird durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (CYP707A) katalysiert. Anschließend isomerisiert 8'-OH-ABA zur Phaseinsäure (PA) (Krochko et al, 1998), die zu DPA durch eine unbekannte Reuktase konvertiert wird. Die Abscinsäure und ihre Katabolite können an Glucose konjugiert werden (Nambara & Marion-Poll, 2005), was im Falle der ABA zur Bildung des ABA-Glucose-Esters führt. Diese Verbindung gilt als Transport- und Lagerungsform der Abscinsäure (Jiang & Hartung, 2008; Wilkinson & Davies, 2002). ABA kann aus dieser Form durch eine Stress-aktivierte  $\beta$ -Glucosidase freigesetzt werden (Lee et al, 2006).

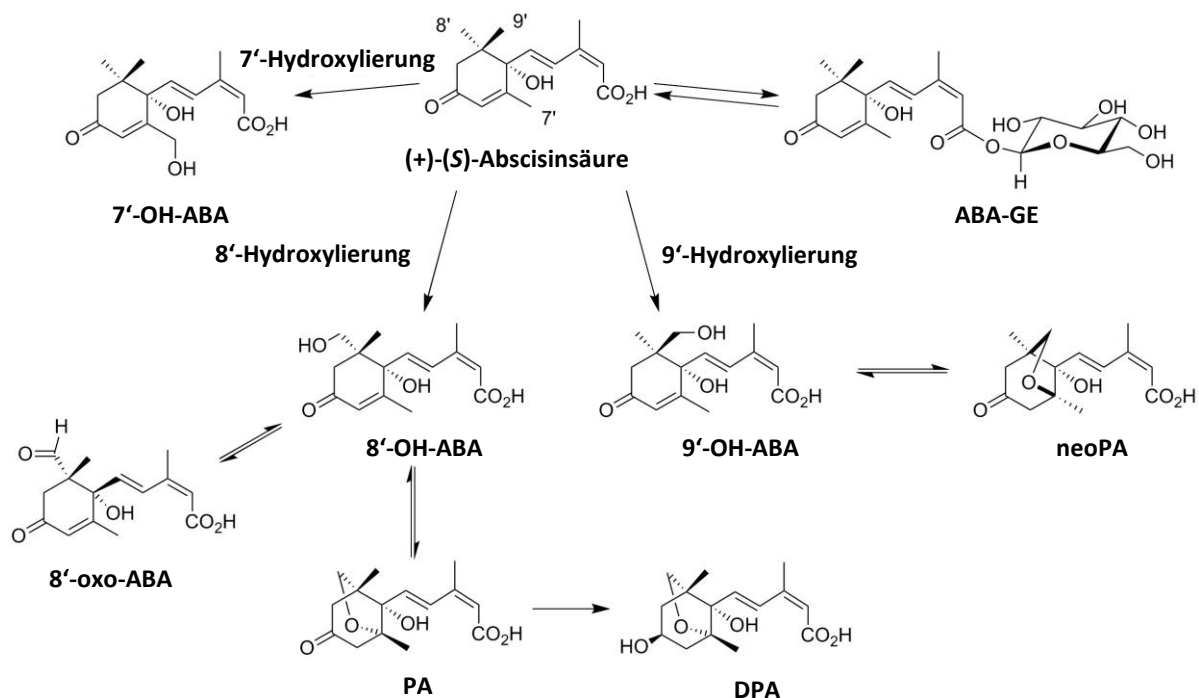


Abbildung 1-3: Abbau der Abscisinsäure (verändert nach Kepka et al., 2011).

### 1.1.2. Abscisinsäure-Rezeptor

Als erster vermeintlicher ABA-Rezeptor wurde 2006 FCA, ein RNA-Bindeprotein und Blütezeitregulator identifiziert (Razem et al, 2006). Es wurde aufgrund der Homologie zu ABAP1 in Gerste, welches ABA bindet (Razem et al, 2004), postuliert, dass die Bindung von ABA an FCA zu einer Störung der Blütenentstehung führt (Razem et al, 2006). Allerdings besitzt ABAP1 keine RNA-Bindestellen. Durch mit radioaktiv markierter ABA durchgeführte Experimente konnte nicht nachgewiesen werden, dass FCA in der Lage ist, Abscisinsäure zu binden (Risk et al, 2008). Danach wurde die Veröffentlichung von Razem et al. zurückgezogen.

Als zweites ABA-Bindeprotein wurde die H-Untereinheit der Magnesium-Protoporphyrin IX-Chelatase (CHIH/ABAR/GUN5) postuliert, die eine Rolle bei der Synthese des Chlorophyllprecursors spielt. Es zeigte sich, dass CHIH Abscisinsäure mit einer hohen Affinität ( $K_D=32$  nM) binden kann (Shen et al, 2006). Es wurde, gezeigt dass die Mg-Protoporphyrin IX-Chelatase in Kern und Chloroplasten die Genexpression reguliert (Kropat et al, 1997; Strand et al, 2003). Der Transkriptionsfaktor ABI4 wird in diesem Signalweg reguliert (Koussevitzky et al, 2007). Weitere Untersuchungen bewiesen, dass ein CHIH-Homolog in Gerste die Abscisinsäure nicht bindet (Muller & Hansson, 2009) und lassen darum bezweifeln, dass es sich bei CHIH um einen ABA-Rezeptor handelt.

## Einleitung

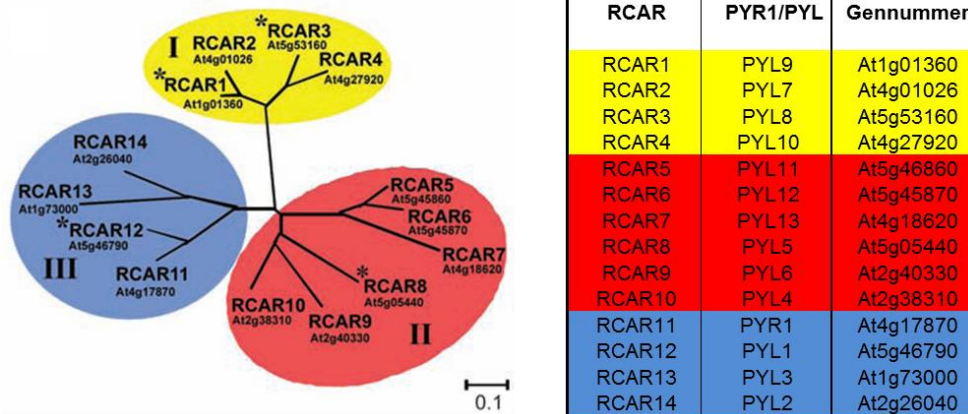
---

Als dritter Kandidat wurde das GCR2-Protein (*G-proteine coupled receptor homologue 2*), ein Interaktionspartner von GPA1, als ABA-Rezeptor postuliert (Liu et al, 2007). GPA1 ist die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Protein-Komplexes (Jones & Assmann, 2004). Die ABA-Bindung an GCR2 soll den  $G\alpha\beta\gamma$ -Heterocomplex trennen, was zu einer Aktivierung der ABA-Effektoren führt. Allerdings konnte man in weiteren Untersuchungen weder den ABA-spezifischen Phänotyp reproduzieren (Chen, 2008; Gao et al, 2007; Guo et al, 2008) noch die ABA-Bindung nachweisen (Risk et al, 2009). Außerdem besitzt GCR2 nicht die typischen sieben Transmembrandomänen eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Johnston et al, 2007). Dies gilt auch für die GPCR-Proteine (*GPCR-type G proteins*) GTG1 und GTG2 mit neun Transmembrandomänen (Pandey et al, 2009). GTGs sind in der Plasmamembran lokalisiert, besitzen eine GTP-Bindestelle und eine GTPase-Aktivität. Die *gtg1gtg2*-Doppelmutante zeigt ABA-Hypersensitivität in der Keimung und hinsichtlich des Wurzelwachstums (Pandey et al, 2009). Die Regulation der Spaltöffnungen zeigte keine veränderte Abscisinsäure-Empfindlichkeit. Allerdings konnte die ABA-Bindung an GTG1 und GTG2 nicht überzeugend gezeigt werden.

### 1.1.2.1. Bet v 1-Superfamilie

In 2009 wurden unabhängig von zwei Gruppen die cytosolischen, ABA-bindenden RCAR-Proteine (*Regulatory Component of ABA Receptor*) bzw. PYR1/PYL-Proteine (*Pyrabactin-resistance 1/-like*) entdeckt, die im Komplex mit Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2Cs) einen funktionellen ABA-Rezeptor bilden (Ma et al, 2009; Park et al, 2009). Die RCAR-Proteine gehören zur Bet v 1-Superfamilie, zeigen starke Sequenz- und Strukturhomologie zu dem Birkenpollenallergen Bet v 1a (Iyer et al, 2001; Radauer et al, 2008) und werden in drei Klassen eingeteilt (Abb. 1-4).





**Abbildung 1-4:** Phylogenetischer Baum der RCAR-Proteine (Ma et al., 2009). Die Tabelle gibt die entsprechende PYR1/PYL-Bezeichnung für die RCAR-Proteine an.

Die gemeinsame Eigenschaft der Proteine aus der Bet v 1-Superfamilie (auch bekannt als START-Proteine) ist ihre Struktur. Sie besteht aus sieben  $\beta$ -Faltblattstrukturen und zwei  $\alpha$ -Helices, die eine C-terminale  $\alpha$ -Helix umfassen und damit ein *helix-grip fold* Motiv formen (Iyer et al, 2001; Radauer et al, 2008). Die START-Proteine wurden auch in Säugtieren gefunden, wo sie eine sehr wichtige Rolle beim Cholesterin-Transport spielen (Stocco, 2001). Es wurde gezeigt, dass die Mitglieder der Bet v 1-Superfamilie Cytokinine und Brassinosteroide binden (Fernandes et al, 2008; Markovic-Housley et al, 2003; Pasternak et al, 2006). Die PR-10-Proteine, die ebenfalls zu der Bet v 1-Superfamilie gehören, regulieren sowohl die Abwehr gegen Mikroorganismen als auch abiotische Stresstoleranz (Liu & Ekramoddoullah, 2006). Die Assoziierung der START-Domäne mit Homöodomänen von Transkriptionsfaktoren kann zur Lipid-abhängigen Genexpression führen (Ponting & Aravind, 1999). Zu der Bet v 1-Superfamilie gehören außerdem Norcoclaurinsynthasen (NCS) (Samanani et al, 2004) und die CSBPs (*cytokinin-specific binding proteins*) (Fujimoto et al, 1998).

Die Funktion der RCAR/PYR1/PYL-Proteine in der ABA-Signaltransduktion wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

### 1.1.2.2. RCAR-Proteine als Interaktionspartner von PP2Cs

Die PYR1/PYL/RCAR-Proteine wurden von zwei Gruppen unabhängig entdeckt. Das PYR1-Protein wurde während der Charakterisierung eines synthetischen, selektiven ABA-Agonisten, Pyrabactin, von Park et al. entdeckt (Park et al, 2009). Da es sich bei Pyrabactin um einen Keimungsinhibitor handelt, wurde ein Screen auf hinsichtlich der Keimung Pyrabactin-insensitive Mutanten durchgeführt. In der so gefundenen *pyr1*- Mutante wurde *PYR1*

## Einleitung

---

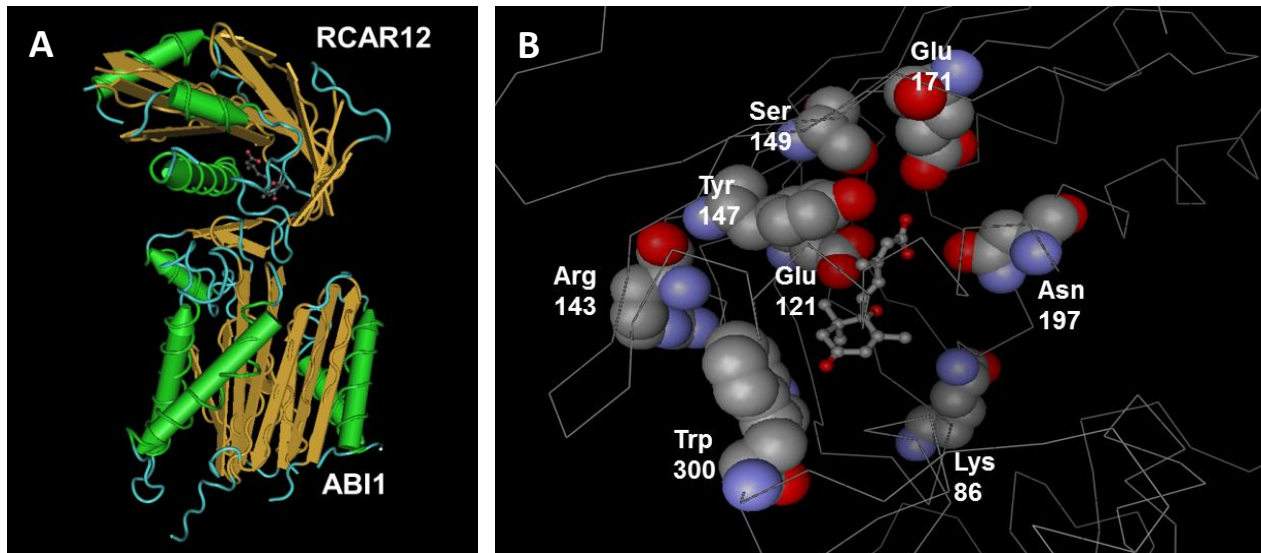
als das betroffene Gen kloniert. In einem *yeast-two hybrid*-Screen (Y2H) suchten Park et al. dann nach einem Protein, das in Anwesenheit von Pyrabactin mit PYR1 interagiert. Es zeigte sich, dass sowohl Abscisinsäure als auch Pyrabactin eine Bindung und Inhibierung der Proteinphosphatasen des Typs 2C ABI1, ABI2 und HAB1 in Gegenwart von PYR1 und zusätzlichen 13 PYL-Proteinen (*PYR1-like*) auslösen. Gleichzeitig konnten Ma et al. in einem Y2H-Screen zeigen, dass ABI2 konstitutiv mit RCAR1 (PYL9) und RCAR3 (PYL8) interagiert (Ma et al, 2009). Die Proteinphosphatasen des Typs 2C sind an zahlreichen Singaltransduktionswegen in Prokaryoten und Eukaryoten beteiligt. In *Arabidopsis thaliana* wurden 76 derartige Phosphatasen gefunden (Kerk et al, 2002) und, bis auf 6 Vertreter die nicht zugeordnet werden konnten, in 10 Gruppen eingeteilt (Schweighofer et al, 2004). Alle sind  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  abhängige, monomere Enzyme. Neun von diesen Proteinen gehören zur Gruppe A und regulieren die ABA-Signaltransduktion, wie die Phosphatasen ABI1 und ABI2, die in den 90er Jahren in einem Screen nach ABA-insensitiven Mutanten entdeckt wurden (Leung et al, 1997; Meyer et al, 1994; Rodriguez et al, 1998a). Auf Grund der Sequenzähnlichkeit wurden HAB1 (*HOMOLOGY TO ABI1*) und HAB 2 isoliert (Saez et al, 2004), AHG1 und AHG3 wurden aus einem genetischen Screen kloniert (Kuhn et al, 2006; Nishimura et al, 2007; Yoshida et al, 2006). Die *loss of function*-Mutanten der Gruppe A PP2Cs weisen einen ABA-hypersensitiven Phänotyp auf (Hirayama & Shinozaki, 2007). Die PP2Cs werden in der Pflanze unterschiedlich exprimiert: ABI1 kommt in allen Geweben vor, während AHG1 und AHG3 grundsätzlich in Samen exprimiert werden (Nishimura et al, 2007; Umezawa et al, 2009). Es wurde gefunden, dass RCAR10/12/13/14 (PYL4/1/3/2) nur in Anwesenheit von ABA mit PP2Cs interagieren (Nishimura et al, 2010). RCAR1 bindet ABA mit einer Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) von 660 nM, wobei sich in Anwesenheit von ABI2 die Affinität 10-fach erhöht und der  $K_d$  dann bei 64 nM liegt (Ma et al, 2009). Dies spricht für eine PP2C-abhängige Stabilisierung der ABA-Bindung (Melcher et al, 2009; Miyazono et al, 2009; Nishimura et al, 2009; Santiago et al, 2009a; Yin et al, 2009). Die Interaktion von PP2Cs mit RCAR/PYR1/PYL-Proteinen wurde über bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in *Arabidopsis*-Protoplasten bzw. Coimmunopräzipitations-Versuchen für das Zytoplasma und den Nukleus bestätigt (Ma et al, 2009; Santiago et al, 2009b), wobei nur RCAR7/PYL13 keine Regulation der ABA-Signaltransduktion in Protoplasten aufwies (Fujii et al, 2009). Die Bindung an RCAR1/PYL9 zeigt eine starke Stereospezifität für (+)-ABA, während RCAR8/PYL5 auch (-)-ABA bindet. Die  $K_d$ -Werte liegen für RCAR8/PYL8 und *S*- bzw. *R*-ABA bei 1,1  $\mu$ M bzw. 19,1  $\mu$ M (Santiago et al, 2009b). RCAR10/13/14 (PYL4/3/2) interagieren im Y2H mit HAB1 in Anwesenheit von 10  $\mu$ M (+)- und (-)-ABA. (Park et al, 2009). Die *pyr1/pyl1/pyl4* (*rcar11/rcar12/rcar10*) Tripel-Mutante und *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* (*rcar11/rcar12/rcar14/rcar10*) Quadrupel-Mutante zeigten beide eine reduzierte ABA-Sensitivität in Keimung und Wurzelwachstum (Park et al, 2009). Die

Quadrupel-Mutante zeigte eine reduzierte, ABA-abhängige Aktivierung der SnRK-Kinasen. Überexpression von RCAR1/PYL9 verleiht ABA-Hypersensitivität (Ma et al, 2009).

### 1.1.2.3. Struktur eines Rezeptors

Die Entdeckung des ABA-Rezeptors führte zu kristallographischen Studien, in denen sowohl die Struktur einer apo-Form als auch eines Rezeptors, der ABA gebunden hatte, dargestellt werden konnten (Melcher et al, 2009; Miyazono et al, 2009; Nishimura et al, 2009; Santiago et al, 2009a; Yin et al, 2009). Die Strukturuntersuchungen bewiesen, dass ungebundene Rezeptoren als Homodimere vorkommen, während die mit PP2C-gebundene Form zur PP2C in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 steht (Nishimura et al, 2009; Santiago et al, 2009a; Yin et al, 2009). Es wurde gezeigt, dass ABA eine Dissoziation des RCAR11/PYR1- bzw. RCAR14/PYL2-Homodimers induziert. (Nishimura et al, 2009; Yin et al, 2009). Die ABA-Bindung an den RCAR11/PYR1-Rezeptor erfordert die Anwesenheit des *helix-grip fold* Motivs. Die Struktur formt eine Bindestelle, die in Abwesenheit von einem Liganden in der offenen Form vorkommt. Die Struktur der Bindestelle und der ABA-Enantiomere deutet an, dass die vier Formen der ABA (vgl. Abb. 1-1) an Rezeptoren mit verschiedenen Affinitäten gebunden werden können, wie die ABA-Bindung an RCAR8/PYL5 zeigt (Santiago et al, 2009b). Es stellte sich heraus, dass die C2'-Methylgruppe und die C'6-Dimethylgruppe für die Stereospezifität äußerst wichtig sind. Bei der ABA-Bindung wird die Konformation des PYR1/RCAR11-Proteins geändert (Nishimura et al, 2009; Santiago et al, 2009a), die  $\beta$ 3-  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5-  $\beta$ 6 Schleifen klappen über ABA und decken sie ab. In einer apo-Form des Rezeptors formen die Schleifen eine offene Konformation und erlauben dem Liganden einen Eingang in die Bindestelle. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei der ABA-Bindung an RCAR14/PYL2 entdeckt (Yin et al, 2009).

Die Krystalstrukturen der Holorezeptorkomplexe RCAR12 (PYL1)-ABA-ABI1 (Abb. 1-5A, 1-5B) und RCAR14 (PYL2)-ABA-HAB1 (Melcher et al, 2009; Miyazono et al, 2009; Yin et al, 2009) zeigten, dass die RCAR-Proteine mit der jeweiligen PP2C über  $\beta$ 3- $\beta$ 4,  $\beta$ 5- $\beta$ 6 und  $\beta$ 7- $\alpha$ 5 Schleifen in Kontakt stehen.



**Abbildung 1-5:** A, die Struktur des RCAR12 (PYL1)-ABA-ABI1-Rezeptors (verändert nach Miyazono et al. Nature 2009). B, die in der ABA-Bindung involvierten Aminosäurereste. Markiert wurden sieben Aminosäuren des RCAR12 Proteins sowie Tryptophan 300 der ABI1-Phosphatase.

Die Phosphatase berührt den Rezeptor im Bereich ihrer katalytischen Tasche über einen Tryptophan-Rest an der Position 300 (Abb. 1-5B). Serin 112 von RCAR12/PYL1 bzw. Serin 82 von RCAR14/PYL2 bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit Glycin 180 von ABI1 bzw. mit Glycin 246 von HAB1 und mit Glutaminsäure 142 von ABI1 bzw. Glutaminsäure 203 von HAB1. In diesem aus drei Teilen bestehenden Komplex wird die katalytische Tasche der PP2C von der  $\beta$ 3- $\beta$ 4 Schleife des RCAR-Proteins blockiert, der ganze Rezeptor-Komplex wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Das Tryptophan 300 von ABI1 bzw. Tryptophan 385 von HAB1 bindet über eine Wasserstoffbrückenbindung die Keto-Gruppe der Abscisinsäure und gilt als einzige Aminosäure, die in direkten Kontakt mit ABA kommt (Melcher et al, 2009; Miyazono et al, 2009). Der ternäre Komplex RCAR12 (PYL2)-ABA-ABI1 erklärt den dominanten Phänotyp der *abi1-1*- und *abi2-1*-Mutanten (Gly180 zu Asp bzw. Gly168 zu Asp) (Koornneef et al, 1984; Leung et al, 1994; Leung et al, 1997; Meyer et al, 1994; Rodriguez et al, 1998b). Glycin 180 interagiert durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit Serin 112 des RCAR12/PYL1. Zur Blockierung der katalytischen Tasche der PP2C ist für ABI1 die Interaktion von Glycin 180 mit einem bestimmten Serin (Serin 112 in RCAR12/PYL1) erforderlich. Durch die Mutation Gly180Asp ist diese Interaktion nicht mehr möglich, *abi1-1* kann durch den ABA-RCAR/PYL1/PYL-Komplex nicht mehr inhibiert werden.

Die kristallographischen Studien zeigten, dass Pyrabactin nicht nur als ABA-Agonist für RCAR11/PYL1 und RCAR12/PYL1 sondern auch als ABA-Antagonist für RCAR14/PYL2 wirken kann (Hao et al, 2010; Melcher et al, 2009; Peterson et al, 2010; Yuan et al, 2010). Pyrabactin bindet an RCAR11/PYL1 und RCAR12/PYL1 und induziert eine Änderung der Konformation ähnlich zu der für Abscisinsäure beobachteten und wird entsprechend von den  $\beta$ -Schleifen in

der Bindestelle eingeschlossen. Die Pyrabactin-Bindung an RCAR14/PYL2 bewirkt dagegen keine Konformationsänderung. Eine Interaktion mit PP2Cs bleibt damit aus.

### 1.1.3. Regulation der Schließzellen

Die oberirdischen Organe der höheren Pflanzen sind von einer für Wasser und CO<sub>2</sub> nahezu undurchlässigen Schicht, der Cuticula bedeckt. Gasaustausch und Transpiration erfolgen fast ausschließlich über die Stomata. Die Stomata bestehen aus zwei Schließzellen, die die Fähigkeit besitzen, ihren Turgor zu regulieren, und der von den Schließzellen umschlossenen Pore. Das Öffnen der Stomata setzt einen ausreichend hohen Turgor voraus. Turgorverlust führt zum Schließen der Stomata. Das Sonnenlicht stimuliert das Öffnen und ermöglicht eine Diffusion von CO<sub>2</sub> ins Blattinnere (Dietrich et al, 2001), was weiter in der Photosynthese verwendet wird, während hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen den Stomataschluss induzieren (Kim et al, 2010). Der Turgor der Schließzellen wird durch ihren Gehalt an organischen und anorganischen Ionen, wie K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, oder NO<sub>3</sub> reguliert. Die Abscisinsäure, die bei Trockenstress durch Neusynthese oder eine Freisetzung aus Speicherform (ABA-GE) entsteht, ist das zentrale Signal zur Steuerung des Öffnungszustandes der Schließzellen.

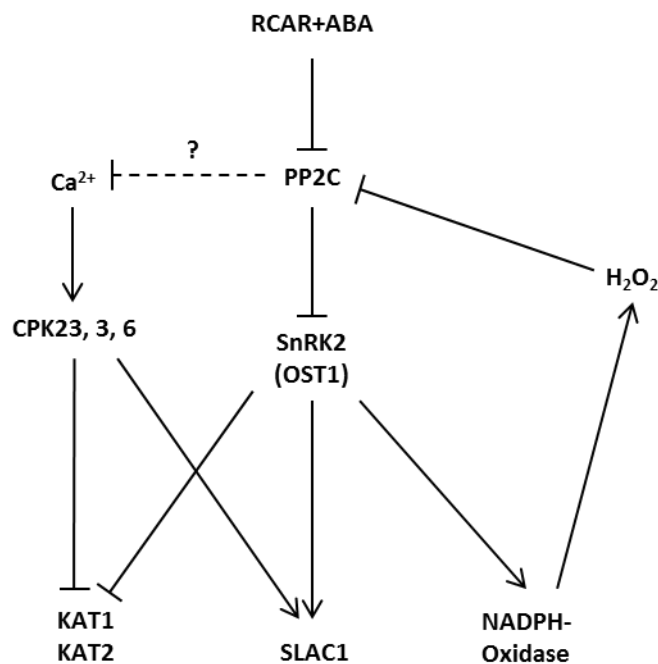
Die Entdeckung des ABA-Rezeptors bedeutete einen Durchbruch im Verständnis der molekularen Mechanismen der Stomataregulation. Nach Bindung von ABA durch RCAR/PYR1/PYL-Proteine kommt es zur Ausbildung von einem trimeren Komplex mit PP2Cs, die dadurch inhibiert werden (Ma et al, 2009; Santiago et al, 2009b). Es wurde gezeigt, dass die PP2Cs in Anwesenheit von ABA mit OST1/SnRK2.6/SnRK2E, SnRK2.2/SnRK2D und SnRK2.3/SnRK2I Protein-Kinasen interagieren (Umezawa et al, 2009; Vlad et al, 2009). Diese Protein-Kinasen sind positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktion, werden aber von den Proteinphosphatasen dephosphoryliert und dadurch inhibiert. Die ABA-Bindung an die RCAR/PYR1/PYL-Proteine inhibiert nun ihrerseits die Phosphatasen und ermöglicht dadurch die Aktivierung der Protein-Kinasen durch Autophosphorylierung (Umezawa et al, 2009). In den Schließzellen wirkt besonders die OST1-Kinase als ein positiver Regulator des Stomataschlusses (Mustilli et al, 2002). OST1 phosphoryliert SLAC1- (Geiger et al, 2009; Lee et al, 2009b) und KAT1-Kanäle (Sato et al, 2009), die dadurch aktiviert (SLAC1) bzw. inhibiert (KAT1) werden. In der Folge strömen Anionen über SLAC1 aus der Zelle, es kommt zu einer Depolarisation, die wiederum einen massiven Kaliumionen-Ausstrom auslöst. Damit verbunden ist ein Wasser- und Turgorverlust, die Stomata schließen sich. Die Ionen-Kanäle können auch durch das cytosolische Calcium reguliert werden (Siegel et al, 2009), wobei Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kinasen wie CPK23 (Geiger et al, 2010) oder CPK3 und CPK6 (Mori et al, 2006) wahrscheinliche eine Rolle spielen. Durch eine von OST1-katalysierte Phosphorylierung wird die in der Membran lokalisierte NADPH-

## Einleitung

---

Oxidase aktiviert (Sirichandra et al, 2009), was zur Erhöhung der cytosolischen  $H_2O_2$ -Konzentration und in Folge zur Inhibierung der Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 führt (Meinhard & Grill, 2001; Meinhard et al, 2002).

Wenn die ABA-Konzentration in der Zelle wieder abnimmt, werden  $H^+$ -ATPasen, die für eine Hyperpolarisierung sorgen, aktiviert. Dadurch werden die Kalium-Influx-Kanäle eingeschaltet. Zusätzlich werden vermehrt osmotisch wirksame Substanzen wie Malat und Saccharose synthetisiert, was zu einem Wassereinstrom und so zum Anstieg des Turgors und zu einer Öffnung der Stomata führt (Kwak et al, 2001; Lebaudy et al, 2007; Merlot et al, 2007; Schroeder et al, 2001b). Die Regulation des Stomataschlusses wird in der Abbildung 1-6 zusammengefasst.



**Abbildung 1-6:** Modell der Regulation der im Stomataschluss beteiligten Komponenten. Dargestellt sind die wichtigsten im Text erwähnten regulatorischen Komponenten, die zur Schließung der Stomata führen (verändert nach Umezawa et. al, 2010).

### 1.1.4. Regulation der Genexpression

Trocken- und Salzstress führen über die Bildung von ABA, aber auch über ABA-unabhängige Signalwege zu Veränderungen der Genexpression, wobei ca. 10 % des Genoms durch die Abscisinsäure reguliert wird (Nakashima et al, 2009; Shinozaki et al, 2003). Die Promotoren der meisten dabei betroffenen Gene enthalten bestimmte cis-Elemente, die sogenannten ABREs (*ABA-responsive elements*), die von bZIP-Transkriptionsfaktoren erkannt werden (Nakamura et al, 2001; Nakashima et al, 2009; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). In ABA-regulierten Genen befinden sich auch Bindestellen für MYB- bzw. MYC-Proteine (Abe et al, 2003; Ciftci-

Yilmaz et al, 2007; Davletova et al, 2005). Die ABA-regulierten Gene besitzen mindestens eine ABRE-Sequenz und zusätzliche entweder ABRE- oder CE-Elemente. Die bZIP-Familie besteht aus neun Transkriptionsfaktoren: AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, AREB3/DPBF3, ABF1, ABF3/DPBF5, ABI5/DPBF1, EEL/DPBF4, DPBF2 und At5g42910 (Jakoby et al, 2002). Die Expression von *AREB1/ABF2*-, *AREB2/ABF4*- und *ABF3/DPBF5* wird von Trocken- und Salzstress induziert (Fujita et al, 2005). ABI5/DPBF1 wurde in einem Keimungs-Screen auf ABA-Insensitivität identifiziert (Finkelstein & Lynch, 2000; Lopez-Molina & Chua, 2000) und seine Überexpression führt zu schwacher ABA-Hypersensitivität der Pflanze. Der B3-Transkriptionsfaktor ABI3 (Rohde et al, 1999) kann an ABI5 binden und dessen Wirkung verstärken. ABA-abhängige NAC-Transkriptionsfaktoren vermitteln die bei Trockenstress induzierten Signale durch Bindung an den ERD1-Promotor (Tran et al, 2004). Einige Transkriptionsfaktoren wie ABI4 besitzen eine Doppelfunktion und können sowohl als Aktivatoren als auch Repressoren der ABA-abhängigen Genexpression wirken (Bossi et al, 2009; Hoecker et al, 1995). ABI4 aktiviert sowohl die eigene Expression als auch die Expression von ABI5 und SBE2.2 (ein Stärke-verzweigendes Enzym) in Gegenwart von Glucose, osmotischem Stress und ABA. ABI4 kann in Anwesenheit von hohen Zuckerkonzentrationen auch als ein transkriptioneller Repressor der Expression und ABA der an der Photosynthese beteiligten *RBCS*- bzw. *Lhcb*-Gene wirken (Koussevitzky et al, 2007). Es wurde gezeigt, dass die Abscisinsäure durch eine Modifikation der Histone einen Chromatinumbau verursachen kann (Sokol et al, 2007). In Abwesenheit von ABA kann die HAB1-Phosphatase mit einem SWI3-Homolog (Komponente des SWI/SNF-Komplexes) interagieren und dadurch zur Hemmung der Induktion von ABA-regulierten Genen (Saez et al, 2008) führen. Der SWI/SNF-Komplex ist für einen ATP-abhängigen Chromatinumbau verantwortlich und wurde als erstes in Hefen entdeckt. Der Komplex ändert die Struktur und die Platzierung der Nukleosomen.

Viele Transkriptionsfaktoren, die an der ABA-Signaltransduktion beteiligt sind, bleiben inaktiv, bis sie in Anwesenheit von ABA phosphoryliert werden (Furihata et al, 2006; Kagaya et al, 2002; Uno et al, 2000). Es wurde gezeigt, dass dafür außer der bereits erwähnten SnRK2s auch SnRK1- und SnRK3-Kinasen verantwortlich sind (Fujii et al, 2007; Furihata et al, 2006; Hong et al, 2011; Yoshida et al, 2002). Im Arabidopsis-Genom existieren 38 SnRK-Kinasen (*sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1*), die mit SNF1-Kinasen aus Hefen verwandt sind, und in drei Gruppen eingeteilt werden (Coello et al, 2011; Hrabak et al, 2003). Die SnRK2-Gruppe besteht aus 10 Kinasen (SnRK2.1 bis SnRK2.10) in *Arabidopsis thaliana* und in *Oryza sativa* (Hrabak et al, 2003). Es wurde gezeigt, dass alle 10 SnRK2s in Reis durch osmotischen Stress induziert werden, während die Expression von 3 SnRK2s durch Abscisinsäure reguliert wird (Kobayashi et al, 2004). SnRK2s kontrollieren in *Arabidopsis thaliana* die Expression der Stress-abhängigen Gene. Die überexprimierten SnRK2s erhöhen die Trockentoleranz (Umezawa et al, 2004). Die Entdeckung des ABA-Rezeptors erklärte die Rolle der SnRK2-Kinasen. In

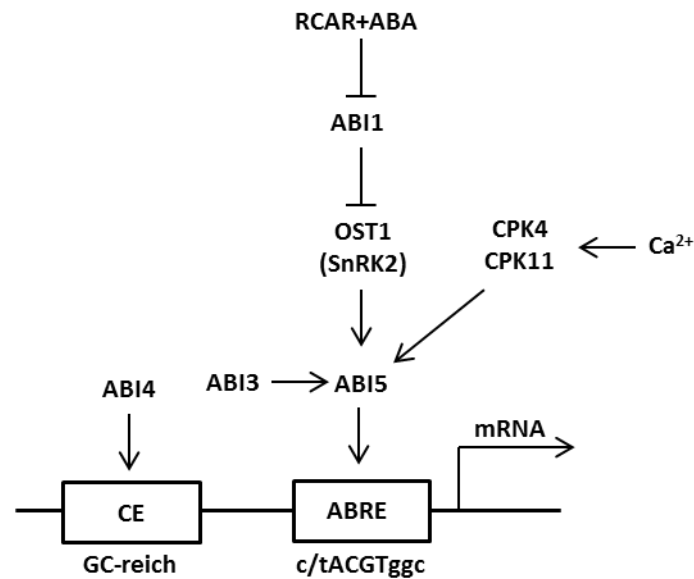
## Einleitung

---

Abwesenheit von ABA werden die Kinasen durch PP2C-Phosphatasen dephosphoryliert und so bleiben sie inaktiv. Während der ABA-Bindung werden PP2Cs inhibiert, was zur Aktivierung der SnRK2s führt. Diese autophosphorylieren und aktivieren dann durch Phosphorylierung die Transkriptionsfaktoren (ABFs), die *downstream* in der Signalkaskade liegen (Ma et al, 2009; Park et al, 2009; Umezawa et al, 2009). Fujii et al. zeigten, dass alle SnRKs außer SnRK2.9 durch osmotischen Stress aktiviert werden können, wobei nur SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6 an dem ABA-abhängigen Signalweg beteiligt sind (Fujii et al, 2011; Fujii & Zhu, 2009). Entsprechend zeigt die *snrk2.2/3/6* Tripel-Mutante einen ABA-insensitiven Phänotyp (Fujii & Zhu, 2009).

SnRK1s zeigen die stärkste Homologie zu SNF1s aus Hefen und AMP-aktivierten Proteinkinasen (AMPKs) aus Tieren, allerdings werden SnRK1s nicht durch AMP reguliert. Die SnRK1-Gruppe besteht aus drei Mitgliedern, die den Kohlenstoff-Metabolismus durch entweder direkte Phosphorylierung der beteiligten Enzyme oder Regulation der Genexpression regulieren. Die SnRK3-Gruppe, auch bekannt als CIPKs (*CBL-interacting protein kinases*) hat 25 Mitglieder, die mit Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteinen wie SOS3 und CBL (*calcineurin-B like protein*) interagieren, und bei Salz- bzw. Zuckerstress und in Anwesenheit von Abscisinsäure aktiviert werden (Gong et al, 2002; Guo et al, 2002). Die aktiven CIPKs sind in der Lage die Transkriptionsfaktoren durch eine Phosphorylierung zu aktivieren. Deaktivierung der Transkriptionsfaktoren wie ABI5 oder ABI3 erfolgt entweder über Dephosphorylierung oder Degradation in Proteasomen (Lopez-Molina et al, 2001; Lopez-Molina et al, 2003; Zhang et al, 2005). An der ABA-abhängigen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sind auch Calcium-abhängige Kinasen beteiligt. So wurden CPK4 und CPK11 als positive Regulatoren von ABF1 und ABF4 gefunden, die durch Phosphorylierung aktiviert werden (Zhu et al, 2007). Die aktivierten ABI4- und ABI5-Transkriptionsfaktoren binden an die spezifischen Sequenzen und induzieren die Genexpression.





**Abbildung 1-7:** Der zentrale Weg der ABA-abhängigen Regulation der Genexpression. Die ABA-aktivierten SnRK2-Kinasen steuern Transkriptionsfaktoren, die *cis*-regulatorische Elemente in den Promotoren erkennen und zur Expression der Zielgene führen. .

## 1.2. Trockentoleranz bei Pflanzen

Da Pflanzenwachstum und Entwicklung von Trockenstress außerordentlich beeinflusst wird, ist eine Anpassung an die Stressbedingungen überlebensnotwendig. Trockenheit wird vermutlich durch einen Osmosensor wahrgenommen. In Pflanzen könnte osmotischer Stress durch mechanosensitive Kanäle (wie *stretch-activated channels*) oder in der Plasmamembran lokalisierte zwei-Komponenten-Histidin-Kinasen wahrgenommen werden, die eine Homologie zum Osmosensor Sln1 aus Hefen zeigen. ATHK1, ein Sln1-Homolog in *Arabidopsis thaliana*, ist fähig bei osmotischem Stress das Signal wahrzunehmen und dann bestimmte Komponenten wie MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) zu aktivieren. ATHK1 spielt auch eine Rolle bei der Austrocknung im Zuge der Samenreifung (Wohlbach et al, 2008). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität einer weiteren pflanzlichen Histidin-Kinase, Cre1, durch Änderungen des Turgordrucks ähnlich zu Sln1 induziert werden kann (Reiser et al, 2003), was für eine Rolle als Osmosensor sprechen würde. Trockenstress löst die Synthese der Abscisinsäure aus, was zur Erhöhung des ABA-Gehalts führt. Abscisinsäure wird dabei durch ATP-abhängige ABC-Transporter AtPDR12/ABCG40 (Kang et al, 2010) und AtABCG25 (Kuromori et al, 2010) transportiert. ABCG40 ist für die ABA-Aufnahme verantwortlich, während ABCG25 grundsätzlich in der Plasmamembran des Leitgewebes exprimiert wird und eine ATP-abhängige ABA-Exportaktivität zeigt. In den Zielzellen bewirkt ABA einen Stomataschluß und löst massive Genexpressionsänderungen aus, wodurch der Wasserverlust stark reduziert wird (Seki et al, 2002; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Das bei Trockenheit beobachtete

Genexpressionsmuster ist jedoch nicht allein ABA-abhängig, sondern ist das Resultat ABA-abhängiger und ABA-unabhängiger Signaltransduktion. (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005). Als Folge davon werden biochemische und physiologische Antworten der Pflanze induziert, können bei Trockenstress beispielweise Verbindungen wie Sorbit, Trehalose, Mannit oder Prolin und Polyamine akkumulieren. Sie wirken als Osmolyte und Antioxidantien (Bartels & Sunkar, 2005; Kim et al, 2010; Seki et al, 2007; Taji et al, 2002) und finden sich im Zytoplasma. Unter ihren Einfluß kommt es zu einer Turgorstabilisierung bzw. einem osmotischen Gleichgewicht in Anwesenheit von osmotischem Stress, sie haben aber keinen Einfluß auf dem pflanzlichen Metabolismus (Chen & Murata, 2002). Trockenstress kann Blattwelken, Reduktion der Blattfläche, Abszission, Defekte der Membranen und ROS-Produktion verursachen. Die Entdeckung der RCAR/PYR1/PYL-Proteine (Ma et al, 2009; Park et al, 2009) führte zum Verständnis der ABA-Perzeption und der ersten Schritte der ABA-Signaltransduktion, die anschließend die Trockentoleranz wesentlich reguliert. Abscisinsäure induziert in diesem Modell die Interaktion zwischen RCAR/PYR1/PYL-Proteinen mit Proteinphosphatasen Typs des 2C, was zur Inhibierung der PP2Cs und Aktivierung der SnRKs führt. Diese aktivieren die ABA-Signaltransduktion, die sowohl im Kern als auch im Zytoplasma stattfindet (der Mechanismus wurde im oberen Kapitel beschrieben).

### 1.2.1. Aquaporine

Aquaporine sind Kanal-Proteine, die insbesondere bei einem Transport von Wasser durch die Membran eine Rolle spielen und dadurch den Wasserstatus der Pflanze steuern können (Gomes et al, 2009; Kaldenhoff et al, 2008; Maurel et al, 2008). Außerdem sind die Aquaporine am Transport von kleinen, ungeladenen Molekülen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Henzler & Steudle, 2000), Lactat (Choi & Roberts, 2007), Glycerin, Ammoniak und Harnstoff (Beitz et al, 2006) beteiligt. Es wurde gezeigt, dass AQP1s (PIP1-Aquaporine aus *Nicotiana tabacum*) sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran von Chloroplasten lokalisiert sind und für den Wasser- bzw. CO<sub>2</sub>-Transport verantwortlich sind (Uehlein et al, 2008). Die in der Plasmamembran lokalisierten AQP1s weisen bis 45 % Durchlässigkeit für Wasser und nur eine geringe für CO<sub>2</sub> auf, während die in der Chloroplastenhüllmembran lokalisierten AQP1s fast nur für CO<sub>2</sub> durchlässig sind. Die Aquaporine werden auf Grund ihrer Lokalisation in 4 Gruppen eingeteilt: PIPs in der Plasmamembran (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*), TIPs im Tonoplasten (*Tonoplast Intrinsic Proteins*), SIPs im endoplasmatischen Retikulum (ER) (*Small basic Intrinsic Proteins*) und NIPs (*Noduline-26 like Intrinsic Proteins*), die zu einem Peribacteroidmembran-Aquaporin homologen Aquaporine. Auf Grund von Sequenzhomologie wurden zwei neue Gruppen der Aquaporine im Moos *Physomitrella patens* gefunden: HIPs (*hybrid intrinsic proteins*), die in Gefäßpflanzen nicht

nicht identifiziert wurden, und XIPs (*uncategorized X intrinsic proteins*), die in vielen Pflanzenarten außer Monokotyledonen existieren (Danielson & Johanson, 2008). Die Aktivität der Aquaporine kann sowohl durch Phosphorylierung als auch  $H^+$  und cytosolisches Calcium reguliert werden. PIP2;1 wird beispielsweise an Serin 280 und Serin 283 phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung des Serins 283 wahrscheinlich für den Transport des Proteins aus dem ER und das Schließen erforderlich ist (Prak, Hem et al. 2008). Die durch Trockenstress induzierte Ubiquitinierung der PIP-Aquaporine erfolgt über Ubiquitin-E3-Ligase und leitet den Abbau der Proteine im Proteasom ein (Lee et al, 2009a). FRET- und Co-Immunopräzipitations-Experimente an Pflanzenextrakten zeigten eine Interaktion zwischen den PIP1-Molekülen und zwischen PIP1 und PIP2, was für eine Bildung sowohl des Heterotetramers als auch des Homotetramers spricht (Zelazny et al, 2007). PIPs akkumulieren intrazellulär nach einer Behandlung mit Salz oder Salicylsäure (SA) (Boursiac et al, 2008a; Boursiac et al, 2005). Diese Internalisierung ist von der Phosphorylierung abhängig (Boursiac et al, 2008b). Auch die Lokalisation von TIPs kann sich bei Trocken- oder Salzstress ändern (Boursiac et al, 2005; Vera-Estrella et al, 2004). Die Anwesenheit der Aquaporine beinahe in allen Membranen der Zelle suggeriert, dass diese Proteine nicht nur Wasser sondern weitere Substrate transportieren. In der Tat zeigte sich, dass TIP1;1 und TIP1;2 in Arabidopsis  $H_2O_2$  weiterleiten (Schussler et al, 2008), während *NtAQP1* aus dem Tabak für einen  $CO_2$ -Transport verantwortlich ist (Evans et al, 2009). ABA beeinflusst die Expression der PIP-Aquaporine durch die ABA-induzierten Transkriptionsfaktoren und reguliert die Abundanz dieser Proteine in Pflanzen (Aroca et al, 2006; Kaldenhoff et al, 1996; Lian et al, 2006; Parent et al, 2009). Parent et al. verwendeten *sense* und *antisense* Konstrukte für ein *NCED*-Gen (9-cis-Epoxycarotenoid-Epoxydase) und zeigten, dass die Expression der PIP-Aquaporine in *Zea mays* mit dem ABA-Gehalt korrelierte und Abscisinsäure auf diese Weise die hydraulische Wurzeleitfähigkeit regulierte.

### 1.2.2. MSLs

Lebende Organismen besitzen die Fähigkeit, mechanische Kräfte aus der Umwelt wahrzunehmen und auf sie zu reagieren (Anishkin & Kung, 2005; Sukharev & Corey, 2004). In *E. coli*-Bakterien spielen dabei mechanosensitive Kanäle eine Rolle wie MscL (*Mechanosensitive channel of Large conductance*) und MscS (*Mechanosensitive channel of Small conductance*), die zuerst in *Escherichia coli*-Sphäroplasten entdeckt wurden (Cui et al, 1995; Martinac et al, 1987; Sukharev et al, 1993). Die mechanosensitiven Kanäle reagieren auf eine Änderung der Membranspannung durch Öffnen oder Schließen einer zentralen Pore. Dies erfordert eine Interaktion mit der Plasmamembran (Kung et al, 2010), wobei sich durch Änderungen der Membrandicke eine das Öffnen und Schließen bewirkende Anspannung im Kanal-Molekül

## Einleitung

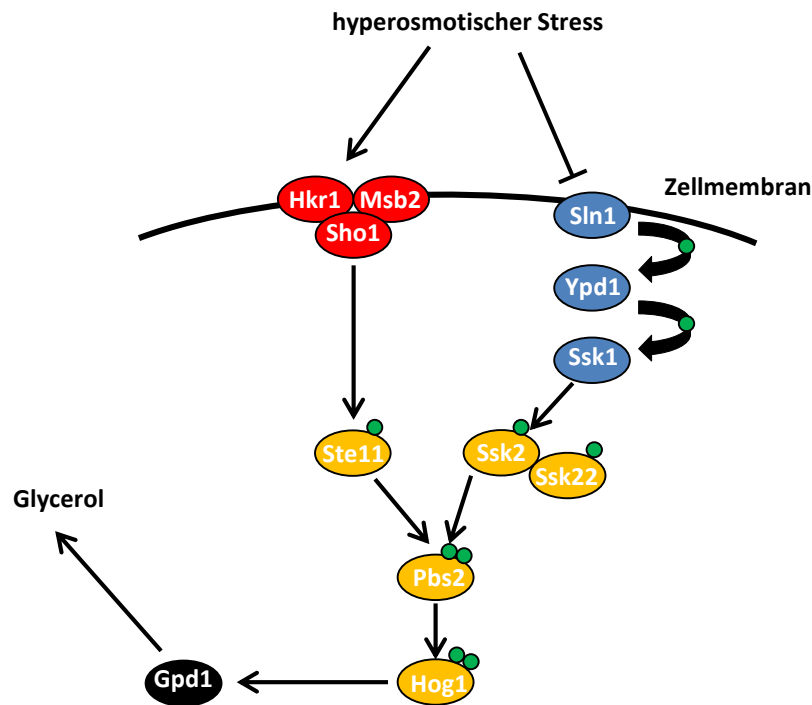
---

aufbaut (Perozo et al, 2002). Die MscS und MscL funktionieren redundant und sind in Prokaryoten zahlreich zu finden (Schumann et al, 2010). Bei Eukaryoten wurden Homologe zu mechanosensitiven Kanälen in Pflanzen (10 MscS-Homologe in *Arabidopsis thaliana*) und Pilzen gefunden, während derartige Homologe in Säugetieren fehlen (Haswell et al, 2011; Kloda & Martinac, 2002; Pivetti et al, 2003). Kristallographische Studien zeigten, dass MscL und MscS in einer tetrameren oder pentameren bzw. heptameren Form vorkommen können (Chang et al, 1998; Liu et al, 2009; Wang et al, 2008) und zwei bzw. drei Transmembrandomänen aufweisen, wobei die N-terminalen Transmembrandomänen der Kanäle sehr ähnliche Organisation beweisen. (Levina et al, 1999; Moe et al, 1998). Die mechanosensitiven Kanäle in *E. coli*-Sphäroplasten vermitteln bei einem hypoosmotischen Stress eine Freisetzung der osmotischen Metabolite, Ionen (Berrier et al, 1992) und Stress-induzierten cytosolischen Proteine (Ajouz et al, 1998; Berrier et al, 2000). Für *Bacillus subtilis* wurde gezeigt, dass MscL- und MscS-Homologe für das Überleben bei osmotischen Stress essentiell sind (Hoffmann et al, 2008; Wahome & Setlow, 2006; Wahome & Setlow, 2008). MscK (ein MscS-Homolog aus *E. coli*) hat eine vergleichbare Leitfähigkeit wie MscS, trägt aber nicht wesentlich zur Osmoresistenz bei und ist für eine Toleranz bei hohen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen verantwortlich (Levina et al, 1999; Li et al, 2002). Bakterielle MSCs können zusätzlich Änderungen des Zellurgors während der Zellteilung und des Zellwachstums wahrnehmen und diesen kontrollieren (Kung et al, 2010). In Eukaryoten sind MscS-ähnliche Kanäle an der Osmoregulation beteiligt (Liedtke & Friedman, 2003; Palmer et al, 2001) sowie an der Perzeption mechanischer Signale (O'Hagan et al, 2005; Sidi et al, 2003; Tracey et al, 2003). Das *Arabidopsis thaliana* Genom kodiert für zehn MSL-Proteine (*MscS-like*) mit unterschiedlichem Expressionsmuster und verschiedener Lokalisation (Pivetti et al, 2003). MSL 1-3 befinden sich in Chloroplastenmembranen, MSL4-10 dagegen in Plasma- und Vakuolenmembran (Haswell & Meyerowitz, 2006; Haswell et al, 2008). Die Expression der MSL-Gene wird in allen pflanzlichen Geweben unter anderem durch Salz- und Trockenstress beeinflusst, wobei bisher kein direkter Zusammenhang zwischen MSLs und Trockentoleranz von Pflanzen gefunden wurde. *Arabidopsis* MSL2 und MSL3 werden sowohl für den Erhalt von Größe und Form sowie bei der Teilung der Chloroplasten benötigt. Darüber hinaus setzt auch eine normale Morphologie der Blätter funktionelle MSLs 2 und 3 voraus (Haswell & Meyerowitz, 2006; Wilson et al, 2011). MSC1 von *Chlamydomonas* und MSL2 bzw. MSL3 aus *A. thaliana* spielen eine Rolle in einer Stress-induzierten Signaltransduktion zwischen Plastiden und Zytoplasma (Nakayama et al, 2007).

### 1.2.3. Histidinkinasen

Zwei-Komponenten-Systeme existieren sowohl in den Signaltransduktionswegen der Prokaryoten als auch der Eukaryoten. In Bakterien sind sie für die Stresstoleranz verantwortlich, wobei sie unter Stressbedingungen unter anderem die Zellteilung hemmen und dadurch die Überlebenschancen wesentlich erhöhen (Martinez-Wilson et al, 2008; Raghavan & Groisman, 2010; Stock et al, 2000). Diese Systeme bestehen aus einer homodimeren, in der Plasmamembran lokalisierten Histidinkinase (HK), die eine extrazelluläre Sensor-Domäne besitzt, und einer regulatorischen Komponente (*response regulator*), wobei es sich meistens um einen Transkriptionsfaktor handelt, die Antwort also durch Regulation der Expression ausgelöst wird (Gao & Stock, 2009; Stock et al, 2000). Die Anregung der Sensor-Domäne führt zur ATP-abhängigen Phosphorylierung des Histidin-Restes der homodimeren, helicalen HK-Domäne. Die N-terminale Domäne der Histidinkinase überträgt ein Signal auf die C-terminale, katalytische Domäne, die ATP bindet und Histidin phosphoryliert. Anschließend wird das Phosphat auf einen Asparaginsäure-Rest der Akzeptor-Domäne der regulatorischen Komponente übertragen, welche dadurch aktiviert wird (Stock et al, 2000). Die Phosphorylierung induziert Konformationsänderungen der regulatorischen Komponente und moduliert dadurch die Affinität der Effektor-Domäne, die jedoch in manchen regulatorischen Komponenten fehlt. In solchen Fällen übernimmt die Akzeptor-Domäne die Effektor-Rolle (Casino et al, 2010). Die HK-Domäne, die katalytische C-terminale Domäne und Akzeptor-Domäne liegen in allen Zwei-Komponenten-Systemen vor, während Sensor- und Effektor-Domänen je nach Stimulus unterschiedlich vorkommen. Die aktivierte regulatorische Komponente kann von ein paar Sekunden bis mehrere Wochen angeregt bleiben und dabei die Expression von bis zu 30 % des bakteriellen Genoms induzieren (Gomelsky et al, 2008). Durch Dephosphorylierung durch bestimmte Phosphatasen wird die regulatorische Komponente wieder in den Ausgangszustand versetzt. Es wurden sowohl Fälle beschrieben, in denen eine Kinase viele verschiedene Komponenten aktivieren kann als auch Fälle, in denen Kinasen nur eine bestimmte regulatorische Komponente der Zwei-Komponenten-Systeme aktivieren (Higgs et al, 2008; Jenal & Galperin, 2009).

Unter Eukaryoten sind Zwei-Komponenten-Systeme in Bedecktsamern (*Arabidopsis thaliana*, Reis), *Chlamydomonas*, Kieselalgen (*Thalassiosira*) und *Dictyostelium* zu finden. In Pilzen sind derartige Systeme an der Adaptation an osmotischen und oxidativen Stress, der Reaktion auf Rotlicht oder der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Nemecek et al, 2006; Rockwell et al, 2006; Santos & Shiozaki, 2001). Eines der am besten beschriebenen Zwei-Komponenten-Systeme ist der HOG (*High Osmolarity Glycerol*)-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae* (Brewster et al, 1993), der durch einen osmotischen Stress induziert wird (Abb. 1-8).



**Abbildung 1-8:** Der HOG-Signalweg. Die hyperosmotische Anregung von Sho1- bzw. Sln1-Signalweg führt zur Aktivierung von Pbs2 (MAPKK) und Hog1 (MAPK). Der Sln1-Signalweg besteht aus einem Phosphorelay-System, das die Aktivität von MAPKKKs, Ssk2 und Ssk22 reguliert. Der Phosphotransfer in dem Sln1-Ypd1-Ssk1-Signalweg führt zur negativen Regulation der Ssk1-Kinase in Abwesenheit von hyperosmotischem Stress (Miermont et al, 2011).

Die HOG1-Kinase wird in Anwesenheit von hyperosmotischem Stress durch Phosphorylierung der konservierten Threonin- und Therosin-Reste aktiviert. Aktive HOG1 akkumuliert im Kern, wo sie Expression der Stress-Gene reguliert. Zwei transmembrane Osmosensoren, Sho1 (Hohmann, 2002; Saito & Tatebayashi, 2004) und Sln1 (Maeda et al, 1994; Posas et al, 1996) wurden gefunden, die in der Lage sind HOG1-Kinase unabhängig zu aktivieren. Das Sln1-Protein ist ein Homolog von bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen und besitzt eine zytoplasmatische HK-Domäne und eine Akzeptor-Domäne. In Abwesenheit von osmotischem Stress autophosphoryliert die aktive HK-Domäne des Sln1-Proteins einen Histidin-Rest. Das Phosphat wird anschließend auf einen Asparaginsäure-Rest der C-terminalen Akzeptor-Domäne übertragen. Über einen *phospho-relay* Mechanismus erfolgt dann ein Phosphotransfer auf ein Phosphoträger-Protein Ypd1, eventuell auch auf einen Asparaginsäure-Rest des Ssk1-Proteins (Maeda et al, 1994; Posas et al, 1996). Die erste Reaktion der Hefe auf einen hyperosmotischen Stress erfolgt über eine Aktivierung von Membransensoren als Antwort auf den Wasserverlust der Zelle. Sln1 wechselt dabei in eine inaktive Konformation geändert (Hohmann, 2002; Reiser et al, 2003), was zur Einstellung der Sln1-Ypd1-Ssk1 *phospho-relay* Reaktion führt. Ssk1 wird daraufhin sehr schnell dephosphoryliert und dadurch aktiviert. Aktives Ssk1 bindet und aktiviert Ssk2- und Ssk22-Kinasen (MAPKKK), was zur Aktivierung der Pbs2-Kinase (MAPKK) und anschließend der HOG1-Kinase führt (MAPK). Der aktivierte HOG-Signalweg ist nach ein

paar Minuten abgeschlossen (Hersen et al, 2008). Die dephosphorylierte Ssk1-Kinase wird durch das Ubc7-abhängige Ubiquitin-Proteasom-System degradiert, was zum Ausschalten des HOG-Signalwegs nach Osmoadaptation führt (Sato et al, 2003).

Der Sho1-Signalweg besteht aus den Mucin-ähnlichen Osmosensoren Msb2 und Hkr1, dem Adapterprotein Sho1, Cdc42, Ste20, Ste11 und Ste50, die für Signaltransduktion verantwortlich sind (de Nadal et al, 2007). Msb2 und Hkr1 sind in der Plasmamembran lokalisiert und funktionieren redundant bei der Aktivierung des HOG-Signalwegs. Diese Proteine bestehen aus einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Serin/Threonin-reichen Region, welche glycosyliert wird und für die Osmoperzeption verantwortlich ist, wobei die Aktivierung von Msb2 und Hkr1 einen Kontakt mit den Transmembrandomänen des Sho1-Proteins benötigt (de Nadal et al, 2007). Das Sho1-Protein hat vier Transmembrandomänen, die nah am N-Terminus liegen, und eine zytosolische SH3-Domäne, die an ein in Pbs2 lokalisiertes, Prolin-reiches Motiv bindet (Maeda et al, 1995), wobei die Pbs2-Aktivität durch eine Ste11-abhängige Phosphorylierung beeinflusst wird (Posas & Saito, 1997). Ste11 wird von Ste20 durch Phosphorylierung aktiviert (Drogen et al, 2000). Außerdem kann Pbs2 ebenfalls von mit der Membran gebundenen Cdc42, Ste20 und Ste11 aktiviert werden (Reiser et al, 2000).

Die Zwei-Komponenten-Kinasen kommen nicht nur in Prokaryoten und Pilzen sondern auch in Pflanzen vor. Auf Grund der Sequenzanalyse wurden in *Arabidopsis thaliana* mehrere Histidinkinasen gefunden, die eine Rolle in der Cytokinin- bzw- Ethylen-Signaltransduktion spielen. So wurden AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 Histidinkinasen als Cytokinin-Rezeptoren identifiziert (Ferreira & Kieber, 2005; Heyl & Schmulling, 2003; Kakimoto, 2003). Diese transmembranen Proteine enthalten eine extrazelluläre CHASE (*cyclase/HIS kinase-associated sensisng extracellular*)-Domäne, die Cytokinine bindet und die HK-Aktivität positiv beeinflusst, sowie zelluläre Phosphotransfer- bzw. Phosphoakzeptordomänen (Kakimoto, 2003). Sie unterscheiden sich in der Anzahl der Transmembrandomänen. Am Cytokinin-Signalweg sind weitere Komponenten beteiligt: AHPs (*Arabidopsis HIS Phosphotransfer Proteins*) und ARRs (*Arabidopsis Response Regulators*) (Hutchison et al, 2006). Die Cytokinin-Bindung führt zur Aktivierung der Kinase und zum Transfer des Phosphats auf AHPs. Aktive AHPs werden in den Kern importiert, wo sie an ARRs des Typs B das Phosphat abgeben. Die phosphorylierten Typ B-ARRs induzieren dann die Expression der Cytokinin-abhängigen Gene. Gleichzeitig werden ARRs des Typs A aktiviert, die als negative Regulatoren der Cytokinin-Signaltransduktion wirken (Ferreira & Kieber, 2005; Kakimoto, 2003).

Weitere in *Arabidopsis* vorkommende Histidinkinasen besitzen keine CHASE-Domäne, was dafür spricht, dass sie nicht als Cytokinin-Rezeptoren funktionieren (Kakimoto, 2003). Zu dieser Gruppe gehört die in der Plasmamembran lokalisierte ATHK1. Nach RNA-Analysen ist das *ATHK1*-Transkript in *Arabidopsis thaliana* vor allem in Wurzeln vorhanden und wird durch osmotischen Stress positiv reguliert (Urao et al, 1999). Wohnach et al. zeigten, dass die *ATHK1*-

Überexpression eine hohe Trockentoleranz bewirkt, sowie einen erhöhten ABA-Gehalt und die verstärkte Transkription von Genen der ABA-Biosynthese in Anwesenheit von osmotischem Stress (Wohlbach et al, 2008). Die *ahk1*-Mutante einen ABA-insensitiven Phänotyp aufweist (Tran et al, 2007). Dies spricht zusammengenommen dafür, dass ATHK1 eine wichtige Rolle bei der Adaptation auf Wasserstress spielt. Es wurde gezeigt, dass eine *AHK1*-Überexpression in *S. cerevisiae snl1* und *sho1* Mutanten den Salz-hypersensitiven Phänotyp der Hefe komplementiert und den HOG-Signalweg aktiviert (Urao et al, 1999) Allerdings gelingt dies auch bei Verwendung von *AHK2*, *AHK3* und *CRE1* (Tran et al, 2007). Während *AHK1*, wie erwähnt, als positiver Regulator der Trockentoleranz in *Arabidopsis thaliana* funktioniert, regulieren *AHK2*, *AHK3* und *CRE1* die Antwort auf einen osmotischen Stress negativ. Auf Grund dieser Befunde wurde postuliert, dass die 4 *AHK*-Histidinkinasen von *Arabidopsis thaliana* als Osmosensoren funktionieren könnten.

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

Abscisinsäure reguliert die Anpassung, die Entwicklung und das Wachstum der Pflanzen in Antwort auf abiotischen Stress. In den letzten zwei Dekaden wurden die Komponenten der ABA-Signaltransduktion sehr intensiv untersucht, was 2009 zur Entdeckung der ABA-Rezeptoren und in der Folge zu einem wesentlich verbesserten Verständnis der Anfangsschritte der ABA-Signalkaskade führte. Es ist aber wenig über die Komponenten bekannt, die eine Stresswahrnehmung, die Umwandlung des externen Stresssignals in ein zellinternes Signal und letzten Endes eine Aktivierung der ABA-Biosynthese vermitteln. In dieser Arbeit sollte ein Arbeitsmodell entwickelt und ein auf diesem basierender Screen nach in der Osmoperzeption gestörten Mutanten etabliert und durchgeführt werden. Gesucht werden sollte dabei nach Mutanten, die auf einen osmotischen Stress hypersensitiv hinsichtlich der Aktivierung eines ABA-Reporters reagieren. Unter den aufgefundenen Mutanten sollten diejenigen weiter bearbeitet werden, die auf eine externe ABA-Gabe wie der Wildtyp reagieren. In derartigen Mutanten sollten nach dem Arbeitsmodell Störungen in denjenigen Prozessen vorliegen, die die Stressperzeption und nachgeschaltete Vorgänge bis zur Aktivierung der ABA-Biosynthese umfassen. Anschließend sollte mit Hilfe positioneller Klonierung das jeweils betroffene Gen identifiziert werden. Die gefundene(n) Mutante(n) sollte(n) dann hinsichtlich ihrer Physiologie und ihrer ABA-Signaltransduktion charakterisiert werden.

Die vor kurzem entdeckten regulatorischen Komponenten (RCAR/PYR1/PYL-Proteine) des Abscisinsäure-Rezeptors binden ABA und interagieren mit Proteinphosphatasen des Typs 2C, die als negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion gelten. Dies führt zur Inhibierung der PP2Cs und zur Aktivierung der ABA-Antwort (Ma et al, 2009; Park et al, 2009). Auf der Basis



dieser neuen Erkenntnisse sollten Literaturangaben zur ABA-ähnlichen Aktivität von ABA-Vorstufen, ABA-Metaboliten und *S*-bzw. *R*-ABA-Analogen im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden. Dazu sollte untersucht werden, inwieweit diese Verbindungen wie ABA im Komplex mit diversen RCAR-Proteinen PP2Cs zu inhibieren vermögen. Zusätzlich sollte die *in vivo* Aktivität von diesen Substanzen mit Hilfe von in der ABA-Biosynthese und der ABA-Signaltransduktion gestörten Mutanten getestet und verifiziert werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Osmotischer Stress

Osmotischer Stress löst in der Pflanze Signaltransduktionswege und Toleranzmechanismen aus, die nur teilweise aufgeklärt und verstanden sind. Wasserdefizit löst ein hydraulisches Signal im Wurzelsystem ein, das in den Spross weitergeleitet wird und zur ABA-Biosynthese, die vor allem im vaskulären System und in den Schließzellen stattfindet, und zur ABA-Freisetzung führt (Christmann et al, 2007). ABA induziert dann den Stomataschluss und die ABA-abhängige Genexpression, die zur Adaptation an die Stressbedingungen führen. Es ist nicht klar, wie die Pflanzen Änderungen des Wasserpotentials wahrnehmen und, das Signal weiterleiten. Ein Osmosensor, der in der Perzeption des Wasserdefizits als erste Komponente funktionieren könnte, wurde bis jetzt noch nicht entdeckt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten in der Osmoregulation gestörte Mutanten gefunden und charakterisiert werden, um so zur Identifikation eines vermeintlichen Osmorezeptors beizutragen.

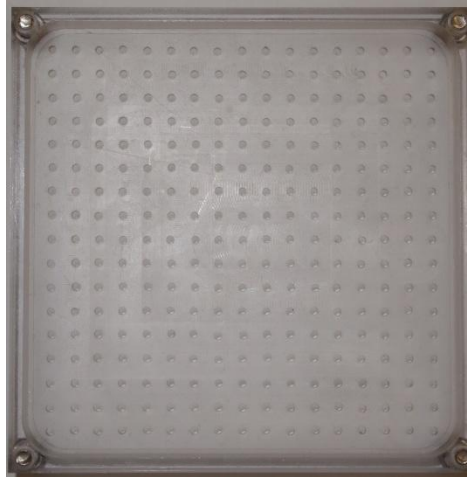
#### 2.1.1. Etablierung und Durchführung eines Screens

##### 2.1.1.1. Aktivierung des Reporters durch osmotischen Stress in der Kontrolllinie *pAtHB6::LUC*

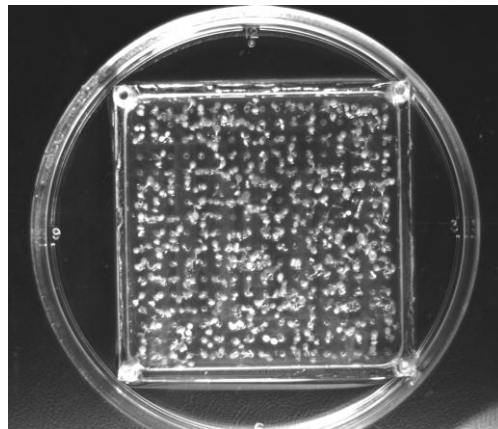
Zunächst wurde ein Screen etabliert und optimiert, in dem nach in der Osmoregulation gestörten Mutanten gesucht werden sollte. Dazu wurde die Kontrolllinie *pAtHB6::LUC* im *Columbia*-Ökotyp verwendet. Das stabil in die Pflanze eingebrachte Konstrukt besteht aus der Sequenz, die Luciferase des Glühwürmchens kodiert, und einem das HB6-Gen kontrollierenden Promotor, der ein ABRE-Element (ACGTG G/T C) besitzt. Bei Wassermangel wird das Reportergen durch die Abscisinsäure aktiviert, was zur Induktion der Luciferase-Expression führt (Christmann et al, 2005). Die Emission der Fluoreszenz wird mit Hilfe einer CCD-Kamera gemessen und unter Verwendung der SimplePCI-Software (<http://www.cimaging.net>) ausgewertet. Das Reportersystem ermöglicht ein nichtinvasives *in vivo imaging* durchzuführen, um die ABA-Vorgänge in der Pflanze zu beobachten.

Um einen Screen zu etablieren, wurden die speziell zu diesem Zweck entworfenen Platten verwendet (Abb. 2-1, Entwurf von Herrn Josef Reischenbeck). Die Platte weist 289 Löcher (17x17) auf, die mit MS-Medium mit Agar aufgefüllt werden konnten. Die Arabidopsis-Samen wurden so ausgebracht, dass sie sich einzeln in jedem Loch befanden. Die Platte wurde in eine

große Petri-Schale mit flüssigem MS-Medium von demselben osmotischen Potential platziert und 2 Tage in einem Kühlraum inkubiert, um die Dormanz der Samen zu brechen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 Tage bei 23°C und danach wurden die Keimlinge je nach Versuch mit unterschiedlich konzentriertem Mannit-haltigem MS-Medium behandelt (Abb. 2-2).



**Abbildung 2-1:** Die im Screen verwendete Platte. Die Löcher wurden steril mit MS-Medium mit Agar aufgefüllt. Anschließend wurden die Samen einzeln auf das Medium gelegt.

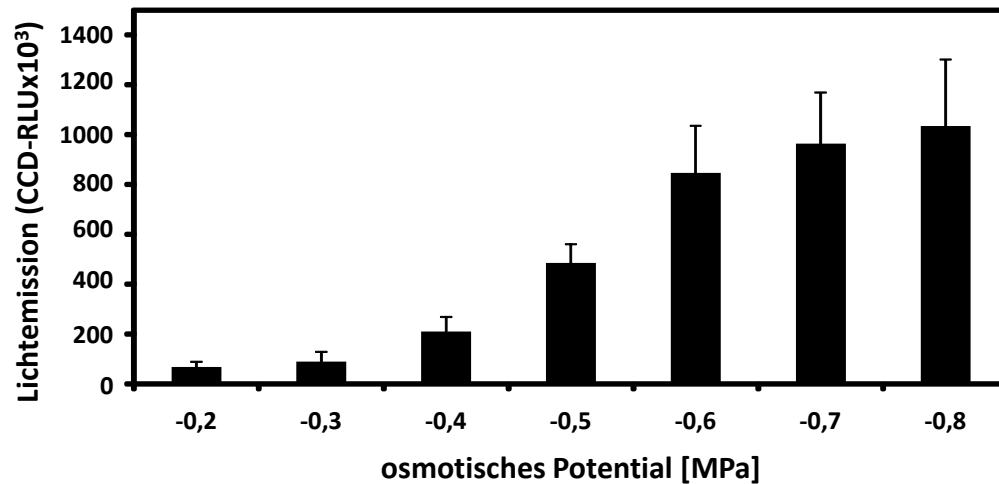


**Abbildung 2-2:** Darstellung der 5 Tage alten Keimlinge, die mit einem flüssigen Medium behandelt wurden. Allerdings hatten nur die Wurzeln einen Kontakt mit dem Medium. Die Reporteraktivität in Sprossen konnte mit Hilfe einer CCD-Kamer erfasst werden.

Um die Aktivierungsmuster des Reporters in 5 Tage alten Keimlingen zu untersuchen, wurden sie einem osmotischen Stress von -0,2 MPa bis 0,8 MPa für 18 Stunden ausgesetzt. Allerdings hatten nur die Wurzeln Kontakt zum Stressmedium. Dies führte zur Induktion der ABA-Biosynthese im Spross und in Folge zur Expression des *pAtHB6::LUC*-Reporterkonstrukts. Die ABA-induzierte Lichtemission konnte gemessen werden und wird graphisch in Abbildung 2-3 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Aktivität des Reporters proportional zum angewandten osmotischen Stress anstieg (Abb. 2-3). Für die osmotischen Potentiale von -0,2 MPa (Potential

## Ergebnisse

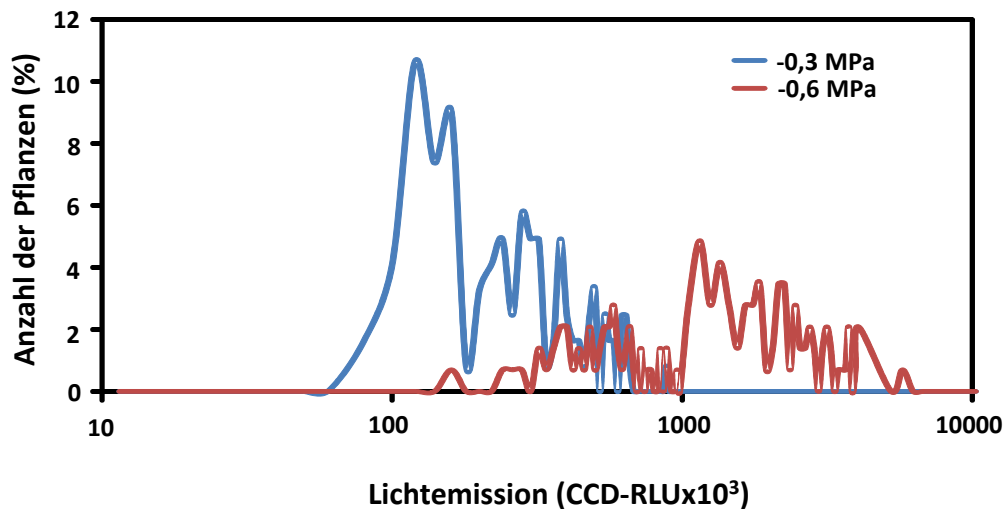
des Ausgangsmediums) und -0,3 MPa wurde eine geringe Aktivität beobachtet, die Lichtemission lag bei  $67 \times 10^3$  RLU (*relative light units*) bzw.  $89 \times 10^3$  RLU, wobei der Wert für -0,2 MPa wie erwähnt der Kontrolle entsprach.



**Abbildung 2-3:** ABA-abhängige Aktivierung des *pAtHB6::LUC*-Reporterkonstrukts, ausgelöst durch osmotischen Stress. Die Lumineszenz wurde nach 18 h Mannit-Stress bzw. unter Kontrollbedingungen (-0,2 MPa) gemessen.

Das osmotische Potential von -0,6 MPa induzierte eine sehr starke Lichtemission ( $850 \times 10^3$  RLU) und aktivierte den Reporter 13-fach im Vergleich zur Kontrolle. Es ist wichtig zu erwähnen, dass negative Potentiale von -0,7 MPa und -0,8 MPa keine bedeutenden Unterschiede in der Induktion des Reporters (1,12-fach bzw. 1,2-fach) im Vergleich zu -0,6 MPa hervorriefen.

Da das osmotische Potential von -0,6 MPa eine ca. 10-fach stärkere Induktion des Reporters bewirkte als -0,3 MPa, wurde entschieden, die Verteilung des Signals innerhalb einer Population der Kontrolllinie *pAtHB6::LUC* in Gegenwart von diesen 2 osmotischen Potentialen weiter zu untersuchen. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden wiederum 18 Stunden lang unter Stressbedingungen inkubiert, anschließend wurde die Lichtemission gemessen. Das Signal des Reporters verteilte sich über einem Bereich von  $100 \times 10^3$  bis  $800 \times 10^3$  RLU mit einer Häufung zwischen  $100 \times 10^3$  und  $160 \times 10^3$  (Abb. 2-4). Das osmotische Potential von 0,6 MPa führte wieder zu einer 10-fach stärkeren Induktion der ABA-Antwort in den Sprossen. Eine Häufung (20 % der Keimlinge) trat im Bereich von  $1150 \times 10^3$  RLU bis  $2150 \times 10^3$  RLU auf. Das Experiment wurde mehrmals wiederholt und brachte zu den in Abbildung 3 dargestellten Versuchen vergleichbare Ergebnisse. Es zeigte sich, dass die Signale der mit den untersuchten osmotischen Potentialen gestressten Keimlinge nur teilweise überlappten. Der Befund konnte damit als Grundlage für den Screen dienen.



**Abbildung 2-4:** Die Verteilung des Lumineszenz-Signals in HB6LUC-Wildtyp-Keimlingen. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden für 18 Stunden mit dem Stressmedium von -0,3 MPa bzw. -0,6 MPa behandelt.

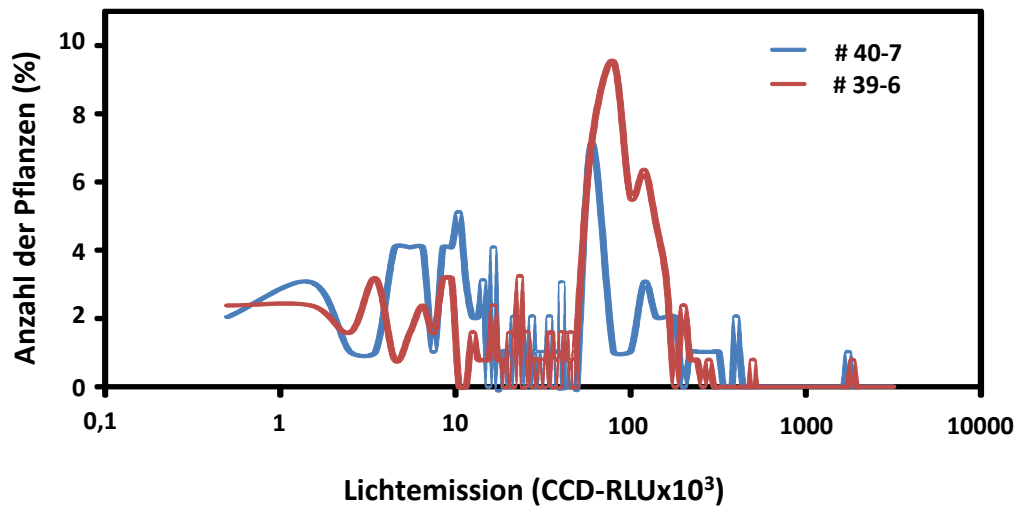
#### 2.1.1.2. Isolierung von Kandidaten und Bestätigung des erwarteten Phänotyps.

Der Pre-Screen mit *pAtHB6::LUC* Kontrolllinie brachte wertvolle Hinweise für einen Screen nach in der Osmoregulation gestörten Mutanten. Es sollte darin nach Stress-hypersensitiven Mutanten gesucht werden, die auf -0,3 MPa osmotisches Potential mindestens so stark reagierten wie die Kontrolllinie auf ein Stressmedium mit einem osmotischen Potential von -0,6 MPa. Verwendet wurde in diesem Screen die M2-Generation der mit Ethylmethansulfonat (EMS) mutagenisierten *pAtHB6::LUC*-Pflanzen (mutagenisiertes Samenmaterial von Dr. A. Christmann bereitgestellt). EMS ruft zufällige Mutationen in der DNA zum Beispiel durch Alkylierung von Guanin hervor. Bei der DNA-Replikation wird dann statt einem Cytosin ein Thymin eingebaut. Dadurch entstehen zahlreiche Punktmutationen von G/C nach A/T. Der Screen wurde mit der Hilfe der in Kapitel 2.1.1.1. beschriebenen Platten durchgeführt. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden mit dem beschriebenen Stressmedium mit einem osmotischen Potential von -0,3 MPa behandelt. Die Lumineszenz der Keimblätter wurde nach 18 h Inkubation gemessen und quantifiziert. In Abbildung 5 werden Ergebnisse für unabhängige EMS-Samenpools dargestellt. Es zeigte sich, dass die meisten Keimlinge einer ähnlichen Sensitivität auf das osmotische Potential von -0,3 MPa reagierten wie der Wildtyp (Abb. 2-4). In diesen Samenpools wurden putative Mutanten gefunden, die eine Lichtemission von  $1750 \times 10^3$  RLU bzw.  $1850 \times 10^3$  RLU zeigten und damit im Bereich der an mit -0,6MPa gestressten Wildtyp-Keimlingen gemessenen Lumineszenz lagen (Abb. 2-5).

Im diesem Screen wurden insgesamt 92630 Samen der M2-Generation ausgebracht, wovon 81051(87 %) keimten. 46 (~0,06 %) putativen Mutanten wurden gefunden, die den

## Ergebnisse

erwünschten Phänotyp zeigten und deutlich hypersensitiv auf den applizierten osmotischen Stress reagierten. Die putativen Mutanten wurden in die Erde pikiert und amplifiziert.



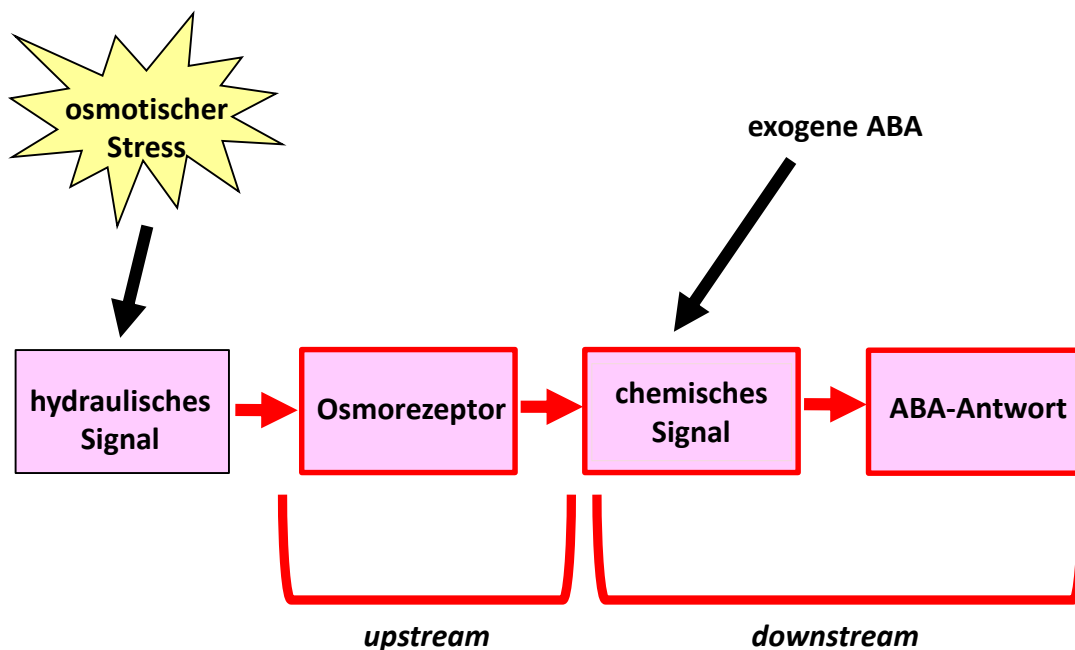
**Abbildung 2-5:** Screen auf in der Osmoperzeption gestörte Mutanten. Der dargestellte Versuch wurde bei einem osmotischen Potential von -0,3 MPa durchgeführt. Im Test zweier verschiedener EMS-Samenpools (rote und blaue Linie) wurden zwei putativen Mutanten gefunden.

Es überlebten jedoch nur 25 Mutanten, deren M3-Generation anschließend phänotypisch getestet wurde. Die Hypersensitivität konnte nur für 5 von diesen Mutanten in den nächsten Generationen bestätigt werden.

In den letzten 20 Jahren wurde die ABA-Signaltransduktion sehr intensiv untersucht, dabei wurden ihre wichtigsten Komponenten entdeckt und charakterisiert. Allerdings identifizierte man keine Elemente, die die Rolle eines Osmorezeptors spielen könnten. Da im vorgestellten damit gerechnet werden musste, bekannte, an der ABA-Signaltransduktion beteiligte Loci zu finden, war es wichtig, die gefundenen Mutanten weiter zu charakterisieren. Dabei sollten spezifisch die Mutanten herausgefunden werden, deren Störung in der Stress-Signaltransduktion *upstream* von der ABA-Biosynthese und ABA-Antwort liegt und die ABA-Signalwege auf hypersensitive Weise aktiviert. Das Arbeitsmodell, auf dem die Charakterisierung der Mutanten basiert, wird in der Abbildung 2-6 dargestellt. Bei Wasserdefizit wird ein hydraulisches Signal in den Wurzeln induziert (Christmann et al, 2007). Dies sollte durch einen unbekanntem Osmosensor wahrgenommen werden und weiter zur ABA-Biosynthese führen. Dabei wird das osmotische Signal zu einem chemischen Signal umgewandelt, in diesem Fall wird die Abscisinsäure gebildet, die anschließend die ABA-Signaltransduktion aktiviert.

Die weitere Analyse der in der Osmoperzeption gestörten Mutanten erfolgte mit Hilfe der exogenen Zugabe von Abscisinsäure und der dadurch bewirkten Induktion des

*pAtHB6::LUC*-Reporters. Die exogene Abscisinsäure ermöglichte es zwischen *upstream*- und *downstream*- Mutanten zu unterscheiden. Auf Grund des vorgestellten Arbeitsmodells wurde angenommen, dass die *upstream*-Mutanten in Gegenwart von exogener ABA eine Reporterinduktion in vergleichbarem Umfang wie die *pAtHB6::LUC*-Kontrolllinie zeigen sollten (Abb.2-6). Hypersensitivität sollte also nur in Gegenwart von Trockenstress oder osmotischen Stress zu beobachten sein. In diesem Fall müsste die gesuchte Mutation direkt den Osmorezeptor oder nah an dem Sensor liegende Komponenten betreffen, die *upstream* von der ABA-Antwort liegen. Demzufolge würde es in *downstream*-Mutanten in Gegenwart von exogen zugeführter ABA zu einer hypersensitiven Induktion des Reporters im Vergleich zum Wildtyp kommen. Die identifizierten Mutanten zeigten alle eine sehr starke Hypersensitivität in Gegenwart von ABA und wurden daher als *downstream*-Mutanten klassifiziert.

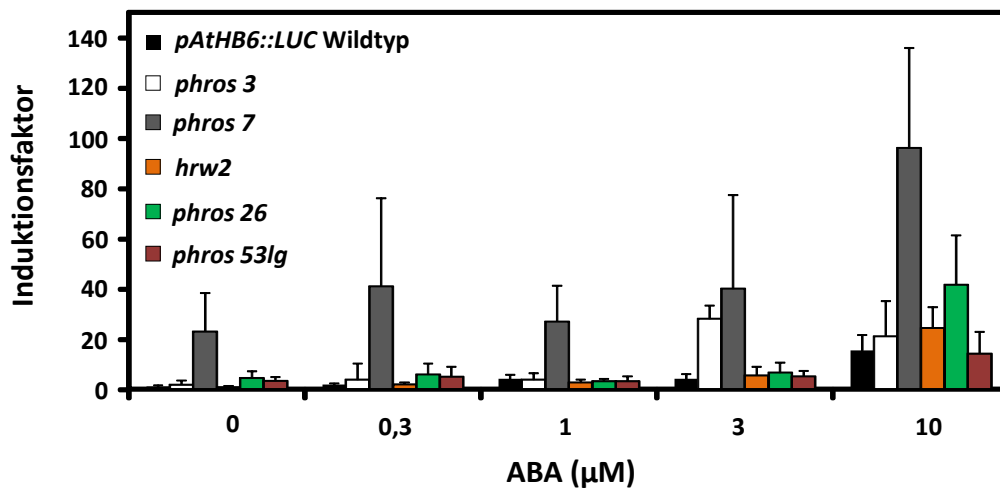


**Abbildung 2-6:** Darstellung des angewandten Arbeitsmodells. Die identifizierten Mutanten wurden als *upstream*- oder *downstream*-Mutanten klassifiziert.

Parallel wurde ein Screen von Dr. Alexander Christmann und Johanna Berger durchgeführt, der zur Identifizierung von neuen osmo-hypersensitiven Mutanten führte. Die Mutanten wurden *phros* (*putatively hypersensitive to root-applied osmotic stress*) genannt. Eine erste Charakterisierung dieser Mutanten wurde von Frau Berger vorgenommen, sie wurde nun an Linien der Folgegeneration überprüft. Dazu wurde wiederum die Induktion des Reporters in Anwesenheit exogener Abscisinsäure untersucht (Abb. 2-7). Die stärkste Induktion zeigte die *phros 7*-Mutante, die einen ABA-hypersensitiven Phänotyp in Gegenwart der verwendeten ABA-Konzentrationen aufwies. Interessanterweise zeigte die *phros 7* im Vergleich zur Kontrolle

## Ergebnisse

eine 23-fache Induktion des Reporters in Abwesenheit von ABA, was für eine konstitutive Aktivierung der ABA-Antwort sprechen würde. Eine weitere Mutante, *phros 3*, zeigte bei einer ABA-Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  eine 7-fach stärkere Aktivierung des Reporters im Vergleich zum Wildtyp und wies damit einen klar ABA-hypersensitiven Phänotyp auf. Bei einer ABA-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war die Aktivität der *phros 3*-Mutante dann nur noch 1,4-fach höher als die der Kontrolllinie. Die Mutanten *hrw2*, und *phros 53lg* emittierten in Gegenwart von unterschiedlichen ABA-Konzentrationen die Fluoreszenz mit der gleichen Stärke wie der Wildtyp und wurden damit in die Gruppe der *upstream*-Mutanten eingeordnet. *phros 26* zeigte eine schwache ABA-Hypersensitivität und der Reporter wurde in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  ABA 2,7-fach im Vergleich zum Wildtyp induziert.



**Abbildung 2-7:** Einfluß von Abscisinsäure auf die ABA-abhängige Genexpression in *hrw2* und *phros*-Mutanten. Die *pAtHB6::LUC*-Reporteraktivität wurde bei ABA-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  nach 24 h Induktion gemessen

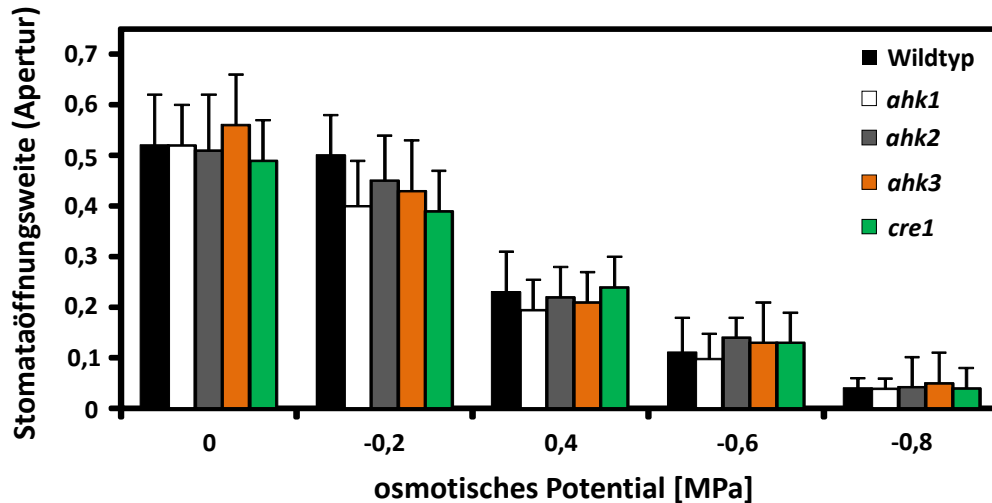
### 2.1.1.3. Histidinkinasen und MSL-Kanäle in *Arabidopsis thaliana* als mögliche Osmosensoren

Da es möglich schien, dass die in den Kapiteln 1.2.2 und 1.2.3 beschriebenen Histidinkinasen und MSL-Kanäle eine wichtige Rolle bei osmotischem Stress als eventuelle Osmorezeptoren spielen könnten, wurde getestet, ob das Verhalten von *ahk*- und *msl* Einfach- und Mehrfachmutanten unter Einwirkung von osmotischem Stress oder von ABA zu dem oben beschriebenen Arbeitsmodell passen.

Zunächst wurde die Stomataregulation der *ahk*-Mutanten (Columbia-Ökotyp) in Anwesenheit von Mannit untersucht. Die 3 Wochen alten Pflanzen wurden mit Mannit-Lösungen verschiedener Konzentration gegossen. Dann wurden 24 Stunden inkubiert und anschließend Epidermispräparate angefertigt. An den Epidermispräparaten wurden die



Stomataöffnungsweite nach 24 Stunden Inkubation gemessen. Die Spaltöffnungsweiten wurden als Apertur (= Verhältnis von Spaltbreite zu Spaltlänge) gemessen (Abb. 2-8).

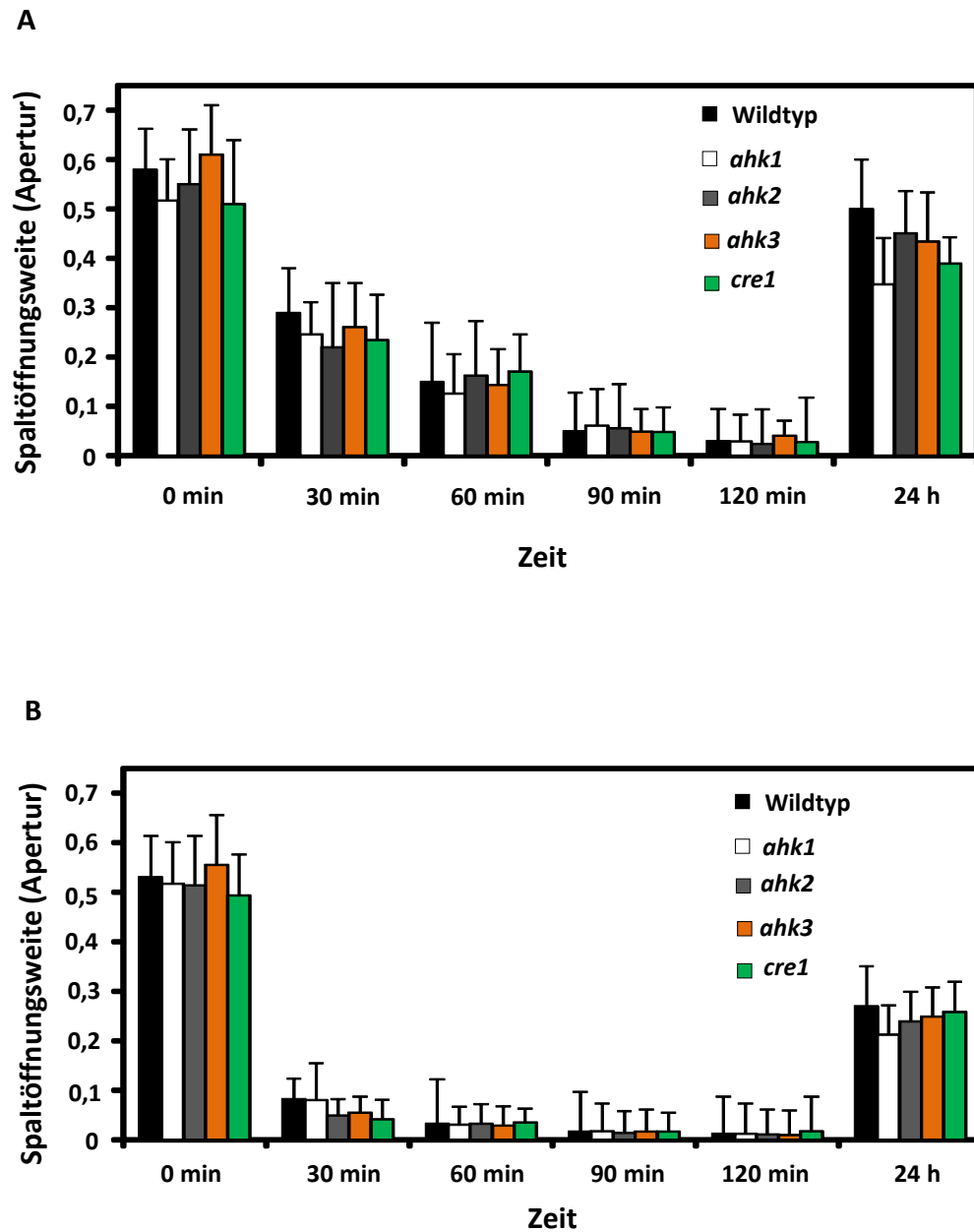


**Abbildung 2-8:** Stomataöffnungsweiten in Anwesenheit von verschiedenen Mannit-Konzentrationen von Columbia-Wildtyp (schwarze Balken), *ahk1* (weiße Balken), *ahk2* (graue Balken), *ahk3* (orange Balken) und *cre1* (grüne Balken).

Bei einem osmotischen Potential von -0,2 MPa zeigten die Mutanten eine leicht erhöhte Sensitivität im Vergleich zur Kontrolle (Apertur 0,42 bzw. 0,5), allerdings lagen die Unterschiede innerhalb der Standardabweichung und waren nicht signifikant. Bei einem osmotischen Potential von -0,8 MPa waren die Stomata von den Mutanten und der Kontrolle mit Aperturen von 0,039 bzw. 0,045 völlig geschlossen. Bei einem osmotischen Potential von -0,2 MPa bis -0,8 MPa zeigte also keine der getesteten *ahk*-Mutanten (*ahk1*, *ahk2*, *ahk3*, *cre1*) einen Stomataphänotyp. Da die 24-stündige Inkubation keine deutlichen Unterschiede bei der Stomataregulation zwischen dem Wildtyp und den *ahk*-Mutanten lieferte, wurde die Kinetik der Stomatareaktion untersucht. Bei osmotischem Stress von -0,2 MPa zeigte sich, dass die Kurzzeiteffekte (0 bis 120 min) auf die Öffnung der Stomata sich nicht zwischen dem Wildtyp und *ahk*-Mutanten unterschieden, wobei die Regulation der Stomataporen deutlich zu sehen war (Abb. 2-9 A). Nach 30 Minuten Stress lag die Apertur bei 0,25, während 2-stündige Inkubation zum kompletten Schließen der Stomata führte (Apertur ca. 0,03). Nach 24 Stunden Inkubation wurde eine teilweise Wiederöffnung der Stomata in Anwesenheit von osmotischem Stress beobachtet, so betrug die Stomataöffnungsweite ca. 0,4 (Kontrolle ca. 0,55). Anschließend wurde die Kinetik der Stomataregulation bei osmotischem Stress von -0,4 MPa getestet (Abb. 2-9 B). Es zeigte sich, wie erwartet, dass die Schließzellen schneller als bei osmotischem Stress von -0,2 MPa den Turgor verloren und nach 30 Minuten Inkubation lag die Apertur bei 0,07. Eine weitere Stressbehandlung führte zum völligen Schließen von Stomataporen und die

## Ergebnisse

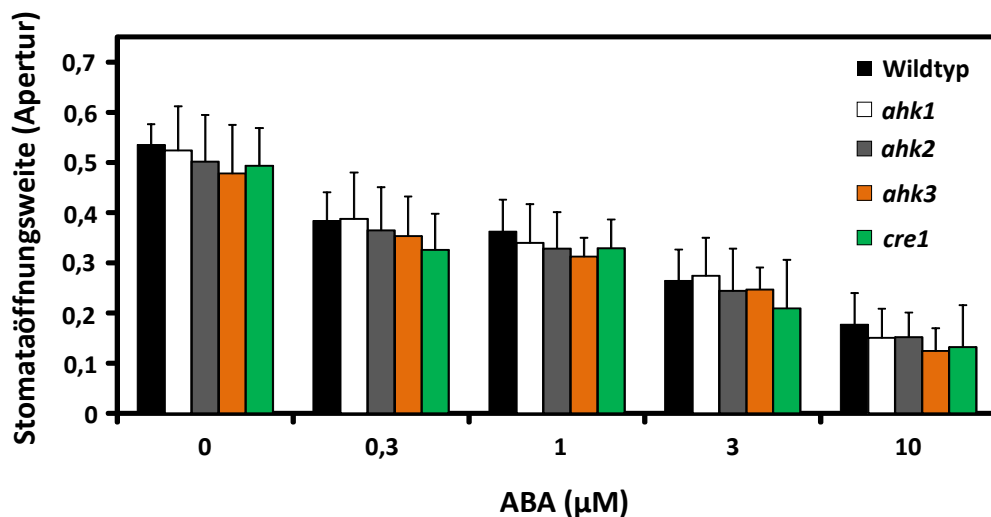
Apertur lag nach 120 min bei osmotischem Stress von -0,4 MPa bei 0,01. Nach 24 Stunden wurde erneut eine Wiederöffnung beobachtet, wobei die Apertur betrug nur ca. 50 % der Kontrolle und lag bei 0,27.



**Abbildung 2-9:** Die Kinetik der Stomataregulation vom Wildtyp und *ahk1*, *ahk2*, *ahk3* und *cre1*-Mutante bei osmotischem Stress von -0,2 MPa (A) bzw. -0,4 MPa (B).

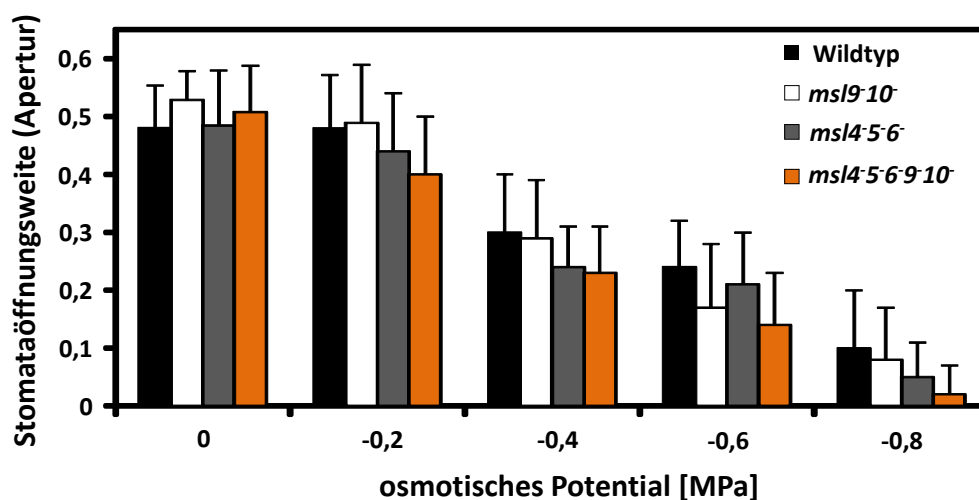
Anschließend wurde die Stomatareaktion der *ahk*-Mutanten auf die Gegenwart von Abscisinsäure untersucht. Die Epidermispräparate wurden dazu in einem MES-KOH-Puffer für 3 Stunden bei unterschiedlichen ABA-Konzentrationen inkubiert (siehe Material und Methoden)

Die Stomataöffnungsweite lag in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  ABA bei ca. 0,15 und unterschied sich damit deutlich von der Apertur in Abwesenheit inkubierten Proben (Apertur ca. 0,5). Es zeigte sich, dass ABA zum Stomataschluss führte, jedoch die *ahk1*, *ahk2*, *ahk3* und *cre1*-Mutante weder hypersensitiv noch insensitiv auf ABA reagierten (Abb. 2-10).



**Abbildung 2-10:** Einfluss der Abscisinsäure auf Spaltöffnungsweiten von Columbia-Wildtyp (schwarze Balken), *ahk1* (weiße Balken), *ahk2* (graue Balken), *ahk3* (orange Balken) und *cre1* (grüne Balken). Die Epidermispräparate wurden für 3 Stunden in Abwesenheit von ABA bzw. in Gegenwart verschiedener ABA-Konzentrationen inkubiert.

Als Nächstes wurde die Stomatareaktion der *msl*-Mutanten getestet. In diesem Versuch wurden die Mehrfachmutanten *msl9-10*, *msl4-5-6* und *msl4-5-6-9-10* verwendet. Zunächst wurde der Einfluss von Mannit in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht.

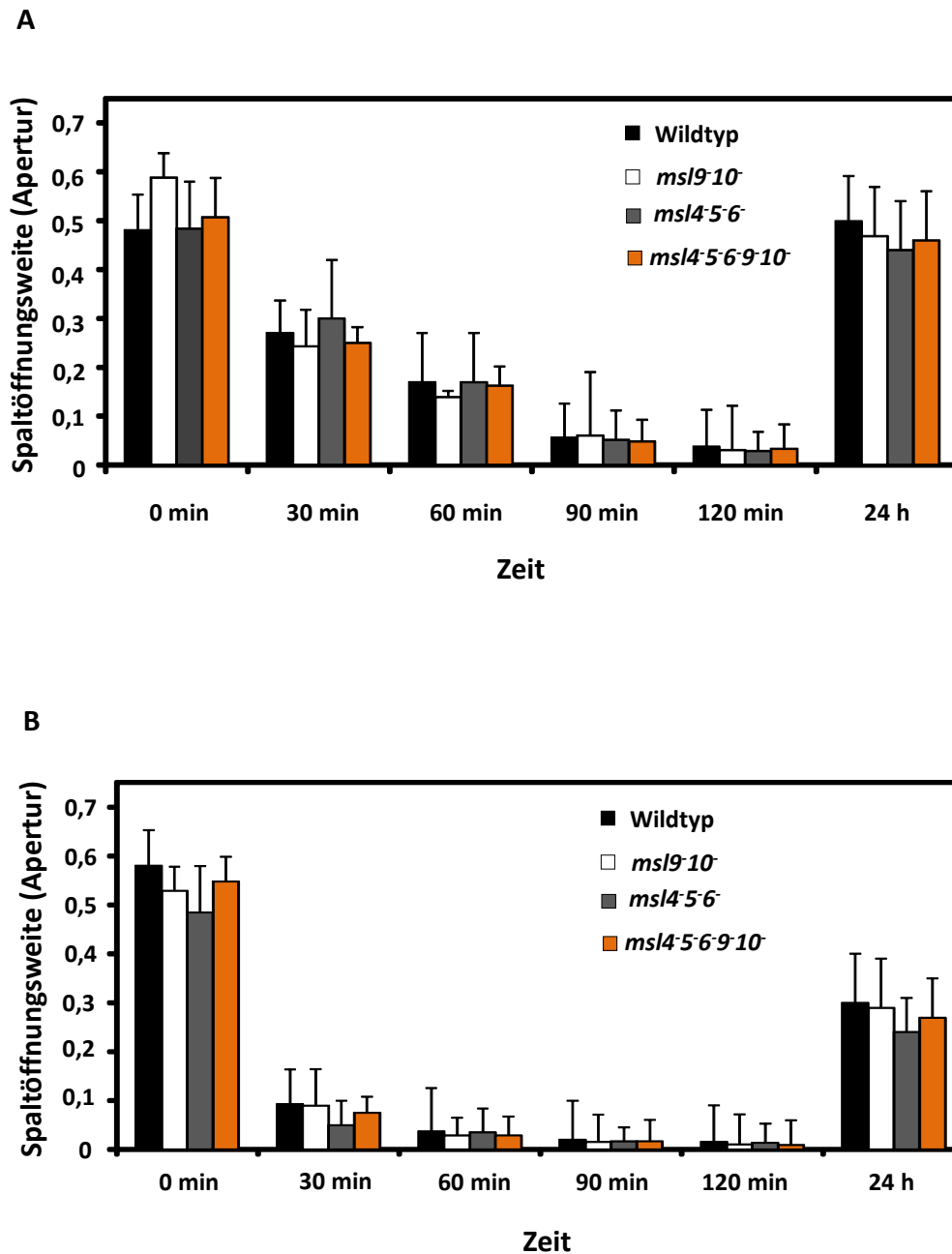


**Abbildung 2-11:** Mannit-abhängige Regulation der Stomataaperturen in Columbia-Wildtyp (schwarze Balken), *msl9-10* (weiße Balken), *msl4-5-6* (graue Balken) und *msl4-5-6-9-10* (orange Balken).

## Ergebnisse

---

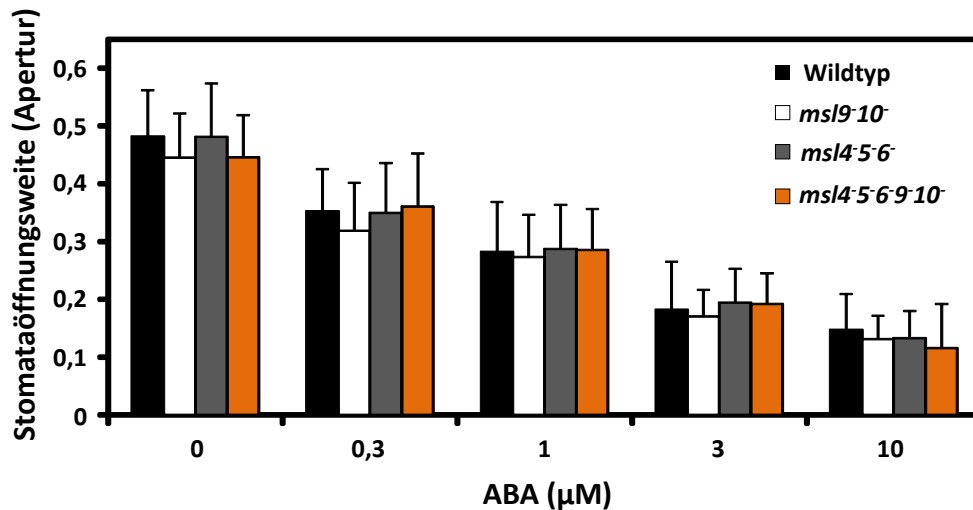
Bei einem osmotischen Potential von -0,2 MPa lag die Spaltöffnungsweite für Wildtyp und *mssl4-5-6-9-10*-Mutante bei 0,48 bzw. 0,4, während die Doppel- und Trippel-Mutante beinahe keinen Effekt zeigten und deren Apertur bei 0,48 bzw. 0,44 lag. Generell zeigte bei einem osmotischen Stress von -0,2 MPa bis -0,8 MPa nur die *mssl4-5-6-9-10*-Mutante ein leicht sensitiveres Verhalten als die Kontrolle (Abb. 2-11). In diesem Versuch zeigte sich somit die überlappende Funktion der getesteten MSL-Kanäle. Der stärkste Unterschied zwischen Kontrolle und 5-fach Mutante war bei einem osmotischen Potential von -0,8 MPa zu sehen und die Stomataöffnungsweite lag hier bei 0,1 (Wildtyp) bzw. 0,02 (5-fach Mutante). Es ist wichtig zu erwähnen, dass solch geringfügige Unterschiede in Stomataexperimenten für eine nicht signifikante Rolle der MSL-Kanäle als Osmosensoren sprechen. Anschließend wurde die Kinetik der Stomataregulation von Mehrfachmutanten *mssl9-10*, *mssl4-5-6* und *mssl4-5-6-9-10* in Gegenwart von osmotischem Potential untersucht. Nach einer 30-minütigen Behandlung zeigten bei osmotischem Stress von -0,2 MPa sowohl der Wildtyp als auch die getesteten *mssl*-Mutanten eine Reduktion der Spaltöffnungsweite, die ca. 0,27 betrug (Abb. 2-12 A). Allerdings zeigten sich keine Unterschiede, die für eine Störung in der Osmostress-Perzeption von *mssl*-Mutanten sprechen könnte. Eine weitere Inkubation induzierte das Schließen und die Apertur von Stomataporen lag nach 120 Minuten bei 0,03, wobei eine Wiederöffnung nach 24 Stunden Stress zu sehen war, bei der die Apertur ca. 0,48 betrug. Osmotischer Stress von -0,4 MPa beeinflusste sie Schließzellen deutlich stärker nach 30 Minuten induzierte fast ein komplettes Schließen von Stomataporen (ca. 0,09). Die Apertur von wiedergeöffneten Spaltöffnungsweiten lag nach 24 Stunden bei ca. 0,28 (Abb. 2-12 B).



**Abbildung 2-12:** Die Kinetik der Stomataregulation vom Wildtyp und *msl*-Mehrfachmutanten bei osmotischem Stress von -0,2 MPa (A) bzw -0,4 MPa (B).

## Ergebnisse

Als Letztes wurde die Reaktion der Stomata von *msl*-Mutanten auf ABA untersucht. Wieder wurden die Epidermispäparate mit verschiedenen ABA-Konzentrationen behandelt und nach 24 h die Aperturen gemessen.



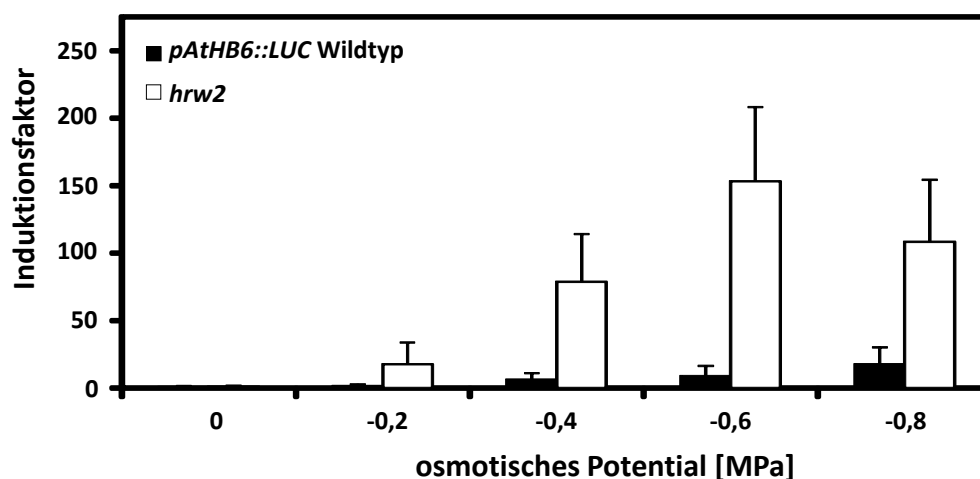
**Abbildung 2-13:** ABA-abhängige Regulation der Stomataöffnungsweiten in Columbia-Wildtyp (schwarze Balken), *msl9-10-* (weiße Balken), *msl4-5-6-* (graue Balken) und *msl4-5-6-9-10-* (orange Balken).

Es zeigte sich, dass die *msl*-Mutanten wie der Wildtyp ihre Stomata in Abhängigkeit von der Konzentration der angebotenen ABA-Lösung schließen. Allerdings wiesen sie keinen ABA-Phänotyp auf. Es wurden keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten beobachtet (Abb. 2-13). Bei einer ABA-Konzentration von 10 μM lag die Apertur von Wildtyp und Mutanten einheitlich bei ca. 0,13. Da nach den in diesem Kapitel vorgestellten Analysen an *ahk*- und *msl*-Mutanten sowohl die untersuchten Histidinkinasen als auch die bearbeiteten MSLs nicht als Osmosensor wirken, erschien die Suche nach neuen in der Osmoperzeption gestörten Mutanten als erfolgversprechender Weg zur Aufklärung der hydraulischen Signalkaskade in *Arabidopsis thaliana*.

## 2.1.2. Charakterisierung der *hrw2* -Mutante

### 2.1.2.1. Reporterexpression in Keimlingen

Da der durchgeführte Screen und die vorläufige Analyse bewiesen, dass die *hrw2*-Mutante den gewünschten Phänotyp besaß, wurde sie als der beste Kandidat zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Zunächst wurde die Mutante 2-mal mit dem *pAtHB6::LUC*- Wildtyp zurückgekreuzt und die homozygoten Pflanzen selektiert. Anschließend wurde der Phänotyp mit Hilfe der ABA-abhängigen Reporterexpression in Sprossen der *hrw2*-Keimlinge bestätigt. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden bei einem osmotischen Potential von 0 MPa bis -0,8 MPa exponiert (Abb. 2-14), wobei 0 MPa das MS-Medium bedeutete und in diesem Versuch als Kontrolle diente. Alle Werte wurden mit der Reporteraktivität des *pAtHB6::LUC*-Wildtyps bei einem osmotischen Potential von 0 MPa verglichen (Induktionsfaktor=1). Bei einem osmotischen Potential von -0,2 MPa reagierte die Mutante deutlich hypersensitiv und zeigte 12-fach stärkere Reporteraktivierung als der Wildtyp, während bei -0,4 MPa die ABA-abhängige Induktion des Reporters 12,7-fach höher war als im Wildtyp. Die stärkste Lumineszenz zeigte die *hrw2*-Mutante bei einem osmotischen Potential von -0,6 MPa, das den Reporter 17-fach effektiver aktivierte als in der *pAtHB6::LUC*-Kontrolllinie. Überraschenderweise wurde der Reporter bei einem osmotischen Potential von -0,8 MPa schwächer aktiviert und zeigte eine nur 6-fach stärkere Induktion im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse ließen sich mehrfach reproduzieren.

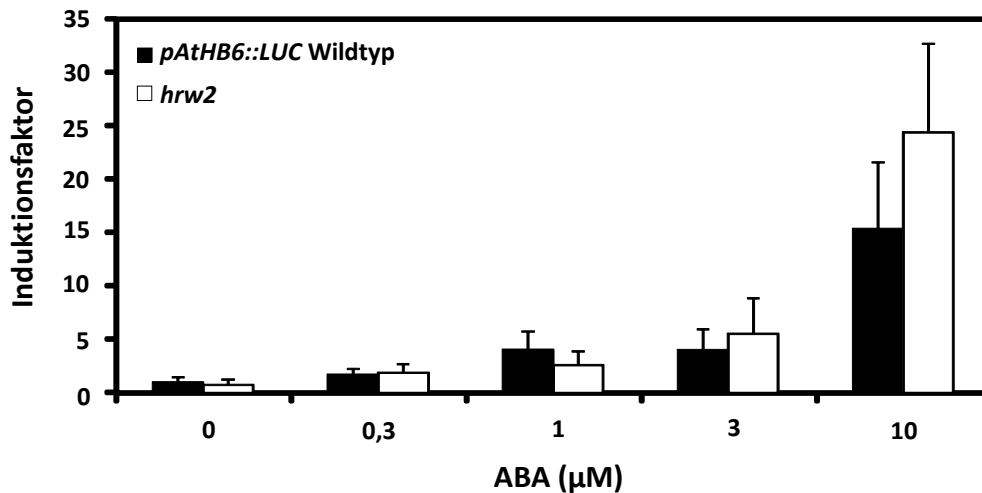


**Abbildung 2-14:** Darstellung der Lumineszenz im Spross der 18 h mit Mannit gestressten *pAtHB6::LUC*-Wildtyp bzw. *hrw2*-Keimlinge.

Anschließend wurde die Reporteraktivierung der Sprosse der rückgekreuzten Linie in Gegenwart von verschiedenen ABA-Konzentrationen untersucht. Nach einer 2-tägigen Lagerung

## Ergebnisse

bei 4°C wurden die Samen für 5 Tage in einem flüssigen MS-Medium (siehe Material und Methoden) mit Schütteln bei 23 °C inkubiert. Die entsprechenden Mengen an ABA wurden zugegeben und nach 24 Stunden der Inkubation wurde die Lumineszenz der Keimlinge gemessen. Die ABA-abhängige Reporteraktivität wird in Abbildung 2-15 dargestellt.



**Abbildung 2-15:** Die LUC-Aktivität der mit ABA in flüssigem MS-Medium inkubierten Keimlinge. Die Lumineszenz wurde nach 24 h Inkubation mit einer CCD-Kamera gemessen.

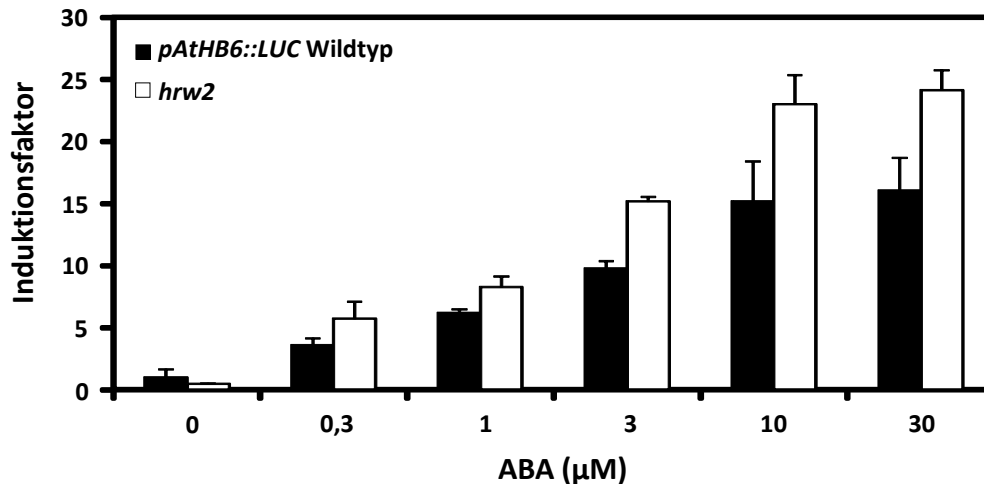
Die Reporteraktivität des Wildtyps in Abwesenheit von der Abscisinsäure wurde auf eins gesetzt und als Kontrolle bestimmt. Die Grundaktivität der *hrw2*-Mutante lag bei 0,8-fach der Kontrollaktivität. Es zeigte sich, dass bei einer ABA-Konzentration von 0,3 µM die *hrw2*-Mutante und der Wildtyp vergleichbare Reporteraktivität erwiesen (Induktion 1,7-fach bzw. 1,9-fach). Bei ABA-Konzentrationen von 1 µM und 3 µM zeigten sich geringe Schwankungen der Reporteraktivität, die innerhalb der Standardabweichung lagen. Bei einer ABA-Konzentration von 10 µM wurden die größten Aktivitätsunterschiede beobachtet, wobei die Mutante nur 1,5-fach den Wildtyp übertraf. Die Reporterexpression der einem osmotischen Stress beziehungsweise ABA exponierten Keimlinge bestätigte den gewünschten Phänotyp der *hrw2*-Mutante.

### 2.1.2.2. Reporterexpression in Protoplasten

Die weitere Analyse der *hrw2*-Mutante erfolgte mit Hilfe des Protoplastensystems. In diesem Versuch wurden die *hrw2*- und Wildtyp-Protoplasten mit *pRD29B::LUC*- und *35S::GUS*-Konstrukten transfiziert. *pRD29B::LUC* ist ein ABA-induzierbares Konstrukt, während *35S::GUS* konstitutiv aktiv wirkt und als eine interne Kontrolle der Transfektionseffizienz



verwendet wird. Anschließend erfolgte eine 18-stündige Inkubation in Gegenwart von verschiedenen ABA-Konzentrationen. Das Aktivierungsmuster des Reporters wird in der Abbildung 2-16 dargestellt.



**Abbildung 2-16:** Einfluß von ABA auf die ABA-abhängige Genexpression in Protoplasten. Die Wildtyp- und *hrw2*-Protoplasten wurden mit *pRD29B::LUC* und *35S::GUS* transfiziert. Die Induktion in Gegenwart von ABA wurde nach 18 h Inkubation gemessen. Jeder Datenpunkt repräsentiert 3 unabhängige Experimente.

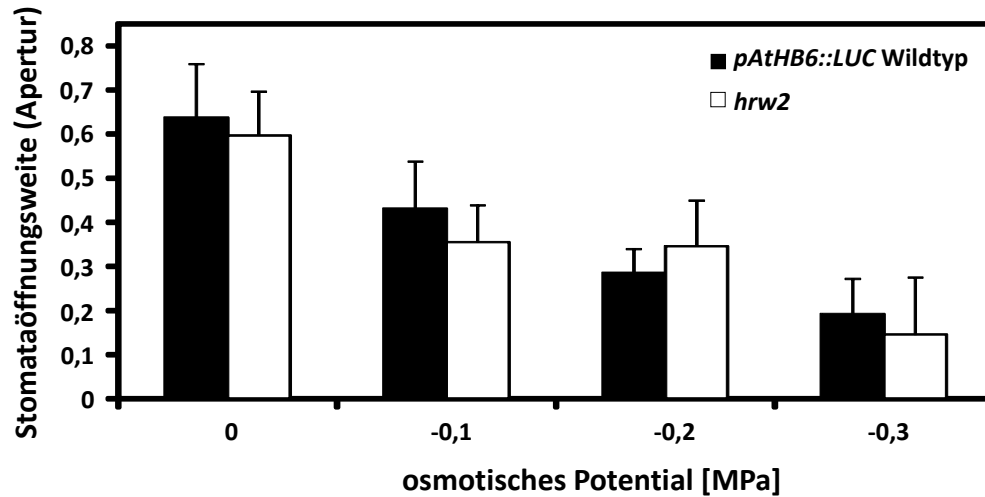
Die Reporteraktivität in Wildtyp-Protoplasten wurde in Abwesenheit von der Abscisinsäure auf eins gesetzt. Bereits bei einer ABA-Konzentration von 0,3 µM zeigten die *hrw2*-Protoplasten leichte ABA-Hypersensitivität der Genexpression im Vergleich zum Wildtyp (Induktion 5,7-fach bzw. 3,6-fach). In Anwesenheit von 1 µM ABA wurde die Reporterexpression der Mutante 1,3-fach stärker induziert im Wildtyp, bei ABA-Konzentration von 3 µM, 10 µM und 30 µM ca. 1,5-fach stärker. Der Protoplastenversuch zeigte eine nur geringe ABA-Hypersensitivität der Reporterexpression in der *hrw2*-Mutante, die durch die Abwesenheit der Zellwand verursacht sein könnte.

### 2.1.2.3. Stomataöffnung

Anschließend wurde die physiologische Analyse durchgeführt, in der die ABA-Antwort von ABA-regulierten physiologischen Prozessen in der Mutante untersucht wurde. Als Erstes wurde die Regulation der Schließzellen in Anwesenheit von osmotischem Stress untersucht. Unter Trockenstress besitzen die Pflanzen die Fähigkeit, die Stomata zu schließen, um die Wasserverluste zu minimieren. Die 3 Wochen alten Pflanzen wurden mit einem Stressmedium von -0,1 MPa bis -0,3 MPa behandelt. Nach 24 Stunden der Inkubation wurden Epidermispräparate fotografiert und die Spaltöffnungsweiten gemessen. Die

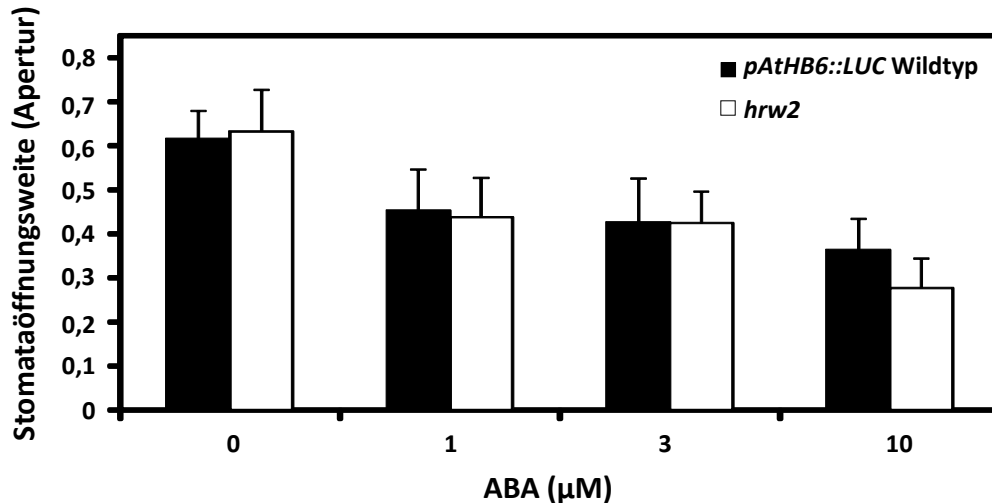
## Ergebnisse

Spaltöffnungsweiten wurden als Apertur (das Verhältnis von Spaltbreite zu Spaltlänge) in der Abbildung 2-17 dargestellt.



**Abbildung 2-17:**Einfluß von Mannit auf die Stomataöffnungsweite. Die 3 Wochen alten Pflanzen wurden mit verschiedenen Mannit-Konzentrationen behandelt, die Apertur wurde nach 24-stündiger Inkubation gemessen.

Es zeigte sich, dass die *hrw2*-Mutante keinen deutlich hypersensitiven Stomataphänotyp aufwies. Die Mutante war zwar fähig, die Schließzellen zu regulieren, unterschied sich aber dabei nicht vom Wildtyp. Bei einem osmotischen Potential von -0,3 MPa waren die Spalten sowohl des Wildtyps als auch der Mutante beinahe völlig geschlossen (Apertur 0,19 bzw. 0,15). Danach wurde die Stomatareaktion in Gegenwart von Abscisinsäure untersucht. Die Epidermispräparate wurden dazu in einem MES-KOH-Puffer für 3 Stunden in Anwesenheit von ABA inkubiert (siehe Material und Methoden). Die Abscisinsäure induzierte in dieser Zeit, wie erwartet, das Schließen der Spalten (Abb. 2-18).



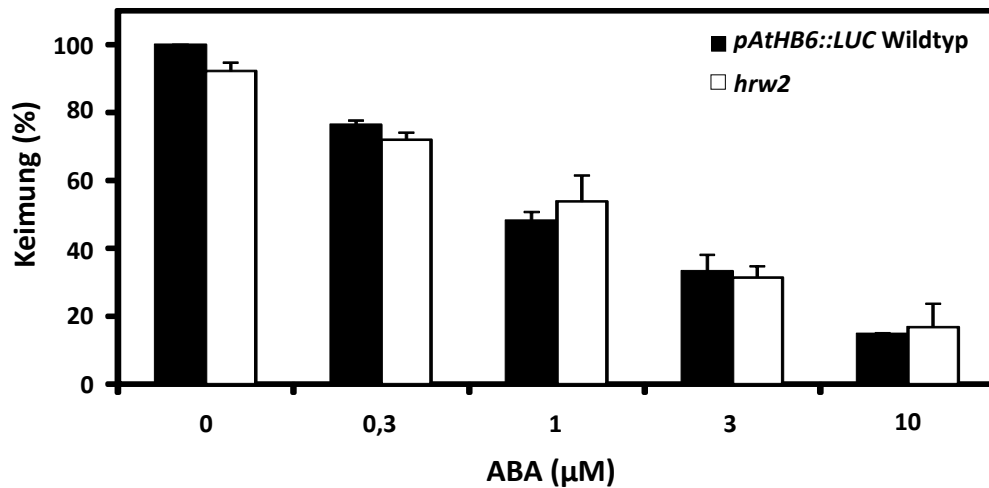
**Abbildung 2-18:** Stomataöffnungsweiten von *pAtHB6::LUC*-Wildtyp (schwarze Balken) und *hrw2* (weiße Balken) Schließzellen in Anwesenheit von Abscisinsäure.

Bei ABA-Konzentrationen von 1 µM und 3 µM wurden die Spaltöffnungsweiten von der Mutante und dem Wildtyp auf ca. 0,43 reduziert. Bei einer ABA-Konzentration von 10 µM schien *hrw2* leicht ABA-sensitiver im Vergleich zur Kontrolle zu sein (0,27 bzw. 0,37). Das Regulationsmuster der Schließzellen in der *hrw2*-Mutante steht in Einklang mit dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen Arbeitsmodell (Abb. 2-6) und zeigte einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp der Mutante.

#### 2.1.2.4. Keimung

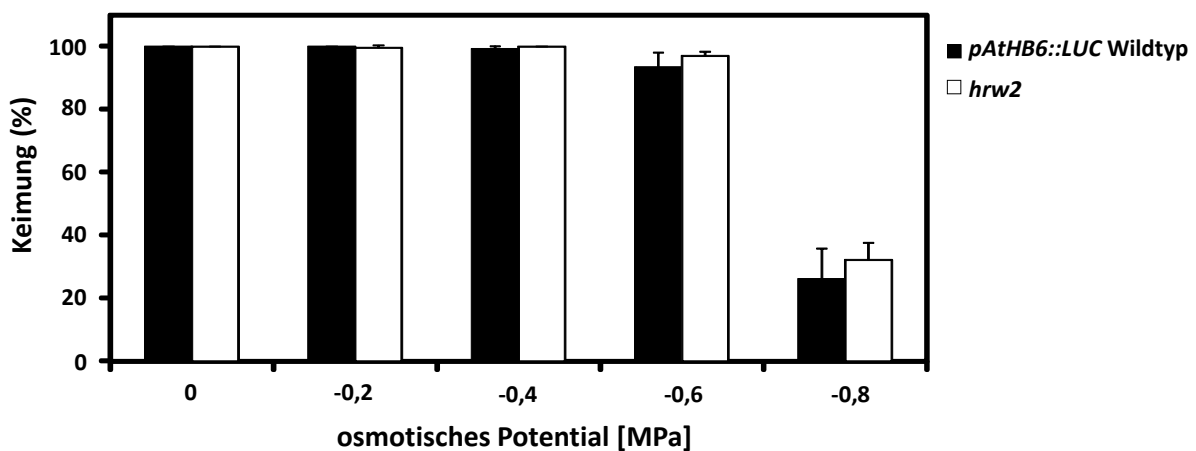
Als weiterer physiologischer Prozess wurde die Keimung der *hrw2* in Gegenwart von Abscisinsäure analysiert. Als Kontrolle wurden die Samen von *pAtHB6::LUC*-Wildtyp verwendet. Die Samen wurden auf ABA-haltigen Platten ausgebracht, 2 Tage lang bei 4°C gelagert, anschließend für 3 Tage bei 23°C inkubiert und danach ausgewertet. *hrw2* reagierte bei allen getesteten ABA-Konzentrationen mit dem Wildtyp vergleichbar (Abb. 2-19). Die Inhibierung der Keimung stieg proportional zu den angewandten ABA-Konzentrationen an. Die Keimungsrate der *hrw2*-Mutante ließ sich nicht deutlich von der Kontrolle unterscheiden und lag in Anwesenheit von 10 µM ABA bei 17 % (*hrw2*) bzw. 15 % (Wildtyp) (Abb. 2-19).

## Ergebnisse



**Abbildung 2-19:** Keimung der Samen von *pAtHB6::LUC*-Wildtyp (schwarze Balken) und *hrw2* (weiße Balken) ( $n > 100$ ) in Anwesenheit von ABA. Die Samen wurden für 3 Tage bei 23°C inkubiert, anschließend wurde der Versuch ausgewertet.

Anschließend wurde die Keimung der *hrw2*-Mutante auf Mannit-haltigem Medium untersucht. Es zeigte sich, dass die osmotischen Potentiale von -0,2 bis -0,6 MPa keinen Einfluss auf die Keimung des Wildtyps und der Mutante hatten (Abb. 2-20).

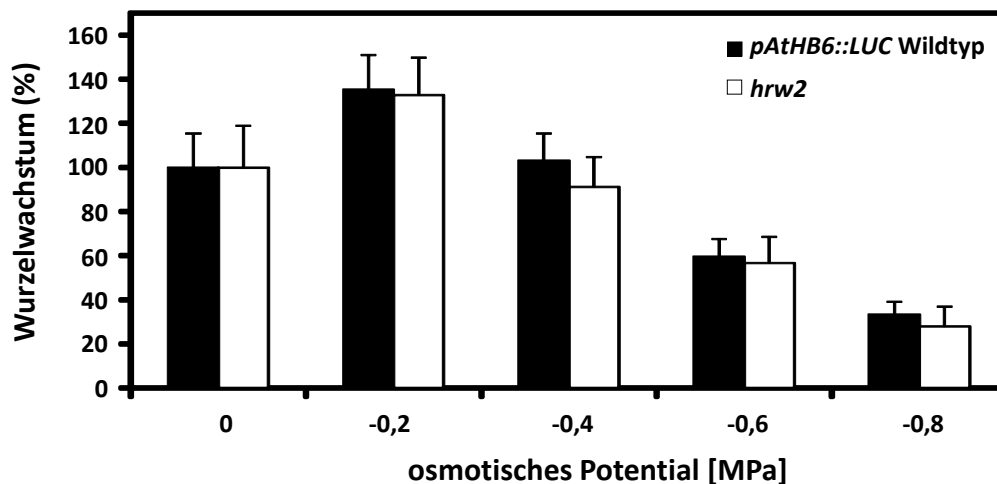


**Abbildung 2-20:** Keimung von *pAtHB6::LUC*-Wildtyp (schwarze Balken) und *hrw2* (weiße Balken) Samen ( $n > 100$ ) in Anwesenheit von verschiedenen osmotischen Potentialen nach einer 3-tägigen Inkubation bei 23°C.

Bei einem osmotischen Potential von -0,8 MPa wurde dagegen eine starke Inhibierung beobachtet und die Keimungsrate des Wildtyps und der Mutante lag bei 27 % bzw. 32 %.

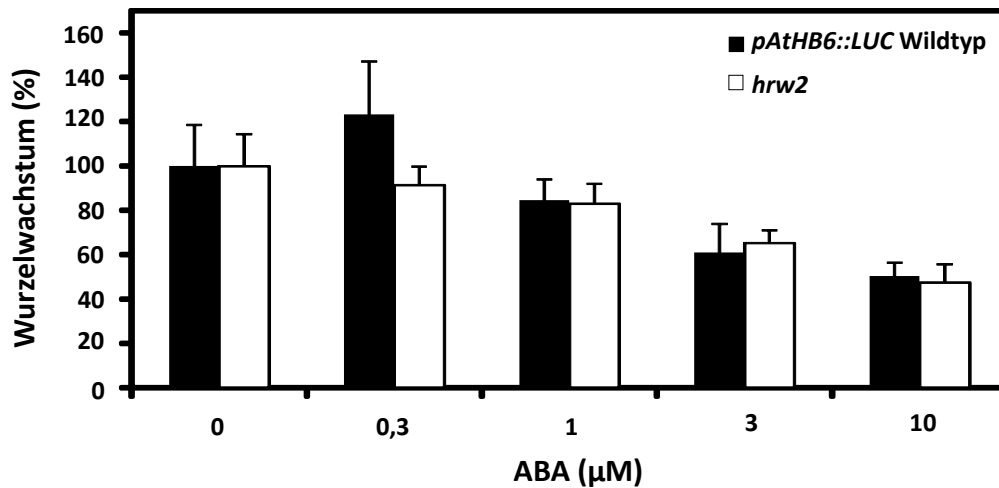
## 2.1.2.5. Wurzelwachstum

Außer der Reporteraktivität der Keimlinge führte keiner der durchgeführten Versuche zur Identifizierung eines osmohypersensitiven Phänotyps in *hrw2*. Als Nächstes wurde der Einfluß von osmotischem Stress auf die Wurzellänge der *hrw2*-Mutante untersucht. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden auf ein Mannit-haltiges Medium umgesetzt und für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurde die Wurzellänge gemessen und in der Abbildung 2-21 dargestellt.



**Abbildung 2-21:** Wurzelwachstum von Keimlingen des Wildtyps (schwarze Balken) und von *hrw2* (weiße Balken) Keimlingen ( $n > 100$ ) in Anwesenheit von Mannit-Stress. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden auf Medium mit verschiedenen Mannit-mengen umgesetzt und nach 3-tägiger Inkubation gemessen

In diesem Experiment zeigte sich, dass ein osmotisches Potential von -0,2 MPa induzierend auf das Wurzelwachstum wirkte und die Wurzellängen des Wildtyps und der Mutante bei 135 % bzw. 132 % lagen. Bei einem osmotischen Potential von -0,4 MPa war ein geringer Unterschied in der Wurzellänge (ca 12 %) zwischen dem Wildtyp und der *hrw2* zu sehen (103 % bzw. 91 %), während bei osmotischen Potentialen von -0,6 MPa und -0,8 MPa kein hypersensitiver Phänotyp der Mutante im Vergleich mit der Kontrolllinie beobachtet wurde und die Wurzellängen bei 57 % und 30 % lagen. Anschließend wurde das Wurzelwachstum in Anwesenheit von Abscisinsäure getestet. Die ABA-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  induzierte das Wurzelwachstum der Kontrolle und die Wurzellänge lag bei 123 %, während das Wachstum der Mutante zu 91 % inhibiert wurde (Abb. 2-22). Der Versuch wurde mehrmals wiederholt.



**Abbildung 2-22:** Wurzelwachstum der Keimlinge von Wildtyp (schwarze Balken) und *hrw2* (weiße Balken) ( $n > 100$ ) in Anwesenheit von Abscisinsäure.

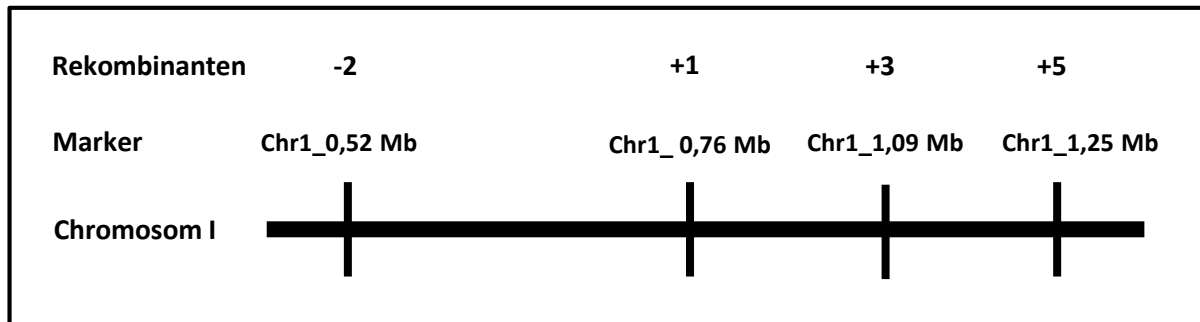
Bei einer ABA-Konzentration von 1 µM wurde das Wurzelwachstum des Wildtyps und der Mutante auf ca. 83 % reduziert, bei Konzentrationen von 3 µM und 10 µM wurden Wurzellängen von ca. 64 % bzw. 48 % der Kontrolle erreicht.

### 2.1.3. Positionelle Klonierung von *hrw2*

#### 2.1.3.1. Physikalische und genetische Karte des Mutanten-Locus

Die *hrw2*-Mutante wurde aus einem EMS-Screen auf Grund ihrer Osmohypersensitivität isoliert. Zur positionellen Klonierung wurde *hrw2*, die im *pAtHB6::LUC-Columbia*-Ökotyp (Col, *pAtHB6::LUC*) generiert wurde, mit dem *Landsberg erecta*-Ökotyp (*Ler*) gekreuzt. Dann wurde die Co-Segregation von genetischen Markern und dem gegenüber osmotischem Stress hypersensitiven Phänotyp in der Tochtergeneration untersucht. Die  $F_2$ -Pflanzen, die einen osmohypersensitiven Phänotyp zeigten, wurden in Erde pikiert. Anschließend wurde die  $F_3$ -Generation phänotypisch getestet und die genomische DNA isoliert. Für diese Kartierung wurden insgesamt 97  $F_3$ -Linien, aus 97 individuellen  $F_2$ -Pflanzen, selektiert und genotypisiert. Der Genotyp der Marker wurde mit dem Phänotyp der isolierten Pflanzen verglichen. Da es sich bei der *hrw2*-Mutante um eine rezessive Mutation handelt, mussten die Pflanzen mit dem hypersensitiven Phänotyp für den *hrw2*-Locus homozygot sein. Da, wie erwähnt, die *hrw2* im Columbia-Ökotyp erzeugt und mit dem *Ler*-Ökotyp gekreuzt wurde, mussten die  $F_2$ -Pflanzen, die den osmohypersensitiven Phänotyp zeigen, an der Stelle des *hrw2*-Locus homozygot für Columbia sein und der Reporter musste mit der Mutation Co-Segregation zeigen. Je näher ein Marker an der Mutation lag, desto weniger traten an diesem Locus rekombinante Pflanzen (Pflanzen, die trotz des hypersensitiven Phenotyps auch die *Ler*-Sequenz zeigten) auf. Durch die

genomische Kartierung konnte die Mutation nah am Telomer des langen Armes von Chromosom I auf ein ca. 240 kb großes Intervall zwischen den zwei Markern Chr1\_0,52 Mb und Chr1\_0,76 Mb eingegrenzt werden (Abb. 2-23).



**Abbildung 2-23:** Kartierungsintervall der *hrw2*-Mutante. Dargestellt sind sowohl die in dieser Kartierung genutzten Marker als auch die Zahl der mit diesen Markern gefundenen Rekombinanten

### 2.1.3.2. Identifizierung der Punktmutation via *whole genome sequencing strategy*

Da mit der vorhandenen Mapping-Population eine weitere Feinkartierung des Mutanten-Locus nicht möglich war, die Suche nach weiteren, dafür geeigneten Rekombinanten aber sehr zeitaufwendig gewesen wäre, wurde das Intervall im Rahmen einer Gesamtgenom-Sequenzierung sequenziert. Die Analyse wurde im Labor von Dr. Tim-Matthias Strom am Helmholtz-Zentrum München durchgeführt. Dort wird routinemäßig mit dem *Illumina-sequencing-by-synthesis Approach* gearbeitet. In dieser Sequenzieretechnik werden fragmentierte Stücke der genomischen DNA zunächst mit Oligonucleotid-Adaptoren versehen und dann zusammen mit sogenannten *Capture Oligos* auf einer planaren, optischen Oberfläche (*Flow Cell*) immobilisiert. Die *Capture Oligos* sind komplementär zu den Adaptorsequenzen am freien DNA-Fragmentende und hybridisieren damit zu Beginn eines jeden Zyklus der nun durchgeführten Festphasen-PCR. Sie dienen in dieser PCR, die auch als Brücken-PCR bezeichnet wird, als Primer. Die Festphasen-PCR wird nun so lange fortgesetzt, bis Cluster mit jeweils ca. 1000 Kopien eines DNA-Fragments entstanden sind. Die Sequenzierung der generierten Cluster erfolgt durch die Replikation des komplementären Strangs mit reversiblen Farbstoff-Terminatoren. Diese sind Desoxynukleotide, die ein Fluorophor und eine Blockierungsgruppe tragen. An die 4 Nukleotide sind jeweils unterschiedliche Fluorophore gebunden. Da die Blockierungsgruppe die DNA-Synthese abbricht, wird pro Zyklus nur eine Base eingebaut und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie für jeden Cluster abgelesen. Im Anschluss wird das Fluorophor und die Blockierungsgruppe von dem Nukleotid abgespalten, was die nächste

## Ergebnisse

Base für den anschließenden Zyklus wieder zugänglich macht. Die Genom-Analyse der *hrw2*-Mutante zeigte 4 Punktmutationen im 240 kb großen Zielintervall, sie werden in der Tabelle 2-1 zusammengestellt. Da es nicht sicher war, um welche Mutation es sich in der *hrw2* handelte, wurde auf Grund im Netz verfügbarer Informationen entschieden, sich zunächst besonders mit dem Gen At1g03060 zu beschäftigen. Saedler et al. (2009) zeigten, dass der Locus das WD40/BEACH-Domänen-Protein SPIRRIG kodiert, das eine starke Homologie zu einer Komponente (LvsA) der kontraktilen Vakuolen in *Dictyostelium* zeigt. Dieser Befund implizierte, dass SPIRRIG eine wichtige Rolle in Osmoregulation der Pflanzen spielen könnte.

**Tabelle 2-1:** Die im kartierten 240 kb-großen Intervall bei der Genomaequenzierung gefundenen Mutationen und ihr Einfluß auf die Aminosäuresequenz der betroffenen Gene.

Position	Gen	Mutation	Aminosäureaustausch
Chr1:614182		C → T	
Chr1:675373	At1g02970	C → T 944	Ser315Leu
Chr1:713556	At1g03060	C → T 10221	Trp3407STOP
Chr1:743687	At1g03090.1	C → T 2111	Ser704Leu
	At1g03090.2	C → T 2171	Ser724Leu

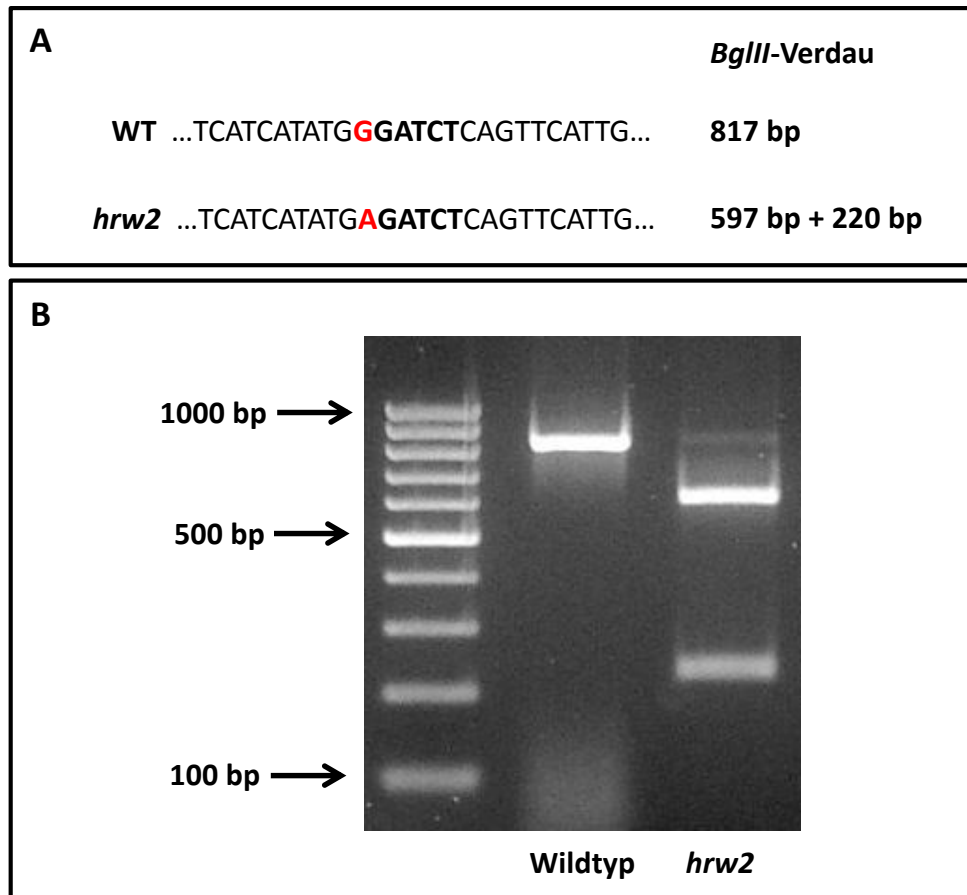
In *hrw2* wurde die Mutation eines Cytosins zu einem Thymin des *antisense*-Stranges identifiziert, dadurch wurde in der Aminosäuresequenz Trp<sup>3407</sup> zu einem Stopcodon. Die Mutation befindet sich in der Position 10221 im letzten Exon (Abb. 2-24).



**Abbildung 2-24:** Die Struktur des Genes At1g03060. Die Exons wurden als Balken und die Introns als Strang dargestellt. Die *hrw2*-Mutation befindet sich im letzten Exon an der Position 10221 (weißes Dreieck).

Die Mutation läßt sich in verschiedenen Kreuzungslinien schnell und einfach mit Hilfe eines CAPS-Markers nachweisen (Abb. 2-25A). Durch den Basenpaaraustausch von G zu A zwischen dem Wildtyp und der Mutante des *sense*-Stranges entstand eine *BglIII* Schnittstelle (AGATCT) in der *hrw2* Sequenz, während es im Wildtyp keine entsprechende Schnittstelle (AGGTCT) gibt (Abb. 2-25A). Die Mutation enthaltende Fragmente mit der Größe von 817 bp wurden amplifiziert, mit *BglIII* verdaut und auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Das *hrw2* PCR-Produkt ließ sich schneiden, dabei waren auf dem Gel 2 Banden mit der Größe von 220 bp und 597 bp deutlich zu sehen (Abb. 2-25B).

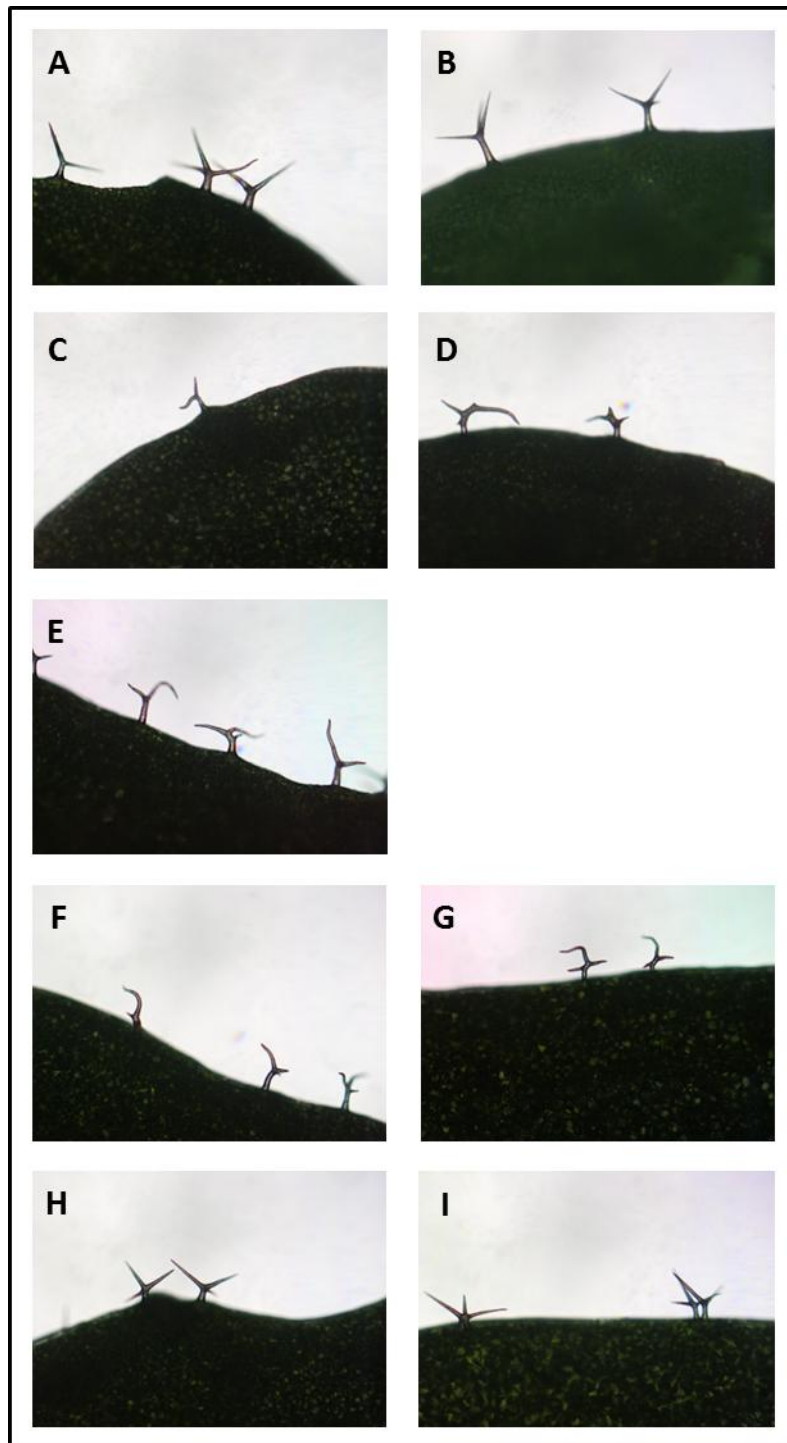




**Abbildung 2-25:** A, ein Basenpaaraustausch zwischen dem Wildtyp und der Mutante generiert eine *Bgl*III-Schnittstelle in der *hrw2* Sequenz (fett hervorgehoben). Über die mutierte Position hinweg wird mittels PCR ein 817 bp langes Fragment amplifiziert. B, die mit *Bgl*III verdauten Wildtyp- und *hrw2*-PCR-Produkte auf einem 2 % Agarosegel getrennt.

#### 2.1.4. Phänotypischer Vergleich zwischen *spirrig*- und *hrw2*-Mutante

Da Saedler et al. (2009) zeigten, dass zwei rezessive Allele des SPIRRIG-Locus *spi-11* (frühes Stopcodon) und *spi-12* (spätes Stopcodon) zu einem Phänotyp mit kürzeren und dünneren Trichomen führen (Abb. 2-26C, 2-26D), wurde die *hrw2*-Mutante auf diesem Phänotyp hin untersucht. Es zeigte sich, dass auch *hrw2* morphologisch veränderte Trichome besitzt (Abb. 2-26E), was als ein *spi*-ähnlicher Phänotyp bezeichnet werden kann. Anschließend wurde *hrw2* mit *spi-11* und *spi-12* (*Ler* Ökotyp) gekreuzt und die F<sub>1</sub>-Generation analysiert. Die F<sub>1</sub>-Pflanzen zeigten den Trichom-Phänotyp (Abb. 2-26F, 2-26G) womit *hrw2* allelisch zu *spi-11* und *spi-12* ist. Die *spi*-Mutanten wurden anschließend mit *pAtHB6::LUC*-Wildtyp Columbia gekreuzt und die jeweilige F<sub>1</sub> getestet. Die *spi-11* und *spi-12* Mutationen wurden durch jeweils ein Wildtyp-Allel komplementiert (Abb. 2-26H, 2-26I).



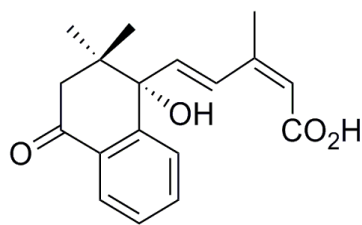
**Abbildung 2-26:** Vergleich des Trichom-Phänotyps zwischen Columbia-Wildtyp (*pAtHB6::LUC*) (A), *Ler*-Wildtyp (B), *spi-11* (C) *spi-12* (D), *hrw2* (E), F<sub>1</sub> *spi-11* x *hrw2* (F), F<sub>1</sub> *spi-12* x *hrw2* (G), F<sub>1</sub> *pAtHB6::LUC* x *spi-11* (H) und F<sub>1</sub> *pAtHB6::LUC* x *spi-11* (I).

## 2.2. Biochemische Vorstufen und Katabolite der Abscisinsäure

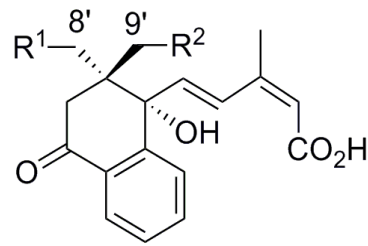
### 2.2.1. Physiologische Aktivität von ABA-Vorstufen und Kataboliten

#### 2.2.1.1. Regulation von Keimung, Wurzelwachstum und Spaltöffnungen

Zunächst wurden die Effekte von biochemischen Vorstufen (Xanthoxin, ABA-Aldehyd, ABA-Alkohol) und Metaboliten der ABA (7'-OH ABA, PA, neoPA, ABA Glucose-Ester) auf Keimung, Wurzelwachstum und Stomataregulation in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Anstelle der chemisch instabilen 8' und 9' hydroxylierten Katabolite wurden die stabilen 8'- und 9'-OH-Tetralone verwendet (Abb. 2-27).



**Tetralon-ABA**



**8'-OH-Tetralon-ABA**  $R^1 = OH, R^2 = H$

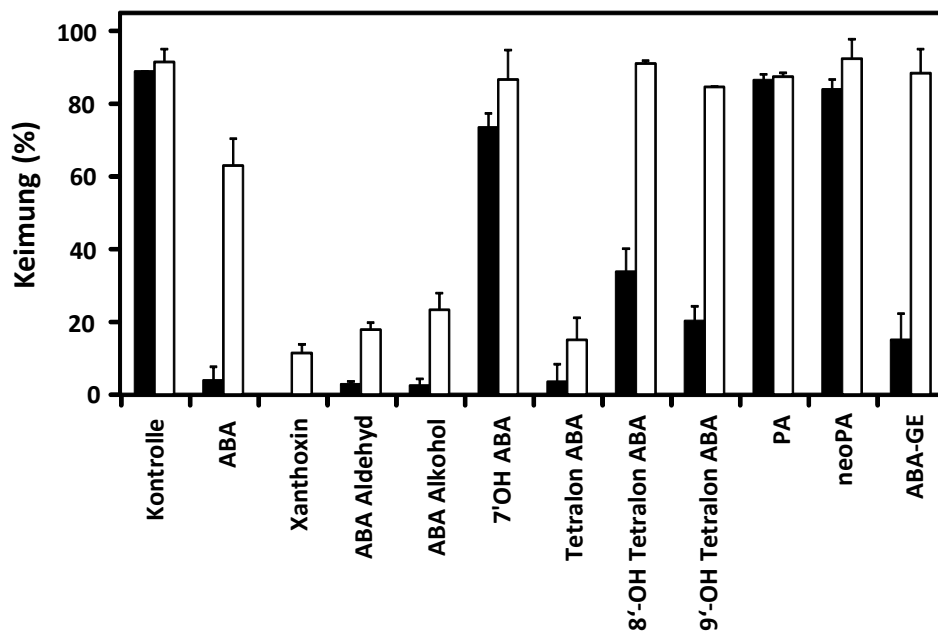
**9'-OH-Tetralon-ABA**  $R^1 = H, R^2 = OH$

**Abbildung 2-27:** Die Struktur von synthetischen ABA Tetralonen. 8'- und 9'-OH-Tetralone sind stabile Formen von 8'- und 9'-OH ABA-Kataboliten

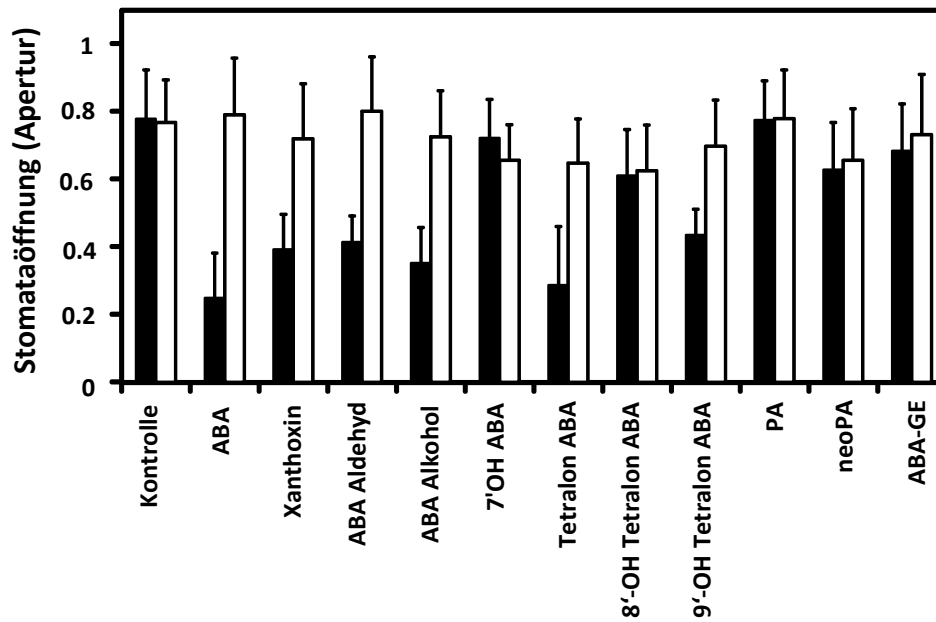
Die Keimungsversuche wurden mit Samen von *Landsberg erecta* und *abi1-1* durchgeführt. Die *abi1-1* Mutante (*abscisic acid insensitive 1-1*) trägt eine dominante Mutation und zeigt ABA-Insensitivität in Keimungsversuchen (Wu et al, 2003). Diese Punktmutation verhindert so die Bindung der PP2C ABI1 an das RCAR-Protein und verhindert die Bildung des aktiven Rezeptorkomplexes (Ma et al, 2009; Park et al, 2009). In den Keimungsversuchen wiesen die ABA-Vorstufen eine gleichwertige Aktivität zur Abscisinsäure auf und inhibierten die Keimung der Wildtyp-Samen bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M fast zu 100 % (Abb. 2-28). Die Katabolite 7'-OH ABA, PA und neo PA waren in diesem Versuch nicht aktiv. ABA Glucose-Ester (ABA GE) zeigte 85 % Inhibierung. 8'-OH/9'-OH Tetralone hemmten die Keimung signifikant, waren aber nicht so aktiv wie ABA und reduzierten die Keimung auf 34 % bzw. 20 %. Die *abi1-1* Mutante reagierte insensitiv auf ABA, Vorstufen und Katabolite. Die ABA-Vorstufen zeigten überraschenderweise stärkere Aktivität als Abscisinsäure. Xanthoxin reduzierte die Keimung auf 11,5 %, ABA-Aldehyd auf 18 %, ABA-Alkohol auf 23,3 %, Abscisinsäure dagegen nur auf 63 % (Abb. 2-28).

## Ergebnisse

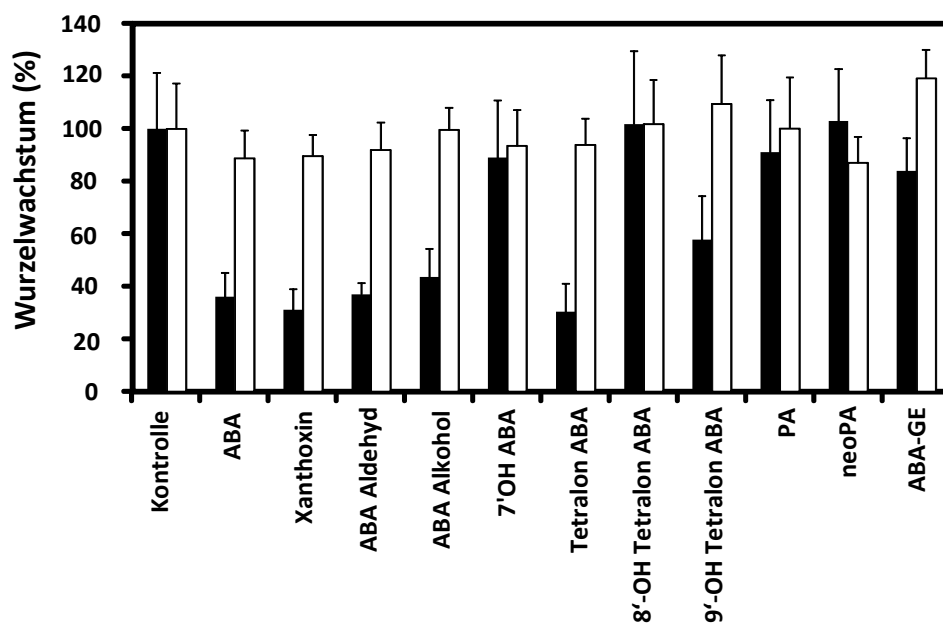
Anschließend wurde die Regulation der Schließzellen analysiert. Dazu wurden Epidermispräparate der 3 Wochen alten *Ler* und *abi1-1* Pflanzen verwendet (siehe 4.1.7). Nach der Zugabe von ABA, ABA-Vorstufen und ABA-Metaboliten wurden die Spaltöffnungsweiten gemessen. Sowohl ABA als auch ABA-Vorstufen regulierten die Öffnung der *Ler* Schließzellen und zeigten keinen oder nur einen minimalen Einfluß auf die Schließzellen der *abi1-1* Mutante (Abb. 29). Außer 8'- und 9'-OH Derivaten, die einen deutlichen Spaltenschluß mit 0,61 bzw. 0,43 induzierten, zeigte keiner der ABA-Katabolite eine Fähigkeit die Schließzellen zu regulieren.



**Abbildung 2-28:** Keimung von *Ler* (schwarze Balken) und *abi1-1* (weiße Balken) Samen ( $n > 100$ ) in Anwesenheit von ABA, ABA-Vorstufen, ABA- Kataboliten und ABA-GE bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$ . 9'-OH Tetralon ABA und 7'-OH ABA waren racemisch.



**Abbildung 2-29:** Stomataöffnung von *Ler* (schwarze Balken) und *abi1-1* (weiße Balken) Schließzellen in Anwesenheit von 3  $\mu\text{M}$  ABA, ABA-Vorstufen und Kataboliten. 9'-OH Tetralon ABA und 7'-OH ABA waren racemisch.



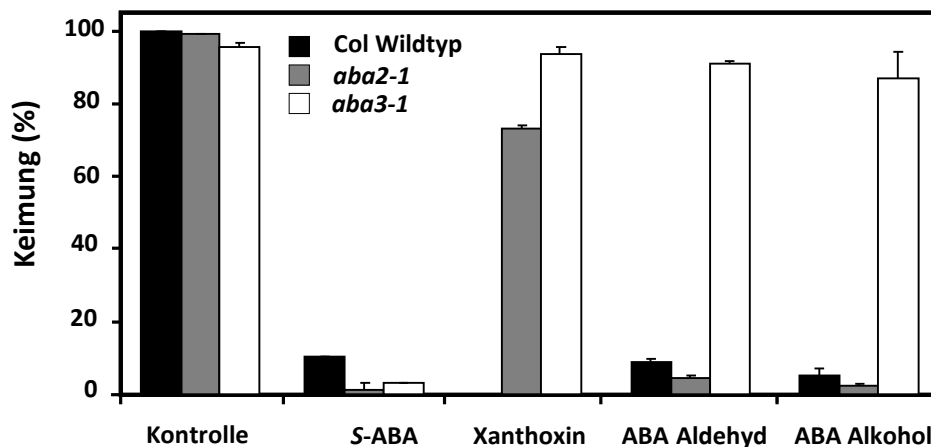
**Abbildung 2-30:** Wurzelwachstum von *Ler* (schwarze Balken) und *abi1-1* (weiße Balken) Keimlingen ( $n > 100$ ) in Anwesenheit von 3  $\mu\text{M}$  ABA, ABA-Vorstufen und Kataboliten. Die 5-Tage alten Keimlinge wurden auf Medium mit ABA-Derivaten umgesetzt und nach der 3-tägigen Inkubation gemessen. 9'-OH Tetralon ABA und 7'-OH ABA waren racemisch.

Die getesteten Substanzen zeigten einen zu der Regulation der Schließzellen ähnlichen Einfluß auf das Wurzelwachstum der 5 Tage alten Keimlinge (Abb. 2-30). Die ABA-Vorstufen inhibierten das Wurzelwachstum vergleichbar zur Abscisinsäure auf 35-40 %. ABA-Katabolite waren

## Ergebnisse

dagegen kaum aktiv und nur 9'-OH-Tetralon-ABA und ABA-GE inhibierten das Wachstum auf 58 % bzw. 73 %. Die *abi1-1* Mutante erwies sich als deutlich insensitiv gegen alle untersuchten Chemikalien. Die maximale Hemmung betrug in diesem Fall 13 % in Anwesenheit von neoPA. ABA-Katabolite zeigten ein übereinstimmendes Aktivitätsmuster in allen drei Experimenten. 9'-OH-Tetralon-ABA und ABA-GE inhibierten die Keimung mit 80 % bzw. 85 % und hatten keine Auswirkung auf Wurzelwachstum und Regulation der Schließzellen bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M.

Die beobachtete Bioaktivität der ABA-Vorstufen warf die Frage auf, ob diese Substanzen direkt als Effektoren der ABA-Signaltransduktion wirken können, oder ob sie *in vivo* zuerst zur ABA konvertiert werden müssen. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Keimungsversuch mit den Samen der in der ABA-Biosynthese gestörten Mutanten *aba2-1* und *aba3-1* durchgeführt. Die *aba2-1* Mutante hat einen Defekt in einer kurzkettigen Alkohol-Dehydrogenase, dadurch kann Xanthoxin nicht zu ABA-Aldehyd konvertiert werden (Nambara & Marion-Poll, 2005). Für die Funktionalität der ABA-Aldehyd-Oxidase (AAO3) ist die durch ABA3 sulfurylierte Form eines Molybdän-Cofaktors erforderlich (Xiong et al, 2001). Die *aba3-1* Mutante ist nicht in der Lage diesen Cofaktor zu bilden und dadurch auch nicht in der Lage ABA-Aldehyd zur Abscisinsäure umzuwandeln. Der Effekt von Xanthoxin auf *aba2-1* Samen war deutlich geringer als auf Wildtyp-Samen, die Keimungsrate lag bei 73 % (*aba2-1*) statt bei 0 % (Wildtyp, Abb. 2-31). Die Restaktivität von Xanthoxin kann entweder durch die Durchlässigkeit der *aba2-1* Mutation (Léon-Kloosterziel et al, 1996) oder die Existenz eines noch unbekanntes, weiteren Xanthoxin-Metabolismuswegs erklärt werden. ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol inhibierten die Keimung von *aba2-1* mit 96 % beziehungsweise 98 %.

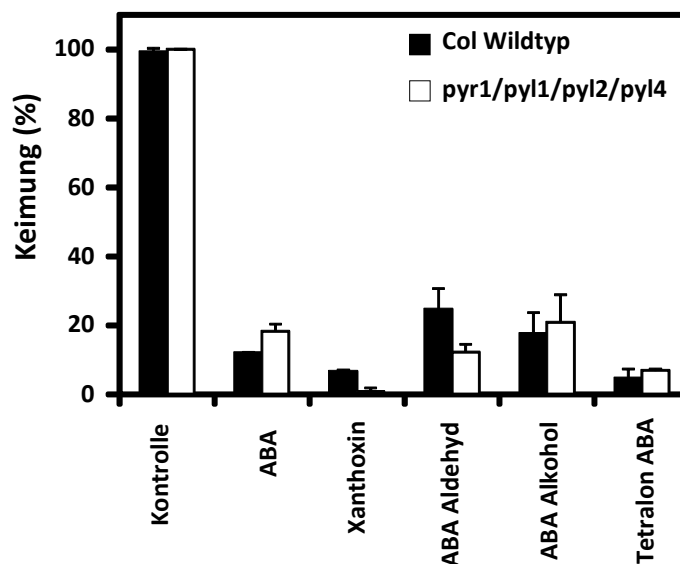


**Abbildung 2-31:** Keimung von Columbia Wildtyp, *aba2-1* und *aba3-1* Samen ( $n > 100$ ) auf 0,5 MS-Platten mit 3  $\mu$ M (S)-ABA und ABA-Vorstufen.

Die Keimung von *aba3-1* wurde durch Xanthoxin nicht inhibiert. Sie lag bei 93 % und war vergleichbar mit der Wirkung auf die Kontrolle (95 %). ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol zeigten keinen Einfluss auf das *aba3-1* Verhalten. Die physiologische Analyse bewies, dass die ABA-Vorstufen zur aktiven Abscisinsäure konvertiert werden müssen, um die Samenkeimung hemmen zu können.

Die weitere Untersuchung der Aktivität von ABA-Vorstufen und Kataboliten *in vivo* erfolgte mit der Hilfe der *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* (*rcar11/12/14/10*) Quadrupel-Mutante. Park et. al (2009) zeigten starke Insensitivität der Mutante im Keimungsversuch nach siebentägiger Inkubation bei einer ABA-Konzentration von 0,9  $\mu\text{M}$ . Nishimura et. al (2010) untersuchten die Regulation der Schließzellen der *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* Quadrupel-Mutante in Anwesenheit von ABA und wiesen ihren insensitiven Phänotyp nach.

Um die Wirkung von Vorstufen und Kataboliten zu untersuchen, wurden die Samen auf MS-Platten mit ABA, Xanthoxin, ABA-Aldehyd, ABA-Alkohol und Tetralon-ABA in einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  ausgebracht. Die Samen wurden 2 Tage bei 4°C gelagert, anschließend 3 Tage bei 23°C inkubiert und ihr Keimverhalten ausgewertet. Die Keimungsrate der *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* Quadrupel-Mutante ließ sich nicht deutlich von der Kontrolle unterscheiden und lag in Anwesenheit von ABA bei 18 % bzw. 12 % (Abb. 2-32).



**Abbildung 2-32:** Keimung von Columbia Wildtyp und *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* Quadrupel-Mutante in Anwesenheit von ABA, Tetralon ABA und ABA-Präkursoren.

Von den ABA-Vorstufen zeigte Xanthoxin den stärksten Effekt und war mit 99 % Inhibierung aktiver als die Abscisinsäure. ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol inhibierten die Keimung zu 88 % bzw. 79 %. Da Tetralon-ABA in anderen physiologischen Versuchen aktiv war, wurde es neben

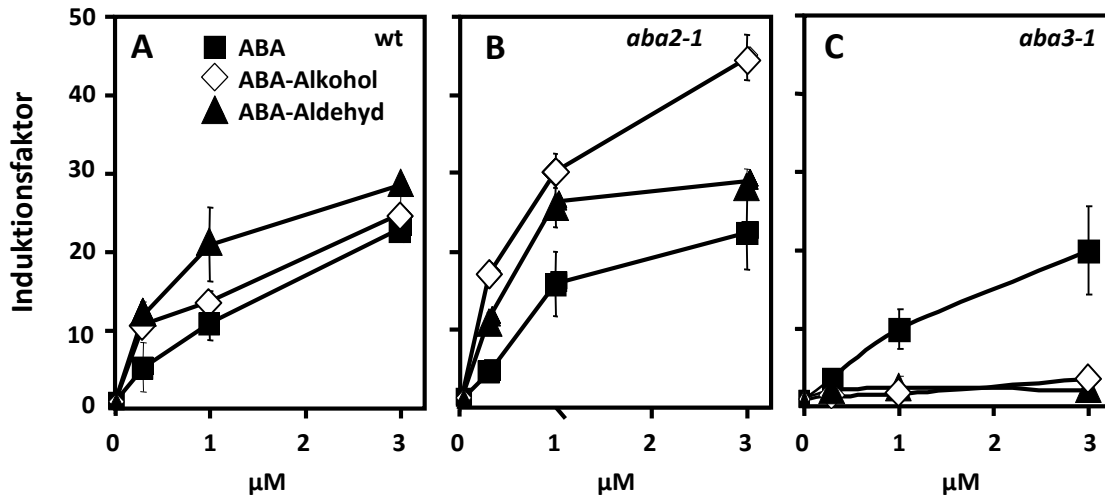
ABA als Positivkontrolle verwendet. Die Substanz wirkte auf die Keimung inhibierend und hemmte sie zu 93 %. Diese Ergebnisse ließen sich mehrfach reproduzieren, waren jedoch widersprüchlich zu Daten von Park et al (2009). Man könnte dies damit erklären, dass die Aktivität 10 RCAR-Proteine in der *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* Quadrupel-Mutante trotz des Verlustes von RCAR11/12/14/10 ausreicht, um die ABA-Signaltransduktion zu aktivieren.

### 2.2.1.2. Aktivität im transienten System

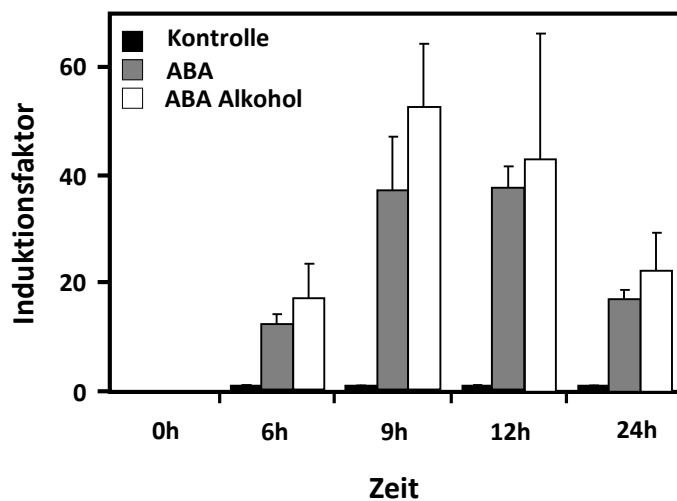
Der Befund indizierte, dass die ABA-Vorstufen *in vivo* zur aktiven Abscisinsäure konvertiert werden. Um dies Ergebnis zu weiter abzusichern, wurde das Vermögen von ABA, ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol zur Induktion der Expression eines ABA-Reportergen in Arabidopsis-Protoplasten untersucht. Das Reportergen besteht aus dem RD29B Promotor, der die Expression der Glühwürmchen-Luciferase reguliert (Moes et al, 2008). Die Protoplasten aus den Mesophyllzellen sind in der Lage die letzten Schritte der ABA-Biosynthese durchzuführen, deshalb wurden die Protoplasten aus dem Wildtyp, der *aba2-1* und der *aba3-1* Mutante mit dem Reporterkonstrukt transfiziert und den ABA-Derivaten exponiert. Die ABA-Vorstufen waren sehr aktiv beim Induzieren der ABA-Antwort in den Wildtypprotoplasten und lösten eine viel stärkere Expression des Reporters als die Abscisinsäure aus (Abb. 2-33A). ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol induzierten die Expression der Luciferase nicht in der *aba3-1* Mutante, in der *aba2-1* Mutante (Abb. 2-33B) und zeigten einen vergleichbaren Effekt wie im Keimungsversuch (Abb. 2-31). Nur die Abscisinsäure zeigte in der *aba3-1* Mutante ähnliche Aktivität wie im Wildtyp (Abb. 2-33C). Die Protoplastenversuche bestätigen, dass die ABA-Vorstufen nur auf Grund der Konvertierung zur aktiven Abscisinsäure physiologisch wirksam sind.

ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol zeigten im Vergleich zu ABA eine verstärkte Induktion der Luciferase im Wildtyp und in der *aba2-1* Mutante (Abb. 2-33A, 2-33B). Aufgrund dieses überraschenden Befundes wurde die Kinetik der Reporterinduktion durch ABA-Alkohol und ABA verglichen. Der Zeitablauf der Geninduktion für ABA und ABA-Alkohol demonstrierte, dass ABA-Alkohol zu allen Zeitpunkten die Abscisinsäure an Wirksamkeit übertrifft, wobei die sichtbaren Unterschiede erst nach 9 Stunden auftraten (Abb. 2-34). ABA-Alkohol weist im Vergleich zur Abscisinsäure eine geringere Polarität auf und kann so und die Zellmembran leichter passieren. Vermutlich war dadurch die ABA-Konzentration in allen mit ABA-Alkohol behandelten Proben höher als in der Anwesenheit von ABA



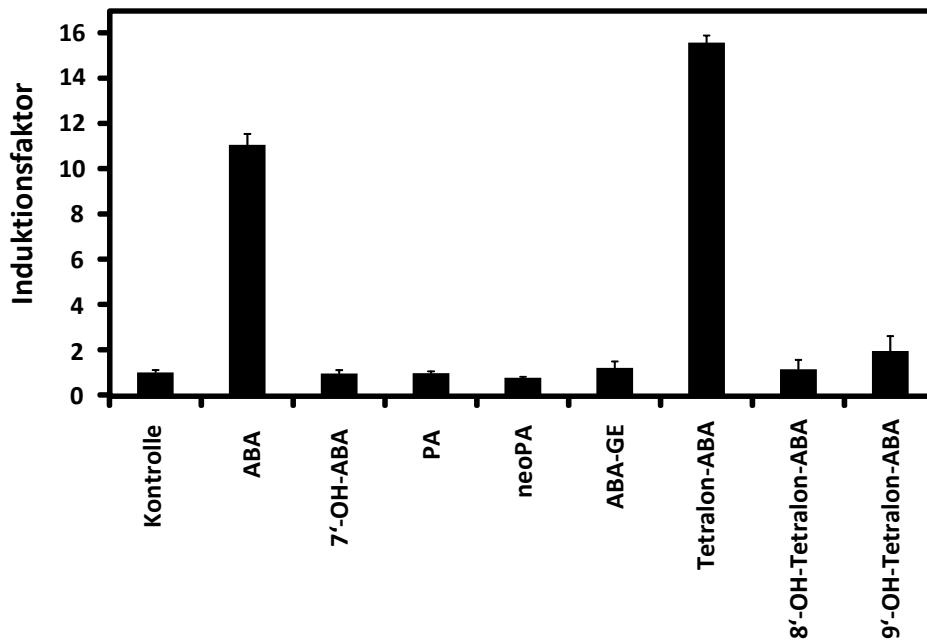


**Abbildung 2-33:** A-C, Aktivierung von ABA-abhängiger Genexpression. ABA, ABA-Alkohol und ABA-Aldehyd wurden in mit *pRD29B::LUC* Reporterkonstrukt transfizierten Wildtyp-, *aba2-1*- und *aba3-1*- Protoplasten untersucht. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 unabhängigen Transfektionen.



**Abbildung 2-34:** Zeitablauf der *pRD29B::LUC* Induktion in Wildtyp-Protoplasten in Abwesenheit bzw. Gegenwart von ABA und ABA-Alkohol bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$ .

Anschließend wurde die Aktivität von 7'-OH-ABA, PA, neoPA, ABA-GE, 8'-OH und 9'-OH Tetralon ABA in Arabidopsis-Protoplasten mit Hilfe des *pRD29B::LUC*-Reporterkonstrukts untersucht. ABA-GE zeigte dabei nur eine schwache Aktivität und induzierte den Reporter nur 1,2-fach bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (Abb. 2-35). 9'-OH-Tetralon-ABA induzierte die ABA-Signaltransduktion in Protoplasten 2-fach, wobei die Aktivität stark reduziert im Vergleich zu den Positivkontrollen (ABA und Tetralon-ABA) war. 8'-OH-Tetralon-ABA und die anderen ABA-Katabolite waren in diesem Versuch nicht aktiv.



**Abbildung 2-35:** Regulation des *pRD29B::LUC* Reporters bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M von ABA-Kataboliten, Tetralone ABA und 8'/9'-OH-Tetralon-ABA. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 unabhängigen Transfektionen. Die Kontrolle zeigt die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von ABA und ABA-Kataboliten.

### 2.2.2. *In vitro* Regulation des ABA-Rezeptorkomplexes

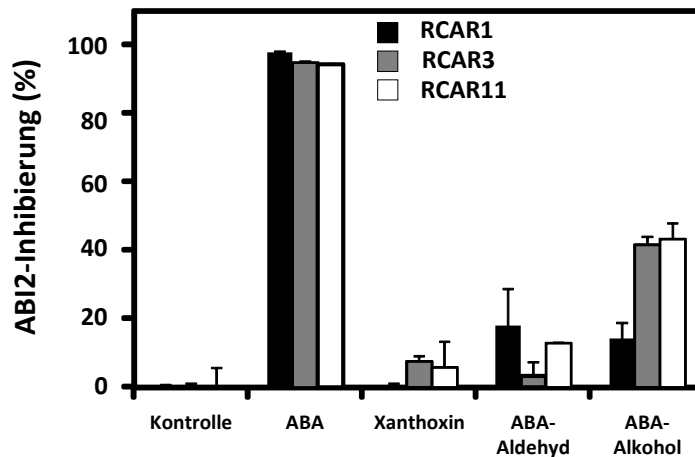
Die Aktivität von ABA-Vorstufen und ABA-Kataboliten wird entweder durch die eigene ABA-ähnliche Funktionalität der Substanzen verursacht oder – im Falle der ABA-Vorstufen – nach biochemischer Konversion durch eine Konzentrationserhöhung der aktiven ABA. Die Analyse der in der ABA-Biosynthese gestörten Mutanten bestätigt, dass die ABA-Vorstufen erst nach Umwandlung zu ABA werden. Eine physiologische Rolle von ABA-Derivaten in der ABA-Signaltransduktion kann durch Applikationsexperimente an intakten Pflanzen jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, weil ihre intrazelluläre Verfügbarkeit durch Aufnahme, Transport und Metabolismus kontrolliert wird. Aus diesem Grund wurden die oben beschriebenen durch *in vitro* Untersuchungen ergänzt.

#### 2.2.2.1. Regulation von verschiedenen ABA-Rezeptoren

Untersucht wurde die Funktion von ABA-Metaboliten und ABA-Derivaten in der Regulation des RCAR1/3/11/PP2C-Komplexes *in vitro*. RCAR1 ist sehr spezifisch für (*S*)-ABA und reagiert darauf mehr als 100 mal empfindlicher als auf (*R*)-ABA (Ma et al, 2009). Die höchste ABA-Affinität innerhalb der ganzen RCAR-Familie weist dagegen RCAR3 im Komplex mit ABI1 und

ABI2 auf (Szostkiewicz et al, 2010). RCAR11 bindet ABA weniger spezifisch und akzeptiert auch andere Liganden wie Pyrabactin (Park et al, 2009; Peterson et al, 2010).

Zunächst wurde der Einfluss von ABA, ABA-Aldehyd, ABA-Alkohol und Xanthoxin auf die Aktivität von ABI2 im Komplex mit RCAR1 getestet (Abb. 2-36).



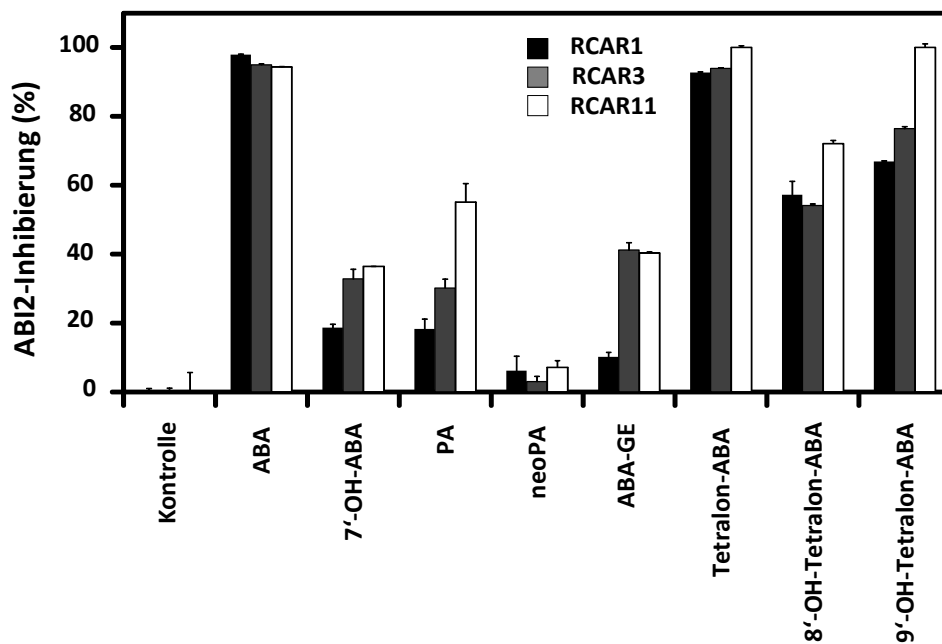
**Abbildung 2-36:** Regulation der ABI2-Aktivität durch (*S*)-ABA, Xanthoxin, ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol im Komplex mit RCAR1 (schwarze Balken), RCAR3 (graue Balken) und RCAR11 (weiße Balken) bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

Die Abscisinsäure hemmte die Aktivität von ABI2 restlos bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Dies wies auf die Bildung eines trimeren funktionellen Komplexes hin, der aus dem Liganden ABA, einem der drei getesteten RCAR-Protein und ABI2 bestand. ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol inhibierten die PP2C in Anwesenheit von RCAR1 nur zu 10 % und 18 %. Dagegen zeigte die Analyse der ABI2-Aktivität im Komplex mit RCAR3 und RCAR11 43 % Hemmung in Anwesenheit von ABA-Alkohol. ABA-Aldehyd inhibierte die Komplexe ABI2/RCAR1 und ABI2/RCAR11 zu 16 % bzw. 13 %, wobei keine bedeutende Aktivität (Grenzwert 6 %) für RCAR3 beobachtet wurde. Xanthoxin zeigte keine Inhibierung der PP2C-Aktivität im Komplex mit RCAR1, und nur eine geringere Inhibierung im Komplex mit RCAR3 und RCAR11 (8 % bzw. 6 %).

Anschließend wurde der Einfluß der ABA-Katabolite 7'-OH-ABA, PA, neoPA, ABA-GE und stabilen 8'/9'-OH-Tetralonen auf die Regulation der PP2C untersucht (Abb. 2-37). 7'-OH-ABA, PA und ABA-GE zeigten eine moderate Aktivität und regulierten die Phosphatase unterschiedlich im Komplex mit verschiedenen RCAR-Proteinen bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M. 7'-OH-ABA inhibierte ABI2 im Komplex mit RCAR1 nur zu 18 %, im Komplex mit RCAR3 und RCAR11 dagegen zu 33 % bzw. 36 %. Phaseinsäure (PA) hemmte die PP2C mit RCAR1 zu 18 %, mit RCAR3 und RCAR11 dagegen zu 30 % beziehungsweise 55 %. neoPA war nicht fähig die PP2C *in vitro* zu regulieren und ihre diesbezügliche Aktivität lag unter dem Grenzwert (6 %). ABA-GE besaß eine moderate Aktivität als Bestandteil eines trimeren Komplexes und inhibierte ABI2 in

## Ergebnisse

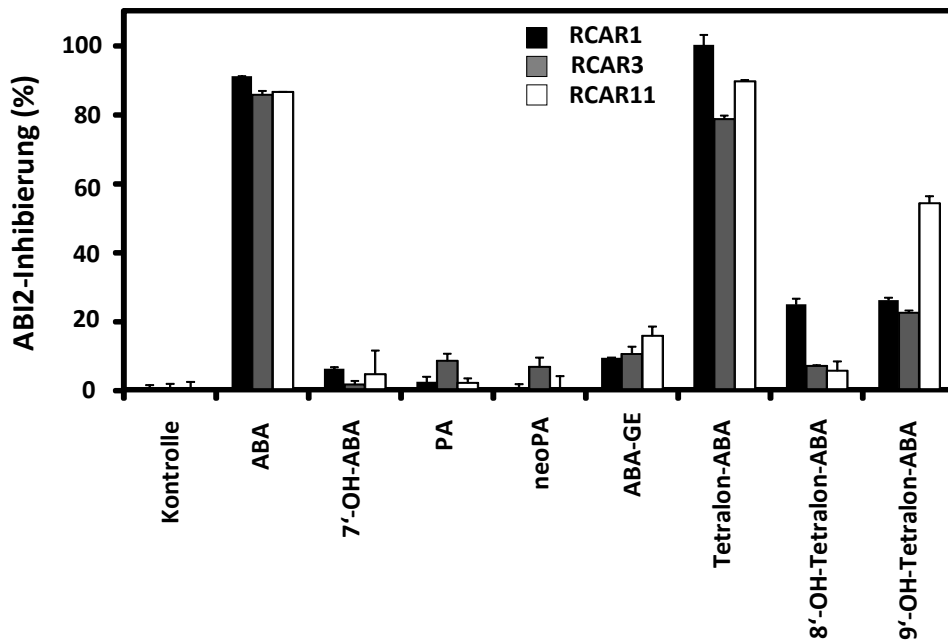
Gegenwart von RCAR1 zu 10 %. Im Komplex mit RCAR3 und RCAR11 zeigte sich die hemmende Wirkung deutlich stärker und lag bei 40 % bzw. 41 %.



**Abbildung 2-37:** PP2C-Inhibierung in Anwesenheit von RCAR1 (schwarze Balken), RCAR3 (graue Balken) und RCAR11 (weiße Balken) im Komplex mit (*S*)-ABA, ABA-Kataboliten und ABA-Tetralonen bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

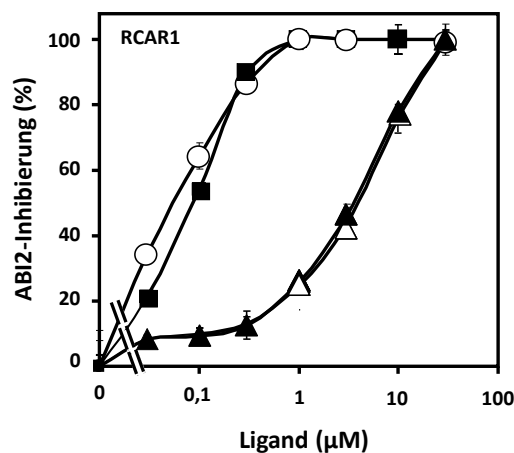
Die Abscisinsäure wurde als Positivkontrolle verwendet und regulierte in einer Konzentration von 1  $\mu$ M ABI2 fast zu 100 % in Anwesenheit von allen getesteten RCAR-Proteinen (Abb. 2-38). Außer ABA-GE, der einen geringen hemmenden Einfluß auf die ABI2-Aktivität zeigte (9 %-16 %), war keiner der untersuchten ABA-Katabolite *in vitro* signifikant aktiv (bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M).

Die stabilen 8'- und 9'-OH-Tetralone der ABA hatten bereits im Keimungsversuch eine hohe Aktivität gezeigt (Abb. 2-28), wobei Tetralon-ABA die Keimung vergleichbar stark hemmte wie ABA. 9'-OH-Tetralone-ABA induzierte auch die ABA-Signaltransduktion in Arabidopsis-Protoplasten, war in diesem Fall aber nicht so effektiv wie Abscisinsäure. 8'-OH-Tetralon-ABA hatte dagegen keinen Einfluß auf die Induktion des Reportergens gezeigt. *In vitro* wirkte Tetralon-ABA wiederum genauso stark wie ABA und inhibierte ABI2 im Komplex mit RCAR-Proteinen zu ca. 98 % bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M. 8'- und 9'-OH-Tetralone blockierten die PP2C zu 58 % bzw 67 % (Abb. 2-37). Bei der Konzentration von 1  $\mu$ M zeigte sich, dass 8'-OH Tetralon die Phosphatase im Komplex mit RCAR1 am stärksten (25 %) hemmte, während die Inhibierung für RCAR3 und RCAR11 bei 6 % lag. 9'-OH-Tetralon demonstrierte einen effektiveren Einfluß und hemmte die PP2C zu ca. 25 % im trimeren Komplex mit RCAR1 bzw. RCAR3, und zu 55 % im komplex mit RCAR11.



**Abbildung 2-38:** PP2C-Inhibierung in Anwesenheit von RCAR1 (schwarze Balken), RCAR3 (graue Balken) und RCAR11 (weiße Balken) im Komplex mit (*S*)-ABA, ABA-Kataboliten und ABA-Tetralonen bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M.

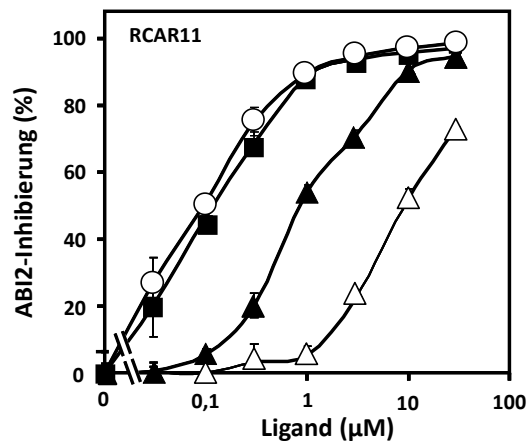
Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) der getesteten Komponenten durch Titration des RCAR1-ABI2 Komplexes mit verschiedenen Liganden abgeschätzt (Abb. 2-39). Die Abscisinsäure führte zu 50 % Inhibierung bei einer Konzentration von 90 nM, während Tetralon-ABA aktiver war und ABI2 bereits bei einer Konzentration von 55 nM zu 50 % inhibierte. 8'- und 9'-OH-Tetralone waren 40-fach weniger wirksam als ABA und ihre  $IC_{50}$  Werte lagen bei 4  $\mu$ M bzw 3,5  $\mu$ M. Die Regulation des ABA-Rezeptors in Anwesenheit von ABA-Tetralonen spiegelte deren physiologische Aktivität im Keimungsversuch (Abb. 2-28).



**Abbildung 2-39:** Ligand-abhängige Inhibierung von PP2C in Anwesenheit von RCAR1. Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) lag für (*S*)-ABA (schwarze Vierecke) bei 90 nM, (*S*)-Tetralon-ABA (weiße Kreise) bei 55 nM, 8'-OH-Tetralon-ABA (weiße Dreiecke) bei 4  $\mu$ M, 9'-OH-Tetralon-ABA (schwarze Dreiecke) bei 3,5  $\mu$ M.

## Ergebnisse

Es war gezeigt (Abb. 2-37), dass RCAR11 in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  ABA, Tetralon-ABA oder 9'-OH-Tetralon-ABA die ABI2 komplett inhibiert. Das Verhalten von 8'-OH-Tetralone unterschied sich hiervon deutlich: 8'-OH-Tetralon hemmte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Um die beobachteten Unterschiede genauer zu charakterisieren, wurde die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) von den genannten Liganden bestimmt (Abb.2-40).



**Abbildung 2-40:** Liganden-abhängige Inhibition der PP2C ABI2 in Anwesenheit von RCAR11. Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) lag für (S)-ABA (schwarze Vierecke) bei 120 nM, für (S)-Tetralon-ABA (weiße Kreise) bei 95 nM, für 8'-OH-Tetralon-ABA (weiße Dreiecke) bei 8  $\mu\text{M}$ , und für 9'-OH-Tetralon-ABA (schwarze Dreiecke) bei 0,9  $\mu\text{M}$ .

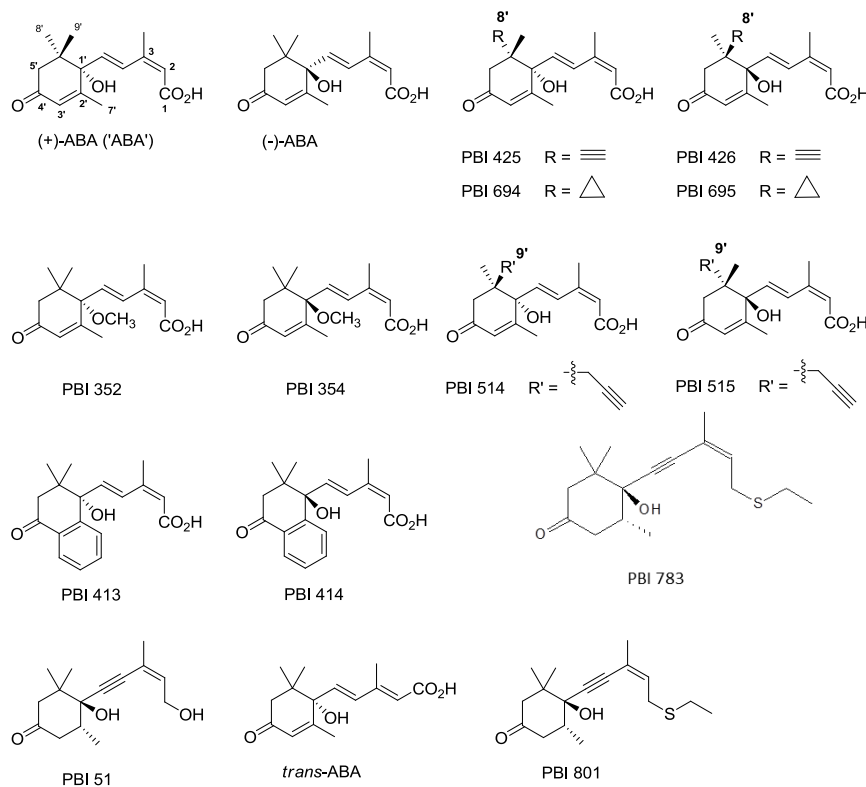
Abscisinsäure und ABA-Tetralon leisteten die effektivste Regulation und zeigten mit  $\text{IC}_{50}$  Werten von 120 nM bzw. 95 nM eine höhere Affinität für den RCAR11-ABI2-Komplex (Abb. 2-40) als für den RCAR1-ABI2-Komplex (Abb. 2-39). 8'-OH-Tetralon inhibierte ABI2 zu 50 % bei einer Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  und war so 2-fach weniger aktiv als in Gegenwart des RCAR1-ABI2-Komplexes, wobei die maximale Inhibition nur 80 % bei der höchsten getesteten Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  erreichte. 9'-OH-Tetralon-ABA ergab einen  $\text{IC}_{50}$  Wert von 0,88  $\mu\text{M}$  und war damit im Komplex mit RCAR11 4-fach effektiver als mit RCAR1. 9'-OH-Tetralon war in diesen Experimenten racemisch, die Hälfte der Probe bestand also aus dem biologisch weniger aktiven (R)-Enantiomeren.

## 2.3. Synthetische ABA-Derivate

### 2.3.1. *In vivo* und *in vitro*-Aktivität von ABA-Analogenen

#### 2.3.1.1. Regulation von Keimung, Wurzelwachstum und Spaltöffnungen

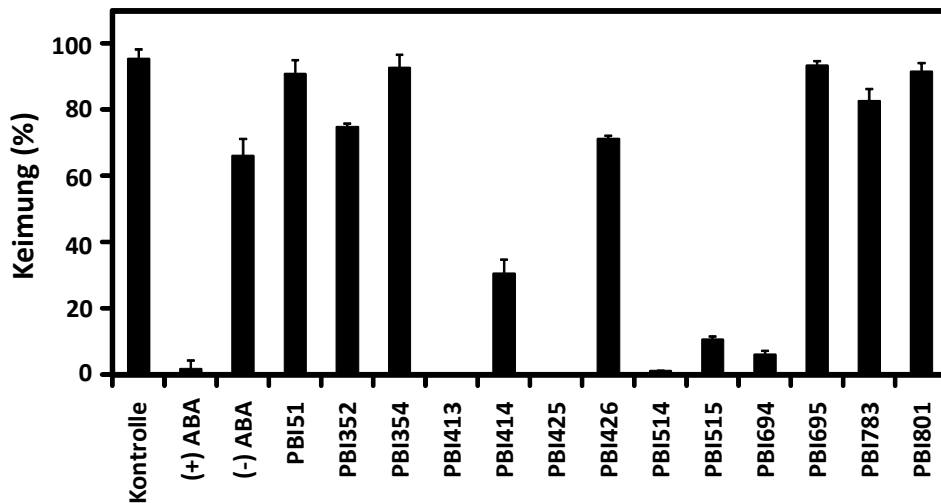
In den vorangehenden Kapiteln hatte sich gezeigt, dass das ABA-Analog Tetralon-ABA in verschiedenen Tests eine der ABA vergleichbare Aktivität aufweist. Es war früher bereits gezeigt worden, dass die strukturellen Analogen der Abscisinsäure die Fähigkeit besitzen, Keimung und Wachstum zu inhibieren, und ABA-abhängige Genexpression zu induzieren (Abb. 2-28, 2-30, 2-35) (Nyangulu et al, 2006). (+)-Tetralon-ABA (PBI 413) inhibierte die Keimung der Arabidopsis-Samen stärker als ABA, wobei das (-)-Enantiomer (PBI 414) weniger effektiv war (Nyangulu et al, 2006). Das (-)-2,3-dihydroacetylen-ABA-Alkohol-Analog (PBI 51) konnte dagegen die Keimung von Arabidopsis nicht beeinflussen, wirkte in diesem Test also weder wie ein ABA-Agonist noch antagonistisch zu ABA (Nishimura et al, 2004a). Interessanterweise hatte PBI 51 in einem Stomatatest an *Vicia faba* (Huang et al, 2007b) antagonistisch zu ABA gewirkt. PBI 51 sollte daher zusammen mit weiteren Strukturanalogen der ABA auf seine Aktivität in *in vitro*-Testsystemen untersucht werden. Parallel dazu sollte die physiologische Aktivität von verschiedenen ABA-Analogenen überprüft werden. Ihre Strukturformeln werden in der Abbildung 2-41 dargestellt.



**Abbildung 2-41:** Die chemische Struktur von (+)-ABA, (-)-ABA und ABA-Analogenen.

## Ergebnisse

Zunächst wurde der Einfluß von ABA-Analogen auf die Keimung von *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* bei einer Konzentration von 3 µM getestet (Abb. 2-42).

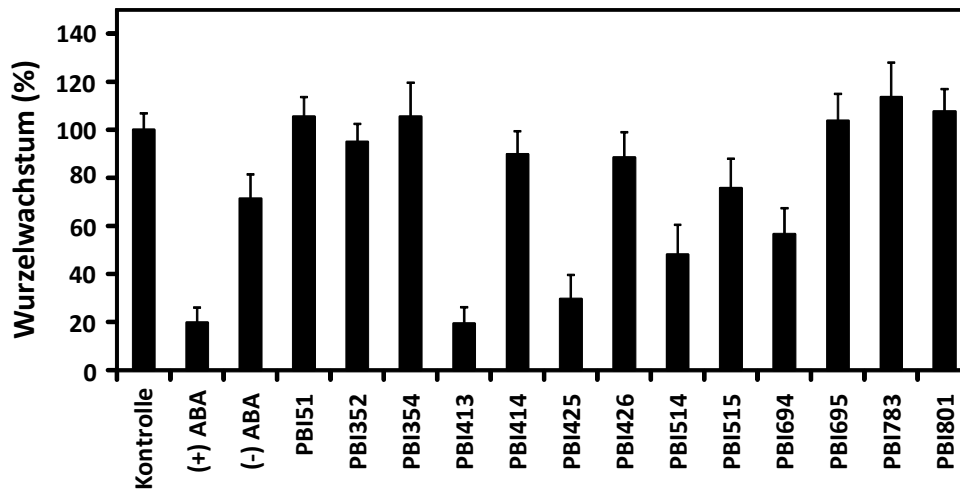


**Abbildung 2-42:** Keimung von Landsberg *erecta* Samen (n>100) auf 0,5 MS-Platten in Anwesenheit von (+)- ABA, (-)- ABA und ABA-Analogen bei einer Konzentration von 3 µM.

Die (+)-Abscisinsäure reduzierte dabei die Keimung nach 3 Tagen auf 2 %, in Anwesenheit von (-)-ABA lag die Keimungsrate bei 66 %. (+)-Methylether (PBI 352) inhibierte die Keimung nur zu 25 %, während (-)-Methylether (PBI 354) keinen Einfluß zeigte, was bedeutet, dass sich die Abwesenheit der Hydroxylgruppe nachteilig auf die Aktivität der ABA-Derivate auswirkt. (+)-Tetralon-ABA (PBI 413) inhibierte die Keimung zu 100 %, (-)-Tetralon-ABA (PBI 414) zeigte 70 % Inhibierung. (+)-8'-Ethin-ABA (PBI 425) und (+)-9'-Propargyl-ABA (PBI 514) reduzierten die Keimung zu 0 % bzw. 1,5 %, während (-)-9'-Propargyl-ABA (PBI 515) überraschenderweise 89 % Inhibierung zeigte. In Anwesenheit des 8'-Cyclopropyl-(+)-Enantiomeren (PBI 694) lag die Keimungsrate bei 6 %. (-)-Tetralon-ABA (PBI 414) und (-)-8'-Ethin-ABA (PBI 426) reduzierten die Keimung zu 30 % bzw. 71 %. PBI 51, 8'-Cyclopropyl(-)-Enantiomer (PBI 695), PBI 783 und PBI 801 waren nicht aktiv.

Anschließend wurden die Effekte von ABA-Analogen auf das Wurzelwachstum der 5 Tage alten *Ler* Keimlingen untersucht. Bei einer Konzentration von 3 µM reduzierte die Abscisinsäure das Wurzelwachstum auf 19 %, während (-)-ABA schwache Aktivität zeigte und das Wachstum zu 29 % hemmte (Abb. 2-43). Die (+)-Enantiomere PBI 413, PBI 425, PBI 514 und PBI 694 demonstrierten das gleiche Muster wie im Keimungsversuch und zeigten von allen getesteten Analogen die höchste Aktivität, obwohl keine der Substanzen die Abscisinsäure übertraf. PBI 413 und PBI 425 reduzierten die Wurzellänge auf 19 % bzw. 29 %, PBI 514 und PBI 694 zeigten sich weniger wirksam und verringerten die Wurzellängen auf 48 % bzw. 56 %.

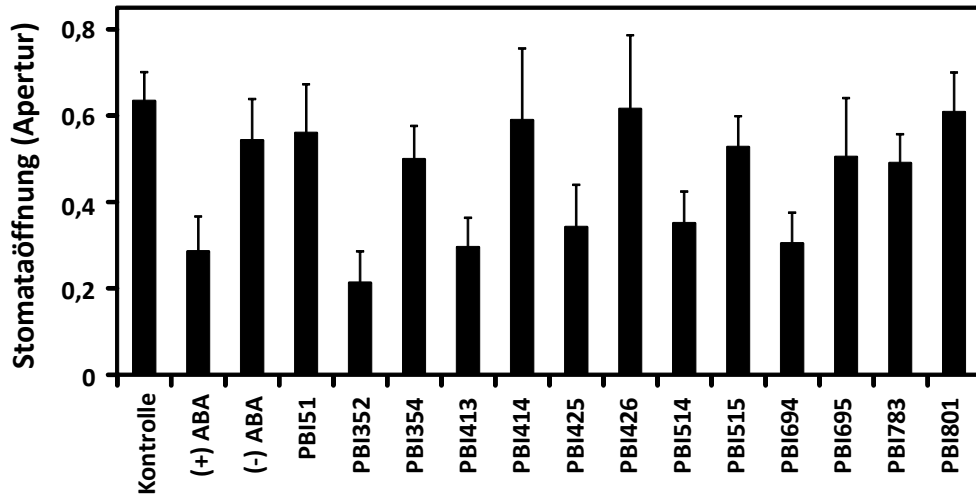




**Abbildung 2-43:** Wurzelwachstum von *Ler* Keimlingen ( $n > 100$ ) in Anwesenheit von 3  $\mu\text{M}$  (+)-ABA, (-)-ABA und ABA-Analogen. Die 5-Tage alten Keimlinge wurden auf Medium mit ABA bzw. ABA-Derivaten umgesetzt und nach 3 Tagen der Inkubation gemessen.

Die (-)-Enantiomere PBI 414, PBI 426, PBI 695 waren in diesem Versuch nicht aktiv, PBI 515 zeigte 25 % Inhibierung des Wurzelwachstums. PBI 352 und PBI 354 hatten wiederum keinen Einfluß auf die Wurzellänge, was erneut darauf hinweist, dass die Hydroxylgruppe eine entscheidende Rolle in der Funktionalität der ABA-Analoga spielt. In Anwesenheit von PBI 51, PBI 783 und PBI 801 wurde keine Hemmung des Wurzelwachstums beobachtet.

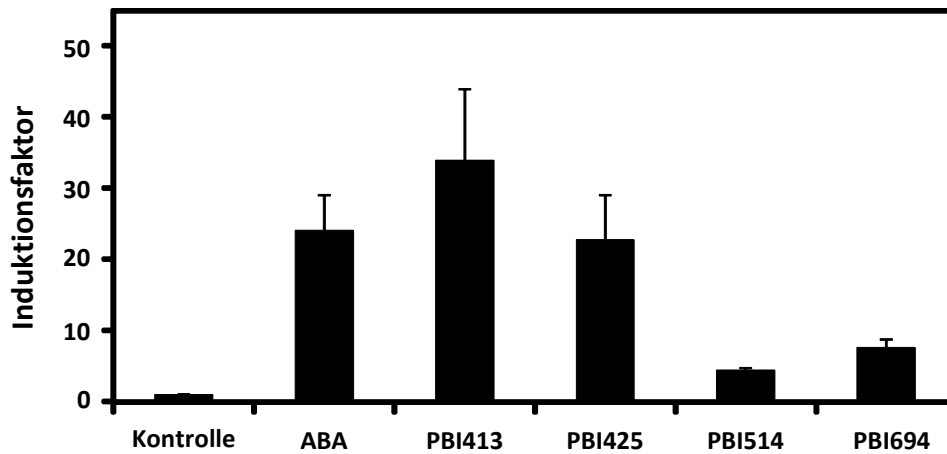
Als dritter physiologischer Test wurde die Regulation der Schließzellen analysiert (Abb. 2-44). Die Epidermispräparate wurden für 2 Stunden ohne bzw. mit ABA oder ABA-Analogen inkubiert und anschließend wurden die Spaltöffnungsweiten gemessen und als Verhältnis von Breite zu Länge (Apertur) dargestellt, das für die Kontrolle 0,63 betrug. (+)-Methylether (PBI 352), der im Wurzelwachstum und Keimungsversuch nicht aktiv war, zeigte überraschenderweise die höchste Aktivität und induzierte das Schließen der Spaltöffnungen (Apertur 0,21), ABA führte zu einer Apertur von 0,28 brachte. (-)-Methylether (PBI 354) und (-)-9'-Propargyl-ABA (PBI 515) waren im Vergleich zu der Kontrolle (0,63) wenig effektiv und führten zu einer Apertur von 0,49 bzw. 0,52. PBI 695 und PBI 783 zeigten ein ähnliches Muster und reduzierten die Öffnung der Stomata auf 0,5 beziehungsweise 0,49. PBI 413 und PBI 694 waren miteinander vergleichbar aktiv und reduzierten die Apertur auf 0,29 bzw. 0,30. PBI 425 und PBI 514 erwies sich als weniger wirksam, induzierte jedoch ein Schließen der Stomata auf eine Apertur von 0,34 bzw. 0,35. Das (-)-2,3-Dihydroacetylen-ABA-Alkohol-Analoga (PBI 51), (-)-Tetralon-ABA (PBI 414), (-)-8'-Ethin-ABA (PBI 426) und PBI 801 zeigten keinen regulatorischen Einfluß auf die Spaltöffnungsweiten.



**Abbildung 2-44:** Stomataöffnung als Verhältnis von Porenweite zu Porenlänge von *Ler* Schließzellen in Anwesenheit von 3  $\mu\text{M}$  (+)-ABA, (-)-ABA und ABA-Analogen.

### 2.3.1.2. Aktivität von ABA-Analogen in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

In den verschiedenen physiologischen Testsystemen hatten sich bestimmte ABA-Analogen als besonders aktiv erwiesen (PBI 413, PBI 425, PBI 514, PBI 694). Diese Analogen wurden nun hinsichtlich ihrer Aktivität bei der Induktion des ABA-Reporterkonstrukts *pRD29B::LUC* in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten untersucht (Abb.2-45). (+)-Tetralon ABA (PBI 413) induzierte die Expression des Reporters 34-fach bei der Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  und zeigte damit höhere Aktivität als Abscisinsäure (24-fach). (+)-8'-Ethyn-ABA (PBI 425) zeigte sich mit 23-facher Induktion genauso wirksam wie ABA, während (+)-9'-Propargyl-ABA (PBI 514) und (+)-8'-Cyclopropyl-ABA (PBI 694) eine geringe Aktivität aufwiesen und den Reporter 4,4-fach bzw. 7,6-fach im Vergleich zu der Kontrolle aktivierten.

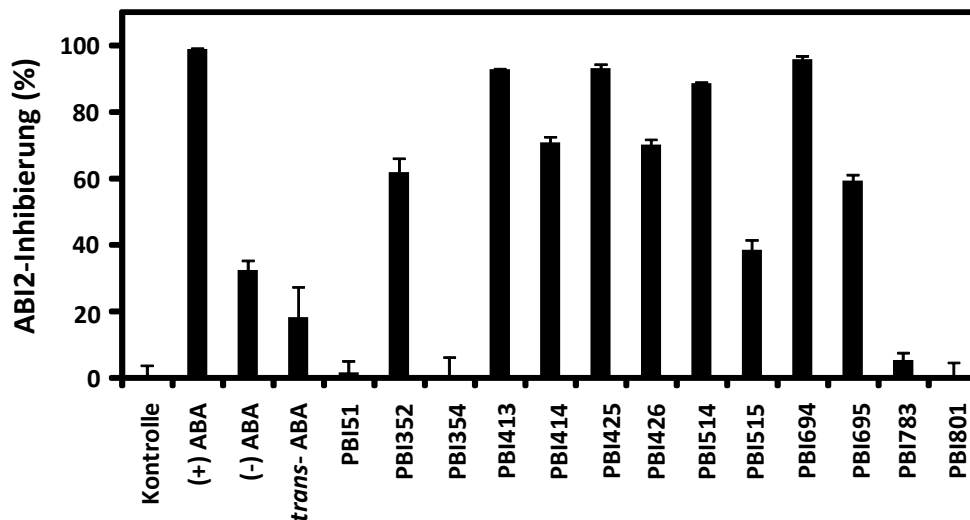


**Abbildung 2-45:** Regulation des *pRD29B::LUC*-Reporters bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M (+)-ABA, PBI 413, PBI 425, PBI 514 und PBI 694. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 3 unabhängigen Transfektionen. Die Kontrolle zeigt die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von Effektoren.

### 2.3.2. *In vitro* Aktivität von ABA-Derivaten

#### 2.3.2.1. Regulation der ABA-Rezeptoren

Um die Effekte von ABA-Analogen *in vitro* zu vergleichen, wurde die ABI2-Inhibierung in Anwesenheit von RCAR1 gemessen (Abb. 2-46).



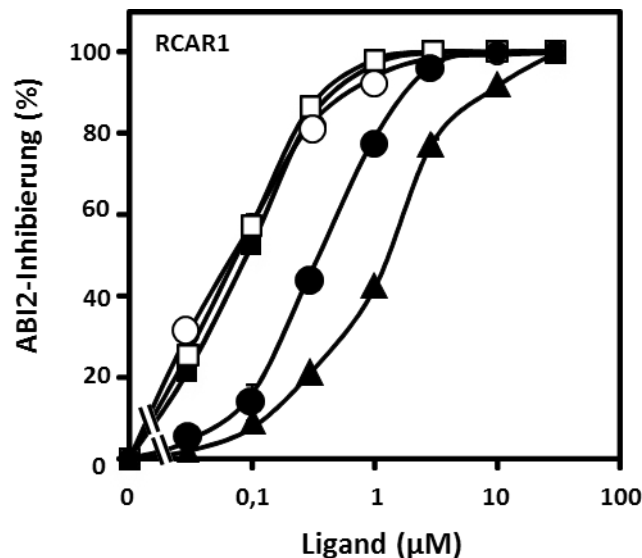
**Abbildung 2-46:** *In vitro* Aktivität von ABI2 im Komplex mit RCAR1 und Liganden: (+)-ABA, (-)-ABA, *trans*-ABA und ABA-Analogen bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

Abscisinsäure hemmte die Aktivität der Phosphatase restlos bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M, während die Aktivität in Anwesenheit von (-)-ABA nur auf 70 % fiel. *trans*-ABA zeigte 19 % ABI2-Inhibierung. Dies zeigt die Enantioselektivität des ABA-Rezeptors für (+)-ABA und

## Ergebnisse

entspricht den früheren Ergebnissen (Ma et al, 2009; Szostkiewicz et al, 2010). Die (-)-Enantiomere PBI 414 und PBI 426 reduzierten die ABI2-Aktivität zu 30 % bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , wohingegen PBI 515 und PBI 695 weniger aktiv im Komplex mit RCAR1 und ABI2 wirkten und die verbleibende PP2C-Aktivität 65 % bzw. 42 % betrug. Die *in vitro* Wirkung der (+)-Enantiomere spiegelt ihre biologische Aktivität in den durchgeführten physiologischen Versuchen wider, während (-)-Enantiomere eine stark reduzierte Fähigkeit haben, einen funktionellen Rezeptor mit RCAR-Protein und PP2C zu bilden. Die (+)-Enantiomere PBI 413, PBI 425, PBI 514 und PBI 694 inhibierten das Enzym in Gegenwart von RCAR1 zu mehr als 90 %.

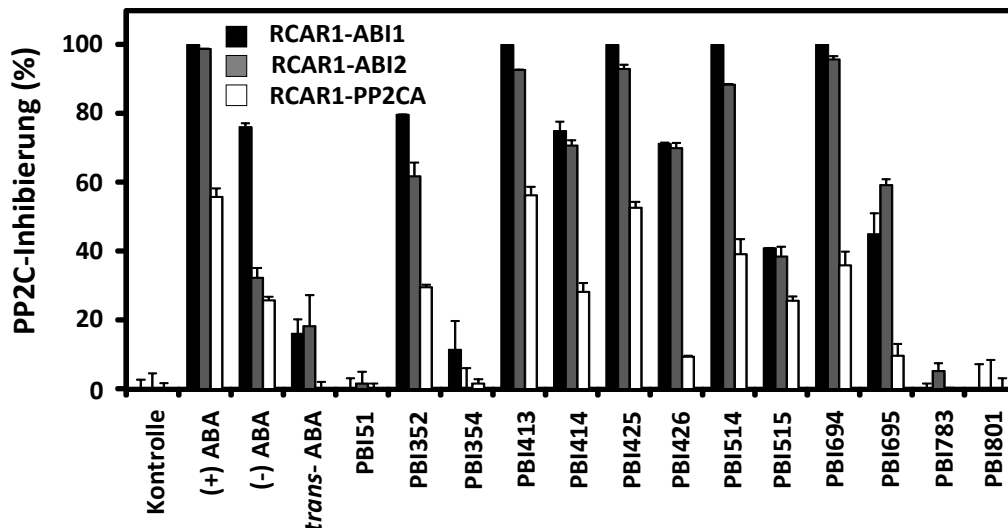
Anschließend wurde die mittlere inhibitorische Konzentration dieser 4 Substanzen bestimmt und mit der entsprechenden Konzentration für ABA verglichen (Abb. 2-47). Die Abscisinsäure erzielte 50 % Inhibierung bei einer Konzentration von 95 nM, wobei PBI 413 und PBI 425 aktiver waren und ABI2 auf 50 % bei der Konzentration von 70 nM bzw. 75 nM hemmten. PBI 694 und PBI 514 zeigten sich mit den  $\text{IC}_{50}$  Werten von 360 nM bzw. 1,3  $\mu\text{M}$  weniger wirksam.



**Abbildung 2-47:** Liganden-abhängige Inhibierung von ABI2 in Anwesenheit von RCAR1. Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) lag für (*S*)-ABA (schwarze Vierecke) bei 95 nM, (*S*)-Tetralon-ABA (PBI 413) (weiße Kreise) bei 70 nM, (+)-8'-Ethin-ABA (PBI 425) (weiße Vierecke) bei 75 nM, 8'-Cyclopropyl-(+)-ABA (PBI 694) (schwarze Kreise) bei 360 nM, (+)-9'-Propagyl-ABA (PBI 514) (schwarze Dreiecke) bei 1,3  $\mu\text{M}$ .

(+)-PBI 352 brachte 40 % ABI2-Restaktivität, wobei (-)-Enantiomer PBI 354 keinen Einfluß auf die Regulation des Rezeptors hatte.

Um weitere Erkenntnisse zur Funktion der PP2C-Phosphatasen in ABA-Signaltransduktion zu erhalten, wurden die Fähigkeit von ABA-Analogen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität von zwei zusätzlichen Phosphatasen ABI1 und PP2CA im Komplex mit RCAR1 untersucht (Abb. 2-48).



**Abbildung 2-48:** Inhibierung von ABI1 (schwarze Balken), ABI2 (graue Balken) und PP2CA (weiße Balken) in Anwesenheit von RCAR1, (*S*)-ABA, (-)-ABA, *trans*-ABA und ABA-Analogen bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

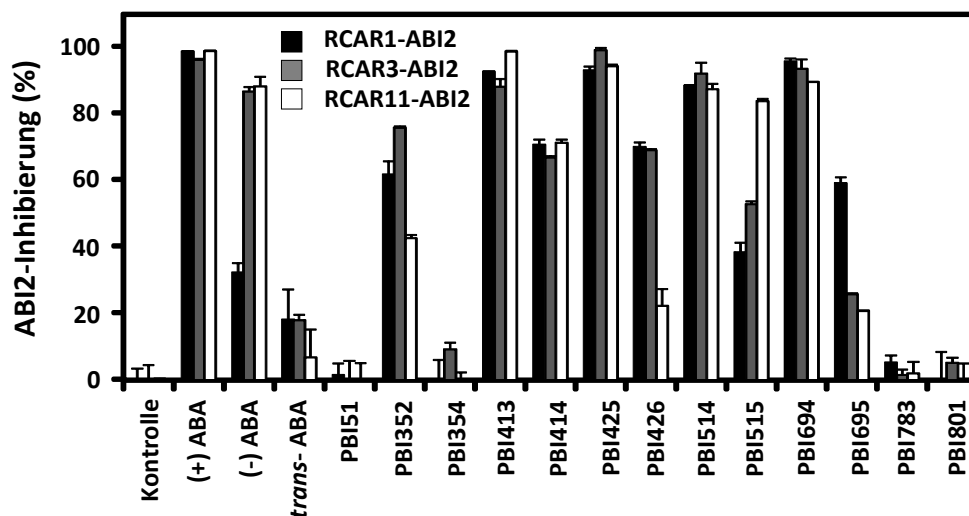
ABI1 und ABI2 wurden im Komplex mit RCAR1 von ABA und (+)-Analogen ähnlich beeinflusst, während (-)-ABA die Phosphatasen unterschiedlich regulierte. Die RCAR1/(-)-ABA-Kombination reduzierte die ABI1-Aktivität überraschenderweise auf bis zu 25 %, während die ABI2-Restaktivität in dieser Kombination noch 67 % betrug. Die aktivsten (-)-Enantiomere PBI 414 und PBI 426 reduzierten die Aktivität von ABI1 und ABI2 auf 27 % bzw. 29 %. PBI 515 und PBI 695 waren etwas weniger aktiv und führten zu Restaktivitäten zwischen 40 % und 60 %.

PP2CA (AHG3) wurde von ABA/RCAR1 bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M zu 44 % inhibiert (Abb. 2-48). Es ist wichtig zu erwähnen, dass sich die Restaktivität von 44 % auch durch höhere Konzentrationen von ABA (30  $\mu$ M) nicht weiter runterregulieren ließ. (-)-ABA brachte 75 %, während *trans*-ABA nicht aktiv war. PBI 51, PBI 354, PBI 783 und PBI 801 zeigten im Komplex mit RCAR1 keinen Effekt auf die PP2CA-Aktivität. (-)-8'-Ethin-ABA (PBI 426) und 8'-Cyclopropyl(-)-ABA (PBI 695) reduzierten die Aktivität auf 90 %. PBI 352 und PBI 694 vermittelten eine schwache PP2CA-Hemmung im Komplex mit RCAR1 und inhibierten die Phosphatase zu 30 % bzw. 35 %. Keines der (+)-Analoge übertraf die Abscisinsäure an Wirkung, (+)-Tetralon-ABA war allerdings so aktiv wie ABA.

Anschließend wurde die ABI2-Regulation im Komplex mit RCAR3/11 und ABA-Analogen bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M untersucht (Abb. 2-49). RCAR1 wurde zur Kontrolle nochmals mitgeführt, die Abweichungen zu den in Abb. 2-48 dargestellten Werten waren dabei gering. (+)-ABA führte zu einer kompletten Inhibierung der Phosphatase in Anwesenheit von RCAR1 und RCAR11, im Komplex mit RCAR3 wurde eine Restaktivität von 4 % beobachtet. Der *R*-ABA/RCAR1-Komplex hemmte die PP2C zu 33 %, während *R*-ABA/RCAR3 und *R*-ABA/RCAR11 viel effektiver wirkten und ABI2 zu 86 % bzw. 88 % inhibierten. PBI 413,

## Ergebnisse

PBI 425, PBI 514 und PBI 694 zeigten eine sehr starke Inhibierung im Komplex mit RCAR1/3/11 und führten Restaktivitäten von 0 % bis 13 %. (-)-Tetralon-ABA (PBI 414) war in diesem Fall weniger aktiv und zu 70 % Hemmung für alle in diesem Versuch untersuchten RCAR-Proteine. Die (-)-Enantiomere PBI 426, PBI 515 und PBI 695 zeigten deutliche Unterschiede in der Regulation in Anwesenheit verschiedener RCAR-Proteine. (-)-8'-Ethin-ABA (PBI 426) reduzierte im Komplex mit RCAR1/3 die PP2C-Aktivität zu 30 %, während für die Kombination PBI 426/ABI2/RCAR11 nur 22 % Regulation beobachtet wurde. (-)-9'-Propagyl-ABA (PBI 515) zeigte im Komplex mit RCAR1/3 zeigte 39 % bzw. 53 % Hemmung der Phosphatase. In Anwesenheit von RCAR11 betrug die Hemmung 84 % PP2C-Regulation und war damit vergleichbar stark wie durch PBI 514 erzielte Inhibierung (88 %). 8'-Cyclopropyl(-)-ABA (PBI 695) war in Anwesenheit von verschiedenen RCAR-Proteinen ebenfalls unterschiedlich aktiv. Im Komplex mit RCAR3 und RCAR11 wurde nur 25 % bzw. 21 % Inhibierung gemessen, während sie im Komplex mit RCAR1 40 % betrug. (+)-Methylether (PBI 352) reduzierte die ABI2-Aktivität in Gegenwart von RCAR1 auf 38 %, und auf 24 % bzw. 53 % in Anwesenheit von RCAR3 oder RCAR11. (-)-Methylether (PBI354), PBI 51, PBI 783 und PBI 801 konnten die Phosphatase nicht beeinflussen.

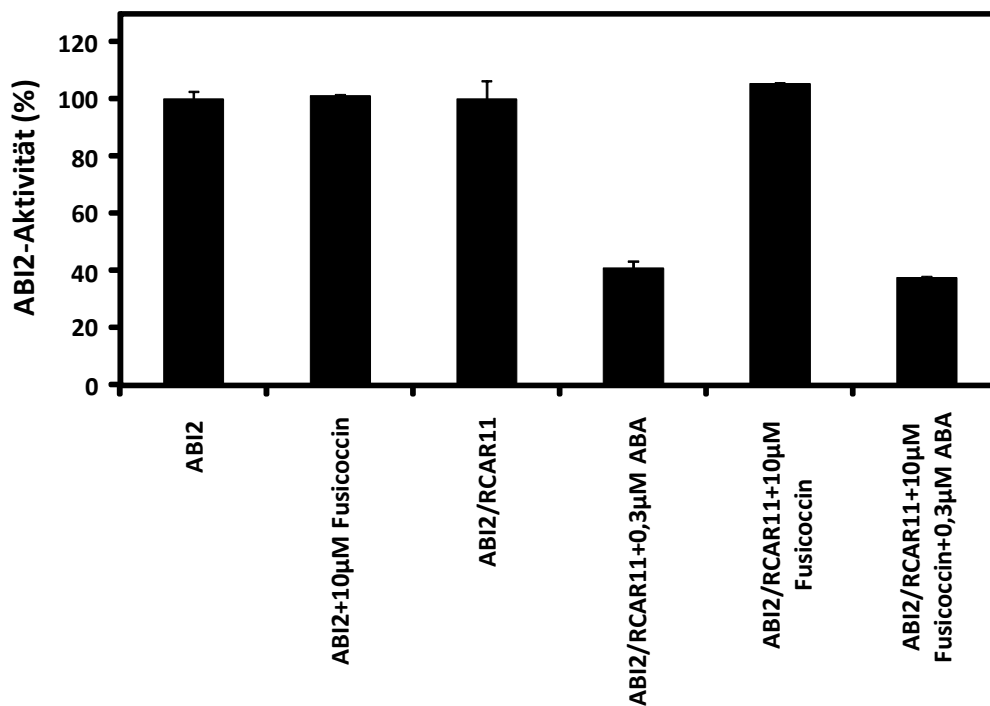


**Abbildung 2-49:** Inhibierung von ABI2 in Anwesenheit von RCAR1 (schwarze Balken), RCAR3 (graue Balken) oder RCAR11 (weiße Balken) und (*S*)-ABA, (-)-ABA, *trans*-ABA bzw. ABA-Analogen bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

#### 2.4. Aktivität von Fusicoccin bei der Regulation des ABA-Rezeptors

Fusicoccin ist ein Phytotoxin, das durch den Deuteromyceten *Fusicoccum amygdali* synthetisiert wird. Fusicoccin bindet mit der Hilfe des 14-3-3-Proteins an die Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase der Schließzellen. Die dauerhafte Aktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase ruft zu Störungen des elektrochemischen Gradienten hervor. Es erhöht die Aufnahme von K<sup>+</sup>-Ionen und induziert das irreversible Öffnen der Schließzellen.

In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von Fusicoccin zur Regulation des ABA-Rezeptors untersucht. Zunächst wurde der direkte Einfluß von Fusicoccin auf die ABI2-Aktivität getestet (Abb. 2-50). Als Positivkontrolle diente die Aktivität der Phosphatase ABI2 in Abwesenheit von Liganden und RCAR-Proteinen, sie wurde als 100 % Aktivität festgesetzt. Die Anwesenheit von RCAR11 alleine hatte keinen Effekt auf die ABI2-Aktivität. Die Abscisinsäure reduzierte in einer Konzentration von 0,3 µM die Aktivität der PP2C in Gegenwart von RCAR11 auf 40 %. Um die Frage zu beantworten, ob Fusicoccin eventuell ABA-antagonistische Wirkungen besitzt, wurde die ABI2-Regulation in Anwesenheit von Fusicoccin (10 µM), RCAR11 mit und ohne ABA (0,3 µM) gemessen. Fusicoccin zeigte dabei keinen Einfluß auf die Phosphatase-Aktivität und ist damit weder Teil eines aktiven RCAR11-ABI2-Komplexes noch interferiert es mit der Bindung von ABA an den RCAR11-ABI2-Holorezeptor.



**Abbildung 2-50:** Einfluß von Fusicoccin (10 µM) auf die Regulation des ABI2/RCAR11-Rezeptors in Anwesenheit und Abwesenheit von ABA bei der Konzentration von 0,3 µM.

### 3. Diskussion

Trocken-, Salzstress und Pathogene beeinflussen beträchtlich die Biomasse und Produktivität der Pflanzen mit entsprechend negativen ökonomischen Auswirkungen (Marris, 2008). Das Phytohormon Abscisinsäure gilt als ein Regulator der abiotischen Stresstoleranz, der die Anpassung der Pflanzen an eine limitierte Wasserverfügbarkeit reguliert (Cutler et al, 2010). Trockenstress führt zu einer Erhöhung des ABA-Gehalts durch eine Aktivierung der ABA-Biosynthese, sowie durch eine Freisetzung der Abscisinsäure aus ihrer Speicherform ABA-GE durch  $\beta$ -Glucosidasen, wie AtBG1 (Christmann et al, 2005; Nambara & Marion-Poll, 2005). Christmann et al. (2007) zeigten, dass ein Wasserdefizit (in diesem Fall als hydraulisches Signal definiert) im Spross in ein chemisches Signal umgewandelt wird. Dieses chemische Signal ist ABA. Die ABA-Biosynthese findet grundsätzlich im Leitgewebe statt, anschließend gelangt ABA unter Beteiligung von ATP-abhängigen Transportern, wie AtABCG25 (ABA-Exporter) (Kuromori et al, 2010) und AtABCG40 (ABA-Importer) (Kang et al, 2010), in andere Zellen. Die freigesetzte ABA reguliert die Genexpression und induziert das Schließen der Spaltöffnungen, was zu einem reduzierten Wasserverbrauch führt. Während die Perzeption der ABA und der zentrale Ablauf des ABA-Signalwegs in den letzten drei Jahren beinahe komplett aufgeklärt wurden (Ma et al, 2009; Park et al, 2009), bleibt die Frage nach der Existenz und Natur eines Osmorezeptors sowie nach der sich anschließenden Signalkaskade offen. Es wurde postuliert, dass Histidinkinasen oder mechanosensitive Kanäle die Rolle eines Osmosensors spielen könnten (Haswell et al, 2011; Tran et al, 2007; Urao et al, 1999).

#### 3.1. AHKs und MSLs als Kandidaten für Osmosensoren

Histidinkinasen (HK) gehören zu zweiteiligen Signalsystemen, die in Prokaryoten und Eukaryoten zu finden sind. Diese Proteine sind u.a. für die Vermittlung einer Stresstoleranz verantwortlich und regulieren durch eine Phosphorylierungskaskade die Stressadaptation. In Hefen wurden die Kinasen Sln1 und Sho1 als Komponenten des HOG-Signalwegs (*High-Osmolarity Glycerol*) identifiziert. Osmotischer Stress führt zur Deaktivierung der Sln1 bzw. Sho1 Autophosphorylierung, was in der Folge die MAPK Hog1 aktiviert und es den Hefen ermöglicht, sich durch die Induktion der Glycerin-Biosynthese an den osmotischen Stress anzupassen (Reiser et al, 2003) (siehe Abb. 1-8, Kapitel 1.2.3). Das *Arabidopsis thaliana*-Genom kodiert für 11 Histidinkinasen. Zu diesen gehören die Cytokinin-Rezeptoren AHK2, AHK3, CRE1/AHK4 sowie AHK1/ATHK1, eine Kinase, die keine für Cytokinin-Bindung verantwortliche CHASE-Domäne (*Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular*) besitzt und nicht als Cytokinin-Rezeptor funktioniert (Urao et al, 2001). Es wurde gezeigt, dass diese vier HKs



durch osmotischen Stress induziert werden (Tran et al, 2007). AHK1 komplementiert den letalen Phänotyp der *sln1sho1*-Doppelmutante in Hefe (Urao et al, 1999). Dies spricht dafür, dass die AHK1 Änderungen der osmotischen Verhältnisse in Hefe erkennt und *downstream*-Komponenten des HOG-Signalwegs aktiviert.

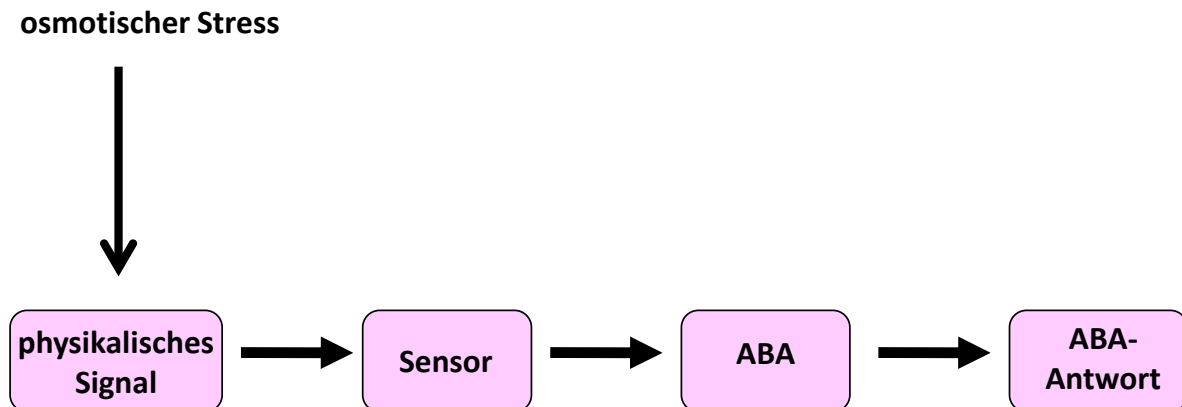
Auch die mit AHK2, AHK3 und CRE1 transformierte *sln1sho1*-Doppelmutante zeigte einen Wildtyp-Phänotyp, wobei Cytokinin für die Aktivierung der CRE1-Kinase erforderlich war. AHK1 wurde in *Arabidopsis thaliana* als positiver Regulator der ABA-Signaltransduktion postuliert. Tran et al. (2007) verglichen in einem Austrocknungsversuch verschiedene *ahk*-Mutanten. Während die untersuchte *ahk1*-Mutante Trockenstress-intolerant und ABA-insensitiv war, zeigten *ahk2*, *ahk3* und *cre1* einen zu *ahk1* entgegengesetzten Phänotyp und reagierten Trockenstress-tolerant bzw. hypersensitiv auf ABA. Auf Grund der in Hefen durchgeführten Komplementationsexperimenten kommen die AHK-Kinasen mit Wirkung auf die Stress-Adaptation als Osmosensoren in Frage. Ihre Rolle ist jedoch bei osmotischem Stress nach Tran et al. (2007) in *Arabidopsis thaliana* jeweils unterschiedlich und im Detail noch nicht verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, Elemente der Signalkaskade zu identifizieren, die an der Umwandlung des hydraulischen Signals in ein ABA-Signal beteiligt sind. Am Anfang dieser Signal-Kaskade muss (vgl. Kapitel 2.1.1.2) ein Osmosensor oder mehrere Osmosensoren stehen. Daher wurden die *ahk*-Mutanten näher charakterisiert. Die Untersuchung des Stomatenschlusses in Gegenwart von osmotischem Stress zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den getesteten Mutanten und dem Wildtyp (Abb. 2-8). Dies stimmte nicht mit dem von Tran et al. (2007) postulierten Trockenstress-toleranten Phänotyp überein, der wahrscheinlich eher als Langzeiteffekt bei Trockenstress zu sehen ist. Auch die ABA-Empfindlichkeit der Stomata unterschied sich nicht bei Mutanten und Wildtyp (Abb. 2-10). Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Dynamik der Stomataantwort zeigte keine Hinweise darauf, dass die verschiedenen *ahk*-Mutanten eine gestörte Osmostress-Perzeption mit der Auswirkung auf die Stomata besitzen (Abb. 2-9). Es ist aber auch denkbar, dass ein Funktionsverlust zu einer Änderung des Osmosensors bzw. Ansprechverhaltens führt, die keine Wirkung auf die Stomataregulation hat. Zudem könnten die homologen AHKs den Funktionsausfall eines Elements kompensieren. In die *ahk*-Mutanten könnte das *pAtHB6::LUC*-Reportersystem gebracht werden, um die Auswirkung des osmotischen Stresses auf die ABA-Aktivität der untersuchten Linien zu visualisieren und näher zu untersuchen (Christmann et al, 2007). Der Hypothese zufolge wäre bei einem osmotischen Stress eine hyper- bzw. hyposensitive Aktivierung des Reporters in Mutanten zu erwarten, während eine Behandlung mit ABA keine Unterschiede in der Genexpression zwischen untersuchten Mutanten und Wildtyp bringen sollte. Das zugrunde

## Diskussion

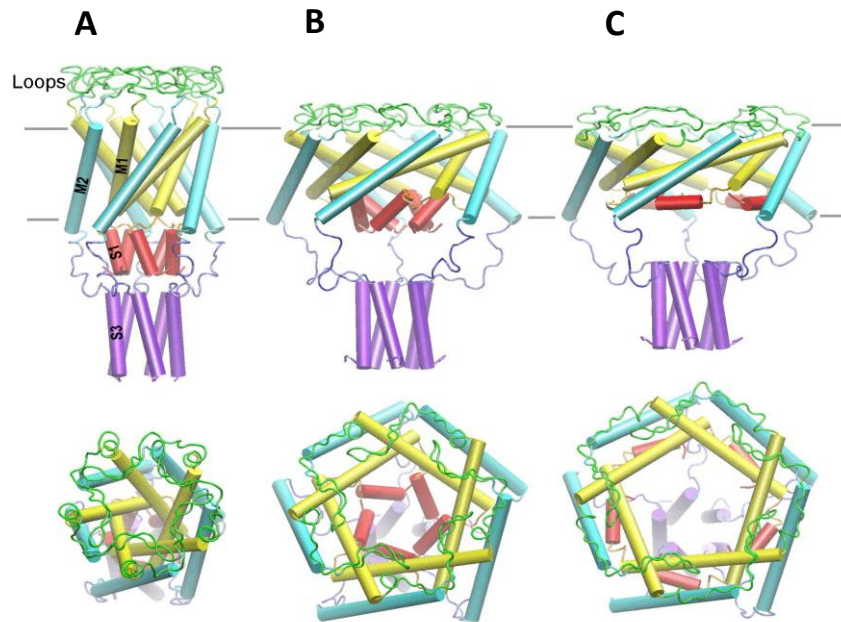
---

liegende Arbeitsmodell wird in der Abbildung 3-1 dargestellt und im Kapitel 2.1.1.2 detailliert beschrieben.



**Abbildung 3-1:** Das in dieser Arbeit angewandte Arbeitsmodell. Ein durch Stresseinwirkung generiertes physikalisches Signal wird durch einen unbekanntem Sensor wahrgenommen und führt zur Aktivierung der ABA-Biosynthese. Anschließend aktiviert Abscisinsäure die ABA-Antwort.

Mechanosensitive Kanäle sind sowohl prokaryotische als auch eukaryotische, membranintegrierte Proteine, die durch physikalische Anregungen (wie osmotischer Stress) hervorgerufene Änderungen der Membranspannung fühlen und bei Überschreitung bestimmter Schwellenweite ein Signal generieren, das wiederum eine Signalkaskade auslösen kann, wodurch letzten Endes die Stresstoleranz positiv beeinflusst wird (Anishkin & Kung, 2005; Sukharev & Corey, 2004). In *E. coli*-Bakterien gibt es mechanosensitive Kanäle wie MscL (*Mechanosensitive channel of Large conductance*) und MscS (*Mechanosensitive channel of Small conductance*), die zuerst in *Escherichia coli*-Sphäroplasten gefunden wurden (Cui et al, 1995; Martinac et al, 1987; Sukharev et al, 1993), wobei die pflanzliche MSLs zu bakteriellen MscS homolog sind. Die mechanosensitiven Kanäle reagieren auf eine Änderung der Membranspannung durch Öffnen oder Schließen einer zentralen Pore. Das Öffnen eines MscL-Kanals erfolgt über eine Expansion des Transmembranzylinders durch das Kippen der Transmembranhelices mit gleichzeitiger Bewegung auf eine irisähnliche Weise (Abb. 3-2). Das N-terminale Segment S1 formt ein kurzes Bündel, das wie ein zusätzlicher Verschluss funktioniert. In einem Übergangsstadium wird der Transmembranzylinder ausgedehnt, während der aus S1-Segmenten bestehende Verschluss noch geschlossen bleibt (Abb. 3-2B). In diesem Stadium verbleibt der MscL-Kanal nicht leitfähig. Eine weitere Expansion trennt die kurzen S1-M1 Verbindungen, was zur Separation von N-terminalen Bündeln und zum Öffnen des Kanals führt (Abb. 3-2C).

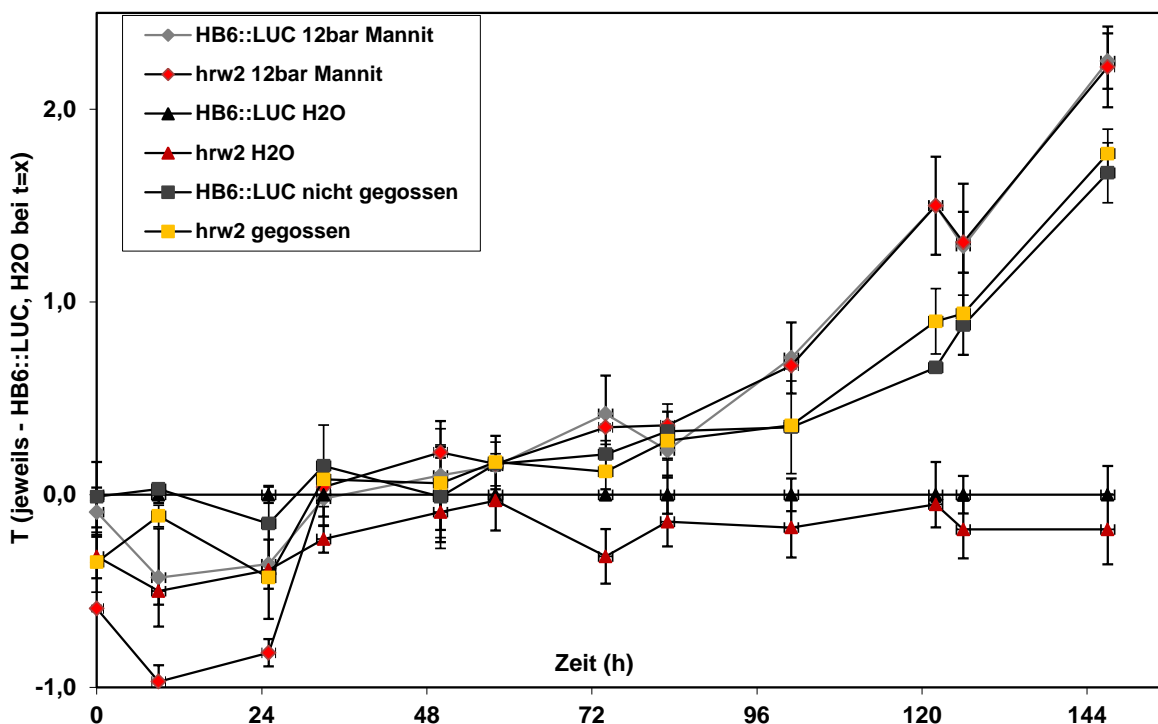


**Abbildung 3-2:** Das Modell eines MscL-Kanals in seiner geschlossenen (A), geschlossen-ausgedehnten (B), und offenen (C) Konformation (Sukharev et al, 2001).

*Arabidopsis thaliana* besitzt 10 MscS-homologe Kanäle, MSL1-10. MSL 1-3 lokalisieren in Plastiden, während MSL4-10 in der Plasmamembran und in der Membran der Vakuole zu finden sind (Haswell & Meyerowitz, 2006; Haswell et al, 2008). Die MSL-Expression wird von biotischen und abiotischen Faktoren reguliert, was für eine Rolle in der Stresstoleranz sprechen kann. Um die Frage zu beantworten, ob diese Kanäle als Osmosensoren funktionieren, wurde in dieser Arbeit die Stomataregulation der *msl9-10*, *msl 4-5-6* und *msl4-5-6-9-10* Mutanten in Anwesenheit von osmotischem Stress bzw. ABA charakterisiert. Nur die *msl4-5-6-9-10*-fünffach Mutante zeigte eine sehr schwach veränderte Sensitivität der Stomataregulation bei einem osmotischen Potential von -0,8 MPa (Abb. 2-11). Die Kinetik-Untersuchungen der Stomataregulation von *msl*-Mehrfachmutanten zeigten allerdings einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp in Anwesenheit von osmotischem Stress (Abb. 2-12). Deshalb konnte postuliert werden, dass die MSL-Kanäle wahrscheinlich keine Funktion in der Osmostress-Perzeption besitzen. Die mit Abscisinsäure behandelten Mutanten wiesen eine Wildtyp-ähnliche Stomataantwort auf und unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Kanäle dennoch in der Trockentoleranz involviert sind. Die vergleichsweise große Anzahl an Genen für mechanosensitive Kanäle in *Arabidopsis thaliana* spricht für eine funktionelle Redundanz. So könnten die in der Plasmamembran lokalisierten MSL7 und MSL8, die bislang nicht analysiert wurden, als potentielle Regulatoren der Osmoperzeption in Pflanzen in Frage kommen und sollten daher näher untersucht werden.

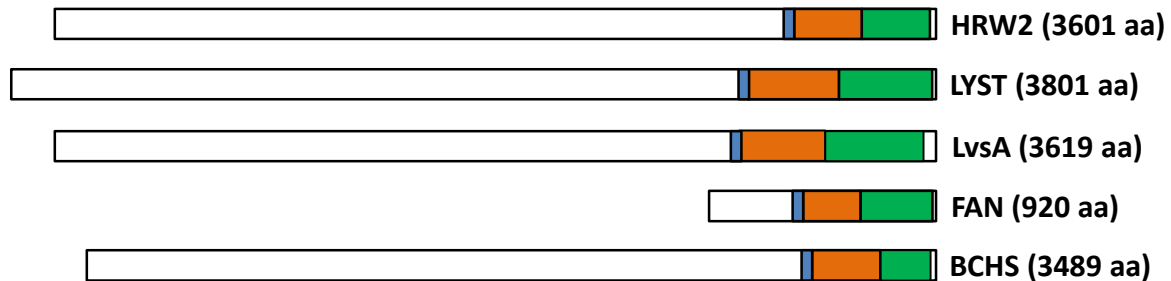
### 3.2. HRW2 ist ein WD40/BEACH-Domänen-Protein

Die *hrw2*-Mutante wurde in einem Screen nach in der Osmoregulation gestörten Mutanten gefunden. Auf osmotischen Stress reagiert die Mutante hinsichtlich der ABA-Reporteraktivierung hypersensitiv, während die Geninduktion in Anwesenheit von Abscisinsäure ein Wildtyp-ähnliches Muster zeigt. Auf Grund des im Kapitel 2.1.1.2 beschriebenen Arbeitsmodells wurde *hrw2* als frühe Stress-Signaltransduktions-Mutante klassifiziert. Auch Protoplasten der Mutante zeigten bei Verwendung des *pRD29B::LUC* ABA-Reporters eine Wildtyp-ähnliche ABA-Sensitivität. Die Reaktion verschiedener physiologischer Prozesse auf ABA, wie Keimung, Wurzelwachstum und Stomataregulation, war in der Mutante unverändert. Überraschenderweise zeigten diese physiologischen Prozesse in der Mutante auch bei Applikation von osmotischem Stress dasselbe Verhalten wie der Wildtyp. Auch eine detaillierte Analyse der Kinetik der Stomataaregulation von Mannit-gestresster *hrw2*-Mutante mit Hilfe der IR-Thermographie ergab keine Unterschiede zum Wildtyp (Masterarbeit, Ulrich Hohmann, Abb. 3-3).



**Abbildung 3-3:** IR-Thermografie: *pATHB6::LUC* vs. *hrw2*-Pflanzen in Erde (Daten von U. Hohmann). Dazu wurden ca. 7 Tage alte Keimlinge von *pAtHB6::LUC*-Kontrolllinie und *hrw2*-Mutante in 3 Schalen pikiert. Die Messung der Blattoberflächentemperatur wurde 4-10 Tage nach dem Pikieren begonnen. Eine Schale wurde unter starken Stresbedingungen gesetzt, die zweite normal gewässert und die dritte nicht gegossen. Der Stress wurde den Pflanzen durch eine -1,2 MPa Mannitlösung appliziert. Alle Messungen wurden in der Klimakammer (16h, 21,6°C tagsüber) durchgeführt.

Die positionelle Klonierung und Gesamtgenom-Sequenzierung führten zur Identifizierung einer Punktmutation in Form eines Guanin zu Adenin Austausches, wie sie für EMS-Mutagenesen typisch ist, in der Position 10221 des At1g03060-Gens, die das Codon für Trp<sup>3407</sup> in ein Stopcodon umwandelt. Das Gen At1g03060 wurde von Saedler et al. (Saedler et al, 2009) in einer früheren Arbeit bereits charakterisiert und *SPIRRIG* genannt. HRW2- bzw. der SPIRRIG-Lokus kodiert für ein großes WD40/BEACH-Domänen-Protein mit 3601 Aminosäureresten, das mit menschlichen LYST (*lysosomal trafficking regulator*) und FAN (*factor associated with neutral sphingomyelinase activation*) Proteinen, LvsA (*large volume sphere A*) aus *Dictyostelium* und BCHS (*autophagy-associated protein BLUE CHEESE*) aus *Drosophila* verwandt ist und eine sehr komplexe, primäre Struktur zeigt (Abb. 3-4). Das HRW2-Protein besitzt eine PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*), die durch eine Interaktion mit Phosphatidylinositolen (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) bei der Bindung von Proteinen an biologische Membranen eine Rolle spielt, eine BEACH-Domäne (*Beige and Chédiak-Higashi domain*), die wahrscheinlich für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist, und vier C-terminale WD40-Domänen (Saedler et al, 2009), wobei die *hrw2*-Punktmutation sich in der letzten WD40-Domäne befindet.



**Abbildung 3-4:** Vergleich der Domänenstruktur von WD40-BEACH-Domänen-Proteinen aus verschiedenen Organismen. Markiert wurden PH-Domäne (blau), BEACH-Domäne (orange) und WD40-Domäne (Grün).

WD40-Domänen gelten als Mittelpunkt des zellulären Netzwerks, sie gehören zu den häufigsten Interaktionsdomänen in eukaryotischen Genomen und vermitteln Interaktionen mit Proteinen, Peptiden oder Nukleinsäuren. WD40-Domänen wurden erstmalig in  $\beta$ -Transducin des Rindes gefunden (Fong et al, 1986) und zeigten repetitive Sequenzmotive aus 44-60 Aminosäuren. Die Kristallstruktur von  $\beta$ -Transducin zeigte, dass diese Motive einen  $\beta$ -Propeller mit 7 Blättern formen, wobei jedes Blatt vier antiparallele  $\beta$ -Faltblätter besitzt (Wall et al, 1995). Proteine mit WD40-Domänen sind grundsätzlich in Eukaryoten zu finden, wo sie in der Signaltransduktion, der Mitose, der Apoptose, der Regulation der Transkription und beim Aufbau des Zytoskeletts

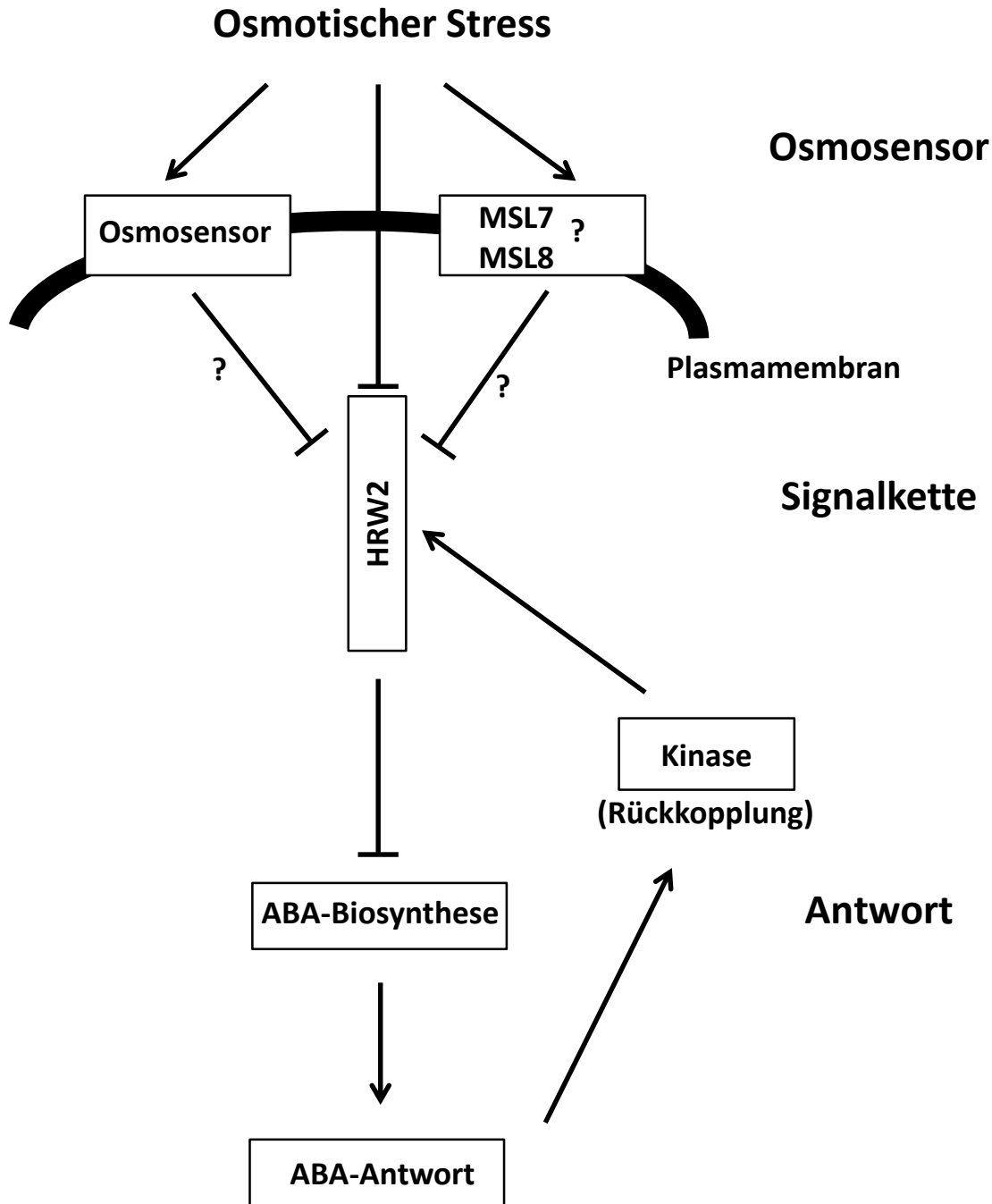
## Diskussion

---

eine wichtige Rolle spielen (Smith, 2008). Eine enzymatische Aktivität der WD40-Domäne wurde bisher nicht bewiesen, jedoch besitzen Proteine mit WD40-Domänen oft andere Domänen mit katalytischen Aktivitäten. WD40-Domänen funktionieren als große Interaktionsplattformen und können gleichzeitig mit vielen Proteinen interagieren (Stirnimann et al, 2010). Die Funktion der WD40-Domäne in WD40/BEACH-Domänen-Proteinen blieb bisher bis auf eine Ausnahme unbekannt. So interagieren die WD40-Domänen des FAN-Proteins mit der N-Sphingomyelinase-Aktivierungsdomäne des TNF-R55-Rezeptors (Adam-Klages et al, 1996). Durch diese Interaktion wird die in der Plasmamembran lokalisierte N-Sphingomyelinase aktiviert, was zur Bildung von Ceramid führt, welches wiederum als Signal wirkt und Folgereaktionen auslöst. Die Rolle dieser Domäne im HRW2-Protein und auch die Funktion des HRW2-Proteins sind in Pflanzen unbekannt. Dass die Punktmutation in der letzten der WD40-Domänen von HRW2 den gegenüber osmotischem Stress hypersensitiven Phänotyp verursacht, spricht dafür, dass diese Domäne entscheidend für die Funktionalität des ganzen Proteins sein muss.

Saedler et al. analysierten 2 von 4 identifizierten *spi*-Allelen, *spi-11* und *spi-12*, und zeigten, dass diese Mutanten sehr dünne und verbogene Trichom-Verzweigungen besitzen. Zusätzlich wurden bei *spirrig* sowohl getrennte, gekräuselte Epidermiszellen des Hypokotyls und des Blattstiels als auch fragmentierte Vakuolen in ca. 50 % von Wurzelhaaren beobachtet, die jedoch bei der *hrw2*-Mutante nicht zu sehen waren. Ein zu HRW2 homologes Protein aus *Dictyostelium*, *LvsA*, ist an Zellteilung und Funktionalität von kontraktile Vakuolen beteiligt, die eine entscheidende Rolle bei der Osmoregulation spielen (Du et al, 2008; Wu et al, 2004). Es könnte sein, dass die Mutation in *hrw2* eine Interaktion mit der Vakuole zerstört, die für einen richtigen Aufbau des Zellurgors verantwortlich ist, was in Folge zur Mißbildung von Trichomen führt. Es kann spekuliert werden, dass es sich bei *HRW2/SPIRRIG* um einen Osmosensor handelt. Aber passt der Mutantenphänotyp wirklich zu diesem Arbeitsmodell? Man würde erwarten, dass ein Osmosensor als positiver oder negativer Regulator der *downstream*-Kaskade wirkt. Im Fall eines Ausfalls der Funktion wäre dann eine Insensitivität bzw. Hypersensitivität gegenüber osmotischem Stress zu erwarten. Beobachtet wurde aber, wie erwähnt, ein hypersensitiver Phänotyp der *hrw2*-Mutante, was für einen negativen Effekt oder für eine Gain-of-function-Mutation sprechen würde. Die Analyse der heterozygoten Pflanzen zeigte, dass es sich bei *hrw2* um eine rezessive Mutation handelt. Es ist bekannt, dass Signal-Rezeptoren auch als negative Regulatoren funktionieren. Es wurde nämlich gezeigt, dass die Ethylen-Rezeptoren ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4 die Ethylen-Signalkaskade negativ kontrollieren. Diese Proteine zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen und besitzen eine His- bzw. Ser/Thr-Kinase-Aktivität. Durch eine Phosphorylierung in Abwesenheit von Ethylen induzieren sie die MAPKKK CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*) und hemmen damit den Signalweg. Die Bindung des Liganden deaktiviert den Rezeptor, was zur Inhibierung der

CTR1-Kinase und zur Aktivierung der Ethylen-Antwort führt (Chen et al, 2005; Kim et al, 2011). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für den bereits in dieser Arbeit erwähnten HOG-Signalweg in Hefe beschrieben, wo die Sln1-Kinase als ein negativer Regulator der Signalkaskade in Abwesenheit von hyperosmotischem Stress gilt. In Gegenwart von hyperosmotischem Stress führen die Änderungen der Membranspannung zur Inhibierung der Kinase-Aktivität von Sln1-Protein, was anschließend die Schutzmechanismen aktiviert. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Sequenzanalyse des HRW2-Proteins keine Hinweise auf die Existenz einer Kinase-Domäne ergab. Es ließe sich postulieren, dass HRW2 mit Osmosensoren oder/und mit mechanosensitiven Kanälen interagiert und als Inhibitor der Signaltransduktion inaktiviert wird (Abb. 3-5). HRW2 könnte wie eine Komponente des *Bacillus subtilis* Stressosom Komplexes funktionieren. Das Stressosom ist ein ca. 1,8 MDa großer Protein-Komplex, der aus RsbS, RsbR und 4 paralogen RsbR (Delumeau et al, 2006; Gaidenko et al, 2006) besteht, deren C-terminale Domänen konserviert vorkommen und als Integratoren von Signalen wirken, während N-terminale Domänen große Unterschiede der Aminosäuresequenz zeigen und eine Rolle als Sensor spielen. Die Stressosome konvertieren ein aus der Umwelt kommendes Signal in ein intrazelluläres Signal, das meistens durch eine transkriptionelle Modulation die Antwort reguliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, kann mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (*Yeast Two Hybrid*) nach potentiellen HRW2-Interaktionspartnern gesucht werden. In einem Kandidaten-Screen könnten Enzyme der ABA-Biosynthese getestet werden, denn falls HRW2 in der Trockentoleranz involviert ist und als ein negativer Regulator funktioniert, sollte die ABA-Biosynthese durch das HRW2-Protein direkt oder indirekt deaktiviert werden. Parallel sollte mit Hilfe der RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) die Expression von an der ABA-Biosynthese beteiligten Genen getestet werden. Bei Gültigkeit der „Interaktionshypothese“ wäre in völliger Abwesenheit des HRW2-Proteins und in Gegenwart von osmotischem Stress eine erhöhte Expression von diesen Genen im Vergleich zur Kontrolle zu erwarten. Es ist allerdings vorstellbar, dass HRW2 nicht direkt mit Komponenten der ABA-Biosynthese interagiert. So gibt es Hinweise auf eine indirekte Verknüpfung zwischen ABA-Biosynthese und HRW2 in Form einer Rückkopplung. In einer massenspektrometrischen Analyse mit Hilfe von der  $N^{14}/N^{15}$  metabolischen Markierung wurde gezeigt, dass drei Serin-Reste (Ser<sup>1961</sup>, Ser<sup>1963</sup>, Ser<sup>1966</sup>) des HRW2/SPIRRIG-Proteins in Anwesenheit von Abscisinsäure phosphoryliert werden können (Kline et al, 2010). In einem noch zu prüfenden Modell könnte man sich eine ABA-abhängige Kinase vorstellen, die nach der HRW2-abhängigen Aktivierung der ABA-Biosynthese die Aktivität von SPIRRIG durch eine Phosphorylierung verändert. Kandidaten für eine solche Kinase wären zunächst die bereits erwähnten SnRKs wie OST1. Ein Model der HRW2-Funktion wird in Abbildung 3-5 dargestellt.



**Abbildung 3-5:**Modell zur Funktion von HRW2 in der Osmoperzeption. Ein osmotischer Stress wird durch einen unbekanntem Sensor bzw. MSLs oder durch HRW2 selbst wahrgenommen, was zur Deaktivierung von HRW2 führt. Da HRW2 im Modell als negativer Regulator wirkt, wird dadurch die ABA-Biosynthese und anschließend die ABA-Signalkaskade aktiviert. Dies beeinflusst auf eine positive Weise eine ABA-abhängige Kinase, die HRW2 phosphoryliert und dadurch reguliert.

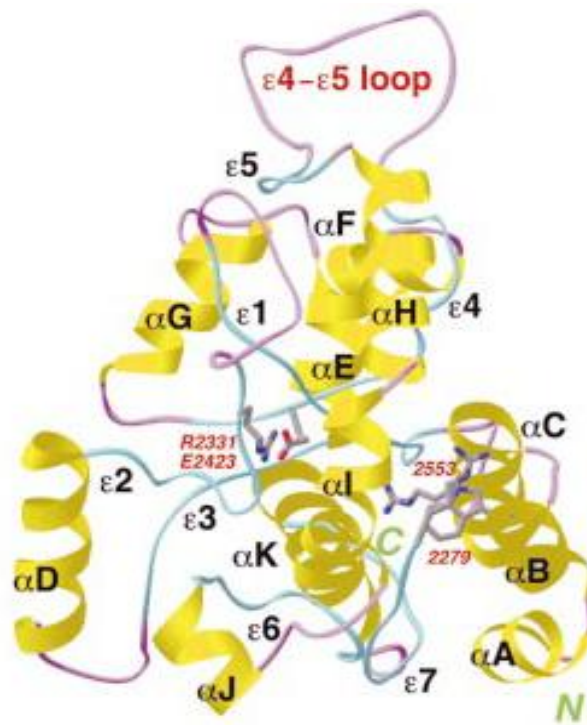
Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der in der *hrw2*-Mutante beobachtete Phänotyp durch einen Zellwandeffekt verursacht wurde. Es wurde nämlich gezeigt, dass ein zu HRW2-homologes menschliches WD40-BEACH-Domänen-Protein, LYST, ein lysosomaler Regulator des Vesikeltransporters ist (Tchernev et al, 2002). LYST scheint als ein Adapter-



Protein von an der Fusion der intrazellulären Membranen beteiligten Proteinen zu funktionieren, während Bchs (*blue cheese*), ein WD40-BEACH-Domänen-Protein aus *Drosophila melanogaster*, eine Rab11-antagonistische Wirkung in den Synapsen sitzt. Rab11 ist eine GTPase, die im Vesikeltransport eine Rolle spielt. Sie reguliert die Formation, die Beweglichkeit, das Andocken und die Fusion der Vesikel (Khodosh et al, 2006).

Neben den WD40-Interaktionsdomänen kommen im SPIRRIG-Protein auch BEACH-Domänen vor, die *upstream* von den C-terminalen WD40-Domänen liegen. Kristallstudien zeigten, dass die BEACH-Domäne von Neurobeachin in eine besondere, für andere Proteine unbekannte Struktur faltet (Jogl et al, 2002) Diese Domäne besitzt mehrere Segmente ( $\epsilon$ -1 bis  $\epsilon$ -7), die weder  $\beta$ -Stränge noch *Random Coil*-Strukturen zeigen und sich im hydrophobischen Domänenkern befinden, wo sie durch danebenliegende  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ -A bis  $\alpha$ -K) stabilisiert werden (Abb. 3-6A). Es wurden weder katalytische noch bindende Taschen in der BEACH-Domäne identifiziert. Die Funktion der BEACH-Domäne ist unbekannt. Im Innenbereich der BEACH-Domäne aus verschiedenen Arten sind viele konservierte Aminosäurereste zu finden, die z.B. bis zu 50 % Homologie zwischen LsvA und menschlichen CHS (*beige/Chediak-Higashi syndrome proteins*)-Proteinen zeigen (De Lozanne, 2003). In der Kristallstruktur der BEACH-Domäne zeigte sich die Anwesenheit einer prominenten  $\epsilon$ 4- $\epsilon$ 5 Schleife, die wahrscheinlich eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Proteinen spielt (Abb. 3-6A). In Abbildung 3-6B wird der mit Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) durchgeführte Homologievergleich der Aminosäuresequenz von BEACH-Domänen zwischen HRW2-, LvsA- und LYST-Proteinen. Der Sequenzvergleich von PH-Domänen, WD40-Domänen als auch von dem N-terminalen Bereich erwies keine Homologie zwischen den verglichenen Proteinen.

A



B

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
HRW2	KRMQNGEISNFQYLMLNTLAGRGYSOLIQYPVFPVLAIDYDSESLDFSDPKTFKRLHKPMGQTPGEEEFKRYESHDDPE-----VPKFHYGSHYSAGIVLFYLIRLPPFSSENQKLGQGFQD														
LvsA	TLKMQGQGISNFQYLMLNTLAGRSYNOLIQYPVFPVLSDYEEELDIDDPKVVYRDL SKPMGAL EESRAQKFRERFENHDDQEPNEHGKVPKFHYGTHYSRAIVLYLIRLEPFQHFLLKLGGRAD														
LYST	NFEYLMFLNTLAGRTYNOLNQPYPFPVLTNYESKDLDSLSPNYRDL SKPIGALNPSRRAYFEERYESHSDT-----IPPFHYGTHYSTAFTLNMLVRYEPTTFMLALQGGKFD														
Consensus	...uq.g.isNF#YLMhLNTLAGR.YnDLtQYP!FPVVL.#Y#Se.LD.sdPk.%RdLskPnGal.psr...FreR%EsHdd.e.....!PKFHYGTHYSsAaiV.L.gL!R!ePf...fLkLQGG.fD														
HRW2	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
LvsA	HADRLFNSIKDTHLSAAGKNTSDVKELIPEFFYMPFELENRFSLDLGKQSGEKVGDVFLPPHARGSVREFILKHKREALESDYVSENLHWHIDLIFGYKQKRAEEAVNVFYHYTYEGNVQIDAVTDP														
LYST	QPDRLFSSITEANASS--QGSGVVMELIPEFYFLDEFVNNKFNFGTKGGEPIDDIILPPHAKGSPQEFILKHKRALESDDYVSEHLHWHIDLIFGYRQKRAADSLNVFYFLTYEGAVNIDAI SDP														
Consensus	.pDRLFsS!...H.s...qg.TsdVkelIPEf%#pEf1.N.....!G.k#.Ge.!dD!.LPPHakGSp.EF!...hR.ALES#vSe.LH.WIDLIFGYkQrGkaA...a.NVFYgIlyEG.V#iDa!.DP														
HRW2	261	270	280	288											
LvsA	AHKRSILAQINHFQGTPKQLFPKRAHYKR														
LYST	VEKARTIAQINHFQGTPKQLFDKPHPKR														
Consensus	vnkaa...aQInnFGQTPkQLf.kplhpkR														

Abbildung 3-6: A, Struktur der BEACH-Domäne von Neurobeachin (Jogl et al, 2002). ε-Segmente wurden blau, α-Helices gelb und Schleifen lila markiert. B, Homologievergleich der BEACH-Domänen von WD40-BEACH-Domänen-Proteinen aus verschiedenen Organismen. Die konservierten Aminosäurereste sind rot angezeichnet.

Es wurde gezeigt, dass Neurobeachin und AKAP-550 aus *Drosophila melanogaster* mit Proteinkinase A (PKA) interagieren (Han et al, 1997; Wang et al, 2000). PKA besteht aus drei katalytischen und vier regulatorischen Untereinheiten. Diese Kinase wird durch cAMP in Antwort auf extrazelluläre Signale reguliert und wirkt auf intrazelluläre Ereignisse (Muniz et al, 1997). Bruzzone et al. zeigten, dass die ABA-Bindung an die Membran der menschlichen Granulozyten zur Erhöhung des zellulären cAMPs führt und dadurch zur Aktivierung der Proteinkinase A (Bruzzone et al, 2007). Ein ähnlicher Mechanismus könnte in Pflanzen ablaufen:

ein osmotischer Stress würde HRW2 anregen, das anschließend die ABA-Biosynthese aktivieren würde. ABA würde zur Aktivierung der Proteinkinase führen, die anschließend HRW2 phosphorylieren und es damit deaktivieren würde. An dieser Stelle sind das nur Spekulationen, die ohne Zweifel weitere Untersuchungen benötigen.

PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*) besteht aus ca. 100-120 Aminosäureresten und vermittelt die Membranassoziation von Proteinen durch eine Bindung an Phosphatidylinositolphosphate, wobei die Ligandenspezifität von PH-Domänen variabel vorkommt. Die PH-Domänen-Proteine sind nicht nur am Membrantransport und Lipidmetabolismus beteiligt sondern regulieren auch das Zellwachstum durch eine Organisation des Zytoskeletts (Ferguson et al, 1995; Lemmon & Ferguson, 2000). Die Anwesenheit der PH-Domäne in HRW2-Protein kann ein Hinweis auf eine Membranlokalisation des Proteins sein. LvsA, ein WD40-BEACH-Protein aus *Dictyostelium*, wurde in einem Screen auf in der Zellteilung gestörten Mutanten gefunden (Kwak et al, 1999). Die *lvsA*-Zellen sind fähig eine Teilungsfurche und einen kontraktilen Ring zu formen. Die Ingression der Teilungsfurche wird allerdings nicht abgeschlossen, was zum Anschwellen der Furche und zum Ausbeulen der Zelle führt. (Kwak et al, 1999). So entstehen Zellen, die die Zellteilung nicht durchführen können und viele Kerne besitzen. Zusätzlich ist LvsA wichtig für die Funktionalität der kontraktilen Vakuolen (CV), die z. B. in *Chlamydomonas*, *Dictyostelium* und *Paramecium* gefunden werden. Diese Organellen kontrollieren die Osmoregulation und regeln den intrazellulären Wasserstatus durch Ansammeln und Austreiben des Wasserüberschusses aus der Zelle. Dies erhöht die Überlebenschancen bei einem hypoosmotischen Stress. In Abwesenheit von kontraktilen Vakuolen, die aus Röhrchen und Bläschen bestehen, kann die Zelle das Wasser nicht austreiben, was zum Anschwellen und zur Lyse führt (Du et al, 2008). Rohrförmige Strukturen funktionieren als Wasser-akkumulierende Kanäle, während Bläschen mit der Plasmamembran fusionieren und dadurch das Wasser austreiben (Heuser et al, 1993). Wenn Zellen sich in einem isotonischen Medium befinden, bleibt das CV-System inaktiv. Die Verbindung des LvsA-Proteins mit den kontraktilen Vakuolen von *Dictyostelium* ist transient und findet nur während der Entleerung der Vakuole statt. Eine expandierende Vakuole ist also frei von LvsA. Wenn die Vakuole den maximalen Durchmesser erreicht, wird sie von LvsA umhüllt. Nach dem Austreiben des Vakuoleninhalts verschwindet die Assoziation zwischen LvsA und kontraktiler Vakuole. Es wurde gezeigt, dass nur das komplette LvsA-Protein seine volle Funktionalität behält (Wu et al, 2004).

Obwohl das Zusammenspiel zwischen LvsA-Protein und kontraktilen Vakuolen in *Dictyostelium* gut beschrieben wurde, gibt es keinen Hinweis auf die Existenz eines solchen Kompartiments in Pflanzen. Die Lokalisation des SPIRRIG/HRW2-Proteins in Pflanzenzellen ist bislang unklar. Es wurde aber gezeigt, dass die *spirrig*-Mutante fragmentierte Vakuolen in Wurzelhaaren aufweist (Saedler et al, 2009). Dieser nur schwach und uneinheitlich ausgeprägte Phänotyp deutet auf

## Diskussion

---

eine Verknüpfung zwischen vakuolärem System und dem SPIRRIG/HRW2-Protein hin. Es ist denkbar, dass HRW2 sich an Tonoplasten der pflanzlichen Zentralvakuole befindet, die an der Regulation des Turgors beteiligt ist, und diese stabilisiert. Um diese Hypothese nachweisen zu können, müssen Lokalisationsstudien z.B. mit Hilfe des eGFP-Proteins durchgeführt werden. Dabei sollten sowohl das intakte Protein als auch verkürzte Varianten untersucht werden. Es ist vorstellbar, dass die Abwesenheit der WD40-Domänen bzw. BEACH-Domäne zur Infunktionalität bzw. Dislokation des HRW2/SPIRRIG-Proteins führen würde. Wu et al. zeigten nämlich, dass eine N-terminale Deletion die Akkumulation des LvsA-Proteins an der Membran der kontraktiven Vakuole verhindert (Wu et al, 2004).

In *Dictyostelium* akkumuliert das LvsA-Protein erst in Anwesenheit der kontraktiven Vakuolen, die durch einen hypoosmotischen und nicht hyperosmotischen Stress aktiviert werden. Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass es unter hypoosmotischen Bedingungen zu einer Aktivierung der ABA-Signaltransduktion in Pflanzen kommt. Um dies zu überprüfen, könnte die Expression von ABI5-Transkriptionsfaktor in *Arabidopsis*-Zellkulturen untersucht werden. Diese Zellen sind an konstante Bedingungen angepasst und schockartiger Austausch des Mediums gegen reines Wasser könnte für sie eventuell eine Stress-Situation darstellen. Die erhöhte ABI5-Expression würde in einem solchen Experiment im Vergleich zur Kontrolle dafür sprechen, dass nicht nur hyperosmotischer Stress, sondern auch allgemeine Änderungen der osmotischen Verhältnisse eine Induktion der ABA-Signaltransduktion auslösen können.

Die phänotypische Analyse der *hrw2*-Mutante zeigte einen Trichom-Phänotyp (Abb. 2-26E). Dies stimmt mit Daten von Saedler et al. (Saedler et al, 2009) überein, die zeigten, dass Trichome von *spi-11* und *spi-12* dünnere und oft verbogene Trichom-Verzweigungen besitzen (Abb. 2-26C, 2-26D). Neben SPIRRIG/HRW2 sind 7 weitere sogenannte DIS-Genen (*DISTORTED genes*) (Hulskamp et al, 1994), die strukturell nicht näher mit SPIRRIG verwandt sind, für die richtige Entwicklung der *Arabidopsis thaliana*-Trichome verantwortlich ist. Die Entwicklung eines Trichoms beginnt mit einer Expansion der Trichom-Zelle aus der Epidermis, anschließend erfolgt eine Initiation von Trichom-Verzweigungen und die Ausbreitung der Zelle (Hulskamp, 2000; Hulskamp et al, 1994). Die Expansion und das Formen der Trichom-Zelle werden durch die Vakuole beeinflusst, die für den Aufbau eines hydrostatischen Drucks in der Zelle verantwortlich ist. Durch diesen Druck auf die Zellwand wird die Trichom-Zelle turgeszent. Gleichzeitig findet eine Endoreplikation statt, bei der die DNA durch Replikation ohne Zellteilung vervielfacht wird. Die Trichom-Zellen des Wildtyps erreichen DNA-Gehalte von 32C. Die *dis*-Mutanten können sich im DNA-Gehalt unterscheiden, was wiederum die Zahl der Trichom-Verzweigungen reguliert. Da diese Mutanten eine abnormale Organisation des Aktins aufweisen und vier von diesen Genen die Komponenten des ARP2/3-Komplexes (*Actin Related Protein 2/3*) kodieren (El-Din El-Assal et al, 2004; Le et al, 2003; Li et al, 2003; Mathur et al, 2003a; Mathur et al, 2003b; Saedler et al, 2004), wurde postuliert, dass die DIS-Gene die

Expansion der Zelle über einen Einfluß auf das Aktin-Zytoskelett regulieren (Mathur et al, 1999). Der ARP2/3-Komplex befördert die Aktin-Bildung durch eine Polymerisation des F-Aktins zu neuen Filamente und assoziiert mit den vorhandenen Aktin-Strängen (Svitkina & Borisy, 1999). *spi*-Mutanten zeigten allerdings als einzige Mutanten aus der *dis*-Gruppe keine Änderungen der Aktin-Organisation (Schwab et al, 2003). Es ist wichtig zu erwähnen, dass mit Ausnahme der teilweise fragmentierten Vakuolen bei *spi*-Mutanten keine Defekte der intrazellulären Organisation des Cytoskeletts bei *dis*-Mutanten identifiziert wurden (Schwab et al, 2003).

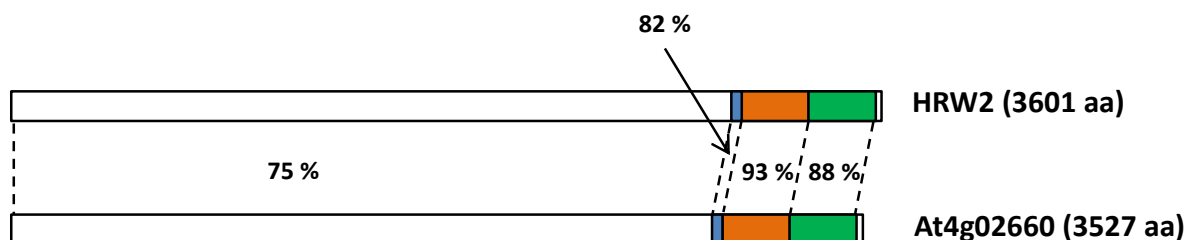
Die *spi-11* bzw. *spi-12* und die *hrw2*-Mutante wurden miteinander gekreuzt und es zeigte sich in der F<sub>1</sub> Generation, dass sie auf Grund des Trichom-Phänotyps allelisch sind (Abb. 2-26F, 2-26G). Da es sich in *spi* und *hrw2* um dasselbe Gen handelt, ist es zu erwarten, dass die F<sub>1</sub>-Generation ebenfalls einen Mannit-hypersensitiven Phänotyp aufweist. Es ist aber nicht klar, wie die Punktmutation in *HRW2* einerseits zum hypersensitiven Phänotyp und andererseits zur Mißgestaltung der Trichome führt. Dies könnte auf eine Funktion des HRW2-Proteins in der Regulation des Turgordrucks hinweisen. Der durch die Vakuole aufgebaute Turgor ist besonders für die Entwicklung und die Stabilisierung der Trichom-Zelle wichtig. Das Wachstum der Zelle erfolgt größtenteils über Wasserzunahme, wobei die Vergrößerung der Zelle als Resultat der Volumenzunahme von der Vakuole auftritt. Die Entwicklung einer Trichom-Zelle involviert auch die Mikrotubuli, die die Initiation und die Formation von Trichom-Verzweigungen kontrollieren. Es wäre denkbar, dass das native Protein die Struktur des Zytoskeletts durch Interaktion mit Aktin stabilisiert. Dagegen spricht das Fehlen einer Änderung des Zytoskeletts, wobei dieses Szenario eine Lokalisation von HRW2 in der Plasmamembran bzw. im Tonoplasten nicht ausschließen würde. In diesem Fall wäre HRW2/SPIRRIG ein Regulator bzw. eine Komponente eines regulatorischen Komplexes, der an der Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt wäre. Eine Beeinträchtigung dieser Funktion könnte dementsprechend zu Störungen der Turgorregulation in Gegenwart von osmotischem Stress führen. Dies könnte einen sekundären Effekt hervorrufen und zur ABA-Signaltransduktion führen. Um die Hypothese zu klären, dass die Punktmutation eine in der Osmoregulation beteiligte Komponente traf und spezifisch in der *hrw2*-Mutante den osmotisch hypersensitiven Phänotyp auslöst, sollten die *dis*-Mutanten ebenfalls auf die osmotische Reaktion hinuntersucht werden. Die *DIS*-Gene kodieren für nicht miteinander verwandte Proteine, die den Trichom-Phänotyp auslösen und zur Mißorganisation des Zytoskeletts führen. In diese Mutanten sollte der *pAtHB6::LUC* Reporter eingebracht und seine Aktivierung in Anwesenheit von osmotischem Stress getestet werden. Wenn keine Induktion des Reporters zu sehen wäre, würde es bedeuten, dass die Punktmutation in *hrw2* spezifisch den hypersensitiven Phänotyp verursacht. Dies würde dafür sprechen, dass das HRW2-Protein eine entscheidende Funktion in der Osmoregulation spielt. Die Hypersensitivität von allen getesteten *dis*-Mutanten würde jedoch heißen, dass die Induktion der ABA-Signaltransduktion eher als

## Diskussion

nicht ein *hrw2*-spezifischer Effekt betrachtet werden sollte und grundsätzlich durch Störungen des Zytoskeletts verursacht wäre.

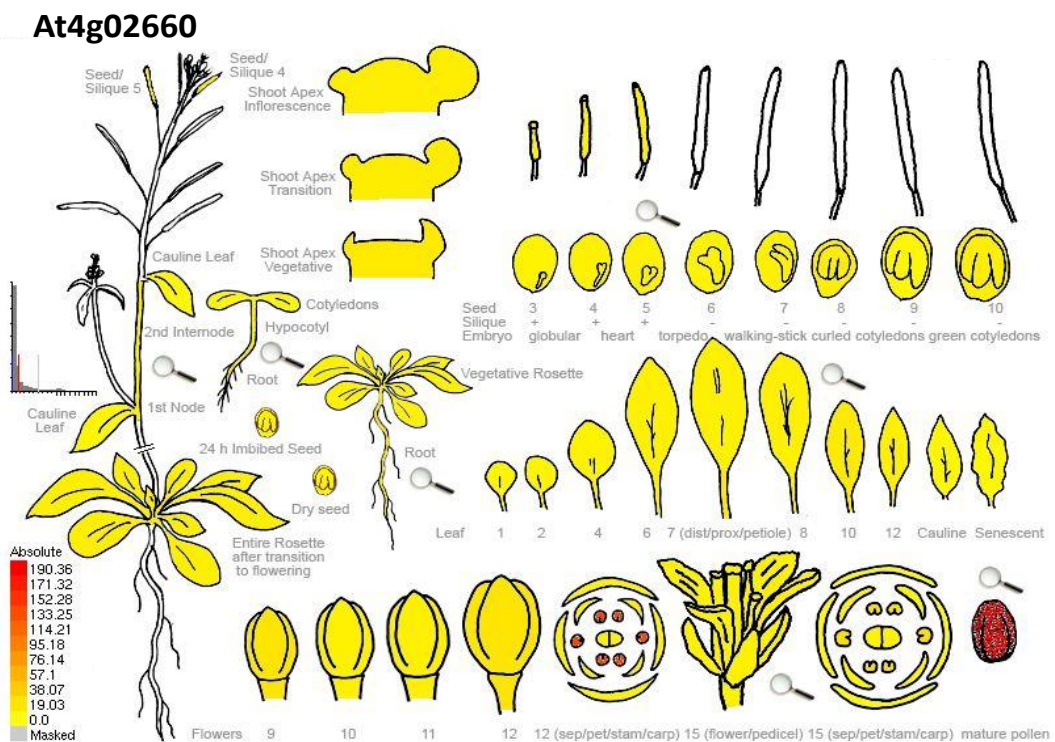
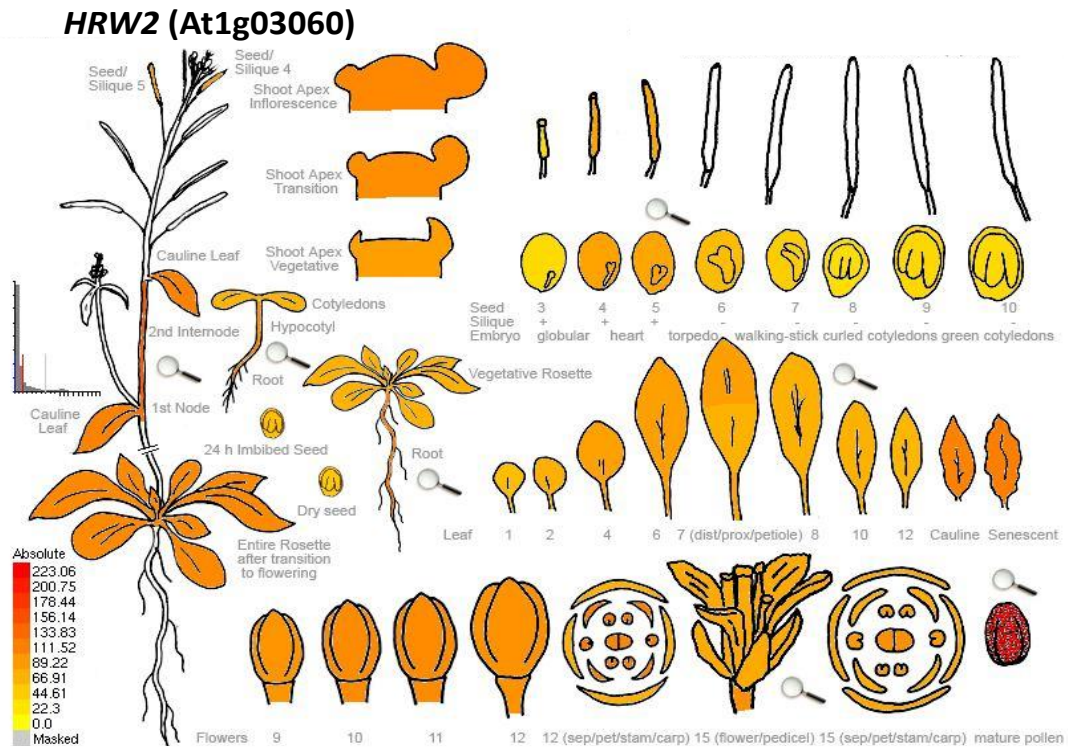
Da die *hrw2*-Mutante in Anwesenheit von osmotischem Stress eine hypersensitive Aktivierung des *pAtHB6::LUC* Reporters und keine veränderte Stomararegulation zeigt, sollte die spezifische Interaktion zwischen HRW2 und AtHB6 mit Hilfe von Y2H untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass AtHB6 als ein negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion wirkt (Himmelbach et al, 2002). Außerdem wurde nachgewiesen, dass der Transkriptionsfaktor an seinen eigenen Promotor bindet und damit autoaktivierend wirkt. Diese Bindung an den eigenen Promotor wird *in vitro* durch eine Phosphorylierung negativ beeinflusst. Es wäre denkbar, dass es in der *hrw2*-Mutante in Anwesenheit von osmotischem Stress nicht zur Aktivierung der entsprechenden Kinase kommen würde, die den AtHB6-Transkriptionsfaktor normalerweise durch Phosphorylierung deaktivieren würde. Der aktive AtHB6 würde in Folge verstärkt seine eigene Expression und gleichzeitig den *pAtHB6::LUC*-Reporter aktivieren. Die Folge wäre zum einen, wie beobachtet, eine verstärkte Reporterantwort, zum anderen sollte AtHB6 vermehrt als negativer Regulator der ABA-abhängigen Antworten wirken, was z.B. in der Regulation der Schließzellen zu sehen sein müsste. Gegen dieses Szenario spricht allerdings, dass dieser Phänotyp in der *hrw2*-Mutante nicht beobachtet wurde. Die Hinweise auf eine Interaktion zwischen HRW2 und AtHB6 könnten zunächst durch eine Kreuzung von *hrw2* mit einer anderen ABA-Reporterlinie wie *pRD29B::GUS* überprüft werden. Wenn HRW2/SPIRRIG spezifisch den Promotor *pAtHB6* aktivieren würde, wäre die hypersensitive Aktivierung des *pRD29B::GUS* Reporters in *hrw2* gegenüber dem osmotischen Stress nicht zu erwarten.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* existiert ein zu HRW2/SPIRRIG homologes Gen (At4g02660) auf dem Chromosom IV. Das At4g02660-Gen zeigt 85 % und 78 % Übereinstimmung der DNA- bzw. Aminosäuresequenz zu HRW2 (Abb. 3-7) und kodiert ebenfalls für ein WD40/BEACH-Domänen-Protein mit unbekannter Funktion (van Nocker & Ludwig, 2003).



**Abbildung 3-7:** Vergleich der Aminosäuresequenzen von HRW2 und einem hoch homologen Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die Zahlen geben prozentuale Übereinstimmung an. Markiert wurden WD40-Domänen (grün), BEACH-Domäne (orange) und PH-Domäne (blau).

Die mit Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter et al, 2007) durchgeführte Expressionsanalyse zeigte, dass *HRW2* in allen Organen der Pflanze mittelmäßig und am stärksten in reifen Pollenkörnern exprimiert wird, während At4g02660 nur in Pollensäcken in Blüten-Entwicklungsstadium 12 und in reifen Pollenkörnern zu finden ist (Abb. 3-8). At4g02660-Knockout-Pflanzen zeigen allerdings einen Trichom-Phänotyp (eigene Beobachtung) und so ist anzunehmen, dass die beiden Proteine ähnlich bzw. redundant funktionieren. Um dies zu beweisen, wurde die At4g02660-Knockout-Linie mit *hrw2* gekreuzt, um die homozygoten Nachkommen in Gegenwart von osmotischem Stress zu testen. Wenn diese Gene redundant wirken würden, ist es zu erwarten, dass die Doppelmutante einen bei osmotischem Stress verstärkten Phänotyp im Vergleich zu *hrw2* zeigt. Es ist denkbar, dass das redundante Gen die Ausbildung eines klaren Phänotyps wie Stomataregulation etc. in *hrw2* verhindert. In diesem Fall wäre in der Doppelmutante ein ausgeprägter Stomata-Phänotyp zu erwarten.



**Abbildung 3-8:** Expression von *HRW2* und homologem Gen *At4g02660*. Die Analyse wurde mit dem eFP Browser ([http://bar.utoronto.ca/efp\\_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi)) durchgeführt und es wurden Werte der ATH1-Microarray-Expression gezeigt. Die Signalintensität wird mit Hilfe der links unten angegebenen Farbskala dargestellt, wobei der Wert für die Hintergrundexpression bei 20 liegt.



### 3.3. Aktivität der ABA-Vorstufen und ABA-Katabolite

ABA-Vorstufen und ABA-Katabolite weisen in verschiedenen Arten eine biologische, ABA-ähnliche Aktivität auf, wobei bisher unklar war, ob diese Substanzen direkt die ABA-Signaltransduktion auslösen. Es wurde gezeigt, dass Xanthoxin, ABA-Alkohol und ABA-Aldehyd das Schließen der Stomata induzierten (Yamamoto & Oritani, 1996; Uehara et al, 1975), während ABA-Alkohol und ABA-Aldehyd eine moderate Aktivität bei der Induktion der Kältetoleranz in *Bromus inermis* Zellkulturen zeigten (Robertson et al, 1994). Einerseits induzierte ABA-Alkohol die Expression von Oleosin stärker als ABA und ABA-Aldehyd (Yamamoto & Oritani, 1996), andererseits wies ABA-Aldehyd eine ABA-vergleichbare Aktivität in Keimungsversuch von Weizensamen auf, während ABA-Alkohol deutlich ineffektiver war (Hays et al, 1996). Interessanterweise zeigte sich, dass auch einige ABA-Katabolite eine physiologische Aktivität besitzen. PA beweist in der Gerste nicht nur eine Hemmung der Aktivität von  $\alpha$ -Amylase und der Keimung von Embryos, sondern induziert auch die Expression von ABA-abhängigen Genen, die für Gerste-Agglutinin kodieren (Dashek et al, 1979; Hill et al, 1992, 1995; Todoroki et al, 1995). Mit der Entdeckung des ABA-Rezeptors eröffnen sich nun völlig neue Möglichkeiten, die Wirkung dieser Verbindungen näher zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die *in vivo*-Wirksamkeit dieser Verbindungen in Form ihres Einflusses auf Keimung, Wurzelwachstum, Stomataregulation und ABA-abhängige Genexpression in Protoplasten untersucht als auch ihre *in vitro* Interaktion mit dem ABA-Rezeptor in Form eines regulatorischen Einflusses auf die PP2C-Aktivität im Komplex mit RCAR-Proteinen charakterisiert.

Die ABA-Vorstufen Xanthoxin, ABA-Aldehyd, ABA-Alkohol waren in Keimung, Wurzelwachstum und Regulation der Schließzellen sehr aktiv, während ABA-GE nur in Keimungsversuch eine ABA-ähnliche Aktivität zeigte. Die biologische Aktivität der ABA-Vorstufen kann so erklärt werden, dass sie zu aktiver Abscisinsäure *in planta* konvertiert werden. Dies wurde mit Hilfe der in der ABA-Biosynthese gestörten Mutanten *aba2-1* und *aba3-1* nachgewiesen. Da die *aba3-1*-Mutante durch Abwesenheit einer funktionellen ABA-Aldehyd-Oxygenase nicht fähig ist, ABA-Aldehyd zu ABA zu konvertieren (Xiong et al, 2001), sollten die ABA-Vorstufen in dieser Mutante keinen Einfluss auf die Keimung der Samen aufweisen. Dies war tatsächlich der Fall. Die zweite verwendete Mutante, *aba2-1*, hat einen Defekt in einer Alkohol-Dehydrogenase und kann dadurch Xanthoxin nicht zu ABA-Aldehyd konvertieren (Gonzalez-Guzman et al, 2002). Es zeigte sich, dass die Keimung in Gegenwart von Xanthoxin nur zu 27 % gehemmt wurde, während ABA-Aldehyd und ABA-Alkohol in dieser Mutante stark keimungshemmend wirkten. Die restliche Aktivität von Xanthoxin könnte mit einer Durchlässigkeit des Mutantenphänotyps (Léon-Kloosterziel et al, 1996) bzw. der Existenz eines alternativen Xanthoxin-Metabolismus erklärt werden. Die Aktivität von ABA-Alkohol und ABA-Aldehyd wurde anschließend in

## Diskussion

---

Protoplasten von Wildtyp, *aba2-1* und *aba3-1* getestet und mit der Aktivität von ABA verglichen. Wie erwartet, induzierten alle Verbindungen die Expression des Reporters im Wildtyp und *aba2-1*, während in *aba3-1* nur Abscisinsäure eine Aktivität aufwies. Es ist notwendig zu erwähnen, dass ABA-Alkohol die *pRD29B::LUC*-Expression deutlich stärker als ABA in Wildtyp und *aba2-1* induzierte. Dies könnte mit der weniger polaren Natur des ABA-Alkohols im Vergleich zu ABA zusammenhängen, was eine schnellere Diffusion durch die Plasmamembran ermöglichen könnte, wobei ABC-Transporter daran ebenfalls beteiligt sein könnten (Kang et al, 2010; Kuromori & Shinozaki, 2010). Es ist denkbar, dass die anschließende enzymatische Konvertierung des ABA-Alkohols zu ABA eine dauerhafte Quelle der aktiven Abscisinsäure liefern könnte, die effektiver als exogene ABA wirkt. Da das ABA2-Enzym im Leitgewebe (dies fehlt in der Protoplastenpräparation) der Pflanze exprimiert wird (Endo et al, 2008), war die Induktion des Reporters in Anwesenheit von Xanthoxin nicht zu sehen (diese Ergebnisse wurden in Abbildung 2-31 nicht gezeigt). Die Aktivität von Xanthoxin könnte jedoch untersucht werden, wenn gleichzeitig ABA2 in Protoplasten überexprimiert würde.

Die ABA-Katabolite 7'-OH-ABA, PA und neoPA waren in physiologischen Experimenten nicht aktiv. *In vitro* inhibierten 7'-OH-ABA und PA ABI2 zu 30 % und 50 % bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M und in Anwesenheit von RCAR1 bzw. RCAR11. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M wurde kein Effekt von diesen Liganden auf die PP2C-Aktivität beobachtet, was für eine schwache Affinität dieser Verbindungen zu RCAR-Proteinen im Vergleich zu ABA spricht. Überraschenderweise wurde gezeigt, dass PA die Keimung von Gerstenembryos in einem zu ABA vergleichbaren Muster inhibiert (Hill et al, 1992), während in *Arabidopsis thaliana* der Effekt unbedeutend bleibt (diese Arbeit) (Kepka et al, 2011). Es könnte sein, dass PA ABA-Rezeptoren mit bestimmten Struktureigenschaften beeinflusst und solche Rezeptoren beispielweise in der Gerste vorkommen, wie es für Pyrabactin gezeigt wurde (Peterson et al, 2010). Diese Verbindung besitzt sowohl eine ABA-antagonistische als ABA-agonistische Aktivität und regulierte die PP2C-Aktivität im Komplex mit RCAR11/PYR1, während im Komplex mit RCAR14/PYL2 nicht fähig ist, die Phosphatase zu inhibieren.

Obwohl ABA-GE gering und ähnlich wie 7'-OH-ABA bzw. PA ABA-Rezeptoren reguliert (bis 40 % mit Komplex mit RCAR3 bzw. RCAR11), inhibiert er sehr stark die Keimung, was auf eine Spaltung dieser Verbindung *in vivo* unter Freisetzung von ABA zurückgehen könnte. Es wurde gezeigt, dass bei einem osmotischen Stress aus ABA-GE durch die  $\beta$ -Glucosidase BG1 aktive Abscisinsäure freigesetzt wird, die dann einen Stomataschluß bewirken kann (Lee et al, 2006). Da in *Arabidopsis thaliana* allerdings zahlreiche Glucosidasen zu finden sind, die redundant funktionieren können, wurde in dieser Arbeit die *bg1*-Mutante nicht untersucht.

Der Abbau der ABA im pflanzlichen Gewebe beginnt mit einer Hydroxylierung, die an verschiedenen Positionen erfolgen kann. Es wurde gezeigt, dass die hydroxylierten ABA-Katabolite eine der ABA ähnliche Aktivität haben (Zhou et al, 2004). Allerdings besitzen sie

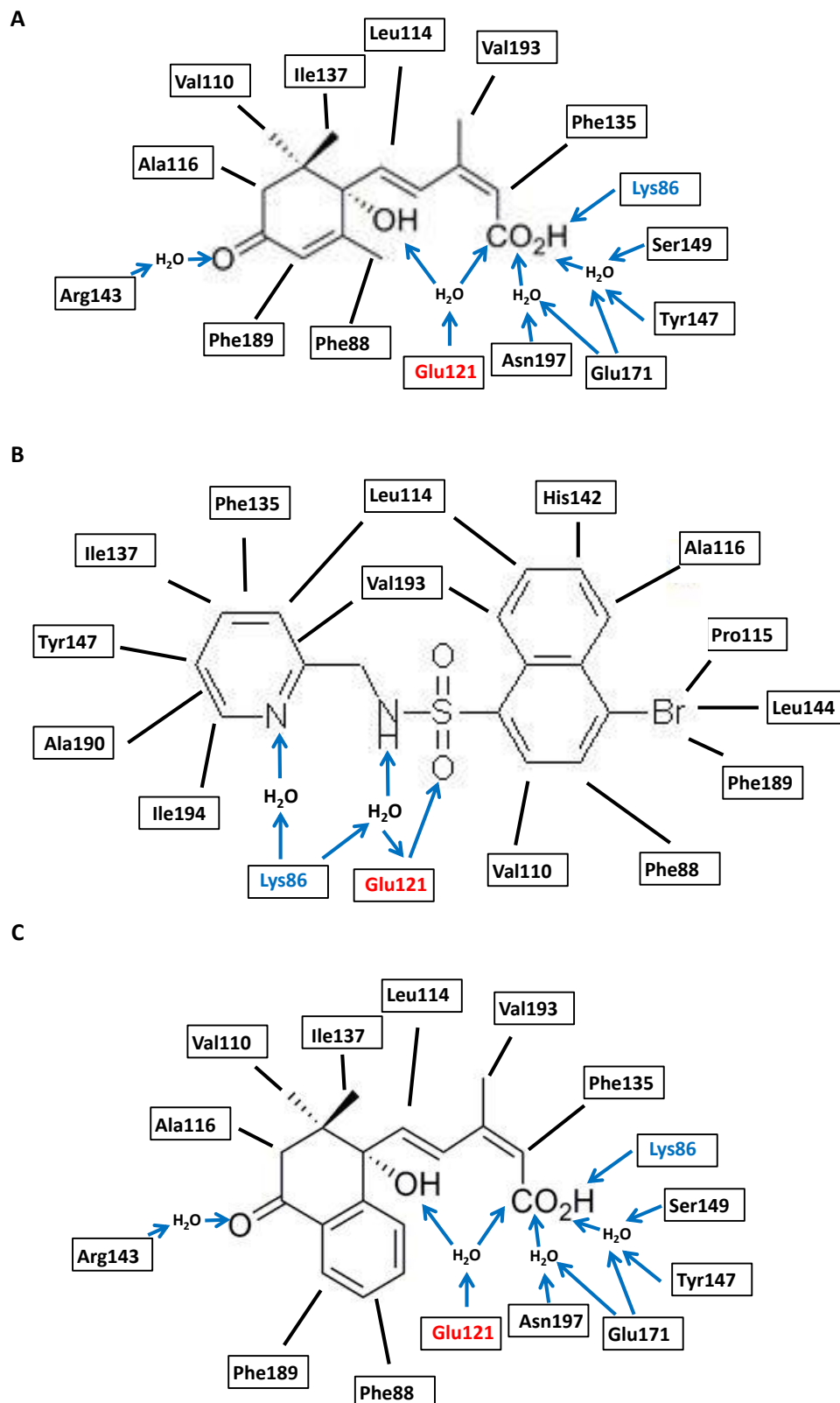
eine Tendenz, spontan zu PA (8'-OH-ABA) bzw. neoPA (9'-OH-ABA) zu konvertieren (Hill et al, 1995)(siehe Abbildung 1-3, Kapitel 1.1.1), 9'-OH-ABA wirkt inhibierend auf die Keimung der *Arabidopsis thaliana* Samen, während neoPA nicht aktiv ist. 8'-OH-ABA zeigte eine geringe Aktivität (Zhou et al, 2004). Um hydroxylierte ABA-Katabolite zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit ihre synthetischen, stabilen Tetralon-Derivate verwendet, die nicht zu PA bzw. neoPA konvertieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tetralon-ABA, sowie 8'- bzw. 9'-OH-Tetralon-ABA in der Lage sind, den RCAR1-ABI2-Rezeptorkomplex zu regulieren, wobei Tetralon-ABA sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine ABA-ähnliche Aktivität aufwies. Es wurde weiter gezeigt, dass 9'-OH-Tetralon-ABA und 8'-OH-Tetralon-ABA unterschiedlich mit RCAR1 (PYL9)/ABI2 bzw. RCAR11 (PYR1)/ABI2 Rezeptorkomplexen interagierten. Beide Verbindungen zeigten moderate Aktivität im Komplex mit RCAR1/PYL9, während die Liganden in Anwesenheit von RCAR11/PYR1 starke Differenzen in ihrer Affinität erwiesen. 9'-OH-Tetralon-ABA war im Komplex mit RCAR11/PYR1 doppelt so aktiv wie 8'-OH-Tetralon-ABA und 4-fach aktiver im Komplex mit RCAR11/PYR1 als mit RCAR1/PYL9. Eine ähnliche Ligandenselektivität wurde für (*R*)-ABA nachgewiesen, wobei diese Verbindung im Komplex mit RCAR3/PYL8 ABI1 bzw. ABI2 inhibierte, während sie im Komplex mit RCAR1/PYL9 nur eine geringe Aktivität zeigte (Szostkiewicz et al, 2010). Der ABA-Agonist, Pyrabactin, reguliert ebenfalls die ABI1-Phosphatase im Komplex mit RCAR11/PYR1, während es als RCAR14(PYL2)/Pyrabactin-Komplex, die PP2C-Aktivität nicht zu hemmen vermag (Peterson et al, 2010). Melcher et al. zeigten, dass ein A93F Aminosäureaustausch in der Bindungstasche des PYL2/RCAR14-Proteins zur Erhöhung der Pyrabactin-Aktivität führt (Melcher et al, 2010). Dies zeigt, dass Strukturänderungen der Bindungstasche die Ligandenaffinität bzw. die Interaktion mit PP2Cs sehr stark beeinflussen kann.

Die ABA-Vorstufen, ABA-Alkohol und ABA-Aldehyd, zeigen eine zu Abscisinsäure sehr ähnliche Struktur und unterscheiden sich nur durch die Oxidation des C-Atoms 1. Da diese Vorstufen im Komplex mit RCAR1/PYL9 nicht so aktiv wie ABA wirken, scheint diese Modifikation die Rezeptoraffinität entscheidend zu beeinflussen. Röntgenstrukturanalysen an Rezeptorkomplexen ergaben, dass das C1 der Abscisinsäure mit dem Rezeptor durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen interagiert (Melcher et al, 2009; Miyazono et al, 2009; Nishimura et al, 2009; Santiago et al, 2009a; Yin et al, 2009). In dem anhand der Strukturanalyse entwickelten Modell interagieren die Carboxy- und die Hydroxygruppe der ABA mit Lysin (Lys)- und Glutaminsäuren (Glu)-Resten in der Bindungstasche des RCAR-Proteins und stabilisieren dadurch die Bindung des Liganden (Abb. 3-9A). Die Kristallstrukturen des RCAR11 (PYR1)/Pyrabactin bzw. RCAR12 (PYL1)/Pyrabactin (Abb. 3-9B) zeigen, dass Pyrabactin den gleichen Bindungsmechanismus nutzt: die Sulfonamidgruppe- und die Pyridingruppe dieser synthetischen Verbindung wurden ebenfalls von den konservierten Lys und Glu Resten des RCAR-Proteins gebunden (Abb. 3-9B) (Hao et al, 2010; Melcher et al, 2010; Peterson et al, 2010;

## Diskussion

---

Yuan et al, 2010). Die Daten indizieren, dass die Abwesenheit des Carboxygruppen-Sauerstoffs in ABA-Alkohol und ABA-Aldehyd die Bindung an die RCAR/PYR1/PYL-Proteine und damit die PP2C-Inhibierung negativ beeinflussen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten implizieren, dass Hydroxylierungen der 8' bzw. 9' Position der Abscisinsäure die Affinität des Liganden an RCAR/PYR1/PYL-Proteine verringern. Der Tetralonring beeinflusst die Bindung an einen Rezeptor nicht nachteilig. Interessanterweise besitzt er eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit dem Bromnaphthalinring des Pyrabactins der nach Kristallanalysen durch RCAR11/PYR1 und RCAR12/PYL1 gut gebunden wurde. Das Modell zur Bindung von Tetralon-ABA wird in Abbildung 3-9C dargestellt.

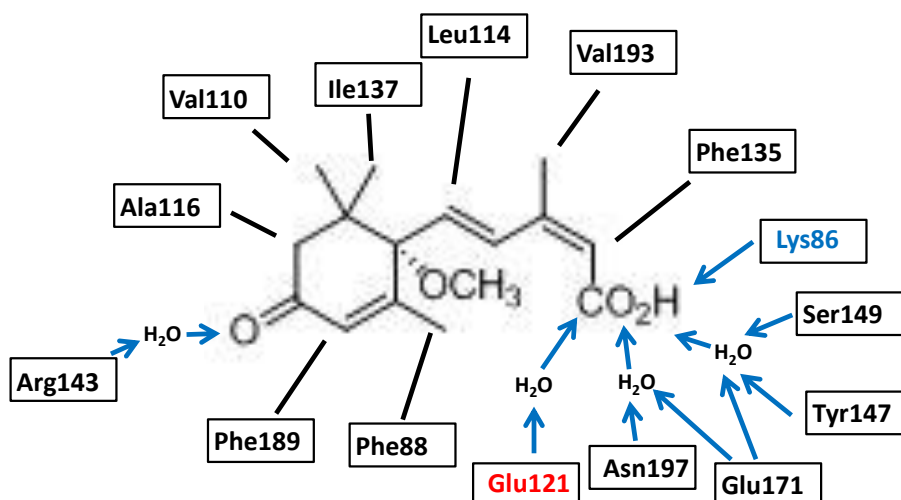


**Abbildung 3-9:** Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Aminosäureresten der Bindungstasche des RCAR12/PYL1-Proteins und ABA (A) (Miyazono et al, 2009) und Pyrabactin (B) (Melcher et al, 2010). Die hypothetische Bindung von Tetralon-ABA an RCAR12 wurde auf Grund der Kristallstrukturen des RCAR12 (PYL1)/Pyrabactin- und RCAR12 (PYL1)/ABA-Komplexes erstellt (C) (modifiziert nach Miyazono et al, 2009; Melcher et al, 2010). Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit blauen Pfeilen markiert

### 3.4. Aktivität der ABA-Analogen

Die ABA-Analogen sind synthetische chemische Verbindungen, deren Struktur auf ABA basiert, und wurden bei Untersuchungen der ABA-abhängigen Genexpression verwendet. Es wurde gezeigt, dass z.B. (+)-8'-Ethin-ABA (PBI 425) nicht umkehrbar die 8'-ABA-Hydroxylase inhibiert (Cutler et al, 2000; Rose et al, 1997) und eine stärkere Aktivität als ABA besitzt (Sharma et al, 2000; Zaharia et al, 2005; Kepka et al, 2011). Außerdem zeigte sich in einer Expressionsanalyse, dass PBI 425 bei der Identifizierung von neuen Genen verwendet werden konnte, die in Gegenwart von ABA (Abb. 3-10A) entweder transient oder sehr schwach exprimiert werden (Huang et al, 2007a). (-)-2,3-Dihydroacetylen-ABA-Alkohol (PBI 51) bewies eine blockierende Wirkung auf die ABA-induzierte Stomataregulation und bindete bioABA an Schließzellenprotoplasten (Yamazaki et al, 2003). Die Anwendung von PBI 51 führte zur Identifizierung von neuen in der ABA-Signaltransduktion gestörten *ahg*-Mutanten (*ABA-hypersensitive germination*). Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Aktivität von synthetischen (*S*) bzw. (*R*)-ABA-Analogen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die (*S*)-Formen stets aktiver sind, während die (*R*)-Analoge keine oder geringe ABA-agonistische Aktivitäten in Komplexen mit RCAR/PYR1/PYL-Proteinen aufweisen. Diese Unterschiede reflektieren die stereospezifische Einpassung des Liganden in den Bindungstaschen der RCAR-Proteine. Auf Grund der Proteinsequenz werden die RCAR-Proteine in 3 Gruppen geteilt, wobei RCAR1-4 (PYL9, PYL7, PYL8, PYL10) zu der Gruppe I gehören, RCAR5-10 (PYL11, PYL12, PYL13, PYL5, PYL6, PYL4) zu der Gruppe II und RCAR11-14 (PYR1, PYL1, PYL3, PYL2) zu der Gruppe III (Ma et al, 2009). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese evolutionäre Klassifizierung noch mit Unterschieden hinsichtlich der Aktivität der (*R*)-ABA-Analogen korreliert. Die ABA-analogen Verbindungen im Komplex mit Rezeptoren aus Gruppe I RCAR1/PYL9 und RCAR3/PYL8 zeigten fast das gleiche Aktivitätsmuster, während sie im Komplex mit RCAR11/PYR1 aus der Gruppe III eine geringere Affinität aufweisen (Abb.2-49). Die RCAR-Proteine der Gruppe III (RCAR11-14) können Homodimere bilden, was einen negativen Einfluss auf die Ligandenbindung durch Blockierung der Bindungstasche haben kann (Dupeux et al, 2011). So besitzt beispielweise RCAR11/PYR1 einen Histidin-Rest in der Position 60, der für die Dimerisierung verantwortlich ist. In den konstitutiv aktiven RCAR-Proteinen (RCAR1-9) befindet sich in der Position 60 ein Prolin-Rest, der die Homodimerisierung verhindert. Die Hydroxygruppe in der Position C1 scheint wichtig aber nicht notwendig für eine ABA-ähnliche Aktivität des Liganden zu sein. Dafür spricht, dass (+)-Methylether-ABA (PBI 352) im Komplex mit RCAR1/PYL9, RCAR3/PYL8 und RCAR11/PYR1 die Phosphataseaktivität reguliert. Die Struktur der Bindungstasche des RCAR11/PYR1-Proteins zeigt, dass der Ligand in ihrem Inneren völlig abgeschlossen wird und ihre Interaktionsfläche zur chemischen Struktur des Liganden passt. Der Cyclohexenring und der Isoprenanteil der ABA werden durch die

hydrophobische Interaktionen mit unpolaren Aminosäureresten des Proteins stabilisiert, während Keto-Gruppe, Hydroxygruppe und Carboxygruppe des Liganden durch die Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Aminosäureresten der Bindungstasche gebunden werden. So interagiert die Carboxygruppe mit Seitenketten des Glu 94, Glu 141, Ser 122, Tyr120 und mit der Aminogruppe von Lys 59 (Melcher et al, 2009; Miyazono et al, 2009; Nishimura et al, 2009; Santiago et al, 2009a). Die Bindungstasche kann sich wahrscheinlich trotz der zusätzlichen Methylgruppe an die Struktur des Liganden anpassen, wobei eine Komplexbildung mit der Phosphatase möglich bleibt, obwohl in diesem Fall die Hemmung der Phosphatase nicht so stark ausfällt wie in Anwesenheit von Abscisinsäure. Diese Methylgruppe scheint aber eine schädliche Wirkung für die Aktivität des Liganden zu haben. Es könnte sein, dass sie die Wasserstoffbrückenbindung mit Glu 121 zerstört, die für Stabilisierung des Liganden verantwortlich ist (Abb. 3-10). Auf Keimung und Wurzelwachstum zeigte PBI 352 keine Wirkung, während die Stomataregulation zu ca 60 % inhibiert wurde. Dies könnte die moderate Aktivität von PBI 352 als Folge der nicht optimalen Bindung an RCAR/PYR1/PYL-Proteine reflektieren. Der (-)-Methylether-ABA (PBI 354) zeigte keine PP2C-inhibitorische Aktivität. Da eine physiologische Aktivität von diesen zwei Enantiomeren gezeigt worden war, könnte es sein, dass diese zwei Enantiomere noch an andere als die getesteten RCAR/PYR1/PYL-Proteine binden. Allerdings wurde gezeigt, dass PBI 354 durch eine Demethylierung *in vivo* zu (*R*)-ABA konvertiert wird, die eine physiologische Aktivität aufweist (Walker-Simmons et al, 1994). Entsprechend könnte auch PBI 352 demethyliert und dadurch *in vivo* zu ABA konvertiert werden. In diesem Fall sollte PBI 352 eine ABA-ähnliche Aktivität in allen physiologischen Versuchen aufweisen, was aber in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte.



**Abbildung 3-10:** Modell zur Bindung von (+)-Methylether-ABA (PBI 352) an RCAR12/PYL1 auf Basis der Kristallstudien zur Bindung von ABA an RCAR12/PYL1 (modifiziert nach Miyazono et al, 2009).

## Diskussion

---

Die synthetischen (*S*)-ABA-Analogen Tetralon-ABA (PBI 413), (+)-8'-Ethin-ABA (PBI 425), 8'-Cyclopropyl-(+)-ABA (PBI 694) und (+)-9'-Propagyl-ABA (PBI 514) wiesen eine sehr starke PP2C-Inhibierungsaktivität im Komplex mit den getesteten RCAR-Proteinen auf. Diese Liganden hemmten ABI2 fast zu 100 % in einer Konzentration von 10  $\mu$ M und waren damit genauso aktiv wie Abscisinsäure. Diese Liganden induzierten auch die ABA-abhängige Genexpression in Protoplasten, in ähnlicher Intensität wie ABA. Dies demonstriert, dass weder die vorgenommenen Modifikationen in der Position 8' und 9' noch die Anwesenheit des Tetralon-Rings einen negativen Einfluss auf die ABA-Wirksamkeit der Liganden haben. In den Untersuchungen zeigte sich, dass alle (*S*)-ABA-Analogen mit der Ausnahme von PBI 352 eine gewisse bis ausgeprägte ABA-ähnliche Wirkung auf Keimung, Wurzelwachstum und Stomataregulation besitzen, während die (*R*)-Formen eher variable Aktivitäten zeigen. Die (*R*)-Enantiomere hatten dabei keinen starken Einfluss auf die Regulation der Schließzellen und das Wurzelwachstum.

Interessanterweise regulierte (-)-Tetralon-ABA (PBI 414) die ABI2-Aktivität im Komplex mit RCAR11/PYR1. Da diese Verbindung sehr stark inhibierend im Keimungsversuch wirkte, ist zu vermuten, dass RCAR11/PYR1 eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielt, was übereinstimmend mit Daten von Park et al. (2009) ist, wo gezeigt wurde, dass PYR1 eine ABA-insensitive Keimung der *pyr1/pyl1/pyl4* (*rcar11/rcar12/rcar10*) Tripel-Mutante und der *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* (*rcar11/12/14/10*) Quadrupel-Mutante komplementiert. Ein ähnliches Muster lieferte (-)-9'-Propagyl-ABA (PBI 515), wobei diese Substanz ABI2 im Komplex mit RCAR11/PYR1 zu 90 % und die Keimung zu 85 % inhibierte. Allerdings zeigte PBI 515 nur ca. 50 % ABI2-Inhibierung im Komplex mit RCAR1/PYL9 und RCAR3/PYL8, was für eine redundante Funktion dieser Proteine bei der Keimung oder eine unspezifische Bindung dieses Liganden sprechen würde.

Für (-)-2,3-Dihydroacetylen-ABA-Alkohol wurde sowohl eine ABA-antagonistische als auch eine ABA-ähnliche Aktivität beschrieben. So blockiert diese Verbindung die ABA-abhängige Expression des Napin- und Oleosin-Gens in *Brassica napus*, und wirkt der Abscisinsäure bei der Regulation der Schließzellen in *Vicia faba* entgegen (Huang et al, 2007a; Wilen et al, 1993). Gleichzeitig wurde eine inhibierende Wirkung von PBI 51 auf die Keimung von *Arabidopsis thaliana* Samen beobachtet (Nishimura et al, 2004b). In dieser Arbeit konnte jedoch weder *in vivo* noch *in vitro* eine ABA-ähnliche oder ABA-antagonistische Aktivität von PBI 51 nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten heben eine wichtige Rolle der ABA-analogen Verbindungen bei der Analyse der funktionellen Redundanz der RCAR-Proteine hervor. Die ABA-Analogen könnten zusätzlich zur Analyse von ABA-Transportern und weiteren Komponenten der ABA-Signaltransduktion, wie GTGs und CHLH, verwendet werden.



### 4. Material und Methoden

#### 4.1. Physiologische Methoden

##### 4.1.1. Pflanzenmaterial und Anzucht

In dieser Arbeit wurden die zwei verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia (Col) und *Landsberg erecta* (Ler), sowie einige in diesen Ökotypen generierte Mutanten eingesetzt. Die Anzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Conviron, Kanada) unter Langtagbedingungen (16 h Licht -  $100 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ,  $22^\circ\text{C}$ , 65% Luftfeuchtigkeit; 8h Dunkelheit bei  $17^\circ\text{C}$ , 75% Luftfeuchtigkeit) in einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ 7). Die Generationszeit lag bei 6 bis 8 Wochen.

##### 4.1.2. Sterilisation der *Arabidopsis*-Samen

Für die sterile Anzucht wurden die *Arabidopsis*-Samen zunächst 20 min in einer Lösung aus 80% (v/v) Ethanol und 0,1% (v/v) Triton X-100 bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Sterilisation in 3% (v/v) Natriumhypochlorit (NaOCl)-Lösung. Nach 5-maligem Waschen mit je 1 ml sterilem Wasser wurden die Samen unter der Sterilbank auf MS Medium (Murashige & Skoog, 1962) ausgebracht, 2 Tage bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert, um die eventuell noch vorhandene Dormanz zu brechen, und anschließend im Zellkulturraum unter Dauerlicht ( $60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ,  $23^\circ\text{C}$ ) 4 bis 5 Tage kultiviert.

#### **MS-Medium** (Murashige and Skoog 1962)

2,5 ml/l 400x Mikrosalz-Lösung  
100 ml/l 10x Makrosalz-Lösung  
10 g/l Saccharose  
1 g/l MES  
mit 5 M KOH auf pH 5,8 eingestellt  
9 g/l Agar  
autoklavieren

#### **MS-Medium (0,5x Saccharose)**

2,5 ml/l 400x Mikrosalz-Lösung  
100 ml/l 10x Makrosalz-Lösung  
5 g/l Saccharose  
1 g/l MES  
mit 5 M KOH auf pH 5,8 eingestellt  
9 g/l Agar  
autoklavieren

## Material und Methoden

---

### 400x Mikrosalze

0,01 g/l  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,01 g/l  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
11,2 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
1,2 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
0,3 g/l KI  
14,6 g/l  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
0,1 g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,8 g/l  $\text{ZnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$

Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

### 10x Makrosalze

3,3 g/l  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
1,7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
19,0 g/l  $\text{KNO}_3$   
3,7 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
4,0 g/l  $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$   
16,5 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Autoklaviert  
Lagerung bei RT

Bei den Versuchen mit osmotischem Stress wurden entsprechende Mengen an Mannit zur Herstellung des Stress-MS-Mediums vor dem Autoklavieren zugegeben. Die Zugabe von Abscisinsäure (0,3-30  $\mu\text{M}$ ) und ABA-Derivaten erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca.  $60^\circ\text{C}$ . Die Platten wurden dunkel bei  $4^\circ\text{C}$  vor der Verwendung gelagert.

ABA-Stocklösung: 5 mM 2-cis-4-trans-(+)Abscisinsäure (Lomon Bio Technology, China, <http://www.lomonbio.com>) in 10 mM MES in Wasser (pH 7,0)

#### 4.1.3. Osmotischer Stress an Keimlingen

Die oben beschriebenen Stress-MS-Platten wurden anschließend zur Durchführung von Wasserstress-Versuchen verwendet. Die steril angezogenen *Arabidopsis*-Keimlinge wurden mit feiner Federstahlpinzette umgesetzt. Mit Parafilm wurde sichergestellt, dass sich nur die Wurzeln im Kontakt mit dem Stress-Medium befanden. Anschließend wurden die Keimlinge auf senkrecht stehenden Platten für die jeweils angegebene Dauer im Zellkulturraum inkubiert.

#### 4.1.4. Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Keimlingen

Infolge der Stressbehandlung wurde das Reportersystem (Christmann et al, 2005) durch Abscisinsäure bzw. osmotischen Stress aktiviert. Die Keimlinge wurden mit dem Substrat D-Luciferin besprüht und die Lichtemission des Reporters mit einem CCD-Kamerasystem (Hamamatsu 1394 ORCAII-ERG; <http://jp.hamamatsu.com>) detektiert. Dabei wurden jeweils 16 Pixel zu einem Pixel zusammengefasst. Zuerst wurden die Keimlinge 5 min belichtet, in welchen Restsignale der Chlorophyllfluoreszenz detektiert wurden. Anschließend erfolgte eine zehnmünütige Messung der Aktivität des Reporters. Die Aufnahmen wurden mit den Programmen SimplePCI (Version 5.0.0.1503, Compix Inc., Imaging Systems, USA) und Microsoft Excel ausgewertet.

### 4.1.5. Keimungsversuche

Die Untersuchung der Keimung von *Arabidopsis*-Samen erfolgte auf MS-Platten mit verschiedenen Konzentrationen von ABA, ABA-Vorstufen, ABA-Analogen und ABA-Metaboliten bzw. Mannit. Gleich alte Samen wurden sterilisiert, einzeln auf MS-Platten ausgebracht, und 48 h bei 4°C gelagert, um die Keimung anzuregen. Anschließend wurden die Platten in den Zellkulturraum horizontal gestellt und unter Dauerlicht ( $60 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , 23°C) inkubiert. Die Keimung wurde nach 3 Tagen ausgewertet. Dabei wurde der Durchbruch der Radicula durch die Samenschale als erfolgte Keimung gewertet.

### 4.1.6. Wurzelwachstumsversuche

Das Wurzelwachstum der *Arabidopsis*-Keimlinge wurde auf 0,5x MS-Medium mit ABA, ABA-Vorstufen, ABA-Analogen und ABA-Metaboliten, bzw. Mannit untersucht. Die 5 Tage alten Keimlinge wurden mit einer Federstahlpinzette umgesetzt und weitere 3 Tage vertikal im Zellkulturraum inkubiert. Die Position der Wurzelspitze wurde auf der Platte markiert.

### 4.1.7. Spaltöffnungsversuche

Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden auf ein mit Medical Adhesive (Hollister Incorporated, Illinois, USA) besprühtes Deckglas aufgeklebt, die Proben wurden in eine mit Inkubationspuffer (10 mM MES-KOH, pH 6,15, 50 mM KCl) gefüllte Petrischale transferiert und dann wurde das Gewebe mit einem Skalpell so abgekratzt, dass nur die Epidermis auf dem Deckglas blieb. Anschließend wurden die Präparate separat in 3 ml Inkubationspuffer (10 mM MES-KOH, pH 6,15, und 50 mM KCl) bei Raumtemperatur für 2 h in Anwesenheit von weißem Licht ( $150 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ) vorinkubiert, um die Stomataöffnung zu induzieren. Das Licht wurde durch ein Wasserbad filtriert, um eine Erwärmung der Proben zu verhindern. Die untersuchten Verbindungen wurden direkt in den Inkubationspuffer zugegeben und anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h unter dieselben Bedingungen. Die Schließzellen wurden mit einer mit dem Mikroskop (HBO 50 Axioskop, Carl Zeiss) verbundenen Kamera (Nikon Coolpix 4500) fotografiert. Länge und Breite von Stomataporen wurden mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) gemessen und als Apertur (Verhältnis: Breite zu Länge) graphisch dargestellt.

## Material und Methoden

---

### 4.1.8. Bestimmung der Spaltöffnungsweite

Die Apertur der Schließzellen wurde auf der Grundlage der mikroskopischen Aufnahmen der Epidermis ermittelt. Dazu wurde das Verhältnis Breite zu Länge der Öffnung bestimmt.

### 4.1.9. Isolierung der *Arabidopsis*-Protoplasten

Die Präparation der *Arabidopsis*-Protoplasten erfolgte nach modifizierten Protokollen (Abel & Theologis, 1998; Sheen, 2001). Zur Protoplastierung wurden 3 bis 4 Wochen alte *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen verwendet. Von diesen Pflanzen wurden ca. 30-50 Blätter (2-3 mg Frischgewicht) abgeschnitten und in eine Petrischale mit 15 ml Enzymlösung überführt. Der Verdau des Pflanzenmaterials erfolgte bei RT für 4-5 h auf einem Kippenschüttler. Die Protoplastensuspension wurde anschließend zur Abtrennung unverdauten Materials durch ein Nylonnetz filtriert. Dann wurde die Suspension mit 8 ml der WIMK- Lösung (siehe unten) gewaschen, und anschließend bei 60 x g 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sehr vorsichtig abgenommen, das Protoplasten-Pellet mit 4 ml WIMK resuspendiert, und anschließend erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in MaMg-Lösung (siehe unten) resuspendiert. Die Zellen wurden zur Kontrolle ihrer Vitalität mit Fluoresceindiacetat (FDA) angefärbt. 1 µl FDA-Lösung wurde zu 100 µl einer Protoplastensuspension gegeben. Mit Hilfe eines Hematocytometers wurde die Anzahl fluoreszierender Protoplasten pro Volumeneinheit mit einem Zeiss Axioskop HBO 50 und einem FITC-Filtersatz (480 nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 nm Emissionsfilter) ermittelt. 1 Protoplast/Quadrat entsprach als Richtwert  $4 \times 10^6$  Protoplasten/ml. Die Protoplastenkonzentration in der Suspension wurde mit MaMg-Lösung auf  $0,5-1 \times 10^6$  eingestellt. Die Protoplastensuspension wurde anschließend 30 min bei 4°C aufbewahrt, um höhere Transformationsraten zu erhalten.

### Enzymlösung

1 % Cellulase Onozuka R-10 (w/v; #216001, Yakult, Tokyo, Japan)  
0,25 % Macerozym R-10 (w/v; #202039, Yakult, Tokyo, Japan)  
400 mM Mannit  
8 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 % BSA (w/v)  
5 mM MES-KOH (pH=5,6)

Die Herstellung der Enzymlösung erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook & Russell, 2001). Zunächst wurde eine Stammlösung mit 2 % Cellulase, 0,5 % Macerozym und 10 mM

MES-KOH (pH=5,6) hergestellt. Die Lösung wurde zweimal 40 min gegen 10 mM MES-KOH (pH=5,6) dialysiert und mit 0,5 mM PMSF behandelt. Die für Dialyse benötigten Schläuche wurden nach Standardprotokoll (Sambrook & Russell, 2001) vorbereitet und bei 4°C gelagert. Anschließend wurden Mannit und CaCl<sub>2</sub> zugesetzt und die Lösung 30 min bei 55°C inkubiert. Nach dem Zusatz von BSA wurde pH-Wert auf 5,6 eingestellt und die fertige Lösung durch 0,22 µm sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **WIMK**

0,5 M Mannit  
5 mM MES-Tris (pH=5,8-6,0)  
autoklavieren

### **MaMg**

400 mM Mannit  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM MES-KOH (pH=5,6-5,8)  
autoklavieren

FDA-Lösung 1mg/ml in Aceton

#### 4.1.10. Transfektion der Protoplasten

Um die DNA-Aufnahme zu erreichen, wurde Polyethylenglycol (PEG-4000) verwendet. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden 15 µl der zu transfizierenden DNA (4 µg des Repoterkonstrukts *pRD29B::LUC* und 3 µg *35S::GUS*) mit dem gleichen Volumen an sterilem 0,8 M Mannit vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 100 µl der Protoplastensuspension gegeben und vorsichtig gemischt. Zum Pipettieren der Protoplasten wurden die Pipettenspitzen um ca. 5 mm gekürzt, um eine weitere Spitzenöffnung zu erhalten und so die beim Pipettiervorgang auftretenden Scherkräfte zu minimieren. Nach dem Zusatz eines gleichen Volumens warmer (37°C) PEG-Lösung (130 µl) und zweimaligem Mischen wurden 750 µl WIMK-Lösung zugegeben und die Mischung bei 500 rpm 2 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 350 µl der WIMK-Lösung gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl WIMK-Lösung aufgenommen. Je nach Versuch wurden ABA, Puffer, und ABA-Derivate zugegeben und die Proben über Nacht (16-18 h) bei 23°C und Schütteln mit 50 rpm inkubiert.

### **PEG-Lösung**

200 mM CaCl<sub>2</sub>  
40 % PEG-4000  
0,5 % MES-KOH (pH=5,8)

### **ABA-Stocklösung**

5 mM 2-*cis*-4-*trans*(+)ABA  
(Lomon Bio Technology, China)  
in 10 mM MES (pH=7,0-7,5)

## Material und Methoden

---

sterilfiltriert

Verdünnung mit WIMK

### 4.1.11. Messung der $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität in Protoplasten

Zur Bestimmung der  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität wurden 50  $\mu$ l der Protoplastenlösung mit 100  $\mu$ l 1,5x MUG-Lösung (4 mM in CCLR) versetzt. Die Aktivität wurde durch fluorimetrische Bestimmung des bei der Reaktion freigesetzten Methylumbelliferons erfasst (Jefferson et al, 1987). Die Fluoreszenz wurde bei 30°C in einer Kinetik über 8 min (Filter: Anregung 360 nm, Emission 465 nm) als mRFU/s, *relative fluorescence units* vermessen (HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader, Perkin Elmer).

#### CCLR-Extraktionspuffer

25 mM Tris-Phosphatpuffer  
2 mM DTT  
2 mM DCTA  
10 % Glycerin (v/v)  
1 % Triton X-100 (v/v)

#### 20x-MUG-Lösung

4 mM 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid  
in CCLR gelöst

### 4.1.12. Messung der Luciferase-Aktivität in Protoplasten

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurde nach der Methode von Luehrsen et al. (Luehrsen et al, 1992) durchgeführt. Die Anwesenheit von Coenzym A im Puffer hilft, die Lichtemission über einen längeren Zeitraum stabil zu halten. Für die Luciferase-Aktivität wurde die zuvor für die Messung der Glucuronidase- Aktivität verwendete Suspension im *flash'n glow* Luminometer analysiert. 150  $\mu$ l der Protoplastensuspension wurden in Plastikröhrchen pipettiert, worauf als erstes die Hintergrundlumineszenz über 10 s gemessen wurde. Anschließend wurden 100  $\mu$ l LAR-Substrat (siehe unten) zugegeben und das über 20 s emittierte Licht gemessen (RLU).

#### LAR

20 mM Tricine-NaOH (pH=7,8)  
1,1 mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$   
2,7 mM  $\text{MgSO}_4$   
0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
33,3 mM DTT  
0,27 mM Coenzym A  
0,53 mM ATP  
0,47 mM D-Luciferin

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. *Escherichia coli*-Stämme und ihre Kultivierung

Stamm	Genotyp	Resistenz	#	Quelle
DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	-	62	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Tetracyclin	120	Stratagene (Heidelberg)
M15 pREP4	<i>abgeleitet aus K12-Stamm, NalS strS rifS thi- lac- ara- gal+ mtl- F- recA+ uvr+ lon+ [pREP4 KanR],</i>	Kanamycin	3343	Qiagen (Hilden)

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium (siehe unten) im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten jeweils bei 37°C. Die Selektion auf Transformanden erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium.

Antibiotikum	Konzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	50-100	200, in sterilem H <sub>2</sub> O
Kanamycin	25-50	100, in sterilem H <sub>2</sub> O
Tetracyclin	25	50, in sterilem H <sub>2</sub> O
Rifampicin	25	25, in 100 % Ethanol

**LB-Medium (Luria-Bertani)**

5 g/l Hefeextrakt  
 10 g/l Pepton  
 10 g/l NaCl  
 15 g/l Agar (für Festmedium)  
 pH=7,0 (NaOH), autoklavieren

Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 60°C wurden die Antibiotika zugegeben.

## Material und Methoden

---

### 4.2.2. Herstellung kompetenter Zellen

#### Chemisch kompetente Zellen (*E. coli*)

Eine 250 ml-Kultur von *Escherichia coli*-Zellen wurde in Medium A bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 kultiviert. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis (10 min) wurden die Zellen 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. Nach einer zweiten Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert und in 10 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden 700 µl DMSO zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 200µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **Medium A**

20 g/l Pepton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

#### **TB-Medium**

10 mM PIPES (pH=6,4)  
55 mM MnCl<sub>2</sub>  
15 mM CaCl<sub>2</sub>  
250 mM KCl

#### Elektro-kompetente Zellen (*E. coli* bzw. *A. tumefaciens*)

Eine 500 ml-ÜN-Kultur wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 zuerst auf Eis abgekühlt, dann 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 ml eiskaltem mQ-Wasser gewaschen und erneut 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurde das Pellet in 20 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und erneut bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 3 ml Glycerin aufgenommen und als Aliquots von 250 µl nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

### 4.2.3. Transformation kompetenter Mikroorganismen mit Plasmid-DNA

#### Hitzeshock-Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Vor der Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, zu 10 µl des jeweiligen Transformationsansatzes (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA in sterilem mQ-Wasser) pipettiert (je 90 µl Zellsuspension) und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeshock erfolgte für 30 s bei 42°C im Wasserbad, danach wurde jeder Ansatz 10 min auf Eis inkubiert und mit 400 µl LB-Medium



gemischt. Nach einer Inkubation von 1,5 h unter Schütteln bei 37°C wurden die transformierten Zellen auf MS-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen ausplattiert.

### Transformation von Mikroorganismen über Elektroporation

Vor der Elektroporation wurden 200 ng DNA in 4 µl Wasser in der Elektroporationsküvette vorgelegt und auf Eis gekühlt. Dazu wurden 40 µl einer Suspension der elektrokompetenten Zellen gegeben und der ganze Ansatz gemischt. Bei einem Abstand der Küvettenelektroden von 0,2 cm wurden folgende Elektroporationsparameter eingestellt: V=2000 V, C=25 µFD, R=700 Ω, t=17,5 ms. Nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und gemischt. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C (*E. coli*) bzw. 2 h bei 28°C (*A. tumefaciens*) geschüttelt, auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*A. tumefaciens*) über Nacht inkubiert.

#### 4.2.4. Methoden der DNA-Isolation

##### Plasmid-Minipräparation aus *E. coli*

Für die Isolierung der Plasmid-DNA über alkalische Lyse wurden 5 ml der ÜN-Kultur von einer Einzelkolonie 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl GTE-Puffer (Lösung 1) resuspendiert. Nach Zusatz von 250 µl Lysepuffer (Lösung 2) wurden die Bakterien 5 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 250 µl 3 M Natriumacetat (Lösung 3), pH=4,8 wurden genomische DNA und Proteine ausgefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 16000 x g wurde der Überstand mit 900 µl eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte für 20 min bei -20°C. Anschließend wurde 15 min lang bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, nochmal 5 min bei RT zentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl sterilem mQ-Wasser oder 0,1x TE-Puffer mit 25 µg/ml RNase gelöst. Die DNA-Konzentration wurde über ein Agarosegel bestimmt.

##### **GTE-Puffer (Lösung 1)**

50 mM Glucose  
10 mM EDTA (pH=8,0)  
25 mM Tris-HCl (pH=8,0)

##### **Lyse-Puffer (Lösung 2)**

0,2 M NaOH  
1 % SDS

## Material und Methoden

---

### Lösung 3

3 M Kaliumacetat (pH=4,8-5,2)

### 0,1x TE-Puffer

1mM Tris-HCl (pH=8,0)  
0,1 mM EDTA

### Plasmid-Midipräparation aus *E. coli*

Größere Mengen der DNA für Klonierung, Transfektion, Transformation und Sequenzierung wurden aus 100 ml einer ÜN-Kultur von Zellen mit dem JetStar®-MIDI Kit (GENOMED, Löhne) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA-Konzentration wurde über ein Agarosegel bestimmt.

### Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Genomische DNA wurde über die CTAB-Methode isoliert (Rogers & Bendich, 1994). Zunächst wurden *Arabidopsis*-Blätter bzw. Keimlinge in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurden 300 µl CTAB-Puffer zugegeben und für 10-60 min bei 65 °C inkubiert. Nach Inkubation und Abkühlen wurden 300 µl Chloroform dazugegeben, die Proben mit Hilfe eines Vortex-Labormischers intensiv gemischt und 10 min bei 16000 x g zentrifugiert, um organische und wässrige Phase voneinander zu trennen. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA wurde mit 300 µl Isopropanol ausgefällt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation für 10 min bei 4°C wurde das Pellet getrocknet, mit 50 µl sterilem mQ-Wasser oder 0,1x TE-Puffer mit RNase versetzt, 15 min bei 37°C sowie 15 min bei 65°C inkubiert. Die auf diese Weise isolierte DNA wurde als *template* zur PCR eingesetzt.

#### 4.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zum Klonieren wurde mit einer *proof reading* Polymerase (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, NEB) durchgeführt. Zur Genotypisierung der Pflanzen wurde GoTaq®-Polymerase (Promega) verwendet. Ein typischer PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten.

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
DNA- <i>template</i>	1-20 ng	2
Puffer (mit 25 mM MgCl <sub>2</sub> ) 5x Phusion HF Puffer für Phusion-Polymerase 5x GoTaq®Green oder GoTaq®White für GoTaq®-Polymerase	1x (2,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	4
dNTP-Mix (10 mM)	1 mM	2
Primer forward (100 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ M	0,1
Primer reverse (100 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ M	0,1
Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 U	0,1
mQ-Wasser	auffüllen auf 20 $\mu$ l	

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im TGradient-Cycler (Biometra) durchgeführt.

<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Vorgang</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
2 min	95 °C	Initialdenaturierung	1
1 min	95 °C	Denaturierung	28-35****
1,5 min*	50-65°C**	Primer- <i>Annealing</i>	
2 min***	72 °C	Elongation	
7 min	72 °C	finale Elongation	1

\* Die Annealingtemperatur für einen Primer lässt sich aufgrund seines GC-Gehaltes (Anteil der organischen Basen Guanin und Cytosin in Prozent) und seiner Länge in Basenpaaren (PL) näherungsweise durch folgende Formel berechnen:  $T_m = 64,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC}\% - 650/\text{Länge des Primers}$

\*\* Primer-abhängige Variation

\*\*\* Elongationszeit ist von der Länge des Amplifikats abhängig: ca. 1 min/kb

\*\*\*\* 28 Zyklen zur Klonierung, 35 Zyklen zur Genotypisierung

#### 4.2.6. Agarose-Elektrophorese

Die Analyse von isolierter Plasmid-DNA, PCR- oder Restriktionsprodukten erfolgte mit Hilfe der Agarose-Elektrophorese verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Molekülgröße wurde bei einer Agarose-Konzentration von 0,8-2,0 (v/v) in 1x TAE als Elektrophorese-Puffer durchgeführt. Für die Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde den Gelen 0,1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt. Als Größenstandards diente entweder mit *Hind*III verdauten  $\lambda$ -DNA oder kommerzielle DNA-Marker (siehe unten). Vor dem Probenauftrag wurden die DNA-Proben mit 6x Gelladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Die

## Material und Methoden

---

entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid-Lösung (5 µl pro 100 ml) zugesetzt und das Gel gegossen.

### 50x TAE-Puffer

2 M TrisBase  
5,71 % (v/v) Essigsäure  
50 mM EDTA (pH=8,0)

### Gelladepuffer 6x

0,09 % Bromphenolblau (w/v)  
0,09 % Xylene Cyanol FF (w/v)  
60 mM EDTA

### EtBr-Lösung

10 g/l Ethidiumbromid in mQ-Wasser

#### 4.2.7. Größenstandards

$\lambda$ -HindIII-Marker	MBI Fermentas
1 kb DNA-Ladder	MBI Fermentas
100 bp DNA-Ladder	MBI Fermentas
100 bp DNA-Ladder PLUS	MBI Fermentas

#### 4.2.8. DNA-Aufreinigung

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda=316$  nm) mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Gel geschnitten und anschließend aus der Gelmatrix mit dem Peqlab Gel Extraktions Kit (Peqlab®) nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### 4.2.9. DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Für das Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs (NEB) und MBI Fermentas verwendet. Zum Verdau von Vektoren zur Klonierung wurden 0,1-0,5 µg DNA eingesetzt, zur Überprüfung von einligierten Fragmenten 0,5-1,0 µg. Bei dem Verdau von PCR-Amplifikaten wurde der gesamte, vorher über Gelextraktion gereinigte PCR-Ansatz verwendet. Jeder Verdauansatz enthielt neben dem entsprechenden Puffer 2 U Restriktionsenzym pro µg der Plasmid-DNA. Die Größe und Konzentration der Fragmente wurde über Agarosegele geprüft.

### 4.2.10. Dephosphorylierung geschnittener DNA

Die verdauten linearisierten DNA-Fragmente wurden dephosphoryliert, um die Religation einzuschränken. Ein typischer Ansatz enthielt 1-2 µg linearisierte DNA, 1-2 U Alkalische Phosphatase (AP, *alkaline phosphatase*, NEB) und 1x Puffer in einem Endvolumen von 15 µl. Die Dephosphorylierung erfolgte für bis zu 30 min bei 37°C, anschließend wurde die Phosphatase durch eine 20-minütige Hitzebehandlung bei 65°C inaktiviert.

### 4.2.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisiertem Vector wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem Ansatz mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) in dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer in einem Endvolumen von 10 µl. Der Ligationsansatz wurde 1 h bei 22°C inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

### 4.2.12. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von der positiv geprüfter Plasmid-DNA aus Transformanden erfolgte bei GATC Biotech, Konstanz (30-100 ng/µl, Primerkonzentration 10 µM). Die Auswertung erfolgte über das Alignment-Tool der VectorNTI-Software (VectorNTI Advance™9.1.0, Invitrogen).

## 4.3. Proteinbiochemische Methoden

### 4.3.1. Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte in einer mit 10 ml ÜN-Kultur angeimpften 400 ml-Hauptkultur. Das LB-Medium wurde mit entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Hauptkultur wurde bei 200 rpm und 37°C geschüttelt und nach Erreichen einer OD von 0,5-0,6 mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid) in einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Je nach Protein wurde 2 h oder 4 h bei 37°C expimiert. Anschließend wurden die Hauptkulturen auf 4°C abgekühlt, um den Metabolismus der Bakterien zu reduzieren, und bei 4000 rpm 20 min lang zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden frisch zur Lyse eingesetzt.

## Material und Methoden

---

### **IPTG-Stammlösung**

1 M IPTG in mQ-Wasser  
sterilfiltriert  
Lagerung bei -20°C

### 4.3.2. Aufreinigung und Dialyse

#### Zell-Lyse

Nach Zentrifugieren wurden die Zellen mit 1 ml/g Zellfrischgewicht Lysepuffer auf Eis resuspendiert und Lysozym bis zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Nach einer dreißigminütigen Lyse wurden die Zellen per Ultraschall 6 x 10 s (5 Zyklen) weiter aufgeschlossen und 30 min bei 30000 x g und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde weiter zur Aufreinigung verwendet.

#### Aufreinigung über Ni-TED

Die rekombinanten 6x Histidin-markierten Proteine wurden über Protino® Ni-TED 2000 Säulen der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt. Der Prozess basiert auf dem Prinzip der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Die Histidine der His-Markierung interagieren mit über den Metall-Chelat-Bildner TED (Triscarboxymethylethylendiamin) immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen. Die Säule wurde zunächst mit 4 ml Equilibrierungspuffer behandelt und dann mit Lysat beladen. Anschließend wurde die Säule mit 8 ml Waschpuffer gewaschen und das gereinigte Protein mit 4 x 1 ml Elutionspuffer eluiert.

#### Dialyse

Die Dialyse der gereinigten Proteine erfolgte in Dialysekammern mit Membranen von 14 kDa *cut-off* (VISKING® *dialysis tubing* 36/32, Durchmesser 27 mm, Serva) unter Rühren der Lösung bei 4°C ÜN, der Puffer wurde zweimal gewechselt.

**Lyse-Equilibrierungspuffer**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 300 mM NaCl  
 5 mM Imidazol  
 pH=8,0 (NaOH)

**Waschpuffer**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 300 mM NaCl  
 pH=8,0 (NaOH)

**Elutionspuffer**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 300 mM NaCl  
 250 mM Imidazol  
 pH=8,0 (NaOH)

**Dialysepuffer**

100 mM Tris/HCl  
 100 mM NaCl  
 2 mM DTT  
 pH=7,9 (NaOH)

**Lysozym-Stammlösung**

10 mg/ml in mQ-Wasser

**4.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS)**

Die Proteine wurden aufgrund ihres Molekulargewichts elektrophoretisch nach der Methode von Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde in Elektrophorese-Kammern (Mini-Protean II, Bio-Rad) mit einem 15%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel durchgeführt. Zu den Proben wurde zunächst Laemmli-Ladepuffer gegeben und die Mischung für 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 200 V und 60 mA.

	<b>15% Trenngel</b>	<b>4% Sammelgel</b>
<b>Acrylamidlösung</b>	5,0 ml	390 µl
<b>mQ-Wasser</b>	2,3 ml	2,3 ml
<b>Trenngelpuffer</b>	2,5 ml	-
<b>Sammelgelpuffer</b>	-	255 µl
<b>10% SDS</b>	100 µl	30 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	3 µl
<b>APS</b>	50 µl	15 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	10 ml	3 ml

## Material und Methoden

---

### Acrylamidlösung

30 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

### Trenngelpuffer

2 M Tris/HCl (pH=8,8)

### Sammelgelpuffer

1,5 M Tris/HCl (pH=6,8)

### TEMED

unverdünntes Tetramethylethyldiamin

### APS

10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v)

### Elektrodenlaufpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % SDS (w/v)

### 5x Laemmli-Probenpuffer

0,3 M Tris/HCl (pH=6,8)  
10 % SDS (w/v)  
30 % Glycerol (v/v)  
0,1 % Bromphenolblau (w/v)  
100 mM DTT

#### 4.3.4. Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in die Färbelösung gegeben und 1 min bei 400 W in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurden die Gele 30 min unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt, die Entfärbelösung und ein Papiertuch zugegeben und die Gele 1 min bei 400 W in der Mikrowelle behandelt. Anschließend wurden die Gele 10-30 Minuten geschüttelt. Das Papiertuch sorgte eine Aufnahme des Farbstoffs. Die entfärbten Gele mit sichtbaren Banden der Proteine konnten in mQ-Wasser gelagert werden.

### Färbelösung

25 % Isopropanol (v/v)  
10% Essigsäure (v/v)  
0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v)

### Entfärbelösung

10 % Essigsäure (v/v)



Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden definierte BSA-Konzentrationen als Standard auf dem Gel verwendet (Ramagli, 1985).

### 4.3.5. Phosphatase-Aktivitätsassay

Die Aktivität und Regulation der PP2Cs wurden durch die Messung von freigesetztem fluoreszierendem 4-Methylumbelliferon bestimmt. Das Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) wird durch Phosphatasen dephosphoryliert, so dass die Menge des freigesetzten Produkts in einem Mikroplattenleser (Synergy 2, Biotek) gemessen werden kann. 4-Methylumbelliferon wird durch Licht der Wellenlänge 360 nm angeregt und das emittierte Licht wird bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen. Die Intensität des Signals ist proportional zur Stoffmenge des entstehenden Fluorophors. Die Reaktion wird 10 min lang gemessen und die Intensität in RFU (*Relative Fluorescence Units*) angegeben. Die RFU werden dann automatisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung dieser Geraden entspricht der Phosphataseaktivität und wird in mRFU/min angegeben.

Zunächst wurde ein Präinkubationsansatz angesetzt. Phosphatase bzw. Phosphatase und ihre Interaktionspartner wurden 20 min lang bei 35°C mit 0,3 mM Mn<sup>2+</sup> und Puffer inkubiert. 5 min vor Zugabe wurde das 2x Substrat mit 0,3 mM Mn<sup>2+</sup> gemischt und bei 35°C inkubiert. Präinkubation und 2x Substrat wurden dann in eine 96er Mikrotiterplatte pipettiert (45 µl + 45 µl) und im auf 30°C vorgeheizten Plattenleser gemessen.

### Stammlösungen

1 M MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
1 M Tris/HCl pH=7,9  
5 M NaCl  
0,1 M MUP  
1 M DTT

### 8x Puffer

1 ml Tris/HCl  
0,2 ml NaCl  
50 µl DTT

### Präinkubation (100µl)

12,5 µl 8x Puffer  
1,5 µl MnCl<sub>2</sub> (20 mM frisch hergestellt)  
mQ-Wasser auf 100 µl  
RCARs  
Phosphatase (500 ng)  
Liganden

## Material und Methoden

---

### 2x Substrat

0,1 M Tris/HCl pH=7,9  
0,1 M NaCl  
0,3 mM MnCl<sub>2</sub>  
5 mM MUP

### 4.3.6. Größenstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)  
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (MBI Fermentas)

## 4.4. Chemikalien und Garete

### 4.4.1. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
CCD-Kamera	ORCAII ERG	Hamamatsu Photonics
Feinwaage	Handy	Sartorius Analytic
Gelelektrophorese-Netzteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Inkubator	Thermoshake	Gerhardt
Kippschuttler	RotoShake Genie	Scientific Industries
Kamera	Coolpix 4500	Nikon
Luminometer	<i>flash'n glow</i>	Berthold
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
	HAT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader	Perkin Elmer
Mikroskope	Stemi SV6	Zeiss
	Stemi SV11	Zeiss
	HBO 50 Axioskop	Zeiss
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech

SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	Mini Protean 3 System	Bio-Rad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Ultraschall	Sonopuls HD2070	Bandelin
UV-Fotosystem	P19D	Mitsubishi
UV-Gerät	Reprostar 3	Camag
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vakuuzentrifuge	Vacuum Concentrator	Bachofer
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius

Zentrifugen	Avanti J-25	Beckman Coulter
	Typ 5424	Eppendorf AG
	Typ 5415C	Eppendorf AG
	Typ 5415D	Eppendorf AG
	Typ 5415R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG
	Universal 16	Hettich

#### 4.4.2. Chemikalien/Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden – soweit nicht anders angegeben – von den Firmen Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Fluka / Sigma Aldrich Chemie GmbH (München), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) oder New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

Die mit HPLC gereinigten ABA-Vorstufen, ABA-Metabolite und ABA-Analogen wurden von Prof. Suzanne Abrams (National Research Council of Canada) zur Verfügung gestellt. Die Stammlösungen wurden in DMSO hergestellt mit Konzentrationen von 50 mM für ABA-Vorstufen und ABA-Analoga bzw. 5 mM für ABA-Metabolite. Je nach Bedarf wurden die Stammlösungen mit den in den jeweiligen Versuchen verwendeten Puffern verdünnt.

## Material und Methoden

---

### 4.4.3. Enzyme, Plasmide, Vektoren

Alle verwendeten und neu klonierten Plasmide sowie die entsprechenden transformierten *E. coli*-Stämme sind im Anhang dieser Arbeit mit numerischer Zuordnung in der Stammsammlung zu finden.

Alle verwendeten Oligonukleotide stammten von den Firmen Eurofins MWG Operon, Ebersberg und Sigam-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen. Die in lyophilisierter Form gelieferten Oligonukleotide wurden in mQ-Wasser aufgenommen und 5 min lang bei 65°C erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Restriktionsenzyme stammten von MBI Fermentas und New England Biolabs® GmbH, Frankfurt.

### 4.5. In silico Analyse

Ermittlung von DNA-Sequenzen:

[www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)

Vorhersage eines Restriktionsverdaus:

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

Homologievergleich und Überprüfen von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

Übersetzung einer Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz:

[www.expasy.ch/tools/dna.html](http://www.expasy.ch/tools/dna.html)

Statistische Tests:

<http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>

Genexpressionsanalyse:

[http://bar.utoronto.ca/efp\\_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi)

## 5. Anhang

### 5.1. Oligonukleotide

Tabelle der in der Kartierung verwendeter Primer

Name	Sequenz	Verwendung	Primer #
phros19 CAPS fwd	5'-GGG GAT TCC CAG ACA GGA GC-3'	CAPS-Marker	1086
phros19 CAPS rev	5'-CTC AAG CCA GTC GGA AGA TGT TGA GC-3'	CAPS-Marker	1087
Chr1_0,44 Mb-fwd	5'-CTC TCT CAT GTA TTT GAA GTG GGA TG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0,44 Mb-rev	5'-AGT ATC ACA ACT ATG GGT CTG ACT GG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0,52Mb (Mbol) fwd	5'-CGG GCA AGC AAA AAG CAT GTG ACA CTT TC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0,52Mb (Mbol) rev	5'-CTA TAA AGT TAC GAG CTT TCT TCT TCA GG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_585761_BsrDI fwd	5'-AGG GAA GCC GCA GCC TGC ATT TGA ACA GG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_585761_BsrDI rev	5'-GCT GGA ATC AGA ACT GAG GGC GAT GGA TG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0.61 Mb (Alw26I) fwd	5'-GCG AGC TCT GGA ACG AGA GTG AAT CTT GG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0.61 Mb (Alw26I) rev	5'-GCG GGA AGG GCA AAG TTT GGC TCG ATC CC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0.61 Mb (Hinfl) fwd	5'-GTT GGC TTC CTG ATG ATG AAA CCA TCC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0.61 Mb (Hinfl) rev	5'-CTA GAG GAT TTG ATT TCT GAT ATT GC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0,76 Mb-fwd	5'-TGG CAG GTG CGA AGA ACC ACT AAA CCC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0,76 Mb-rev	5'-CAT AGA ATT TAA TGA AAC CAA CCC AAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_834960_MluCI fwd	5'-GTG CGA GTA TAC TTT GGG ATT GAA TGG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_834960_MluCI rev	5'-GCT AGA GAG CAT CAT CAG TTT CTA TAA GAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0,844 Mb (Tsp509I) fwd	5'-GTC CTC GTG TTA CCA TTT TCA TCT ACG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_0,844 Mb (Tsp509I) rev	5'-TCC AAA TCA GTC AAC CGA ACG TGG AC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_1,09 Mb (AluI) fwd	5'-GAT GTT TCA TTT GCA GGC TTG AAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_1,09 Mb (AluI) rev	5'-GGT AAC ACA AAA GAC CAT ATG TTT CAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_1,25 Mb-fwd	5'-GAA GAC AAA GCT CTG CAG TAA TGT AG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_1,25 Mb-rev	5'-CAC ATT CTA AGC CTT GTA GAG ATG AAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_2.0 Mb-fwd	5'-CAG GAT TAC TTA GAA TTA ACG CGC A-3'	Mapping	nicht in der Primerlist

## Anhang

Chr1_2.0 Mb-rev	5'-GTG CAA TCT TTG AAA CTT GAG G-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_3,24 Mb-fwd	5'-AAC GTT TGT TCA ATA CCT TGG TTT G-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_3,24 Mb-rev	5'-GCT GCT ACT AAT TTT AAA CAA TTA CAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_7,3 Mb fwd	5'-AAT GTT TGT CAA CAT CCG GAG AC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_7,3 Mb rev	5'-CCA TCT TGT GTG TTT TGT CGA ATC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr.I-10.1Mb-fwd	5'-CTG CAA AGA ATG GAA GGG CCG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr.I-10.1Mb-rev	5'-CTG TCC ACT GCC CAG TCT AGG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 941 fwd	5'-GAC TCG ACG CAT CAA CAA TG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 941 fwd	5'-CCA TAA GAG GAA CCG GGA TT-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_16,37 Mb-fwd	5'-CCA GCT TAT TGT GTT CCC ACC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr1_16,37 Mb-rev	5'-CAA GCT AAG TCA GTT AAC ACT CC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
f 13011-fwd	5'-AGT GAT TGG ATG GTC GGT ATG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
f 13011-rev	5'-TGG TTT TGG TGA GTT CTG CT-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 506-fwd	5'-CTC ATC GCG GTT TAG CAA AT-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 506-rev	5'-TGG GCA CAG TCG TTG AAA TA-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer630_AC-fwd	5'-GAG ATG GTA TGT TTG TCG CCT CTG GGT C-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer630_AC-rev	5'-ACT GGC TAT CGC GTT GTC TTT GAT CG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer116AC-fwd	5'-TCA CCC ATT GCA CCG TTT ATT TCG G-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer116AC-rev	5'-GAA TCA GAT ACT GTC GCC ATC AAG G-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 358-fwd	5'-AAC TGG TTG GTT TAA GAA TAA-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 358-rev	5'-AAC CAA CGA TCC CCT TTT GA-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 168-fwd	5'-TCG TCT ACT GCA CTG CCG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 168-fwd	5'-GAG GAC ATG TAT AGG AGC CTC G-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 172-fwd	5'-CAT CCG AAT GCC ATT GTT C-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 172-rev	5'-AGC TGC TTC CTT ATA GCG TCC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 162-fwd	5'-CAT GCA ATT TGC ATC TGA GG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 162-rev	5'-CTC TGT CAC TCT TTT CCT CTG G-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr3_rpl_ciw11-fwd	5'-CCG TGG AAG GAG AAA CAT CTT TCT AGG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
Chr3_rpl_ciw11-rev	5'-CAG ATG TGA CCT TTT AGA ACT TTG CAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 928-fwd	5'-TCA CGT GAT AGG AAG CAA GTT	Mapping	nicht in der

	CTT-3'		Primerlist
cer 928-rev	5'-AGT TTG CTG CAG GAG GGA AAC CTC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 6-fwd	5'-TGG ATT TCT TCC TCT CTT CAC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 6-rev	5'-ATG GAG AAG CTT ACA CTG ATC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 765-fwd	5'-GGA TGC TTT GTG AAA GTC TCT CAT GCC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 765-rev	5'-CTC GTC GTT CTT TTC GGC TTT CTC C-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 8-fwd	5'-TGG CTT TCG TTT ATA AAC ATC C-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 8-rev	5'-GAG GGC AAA TCT TTA TTT CGG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 787-fwd	5'-AGG ATC CAA CGG TCG ATT CTC GCT AG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 787-rev	5'-GTG GGT TCT TCC CAA GAT TCC CCT C-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 534-fwd	5'-GCC CAG AGG AAG AAG AGC AAA CTA GC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 534-rev	5'-TGG GAA TTC ATG AGA GAA TAT GTG GGA C-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 1107-fwd	5'-GCG AAA AAA CAA AAA AAT CCA-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 1107-rev	5'-CGA CGA ATC GAC AGA ATT AGG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 348-fwd	5'-GGA AAA CAA TGA AAT TGA AAG AAA CGA GAG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
cer 348-rev	5'-AAA CAT GAA GAG AAT CTT TGG AGC GAA G-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 151-fwd	5'-CAG TCT AAA AGC GAG AGT ATG ATG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 151-rev	5'-GTT TTG GGA AGT TTT GCT GG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 139-fwd	5'-GGT TTC GTT TCA CTA TCC AGG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 139-rev	5'-AGA GCT ACC AGA TCC GAT GG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 76-fwd	5'-AGG CAT GGG AGA CAT TT ACG-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
nga 76-rev	5'-GGA GAA AAT GTC ACT CTC CAC C-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
operon 2244-fwd	5'-CTT TGG CGA TCT TTC CTC CC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist
operon 2244-rev	5'-CCG GTT GAG CAT CAA AGT CC-3'	Mapping	nicht in der Primerlist

## Anhang

---

### 5.2. Konstrukte

Tabelle der zur Proteinexpression verwendeten Konstrukte

#	Stamm	Konstrukt	IPTG-Konzentration	Bedingungen
1136	XL1-blue	pQE-30 ABR7 (RCAR3)	0,5 mM	4h, 37°C
1168	XL1-blue	pQE-30 ABR9 (RCAR1)	0,5 mM	4h, 37°C
2703	Rosetta pLysS	pQE-70 RCAR11	0,5 mM	4h, 37°C
2023	M15 [pREP4]	pQE-70 ABI2	0,5 mM	2h, 37°C
2158	M15 [pREP4]	pQE-70 ABI1	0,5 mM	2h, 37°C
2729	Rosetta pLysS	pET-21a(+) PP2CA	0,5 mM	2h, 37°C

Tabelle der zur Protoplastentransfektion verwendeten Konstrukte

#	Plasmid	Stamm	Resistenz
883	pSK 35S::GUS	DH5α	Amp
3041	pSK pRD29B::LUC	DH5α	Amp



## 6. Literatur

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78
- Abel S, Theologis A (1998) Transient gene expression in protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol* **82**: 209-217
- Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Kronke M (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**: 937-947
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF (1968) Abscisic Acid: A New Name for Abscisin II (Dormin) 10.1126/science.159.3822.1493. *Science* **159**: 1493-
- Ajouz B, Berrier C, Garrigues A, Besnard M, Ghazi A (1998) Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *The Journal of biological chemistry* **273**: 26670-26674
- Anishkin A, Kung C (2005) Microbial mechanosensation. *Curr Opin Neurobiol* **15**: 397-405
- Aroca R, Ferrante A, Vernieri P, Chrispeels MJ (2006) Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of botany* **98**: 1301-1310
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodriguez PL, Ponce MR, Micol JL (2005) A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* **418**: 2071-2083
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23 - 58
- Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE, Zeuthen T (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 269-274
- Berrier C, Coulombe A, Szabo I, Zoratti M, Ghazi A (1992) Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *European journal of biochemistry / FEBS* **206**: 559-565
- Berrier C, Garrigues A, Richarme G, Ghazi A (2000) Elongation factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel mscL. *Journal of bacteriology* **182**: 248-251
- Bossi F, Cordoba E, Dupre P, Mendoza MS, Roman CS, Leon P (2009) The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **59**: 359-374

## Literatur

---

- Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu DT, Tournaire-Roux C, Maurel C (2008a) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **56**: 207-218
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant physiology* **139**: 790-805
- Boursiac Y, Prak S, Boudet J, Postaire O, Luu DT, Tournaire-Roux C, Santoni V, Maurel C (2008b) The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species- and phosphorylation-dependent internalization of aquaporins. *Plant Signal Behav* **3**: 1096-1098
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763
- Bruzzo S, Moreschi I, Usai C, Guida L, Damonte G, Salis A, ScarfÃ¬ S, Millo E, De Flora A, Zocchi E (2007) Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger  
10.1073/pnas.0609379104. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 5759-5764
- Casino P, Rubio V, Marina A (2010) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol* **20**: 763-771
- Chang G, Spencer RH, Lee AT, Barclay MT, Rees DC (1998) Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**: 2220-2226
- Chen JG (2008) Heterotrimeric G-protein signaling in Arabidopsis: Puzzling G-protein-coupled receptor. *Plant Signal Behav* **3**: 1042-1045
- Chen TH, Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology* **5**: 250-257
- Chen YF, Etheridge N, Schaller GE (2005) Ethylene signal transduction. *Annals of botany* **95**: 901-915
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**: 2723-2743
- Choi WG, Roberts DM (2007) Arabidopsis NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *The Journal of biological chemistry* **282**: 24209-24218
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, MÃ¼ller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**: 209-219
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 314-325
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* **52**: 167-174

- Ciftci-Yilmaz S, Morsy MR, Song L, Coutu A, Krizek BA, Lewis MW, Warren D, Cushman J, Connolly EL, Mittler R (2007) The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress. *The Journal of biological chemistry* **282**: 9260-9268
- Coello P, Hey SJ, Halford NG (2011) The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *Journal of experimental botany* **62**: 883-893
- Cui C, Smith DO, Adler J (1995) Characterization of mechanosensitive channels in Escherichia coli cytoplasmic membrane by whole-cell patch clamp recording. *The Journal of membrane biology* **144**: 31-42
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology* **61**: 651-679
- Danielson JA, Johanson U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss Physcomitrella patens. *BMC plant biology* **8**: 45
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R (2005) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant physiology* **139**: 847-856
- De Lozanne A (2003) The role of BEACH proteins in Dictyostelium. *Traffic* **4**: 6-12
- de Nadal E, Real FX, Posas F (2007) Mucins, osmosensors in eukaryotic cells? *Trends in cell biology* **17**: 571-574
- Delumeau O, Chen CC, Murray JW, Yudkin MD, Lewis RJ (2006) High-molecular-weight complexes of RsbR and paralogues in the environmental signaling pathway of Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology* **188**: 7885-7892
- Dietrich P, Sanders D, Hedrich R (2001) The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *J Exp Bot* **52**: 1959-1967
- Drogen F, O'Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM, Peter M (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Current biology : CB* **10**: 630-639
- Du F, Edwards K, Shen Z, Sun B, De Lozanne A, Briggs S, Firtel RA (2008) Regulation of contractile vacuole formation and activity in Dictyostelium. *The EMBO journal* **27**: 2064-2076
- Dupeux F, Santiago J, Betz K, Twycross J, Park SY, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Jensen MR, Krasnogor N, Blackledge M, Holdsworth M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA (2011) A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *The EMBO journal* **30**: 4171-4184
- Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **61**: 1401-1426
- El-Din El-Assal S, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB (2004) DISTORTED2 encodes an ARPC2 subunit of the putative Arabidopsis ARP2/3 complex. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **38**: 526-538

## Literatur

---

- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, Nakazono M, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E (2008) Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* **147**: 1984-1993
- Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I (2009) Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. *Journal of experimental botany* **60**: 2235-2248
- Ferguson KM, Lemmon MA, Sigler PB, Schlessinger J (1995) Scratching the surface with the PH domain. *Nature structural biology* **2**: 715-718
- Fernandes H, Pasternak O, Bujacz G, Bujacz A, Sikorski MM, Jaskolski M (2008) Lupinus luteus pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. *J Mol Biol* **378**: 1040-1051
- Ferreira FJ, Kieber JJ (2005) Cytokinin signaling. *Current opinion in plant biology* **8**: 518-525
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Gene *ABI5* Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *Plant Cell* **12**: 599-610
- Fong HK, Hurley JB, Hopkins RS, Miake-Lye R, Johnson MS, Doolittle RF, Simon MI (1986) Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the CDC4 gene and identification of related mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 2162-2166
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**: 660-664
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 485-494
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK (2011) Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 1717-1722
- Fujii H, Zhu JK (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**: 8380-8385
- Fujimoto Y, Nagata R, Fukasawa H, Yano K, Azuma M, Iida A, Sugimoto S, Shudo K, Hashimoto Y (1998) Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *Eur J Biochem* **258**: 794 - 802
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) AREB1 Is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 3470-3488
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- Gaidenko TA, Kim TJ, Weigel AL, Brody MS, Price CW (2006) The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **188**: 6387-6395
- Gao R, Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology* **63**: 133-154
- Gao Y, Zeng Q, Guo J, Cheng J, Ellis BE, Chen J-G (2007) Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*  
doi:10.1111/j.1365-3113X.2007.03291.x. *The Plant Journal* **52**: 1001-1013
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KA, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 8023-8028
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 21425-21430
- Gomelsky L, Moskvina OV, Stenzel RA, Jones DF, Donohue TJ, Gomelsky M (2008) Hierarchical regulation of photosynthesis gene expression by the oxygen-responsive PrrBA and AppA-PpsR systems of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* **190**: 8106-8114
- Gomes D, Agasse A, Thiebaud P, Delrot S, Geros H, Chaumont F (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et biophysica acta* **1788**: 1213-1228
- Gong D, Guo Y, Jagendorf AT, Zhu JK (2002) Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* **130**: 256-264
- Gonzalez-Guzman M, Apostolova N, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodriguez PL (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**: 1833-1846
- Guo J, Zeng Q, Emami M, Ellis BE, Chen JG (2008) The GCR2 gene family is not required for ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **3**: e2982
- Guo Y, Xiong L, Song CP, Gong D, Halfter U, Zhu JK (2002) A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **3**: 233-244
- Han JD, Baker NE, Rubin CS (1997) Molecular characterization of a novel A kinase anchor protein from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of biological chemistry* **272**: 26611-26619
- Hao Q, Yin P, Yan C, Yuan X, Li W, Zhang Z, Liu L, Wang J, Yan N (2010) Functional mechanism of the abscisic acid agonist pyrabactin. *The Journal of biological chemistry* **285**: 28946-28952
- Haswell ES, Meyerowitz EM (2006) MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current biology : CB* **16**: 1-11

## Literatur

---

- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Current biology* : **CB 18**: 730-734
- Haswell ES, Phillips R, Rees DC (2011) Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? *Structure* **19**: 1356-1369
- Henzler T, Steudle E (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in Chara corallina: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J Exp Bot* **51**: 2053-2066
- Hersen P, McClean MN, Mahadevan L, Ramanathan S (2008) Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 7165-7170
- Heuser J, Zhu Q, Clarke M (1993) Proton pumps populate the contractile vacuoles of Dictyostelium amoebae. *The Journal of cell biology* **121**: 1311-1327
- Heyl A, Schumling T (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Current opinion in plant biology* **6**: 480-488
- Higgs PI, Jagadeesan S, Mann P, Zusman DR (2008) EspA, an orphan hybrid histidine protein kinase, regulates the timing of expression of key developmental proteins of Myxococcus xanthus. *Journal of bacteriology* **190**: 4416-4426
- Hill RD, Liu JH, Durnin D, Lamb N, Shaw A, Abrams SR (1995) Abscisic Acid Structure-Activity Relationships in Barley Aleurone Layers and Protoplasts (Biological Activity of Optically Active, Oxygenated Abscisic Acid Analogs). *Plant physiology* **108**: 573-579
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Hohener B, Grill E (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *Embo J* **21**: 3029-3038
- Hirayama T, Shinozaki K (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci*
- Hoecker U, Vasil IK, McCarty DR (1995) Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. *Genes & development* **9**: 2459-2469
- Hoffmann T, Boiangiu C, Moses S, Bremer E (2008) Responses of Bacillus subtilis to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Applied and environmental microbiology* **74**: 2454-2460
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372
- Hong JY, Chae MJ, Lee IS, Lee YN, Nam MH, Kim DY, Byun MO, Yoon IS (2011) Phosphorylation-mediated regulation of a rice ABA responsive element binding factor. *Phytochemistry* **72**: 27-36
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132**: 666-680

- Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR, Cutler AJ (2007a) Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **50**: 414-428
- Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR, Cutler AJ (2007b) Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in Arabidopsis. *Plant J* **50**: 414-428
- Hulskamp M (2000) How plants split hairs. *Current biology : CB* **10**: R308-310
- Hulskamp M, Misra S, Jurgens G (1994) Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell* **76**: 555-566
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, Gonzalez M, Lee E, Lewis MW, Maxwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ (2006) The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant cell* **18**: 3073-3087
- Iyer LM, Koonin EV, Aravind L (2001) Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins* **43**: 134-144
- Jadhav AS, Taylor DC, Giblin M, Ferrie AMR, Ambrose SJ, Ross ARS, Nelson KM, Irina Zaharia L, Sharma N, Anderson M, Fobert PR, Abrams SR (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**: 2678-2688
- Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science* **7**: 106-111
- Jefferson RA, Bevan M, Kavanagh T (1987) The use of the Escherichia coli beta-glucuronidase as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. *Biochem Soc Trans* **15**: 17-18
- Jenal U, Galperin MY (2009) Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Current opinion in microbiology* **12**: 152-160
- Jiang F, Hartung W (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of experimental botany* **59**: 37-43
- Jogl G, Shen Y, Gebauer D, Li J, Wiegmann K, Kashkar H, Kronke M, Tong L (2002) Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *The EMBO journal* **21**: 4785-4795
- Johnston CA, Temple BR, Chen JG, Gao Y, Moriyama EN, Jones AM, Siderovski DP, Willard FS (2007) Comment on "A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid". *Science* **318**: 914; author reply 914
- Jones AM, Assmann SM (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Rep* **5**: 572-578
- Kagaya Y, Hobo T, Murata M, Ban A, Hattori T (2002) Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *The Plant cell* **14**: 3177-3189
- Kakimoto T (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual review of plant biology* **54**: 605-627

## Literatur

---

- Kaldenhoff R, Carbo MR, Sans JF, Lovisolo C, Heckwolf M, Uehlein N (2008) Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell Environ*
- Kaldenhoff R, Kolling A, Richter G (1996) Regulation of the *Arabidopsis thaliana* aquaporin gene *AthH2* (PIP1b). *J Photochem Photobiol B* **36**: 351-354
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2355-2360
- Kepka M, Benson CL, Gonugunta VK, Nelson KM, Christmann A, Grill E, Abrams SR (2011) Action of natural abscisic acid precursors and catabolites on abscisic acid receptor complexes. *Plant physiology* **157**: 2108-2119
- Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 908-925
- Khodosh R, Augsburger A, Schwarz TL, Garrity PA (2006) Bchs, a BEACH domain protein, antagonizes Rab11 in synapse morphogenesis and other developmental events. *Development* **133**: 4655-4665
- Kim H, Helmbrecht EE, Stalans MB, Schmitt C, Patel N, Wen CK, Wang W, Binder BM (2011) Ethylene receptor ETHYLENE RECEPTOR1 domain requirements for ethylene responses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant physiology* **156**: 417-429
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annual review of plant biology* **61**: 561-591
- Kline KG, Barrett-Wilt GA, Sussman MR (2010) In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 15986-15991
- Kloda A, Martinac B (2002) Common evolutionary origins of mechanosensitive ion channels in Archaea, Bacteria and cell-walled Eukarya. *Archaea* **1**: 35-44
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *The Plant cell* **16**: 1163-1177
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377-383
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sabetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**: 715-719
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ (1998) (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase Is a Cytochrome P450 Monooxygenase  
10.1104/pp.118.3.849. *Plant Physiol* **118**: 849-860



- Kropat J, Oster U, Rudiger W, Beck CF (1997) Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14168-14172
- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI (2006) The Protein Phosphatase AtPP2CA Negatively Regulates Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis, and Effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol* **140**: 127-139
- Kung C, Martinac B, Sukharev S (2010) Mechanosensitive channels in microbes. *Annual Review of Microbiology* **64**: 313-329
- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2361-2366
- Kuromori T, Shinozaki K (2010) ABA transport factors found in Arabidopsis ABC transporters. *Plant Signal Behav* **5**: 1124-1126
- Kwak E, Gerald N, Larochelle DA, Vithalani KK, Niswonger ML, Maready M, De Lozanne A (1999) LvsA, a protein related to the mouse beige protein, is required for cytokinesis in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **10**: 4429-4439
- Kwak JM, Murata Y, Baizabal-Aguirre VM, Merrill J, Wang M, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Schroeder JI (2001) Dominant negative guard cell K<sup>+</sup> channel mutants reduce inward-rectifying K<sup>+</sup> currents and light-induced stomatal opening in arabidopsis. *Plant physiology* **127**: 473-485
- Le J, El-Assal Sel D, Basu D, Saad ME, Szymanski DB (2003) Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development. *Current biology : CB* **13**: 1341-1347
- Lebaudy A, Very AA, Sentenac H (2007) K<sup>+</sup> channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS letters* **581**: 2357-2366
- Lee HK, Cho SK, Son O, Xu Z, Hwang I, Kim WT (2009a) Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic Arabidopsis plants. *The Plant cell* **21**: 622-641
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126**: 1109-1120
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S (2009b) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 21419-21424
- Lemmon MA, Ferguson KM (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *The Biochemical journal* **350 Pt 1**: 1-18
- Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *Plant J* **10**: 655-661
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J (1994) Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**: 1448-1452

## Literatur

---

- Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997) The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2)* and *ABI1* Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. *Plant Cell* **9**: 759-771
- Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO journal* **18**: 1730-1737
- Li S, Blanchoin L, Yang Z, Lord EM (2003) The putative *Arabidopsis* arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant physiology* **132**: 2034-2044
- Li Y, Moe PC, Chandrasekaran S, Booth IR, Blount P (2002) Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **21**: 5323-5330
- Lian HL, Yu X, Lane D, Sun WN, Tang ZC, Su WA (2006) Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. *Cell research* **16**: 651-660
- Liedtke W, Friedman JM (2003) Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13698-13703
- Liu J, Ekramoddoullah A (2006) The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol* **68**: 3 - 13
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**: 1712-1716
- Liu Z, Gandhi CS, Rees DC (2009) Structure of a tetrameric MscL in an expanded intermediate state. *Nature* **461**: 120-124
- Lopez-Molina L, Chua NH (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**: 541-547
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua NH (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4782-4787
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* **17**: 410-418
- Luehrsen KR, De Wet JR, Walbot V (1992) Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol* **216**: 397-414
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**: 1064-1068
- Maeda T, Takekawa M, Saito H (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554-558
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242-245
- Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the

- major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* **325**: 123-133
- Marris E (2008) Water: more crop per drop. *Nature* **452**: 273-277
- Martinac B, Buechner M, Delcour AH, Adler J, Kung C (1987) Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 2297-2301
- Martinez-Wilson HF, Tamayo R, Tischler AD, Lazinski DW, Camilli A (2008) The vibrio cholerae hybrid sensor kinase VieS contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *Journal of bacteriology* **190**: 6439-6447
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Hulskamp M (2003a) Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **15**: 1632-1645
- Mathur J, Mathur N, Kirik V, Kernebeck B, Srinivas BP, Hulskamp M (2003b) *Arabidopsis* CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* **130**: 3137-3146
- Mathur J, Spielhofer P, Kost B, Chua N (1999) The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **126**: 5559-5568
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual review of plant biology* **59**: 595-624
- Meinhard M, Grill E (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **508**: 443-446
- Meinhard M, Rodriguez PL, Grill E (2002) The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* **214**: 775-782
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**: 602-608
- Melcher K, Xu Y, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Chinnusamy V, Suino-Powell KM, Kovach A, Tham FS, Cutler SR, Li J, Yong EL, Zhu JK, Xu HE (2010) Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nature structural & molecular biology* **17**: 1102-1108
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, Piette L, Vavasseur A, Genty B, Boivin K, Muller A, Giraudat J, Leung J (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *Embo J* **26**: 3216-3226
- Meyer K, Leube MP, Grill E (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452-1455
- Miermont A, Uhlendorf J, McClean M, Hersen P (2011) The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. *J Signal Transduct* **2011**: 930940
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* **312**: 264-266

## Literatur

---

- Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang HJ, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira KS, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**: 609-614
- Moe PC, Blount P, Kung C (1998) Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Molecular microbiology* **28**: 583-592
- Moes D, Himmelbach A, Korte A, Haberer G, Grill E (2008) Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in Arabidopsis. *Plant J* **54**: 806-819
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriach H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, Schroeder JI (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* **4**: e327
- Muller AH, Hansson M (2009) The barley magnesium chelatase 150-kDa subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol*
- Muniz M, Martin ME, Hidalgo J, Velasco A (1997) Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14461-14466
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**: 3089-3099
- Nakamura S, Lynch TJ, Finkelstein RR (2001) Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant J* **26**: 627-635
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant physiology* **149**: 88-95
- Nakayama Y, Fujiu K, Sokabe M, Yoshimura K (2007) Molecular and electrophysiological characterization of a mechanosensitive channel expressed in the chloroplasts of *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5883-5888
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165-185
- Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS (2006) Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312**: 583-588
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED (2009) Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* **326**: 1373-1379
- Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park SY, Wang A, Carvalho PC, Lee S, Caddell DF, Cutler SR, Chory J, Yates JR, Schroeder JI (2010) PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**: 290-299

- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2007) ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J* **50**: 935-949
- Nishimura N, Yoshida T, Murayama M, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2004a) Isolation and characterization of novel mutants affecting the abscisic acid sensitivity of Arabidopsis germination and seedling growth. *Plant Cell Physiol* **45**: 1485-1499
- Nishimura N, Yoshida T, Murayama M, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2004b) Isolation and characterization of novel mutants affecting the abscisic acid sensitivity of Arabidopsis germination and seedling growth. *Plant & cell physiology* **45**: 1485-1499
- Nyangulu JM, Nelson KM, Rose PA, Gai Y, Loewen M, Loughheed B, Quail JW, Cutler AJ, Abrams SR (2006) Synthesis and biological activity of tetralone abscisic acid analogues. *Org Biomol Chem* **4**: 1400-1412
- O'Hagan R, Chalfie M, Goodman MB (2005) The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat Neurosci* **8**: 43-50
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142**: 1592-1593
- Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y (2001) A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca<sup>2+</sup>-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 7801-7805
- Pandey S, Nelson DC, Assmann SM (2009) Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis. **136**: 136-148
- Parent B, Hachez C, Redondo E, Simonneau T, Chaumont F, Tardieu F (2009) Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant physiology* **149**: 2000-2012
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**: 1068-1071
- Pasternak O, Bujacz G, Fujimoto Y, Hashimoto Y, Jelen F, Otlewski J, Sikorski M, Jaskolski M (2006) Crystal structure of *Vigna radiata* cytokinin-specific binding protein in complex with zeatin. *Plant Cell* **18**: 2622 - 2634
- Perozo E, Kloda A, Cortes DM, Martinac B (2002) Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nature structural biology* **9**: 696-703
- Peterson FC, Burgie ES, Park SY, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA, Chang CE, Cutler SR, Phillips GN, Jr., Volkman BF (2010) Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nature structural & molecular biology* **17**: 1109-1113
- Pivetti CD, Yen MR, Miller S, Busch W, Tseng YH, Booth IR, Saier MH, Jr. (2003) Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 66-85, table of contents

## Literatur

---

- Ponting CP, Aravind L (1999) START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends in biochemical sciences* **24**: 130-132
- Posas F, Saito H (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875
- Radauer C, Lackner P, Breiteneder H (2008) The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 286
- Raghavan V, Groisman EA (2010) Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Current opinion in microbiology* **13**: 226-231
- Ramagli L, Rodriguez, L. V., (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**: 559-563
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294
- Razem FA, Luo M, Liu JH, Abrams SR, Hill RD (2004) Purification and characterization of a barley aleurone abscisic acid-binding protein. *J Biol Chem* **279**: 9922-9929
- Reiser V, Raitt DC, Saito H (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of cell biology* **161**: 1035-1040
- Reiser V, Salah SM, Ammerer G (2000) Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nature cell biology* **2**: 620-627
- Risk JM, Day CL, Macknight RC (2009) Reevaluation of Abscisic Acid-Binding Assays Shows That G-Protein-Coupled Receptor2 Does Not Bind Abscisic Acid  
10.1104/pp.109.135749. *Plant Physiol* **150**: 6-11
- Risk JM, Macknight RC, Day CL (2008) FCA does not bind abscisic acid. **456**: E5-E6
- Robertson AJ, Reaney M, Wilen RW, Lamb N, Abrams SR, Gusta LV (1994) Effects of Abscisic Acid Metabolites and Analogs on Freezing Tolerance and Gene Expression in Bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) Cell Cultures. *Plant physiology* **105**: 823-830
- Rock CD, Zeevaart JA (1991) The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7496-7499
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual review of plant biology* **57**: 837-858
- Rodriguez PL, Benning G, Grill E (1998a) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **421**: 185-190
- Rodriguez PL, Leube MP, Grill E (1998b) Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol* **38**: 879-883
- Rogers S, Bendich A (1994) Extraction of Total Cellular DNA from Plants, Algae and Fungi. In *Plant Molecular Biology Manual*, 3rd edn. Dodrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press

- Rohde A, Van Montagu M, Boerjan W (1999) The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3)* gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **22**: 261-270
- Saedler R, Jakoby M, Marin B, Galiana-Jaime E, Hulskamp M (2009) The cell morphogenesis gene SPIRRIG in *Arabidopsis* encodes a WD/BEACH domain protein. *Plant J* **59**: 612-621
- Saedler R, Mathur N, Srinivas BP, Kernebeck B, Hulskamp M, Mathur J (2004) Actin control over microtubules suggested by DISTORTED2 encoding the *Arabidopsis* ARPC2 subunit homolog. *Plant & cell physiology* **45**: 813-822
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez PL (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37**: 354-369
- Saez A, Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Rodriguez PL (2008) HAB1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 2972-2988
- Saito H, Tatebayashi K (2004) Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *Journal of biochemistry* **136**: 267-272
- Samanani N, Liscombe D, Facchini P (2004) Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J* **40**: 302 - 313
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA (2009a) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**: 665-668
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Marquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL (2009b) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **60**: 575-588
- Santos JL, Shiozaki K (2001) Fungal histidine kinases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2001**: re1
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake H, Goto DB, Uozumi N (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *The Biochemical journal* **424**: 439-448
- Sato N, Kawahara H, Toh-e A, Maeda T (2003) Phosphorelay-regulated degradation of the yeast Ssk1p response regulator by the ubiquitin-proteasome system. *Molecular and cellular biology* **23**: 6662-6671
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001a) Guard Cell Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 627-658
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001b) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**: 327-330

- Schumann U, Edwards MD, Rasmussen T, Bartlett W, van West P, Booth IR (2010) YbdG in *Escherichia coli* is a threshold-setting mechanosensitive channel with MscM activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12664-12669
- Schussler MD, Alexandersson E, Bienert GP, Kichey T, Laursen KH, Johanson U, Kjellbom P, Schjoerring JK, Jahn TP (2008) The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **56**: 756-767
- Schwab B, Mathur J, Saedler R, Schwarz H, Frey B, Scheidegger C, Hulskamp M (2003) Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in *Arabidopsis thaliana*: actin controls the spatial organization of microtubules. *Molecular genetics and genomics : MGG* **269**: 350-360
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* **276**: 25208-25211
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JA, McCarty DR (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872-1874
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**: 236-243
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 296-302
- Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiha T (2000) The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12908-12913
- Sheen J (2001) Signal Transduction in Maize and *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts. *Plant Physiol* **127**: 1466-1475
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823-826
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 410-417
- Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T (2003) NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* **301**: 96-99
- Siegel RS, Xue S, Murata Y, Yang Y, Nishimura N, Wang A, Schroeder JI (2009) Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J*
- Sirichandra C, Gu D, Hu HC, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, Kwak JM (2009) Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS letters* **583**: 2982-2986



- Smith TF (2008) Diversity of WD-repeat proteins. *Subcell Biochem* **48**: 20-30
- Sokol A, Kwiatkowska A, Jerzmanowski A, Prymakowska-Bosak M (2007) Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta* **227**: 245-254
- Stirnemann CU, Petsalaki E, Russell RB, Muller CW (2010) WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in biochemical sciences* **35**: 565-574
- Stocco DM (2001) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology* **63**: 193-213
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* **69**: 183-215
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* **421**: 79-83
- Sukharev S, Betanzos M, Chiang CS, Guy HR (2001) The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* **409**: 720-724
- Sukharev S, Corey DP (2004) Mechanosensitive channels: multiplicity of families and gating paradigms. *Sci STKE* **2004**: re4
- Sukharev SI, Martinac B, Arshavsky VY, Kung C (1993) Two types of mechanosensitive channels in the Escherichia coli cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophysical journal* **65**: 177-183
- Svitkina TM, Borisy GG (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *The Journal of cell biology* **145**: 1009-1026
- Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**: 25-35
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **29**: 417-426
- Tchernev VT, Mansfield TA, Giot L, Kumar AM, Nandabalan K, Li Y, Mishra VS, Detter JC, Rothberg JM, Wallace MR, Southwick FS, Kingsmore SF (2002) The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol Med* **8**: 56-64
- Tracey WD, Jr., Wilson RI, Laurent G, Benzer S (2003) painless, a Drosophila gene essential for nociception. *Cell* **113**: 261-273
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, 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. *The Plant cell* **16**: 2481-2498

## Literatur

---

- Tran LS, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20623-20628
- Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R (2008) Function of Nicotiana tabacum Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO<sub>2</sub> Permeability. *Plant Cell*
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17588-17593
- Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17306-17311
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11632-11637
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-1754
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Plant histidine kinases: an emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Sci STKE* **2001**: RE18
- van Nocker S, Ludwig P (2003) The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function. *BMC genomics* **4**: 50
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant physiology* **135**: 2318-2329
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Lauriere C, Merlot S (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *The Plant cell* **21**: 3170-3184
- Wahome PG, Setlow P (2006) The synthesis and role of the mechanosensitive channel of large conductance in growth and differentiation of Bacillus subtilis. *Arch Microbiol* **186**: 377-383
- Wahome PG, Setlow P (2008) Growth, osmotic downshock resistance and differentiation of Bacillus subtilis strains lacking mechanosensitive channels. *Arch Microbiol* **189**: 49-58
- Walker-Simmons MK, Rose PA, Shaw AC, Abrams SR (1994) The 7[prime]-Methyl Group of Abscisic Acid Is Critical for Biological Activity in Wheat Embryo Germination. *Plant physiology* **106**: 1279-1284
- Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**: 1047-1058

- Wang W, Black SS, Edwards MD, Miller S, Morrison EL, Bartlett W, Dong C, Naismith JH, Booth IR (2008) The structure of an open form of an E. coli mechanosensitive channel at 3.45 Å resolution. *Science* **321**: 1179-1183
- Wang X, Herberg FW, Laue MM, Wullner C, Hu B, Petrasch-Parwez E, Kilmann MW (2000) Neurobeachin: A protein kinase A-anchoring, beige/Chediak-higashi protein homolog implicated in neuronal membrane traffic. *J Neurosci* **20**: 8551-8565
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frey NFD, Leung J (2008) An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More ... 10.1093/mp/ssm022. *Mol Plant* **1**: 198-217
- Wilens RW, Hays DB, Mandel RM, Abrams SR, Moloney MM (1993) Competitive Inhibition of Abscisic Acid-Regulated Gene Expression by Stereoisomeric Acetylenic Analogs of Abscisic Acid. *Plant Physiol* **101**: 469-476
- Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* **25**: 195-210
- Wilson ME, Jensen GS, Haswell ES (2011) Two mechanosensitive channel homologs influence division ring placement in Arabidopsis chloroplasts. *The Plant cell* **23**: 2939-2949
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS one* **2**: e718
- Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR (2008) Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant cell* **20**: 1101-1117
- Wu WI, Yajnik J, Siano M, De Lozanne A (2004) Structure-function analysis of the BEACH protein LvsA. *Traffic* **5**: 346-355
- Wu Y, Sanchez JP, Lopez-Molina L, Himmelbach A, Grill E, Chua NH (2003) The abi1-1 mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. *Plant J* **34**: 307-315
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK (2001) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**: 2063-2083
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci* **10**: 88-94
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803
- Yamazaki D, Yoshida S, Asami T, Kuchitsu K (2003) Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **35**: 129-139
- Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Wu D, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N (2009) Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature structural & molecular biology* **16**: 1230-1236

## Literatur

---

Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **43**: 1473-1483

Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2006) ABA-Hypersensitive Germination3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among Arabidopsis Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* **140**: 115-126

Yuan X, Yin P, Hao Q, Yan C, Wang J, Yan N (2010) Single amino acid alteration between valine and isoleucine determines the distinct pyrabactin selectivity by PYL1 and PYL2. *The Journal of biological chemistry* **285**: 28953-28958

Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12359-12364

Zhang X, Garreton V, Chua NH (2005) The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* **19**: 1532-1543

Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Loewen MK, Jadhav AS, Ross AR, Taylor DC, Abrams SR (2004) A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiol* **134**: 361-369

Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, Xu YH, Zhang XY, Zhang DP (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3019-3036

**Lebenslauf****Persönliche Daten**

---

<b>Name</b>	Michał Jan Kępka
<b>Staatsangehörigkeit</b>	polnisch
<b>Geburtsdatum</b>	30.11.1982
<b>Geburtsort</b>	Ryki, Polen

**Ausbildung**

---

<b>1989-1997</b>	Grundschule Ryki, Polen
<b>1997-2001</b>	Oberschule Ryki, Polen
<b>05.2001</b>	Abitur
<b>2001-2006</b>	Studium der Biotechnologie an der Maria Curie-Sklodowska Universität, Lublin, Polen
<b>09.2005-06.2006</b>	Masterarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Maria Curie-Sklodowska Universität, Lublin, Polen
<b>06.2006</b>	Abschluss als Biotechnologe
<b>seit Januar 2008</b>	Promotion am Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität München (Wissenschaftlicher Mitarbeiter)

**Publikationen**

---

**Kępka M.**, Benson C.L., Gonugunta V.K., Nelson K.M., Christmann A., Grill E., Abrams S.R. (2011) Action of natural abscisic acid precursors and catabolites on abscisic acid receptor complexes. Plant Physiology, December 2011, Vol. 157, pp. 2108-2119

Szostkiewicz, I., Richter, K., **Kepka, M.**, Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, FF., Christmann, A., Grill, E. (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J.* 61, 25-35

### Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Grill für die Überlassung der spannenden Projekte und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl für Botanik anzufertigen. Ich danke Ihnen für Ihre Interesse an meiner Arbeit und zahlreiche, manchmal kritische aber gleichzeitig angebrachte Diskussionen und Hinweise. Herr Grill, Sie haben mir total andere Dimension der Wissenschaft gezeigt!

Herrn Dr. Alexander Christmann danke ich für seine unglaublich große Unterstützung. Alex, ich konnte von Anfang bis zum Ende der Promotion immer auf dich zählen und von Dir sehr viel lernen! Du hattest immer ein offenes Ohr für meine, manchmal auch dumme, Fragen und hast immer sie mit wahnsinniger Geduld beantwortet. Unsere gemeinsame Reise durch die Welt des Trockenstresses werde ich nie vergessen!

Mein herzlicher Dank geht an meinen Bürokameraden für die gemeinsame Zeit in der Denkhalle 204 (auch bekannt als die Zentrale des Irrenhauses): Stefanek Fuchs hat immer ein Verständnis und eine Erklärung für meine Probleme in der ausländischen Realität gehabt. Welli und Dr. Simone „Kleine“ Demmel danke ich für die endlose Fröhlichkeit.

Bei Dr. Arthur Korte möchte ich mich für gute Laune im Labor.

Claudia und Lisa, ich danke Euch für unsere Freundschaft und für das Gefühl, dass ich für Euch nicht nur ein Arbeitskollege bin!

Beate Seeliger danke ich für ihre Hilfe beim Bekämpfen der deutschen Bürokratie. Beate, Du bist mir immer hilfsbereit zur Seite gestanden. Danke schön!

Sepp, ich danke Dir, dass wir immer das gemeinsame Thema in der Bild-Zeitung gefunden haben. Und das war nicht Fußball. Vielen Dank für Lösungen meiner Probleme mit dem Rechner. Ohne Dich hätte ich wahrscheinlich bis jetzt bereits den vierten oder fünften gekauft.

Caroline möchte ich mich für die effektive Fortpflanzung meinen Pflanzen bedanken. Chrisi, Kornl und Johanna danke ich für den lustigen Alltag im Labor.

Den wichtigsten Personen in meinem Leben: meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin danke ich für ihre endlose Liebe, Unterstützung und Geduld. Ihr seid immer für mich da gewesen, auch wenn ich mich manchmal wie ein Wahnsinniger benommen habe. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen.