



Technische Universität München

Lehrstuhl für Botanik

# Identifizierung natürlicher Liganden der Abscisinsäure-Rezeptorkomplexe

Katharina Hill

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. W. Schwab

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

2. apl. Univ.-Prof. Dr. P. Schmitt-Kopplin

Die Dissertation wurde am 25. April 2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23. August 2016 angenommen.



„Auch aus Steinen, die dir in den Weg gelegt werden, kannst du etwas Schönes bauen.“

***Erich Kästner***



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	IV
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	VI
<b>Abkürzungen</b> .....	VII
Zusammenfassung.....	1
Summary .....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Der Abscisinsäure-Signalweg.....	5
1.1.1. Abscisinsäure .....	5
1.1.2. Abscisinsäurebiosynthese und Katabolismus.....	5
1.1.3. <i>Regulatory Components of ABA Receptors</i> (RCARs).....	8
1.1.4. Typ 2C Proteinphosphatasen (PP2Cs) Subklasse A .....	12
1.2. Analytische Methoden .....	14
1.2.1. Affinitätschromatografie .....	14
1.2.2. Fourier-Transform Massenspektrometrie.....	16
1.3. Zielsetzung der Arbeit .....	22
2. Ergebnisse.....	23
2.1. Etablierung einer <i>Ligand Fishing</i> Methode mit ABA-Rezeptorkomplexen.....	23
2.1.1. Regulation von PP2Cs durch RCARs und ABA .....	23
2.1.2. Immobilisierung von $\Delta$ ABI1 .....	27
2.1.3. Phosphatase-Aktivität nach Immobilisierung von $\Delta$ ABI1 .....	29
2.1.4. Quantifizierung von ABA durch HPLC.....	31
2.2. ABA-Affinitätschromatografie mit Rezeptorkomplexen .....	32
2.3. Ergebnisse der FT-MS Analyse.....	37
2.3.1. Optimierung FT-MS Analyse .....	37
2.3.2. Validierung der Funktionalität des <i>Ligand Fishing</i> Systems mit Zellextrakt.....	39
2.3.3. <i>Principal component analysis</i> (PCA) .....	42
2.3.4. Identifikation $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex spezifischer Massen.....	45
2.3.5. Identifikation $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex spezifischer Massen .....	49
2.3.6. Nachweis von <i>E. coli</i> Liganden.....	53
2.3.7. <i>Ligand Fishing</i> mit <i>aba2</i> -Zellextrakt .....	54
2.3.8. Nachweis der Liganden L298 und L385 in verschiedenen.....	55

<i>Brassicaceen</i> durch FT-MS Analyse .....	55
2.3.9. FT-MS-Analyse von Matrix-Effekten .....	57
2.3.10. Quantitative ABA-Bestimmung mit FT-MS .....	59
2.4. Charakterisierung des Liganden L298 mit HPLC und Phosphatase-Assays .....	60
2.4.1. Präparative HPLC des Liganden L298 .....	60
2.4.2. Analyse von Fraktionen des Liganden L298 in Phosphatase-Assays .....	62
2.4.3. Vergleichende Analyse auf mögliche alternative Liganden in der Ligandenfraktion .....	74
2.5. <i>Site directed mutagenesis</i> von RCAR8 .....	75
2.5.1. Phosphatase-Assays mit RCAR8 Mutanten .....	76
2.5.2. MS-Analyse mit RCAR8 Mutante S120W .....	78
2.6. Fragmentierung des potentiellen Liganden L298 .....	80
3. Diskussion .....	84
3.1. System zur Isolation von Liganden des RCAR/PP2C Rezeptorkomplexes .....	84
3.2. Potentielle Liganden der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe .....	89
3.3. Sind die potentiellen Liganden L298 und L385 echte Liganden der .....	95
RCAR/PP2C-Rezeptorkomplexe? .....	95
4. Material und Methoden .....	103
4.1. Material .....	103
4.1.1. Geräte .....	103
4.1.2. Chemikalien und Lösungsmittel .....	103
4.1.3. Oligonukleotide .....	104
4.1.4. Größenstandards .....	104
4.2. Pflanzenmaterial .....	104
4.2.1. Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Phytokammern .....	104
4.2.2. Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i> im Gewächshaus .....	104
4.2.3. Pflanzenmaterial anderer <i>Brassicaceen</i> .....	105
4.3. Molekularbiologische Methoden .....	105
4.3.1. Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung .....	105
4.3.2. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	106
4.3.3. Plasmid DNA-Präparation aus <i>E. coli</i> .....	107
4.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	108
4.3.5. <i>Back to backsite directed mutagenesis</i> (SDM) .....	109
4.3.6. Agarose-Gelelektrophorese .....	110
4.3.7. Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarose Gel .....	110
4.3.8. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen .....	110

4.3.9. Dephosphorylierung von geschnittener Vektor DNA.....	111
4.3.10. Ligation von DNA-Fragmenten .....	111
4.3.11. DNA-Sequenzierung .....	111
4.4. Proteinbiochemische Methoden.....	111
4.4.1. Proteinexpression.....	111
4.4.2. Proteinaufreinigung und Dialyse.....	112
4.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	113
4.4.4. Coomassie-Färbung .....	114
4.4.5. Phosphatase-Aktivitätsassay .....	114
4.4.6. <i>Ligand Fishing</i> Affinitätschromatographie mit Affi 15 gel.....	115
4.4.7. Bradford Proteinbestimmungsassay .....	118
4.5. Analytische Methoden .....	119
4.5.1. Aufreinigung von Metaboliten aus Pflanzenmaterial .....	119
4.5.2. <i>Reversed phase</i> HPLC.....	120
4.5.3. DI-ICR-FT/MS Analyse.....	120
4.5.4. Auswertung der MS-Daten.....	121
5. Literaturverzeichnis.....	123
6. Anhang.....	139
6.1. Klonierte Konstrukte .....	139
6.2. <i>E.coli</i> Liganden L389 und L422 in MS-Analyse der RCAR8 Mutante S120W .....	141
6.3. Fragmentierung von <i>E.coli</i> Ligand L403.....	142
6.4. Strukturvorschläge für den Liganden L298 (C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> ) –Quelle Chemspider.....	143
6.5. Strukturvorschläge für den Liganden L385 – Quelle Chemspider.....	158
Danksagung .....	162
Lebenslauf .....	163

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Struktur von (S)-ABA .....	5
Abb. 2 Abscisinsäure-Biosynthese.....	6
Abb. 3 Abscisinsäure Katabolismus.....	7
Abb. 4 Die RCAR Proteinfamilie.....	8
Abb. 5 RCAR13 Apo-Protein und RCAR13 mit ABA .....	9
Abb. 6 Sequenzhomologie zwischen Bet V 1a und RCAR1.....	9
Abb. 7 Bindung von Pyrabactin und ABA in der Bindetasche von RCAR11.....	10
Abb. 8 Gegenüberstellung der Strukturen von ABA, Pyrabactin und Quinabactin.....	11
Abb. 9 Die PP2C Proteinfamilie in Arabidopsis .....	12
Abb. 10 Interaktion zwischen RCAR12 und ABI1.....	13
Abb. 11 Regulation des ABA-Signalweges.....	14
Abb. 12 Kopplung von Proteinen an Affi 15 gel über primäre Aminogruppen.....	15
Abb. 13 Struktur des Nickel-Chelats einer His <sub>6</sub> -tag-Säule.....	15
Abb. 14 Allgemeiner Aufbau Elektrospray Ionisation .....	17
Abb. 15 Modelle der Evaporation in Elektrospray Ionisation .....	18
Abb. 16 Umrechnung einer Ionen-Frequenz in ein Massenspektrum durch Fourier Transformation .	19
Abb. 17 Bestimmung des Reinheitsgrades rekombinant gereinigter Proteine.....	24
Abb. 18 Regulation der PP2Cs ABI1, $\Delta$ ABI1 und ABI2 durch die RCARs 8 und 11 ohne ABA .....	25
Abb. 19 Regulation der PP2Cs ABI1 , $\Delta$ ABI1 und ABI2 mit den RCARs 8 und11 und ABA.....	26
Abb. 20 Bestimmung eines geeignetenPP2C-RCAR Verhältnisses für die Affinitätschromatografie....	27
Abb. 21 Überprüfung der Bindungsaffinität von $\Delta$ ABI1 für die Affinitätsmatrix Affi 15.....	28
Abb. 22 Immobilisierung der Proteinphosphatase $\Delta$ ABI1 an die Affinitätsmatrix.....	29
Abb. 23 Phosphatase-Aktivität von $\Delta$ ABI1 nach Immobilisierung.....	30
Abb. 24 ABA Analyse durch HPLC.....	31
Abb. 25 ABA-Kalibrierung.....	32
Abb. 26 Optimierung des Waschpuffers der Affinitätschromatografie .....	33
Abb. 27 ABA-Anreicherung durch den $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex .....	34
Abb. 28 ABA-Anreicherung in RCAR11-Rezeptorkomplex .....	36
Abb. 29 Bestimmung der optimalen Probenverdünnung für die FT-MS Analyse .....	37
Abb. 30 Einfluss der Scanzahl auf Peak-Intensität und Peakanzahl in der FT-MS Analyse .....	38
Abb. 31 ABA Anreicherung in PP2C/RCAR Rezeptorkomplexen mit Arabidopsis Zellextrakt.....	39
Abb. 32 ABA in <i>Brassicaceen</i> .....	40
Abb. 33 Trockengewichtsbestimmung von fünf <i>Brassicaceen</i> .....	41
Abb. 34 ABA Anreicherung in PP2C/RCAR Rezeptorkomplexen mit Wirsing Zellextrakt.....	42

Abb. 35 <i>Principal Component Analysis</i> (PCA) mit 4 Versuchsklassen .....	43
Abb. 36 Scatter Plot von <i>Principal Component</i> Analyse (PCA) mit drei Versuchsklassen .....	44
Abb. 37 <i>Hierarchical Clustering</i> Analyse für statistischen Vergleich von $\Delta$ ABI1 und $\Delta$ ABI1/RCAR8 .....	45
Abb. 38 Prozessierung der Liste potentieller Liganden des $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes .....	46
Abb. 39 L298 Peak in der Analyse von $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und $\Delta$ ABI1 Kontrolle .....	47
Abb. 40 L385 Peak in der Analyse von $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und $\Delta$ ABI1 Kontrolle .....	48
Abb. 41 HCE-Profil für den statistischen Vergleich von $\Delta$ ABI1 und $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex .....	49
Abb. 42 Prozessierung der Liste potentieller Liganden des $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplexes .....	50
Abb. 43 L298 Peak im Vergleich von $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex gegen $\Delta$ ABI1 Kontrolle.....	51
Abb. 44 L385 Peak im Vergleich von $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex gegen $\Delta$ ABI1 Kontrolle.....	52
Abb. 45 Identifizierung von <i>E.coli</i> Liganden durch FT-MS Analyse .....	53
Abb. 46 <i>Ligand Fishing</i> mit <i>aba2</i> Zellextrakt .....	54
Abb. 47 FT-MS Analyse von ABA und den Liganden L298 und L385 in <i>Brassicaceen</i> .....	56
Abb. 48 Ionensuppression von L385 in Wirsing Zellextrakt in FT-MS Analyse.....	57
Abb. 49 Matrix-Effekte in der FT-MS Analyse .....	58
Abb. 50 ABA-Quantifizierung in Zellextrakt und $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex in FT-MS.....	59
Abb. 51 Reinigung des Liganden L298 durch präparative HPLC.....	61
Abb. 52 Schema der Probennahme der präparativen HPLC .....	63
Abb. 53 Rezeptorkomplex-Assays mit Fraktionen der Affinitätschromatografie Versuch 1 .....	64
Abb. 54 Rezeptorkomplex Assays mit Fraktionen der Affinitätschromatografie Versuch 2.....	66
Abb. 55 Rezeptorkomplex Assays mit Fraktionen der Affinitätschromatografie Versuch 3.....	68
Abb. 56 ABA- und L298 Signale nach FT-MS Analyse mit Fraktionen der Affinitätschromatografie .....	70
Abb. 57 Ionensuppression durch Kontamination mit langkettigen Fettsäuren.....	71
Abb. 58 Bestimmung der ABA-Menge in der ABA-Fraktion durch Abgleich mit ABA-Standardkurve ..	72
Abb. 59 Mögliche alternative Liganden in der Ligandenfraktion .....	74
Abb. 60 Aminosäure <i>Alignment</i> der RCARs.....	76
Abb. 61 Voruntersuchung mit RCAR8 Mutanten auf Regulierung der Phosphatase ABI1 mit ABA .....	77
Abb. 62 ABA-Standardreihen mit RCAR8 wt und RCAR8 Mutanten .....	78
Abb. 63 FT-MS-Analyse von $\Delta$ ABI1, $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W Komplex.....	79
Abb. 64 Isolierung des Liganden L298 in der FT-MS .....	81
Abb. 65 Fragmentierung des Liganden L298 in FT-MS.....	82
Abb. 66 Inhibierung von drei PP2Cs mit elf RCARs und ABA, Pyrabactin und Quinabactin.....	85
Abb. 67 Unterschiedliche Affinität von RCARs für die Liganden ABA, Pyrabactin und Quinabactin .....	86
Abb. 68 ABA-Signal in Bezug auf Trockengewicht.....	89

## Verzeichnisse

---

Abb. 69 Signalintensitäten von ABA, L298 und L385 in <i>Brassicaceen</i> .....	93
Abb.70 Potentieller Ligand L385 in Wirsing-Zellextrakt.....	94
Abb. 71 <i>Site directed mutagenesis</i> von RCAR14 .....	97
Abb. 72 <i>Site directed mutagenensis</i> der Aminosäuren K87 und S120 in RCAR8.....	98
Abb. 73 Vergleichende FT-MS-Analyse der RCAR8 Mutante S120W .....	99
Abb. 74 Strukturvorschläge für den potentiellen Liganden L298 .....	100
Abb. 75 Rezeptorkomplex-Assays mit Picein als möglicher Ligand der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe .....	101
Abb. 76 Abbau von Resveratrol-4-Glucosid durch Oxidation .....	101
Abb. 77 Enzymatische Hydrolyse von Methylumbelliferylphosphat .....	114
Abb. 78 Kopplungseffizienz der Affinitätsmatrizen Affi 10 Gel und Affi 15 Gel.....	115
Abb. 79 Schema 1 <i>Ligand-Fishing</i> .....	117
Abb. 80 Shema 2 <i>Ligand-Fishing</i> .....	118
Abb. 81 Chromatogramm mit Satellitenpeaks.....	122

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Liganden der BetV1-like-Superfamilie (überarbeitet nach Radauer <i>et al.</i> 2008) .....	10
Tab. 2 Begrenzung der Elemente für Summenformeln in bestimmten Massenbereichen (Kind <i>et al.</i> 2007)© .....	19
Tab. 3 Die am häufigsten beobachteten Verhältnisse zwischen Heteroatomen und Kohlenstoff (Kind <i>et al.</i> 2007)© .....	21
Tab. 4 Regeln für die Zusammensetzung von Formeln mit mehreren Heteroatomen (Kind <i>et al.</i> 2007)© .....	21
Tab. 5 Proteinausbeuten nach Reinigung von ABI1, $\Delta$ ABI1, ABI2, RCAR8 und RCAR11.....	24
Tab. 6 Daten zu Restaktivität, Inhibition und Kontamination der immobilisierten Phosphatase $\Delta$ ABI1 .....	31
Tab. 7 ABA Bindekapazität der immobilisierten ABA-Rezeptorkomplexe .....	35
Tab. 8 $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex spezifische Massen.....	46
Tab. 9 Anreicherung der Liganden ABA, L298 und L385 mit $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex .....	49
Tab. 10 Anreicherung der Liganden ABA, L298 und L385 mit $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex .....	52
Tab. 11 Berechnung der ABA-Kontamination für Versuch 3.....	73
Tab. 12 Anreicherung möglicher Liganden in der Ligandenfraktion gegenüber Kontrollfraktion und ABA-Fraktion .....	75
Tab. 13 Proteinausbeuten aus der Expression der RCAR8 Mutanten.....	77
Tab. 14 Fragmentierung des Liganden L298 .....	82
Tab. 15 Liste von Liganden der RCAR8/RCAR11-Rezeptorkomplexe mit prädiktiven Summenformeln .....	91
Tab. 16 Mögliche alternative Liganden in der Ligandenfraktion .....	96
Tab. 18 Liste der verwendeten Geräte.....	103
Tab. 19 <i>E.coli</i> -Stämme.....	105
Tab. 20 Antibiotika .....	105
Tab. 21 PCR-Ansatz.....	108
Tab. 22 PCR-Programm .....	108
Tab. 23 PCR-Programm <i>twostep</i> PCR .....	108
Tab. 24 Ansatz für SDM-PCR.....	109
Tab. 25 PCR-Programm für SDM .....	109
Tab. 26 Ansatz für Inkubation mit T4 PolynukleotidKinase und DpnI.....	109
Tab. 27 SDS-PAGE Gel Ansatz .....	113
Tab. 28 Bradford BSA-Standard.....	119
Tab. 29 HPLC ABA-Standardreihe.....	120

### Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyssäure
ABA	Abscisinsäure ( <i>abscisic acid</i> )
Abb.	Abbildung
ABI	Abscisinsäure-insensitiv
ABRE	<i>ABA-Response Element</i>
AHG	<i>ABA-Hypersensitive Germination</i>
Amp	Ampicillin
AREB	<i>ABA-Response Element Binding Protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Col	Ökotyp Columbia
C-Terminus	Carboxyterminus
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrosprayionisation
et al.	und andere (lateinisch)
EtBr	Ethidiumbromid
eV	Elektronenvolt
FT	Fourier-Transformation
g	Erdbeschleunigung ( $1g=9,81 \text{ m/s}^2$ )
GC	Gaschromatographie
h	Stunde ( <i>hora</i> )
HAB	<i>Hypersensitive to ABA</i>
HAI	Highly ABA-induced
HCE	Hierarchical Clustering Explorer

ICR	Ionen-Zyklotronresonanz ( <i>ion cyclotron resonance</i> )
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Nährmedium
LC	Flüssigchromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
M	mol/l
m	Masse
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min.	Minute
MS	Massenspektrometrie
MUP	Methylumbelliferylphosphat
nkatal	nano katal (Einheit der Enzymaktivität)
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PP2C	Proteinphosphatase des Typs 2C
ppm	10 <sup>-6</sup> ( <i>parts per million</i> )
PYR1/PYL	<i>Pyrabactin-Resistant 1/Pyrabactin-Resistant Like</i>
RCAR	<i>Regulatory Component of ABA Receptor</i>
RNA	RNA Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	reverse Transkriptase
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett

## Verzeichnisse

---

z Ladungszahl

z.B. zum Beispiel

## Zusammenfassung

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) spielt bei der Regulation von Trockenstress bei Pflanzen eine Schlüsselrolle. Durch den Effekt der Globalerwärmung und dem daraus resultierenden Bedarf an trockenheitstoleranten Kulturpflanzen, ist die Erforschung des ABA-Signalweges verstärkt in den Fokus der Pflanzenwissenschaft gerückt. Im Jahr 2009 wurde der ABA-Rezeptorkomplex, welcher sich aus *regulatory component of ABA-receptor/pyrabactin insensitive 1/ pyrabactin insensitive 1-like* (RCARs/PYR/PYLs) und den Proteinphosphatasen der Klasse 2C (PP2Cs) zusammensetzt, entdeckt.

Diese Dissertation befasst sich mit der Isolierung und Identifikation neuer Liganden der ABA-Rezeptorkomplexe. Zunächst wurde *Ligand Fishing* System basierend auf einer Zwei-Komponenten Affinitätschromatografie entwickelt. Dazu wurde in einem Rekonstruktionsexperiment die verkürzte PP2C  $\Delta$ ABI1 kovalent an einer Affinitätsmatrix immobilisiert. In einem zweiten Schritt wurde mobiles RCAR mit ABA als Ligand inkubiert und anschließend zu der  $\Delta$ ABI1-Matrix gegeben. Durch vergleichende *reversed-phase*-HPLC konnte eine Anreicherung von ABA in dem  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex gegenüber der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle festgestellt werden. Die etablierte Methode wurde mit Pflanzenzellextrakten durchgeführt, um neue Liganden des Rezeptorkomplexes zu identifizieren. Zur vergleichenden Analyse der Proben wurde Fourier-Transform Massenspektrometrie (FT-MS) aufgrund der notwendigen hohen Sensitivität und Auflösung verwendet. Es konnte festgestellt werden, dass auch unter Verwendung von Zellextrakten aus *Brassica oleracea* eine Anreicherung von ABA in den Rezeptorkomplex-Proben nachweisbar war. Die *Ligand Fishing* Methode war demnach mit ABA aus pflanzlichen Zellextrakten funktional. Unter Anwendung dieses Verfahrens konnten zusätzlich zu ABA die neuen Liganden L298 und L385 isoliert werden. Versuche mit RCAR8 oder RCAR11 als Bindungspartner zeigten eine unterschiedliche Bindung der Liganden an die jeweiligen Rezeptorkomplexe. Es stellte sich heraus, dass der RCAR/PP2C Rezeptorkomplex mit RCAR11 eine geringere Affinität für den Liganden L298 aufwies. In weiteren Studien konnte festgestellt werden, dass die gefundenen Liganden in anderen *Brassicaceen* ebenfalls vorhanden waren. Durch präparative *reversed-phase*-HPLC wurde der Ligand L298 gereinigt. *In vitro* Untersuchungen mit Phosphatase-Assays unter Verwendung von Fraktionen des Liganden L298 ergaben, dass dieser Ligand den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex vergleichbar wie ABA regulierte. In weiteren Analysen wurde geprüft, ob L298, L385 und ABA die selbe RCAR-Bindestelle teilen. Dazu wurde die konservierte Aminosäure Serin an der Position 120 im Bindezentrum von RCAR8 gegen Tryptophan (W) und Phenylalanin (F) ausgetauscht. Die RCAR8 Mutanten S120W und S120F zeigten in Phosphatase-Assays keine ABA vermittelte Inhibierung der Proteinphosphatasen. Analysen mit  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex,

## Zusammenfassung

---

$\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W Mutanten-Komplex und der Kontrolle  $\Delta$ ABI1 belegten, dass keine Anreicherung von ABA und L385 mit der RCAR8 Mutante S120W stattfand. Im Gegensatz dazu wurde für den Liganden L298 eine Anreicherung an den Komplex aus  $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W festgestellt.

Die Befunde legen nahe, dass zwei neue Liganden aus Zellextrakten der *Brassicaceen* für die RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe isoliert werden konnten. Die RCAR-vermittelte Regulierung der PP2C Aktivität mit L298 ist vergleichbar mit der von ABA und spielt daher möglicherweise eine Rolle bei der Regulation des RCAR/PP2C Rezeptorkomplexes *in vivo*.

## Summary

The phytohormone abscisic acid (ABA) is a key regulator of drought stress in plants. Due to the effects of global warming, there has been an increasing demand for drought tolerant crops. This has led to extensive research on the ABA-signaling pathway. The ABA receptor was discovered in 2009 as a complex between proteins of the RCAR/PYR/PYL family and protein phosphatases type 2C (PP2Cs).

The major objective of this thesis was the isolation and identification of novel ligands of the ABA-receptor complex. To this end a ligand-fishing assay based on two component affinity chromatography was developed. In a reconstitution experiment, a truncated version of the PP2C ABI1 ( $\Delta$ ABI1) was covalently immobilized on an affinity matrix. A second step consisted of adding mobile RCAR incubated with ABA to the  $\Delta$ ABI1 affinity matrix. Using comparative HPLC analysis, it was found that ABA was enriched specifically in the receptor complex samples ( $\Delta$ ABI1+RCAR+ABA) compared to the control ( $\Delta$ ABI1 alone+ABA). The established method was applied using plant cell extracts to validate the functionality of the ligand fishing system, using the known ABA ligand as a control. For comparative analysis, Fourier-Transform mass spectrometry (FT-MS) was applied as it provided the required sensitivity and mass resolution. It was found that ABA from brassica plant cell extracts could be enriched in receptor complex samples compared to controls. Therefore, the method was used to identify the hitherto unknown ligands L298 and L385 from plant cell extracts. Experiments with RCAR8 and RCAR11 as binding partners showed different binding of the respective ligands for the two RCAR/PP2C complexes. Further studies provided evidence that the new ligands could be found in several brassica. Using preparative reversed phase-HPLC, the ligand L298 was purified. *In vitro* phosphatase assays using different L298 fractions showed that ABA and L298 had similar properties as ligands of the ABA receptor complexes. Based on these results, experiments were conducted to find out whether L298, L385 and ABA shared the same binding site in RCARs. Site directed mutagenesis was used to exchange the conserved amino acid serine at position 120 for tryptophane (W) and phenylalanine (F) in RCAR8 to abolish ABA-binding. In preliminary studies, the RCAR8 mutants were tested for ABA-dependent regulation in phosphatase assays. The RCAR8 mutants S120W and S120F showed no ABA-dependent inhibition of the protein phosphatases. Based on this finding, ligand binding to the  $\Delta$ ABI1/RCAR8 receptor complex, the  $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W mutant complex and to  $\Delta$ ABI1 as a control was analyzed. ABA and L385 did not bind to the  $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W mutant complex. In contrast L298 was considerably enriched in the  $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W mutant complex as compared to the  $\Delta$ ABI1/RCAR8 complex and the  $\Delta$ ABI1 control.

## **Summary**

---

The results of this thesis indicated that two new ligands of the RCAR/PP2C receptor complex were found in plant cell extracts. RCAR-mediated L298 regulation of PP2C activity was comparable to that of ABA, suggesting that the ligand might be involved in the regulation of the RCAR/PP2C receptor complex *in vivo*.

## 1. Einleitung

### 1.1. Der Abscisinsäure-Signalweg

#### 1.1.1. Abscisinsäure

In den Jahren 1963 und 1968 wurde Abscisinsäure (ABA, Abb. 1) in Baumwollpflanzen entdeckt und erstmals beschrieben (Ohkuma *et al.* 1963, Addicott *et al.* 1968). Damals wurde die Säure als Antagonist zu Auxin gehandelt und in Zusammenhang mit der Abscission von Blättern gebracht. Heute wird die Funktionalität der ABA vor allem in der Samenruhe, der Regulation der Schließzellen, der Keimung, der Steuerung des Pflanzenwachstums und im Trockenstress gesehen (Finkelstein *et al.* 2002, Mishra *et al.* 2006, Schroeder *et al.* 2001). Vor allem in Bezug auf Samenruhe wird Gibberellinsäure als Gegenspieler beschrieben (Amen *et al.* 1968).

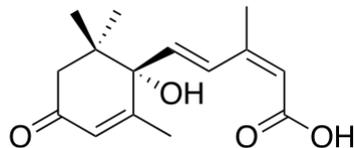


Abb. 1 Struktur von (S)-ABA

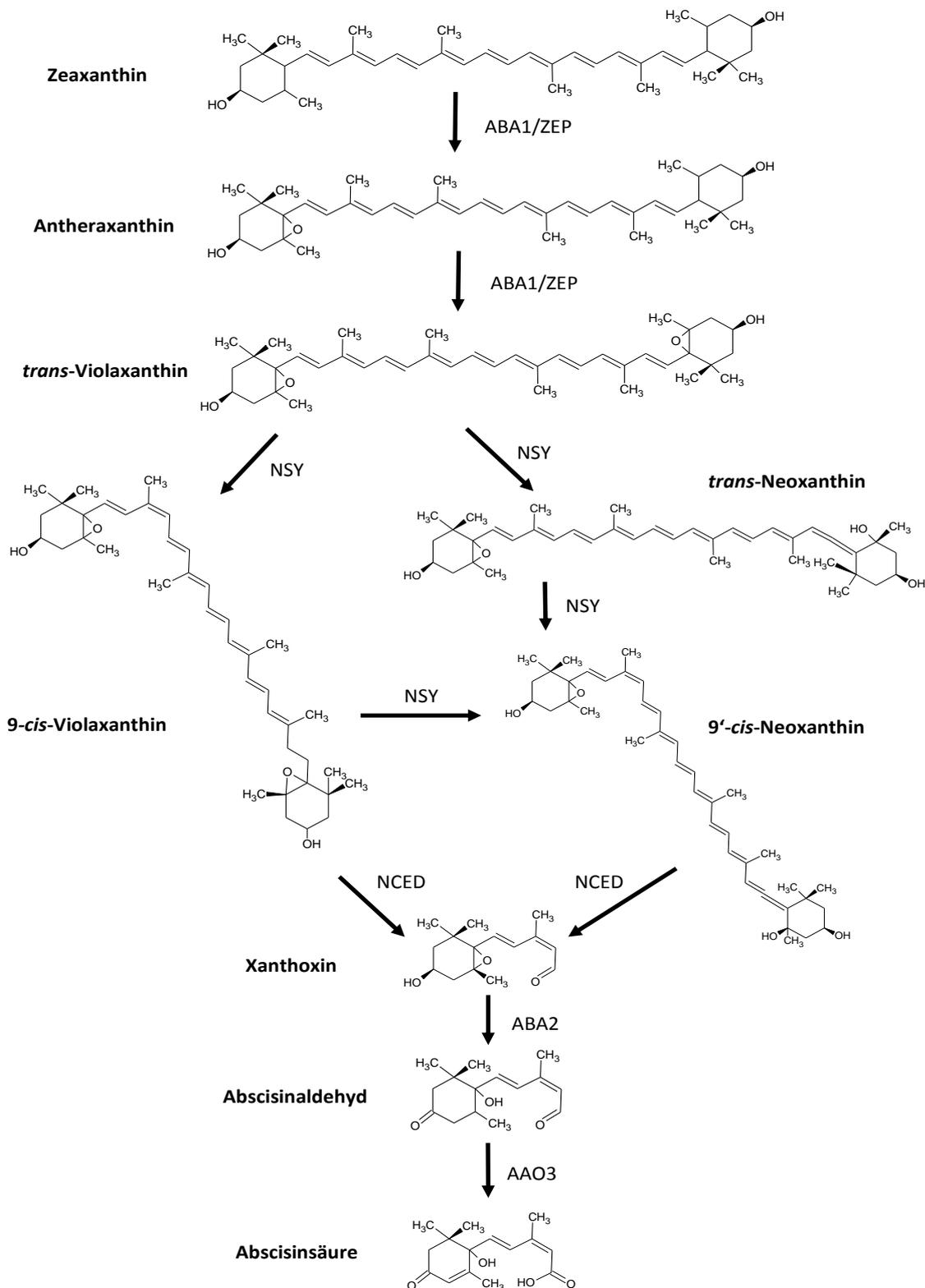
ABA wird auch eine Funktion im Menschen zugeschrieben (Bruzzone *et al.* 2007). Angeblich wird sie in den Granulocysten gebildet und übernimmt die Funktion eines Cytokins und ist somit an der Immunantwort beteiligt (Bruzzone *et al.* 2007). Zudem hat ABA einen positiven Einfluss auf die Ausschüttung von Insulin aus den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (Bruzzone *et al.* 2008).

#### 1.1.2. Abscisinsäurebiosynthese und Katabolismus

Die Synthese von ABA findet in den Wurzelzellen, den Parenchymzellen des Leitgewebes und in den Schließzellen der Blätter von Pflanzen statt (Christmann *et al.* 2005, Nambara *et al.* 2005). Die Prozessierung von C<sub>40</sub>-Epoxy-Carotinoiden (Zeevaart *et al.* 1988, Li *et al.* 1990) bis zur ABA-Vorstufe Xanthoxin erfolgt in den Plastiden (Schwartz *et al.* 2003). Die weitere ABA-Synthese findet ausgehend von Xanthoxin im Cytosol statt. Die genaue Synthese (Abb.2) gestaltet sich wie folgt: Zunächst werden die C<sub>40</sub>-Epoxy-Carotinoide Zeaxanthin, Antheraxanthin und *trans*-Violaxanthin durch die Zeaxanthin Epoxydase ABI1 ineinander umgewandelt. Anschließend werden diese durch die Neoxanthin Synthase NSY zu 9-*cis*-Violaxanthin bzw. 9-*cis*-Neoxanthinprozessiert. Im Anschluss daran werden 9-*cis*-Violaxanthin und 9-*cis*-Neoxanthin durch 9-*cis*-Epoxy-carotenoid Dioxigenase (NCED) gespalten in *cis*-Xanthoxin und eine C<sub>25</sub>-Verbindung (Schwartz *et al.* 2001). Das Xanthoxin wird anschließend in das Cytosol transportiert und dort durch die Xanthoxin Dehydrogenase ABI2 (Gonzalez-Guzman *et al.*

## Einleitung

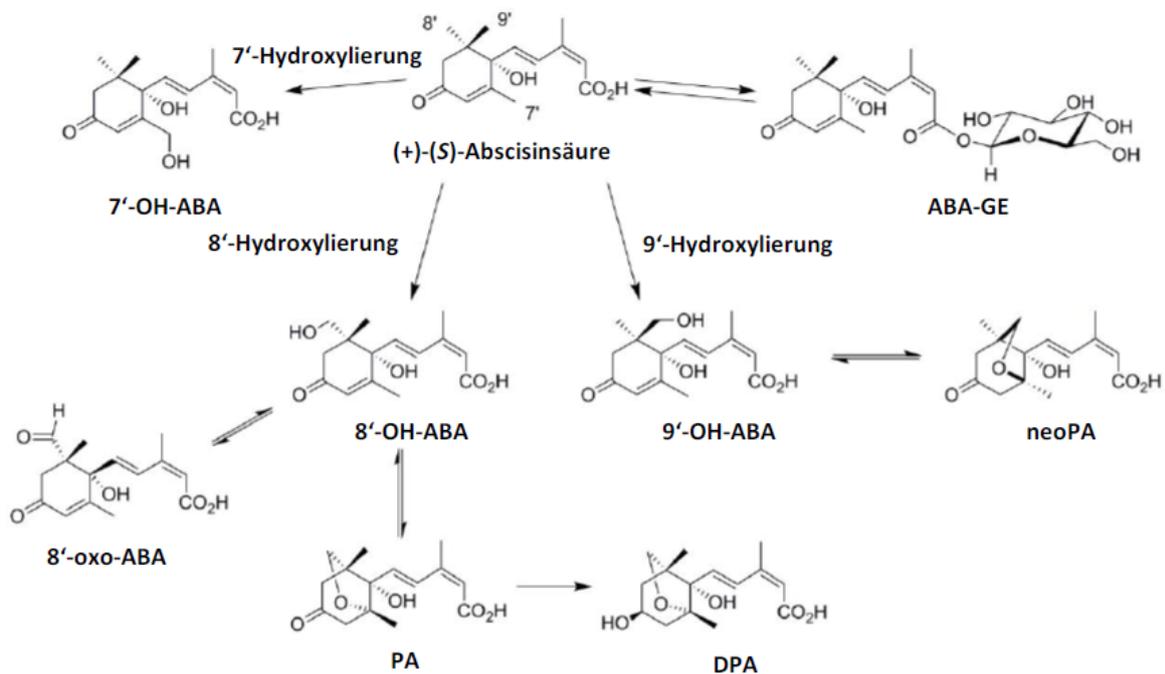
2002) in Abscisin Aldehyd umgewandelt. Die Abscisin Aldehyd Oxidase AAO3 (Seo *et al.* 2000) oxidiert dann das Aldehyd zu Abscisinsäure.



**Abb. 2 Abscisinsäure-Biosynthese**

Die Abbildung wurde nach (Schwartz *et al.* 2003) modifiziert. Die an der Synthese beteiligten Enzyme sind Zeaxanthin Epoxidase (ABA1/ZEP), Neoxanthin Synthase (NSY), 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxigenase (NCED), Xanthoxin Dehydrogenase (ABA2) und Abscisin Aldehyd Oxidase (AAO3).

Der Abbau von Abscisinsäure erfolgt durch Hydroxylierung der 7', 8'-und 9' -Methylgruppen (Kepka *et al.* 2011, Abb. 3). Die Hydroxylierung der 8'-Methylgruppe wird durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysiert. Das Produkt dieser Reaktion isomerisiert zu Phaseinsäure (PA) und wird dann durch eine nicht bekannte Reduktase zu Dihydroxyphaseinsäure umgewandelt (Krochko *et al.* 1998). Durch Konjugation von Glukose an ABA und seine Katabolite kommt es zur Bildung von ABA-Glucose-Estern. Diese Verbindung ist auch als Transport- und Lagerungsform von ABA bekannt (Jiang *et al.* 2008, Wilkinson *et al.* 2002). Durch die stress-aktivierte  $\beta$ -Glucosidase AtBG1 wird das inaktive ABA-Konjugat (ABA-GE) zurück in seine aktive Form umgewandelt (Lee *et al.* 2006).



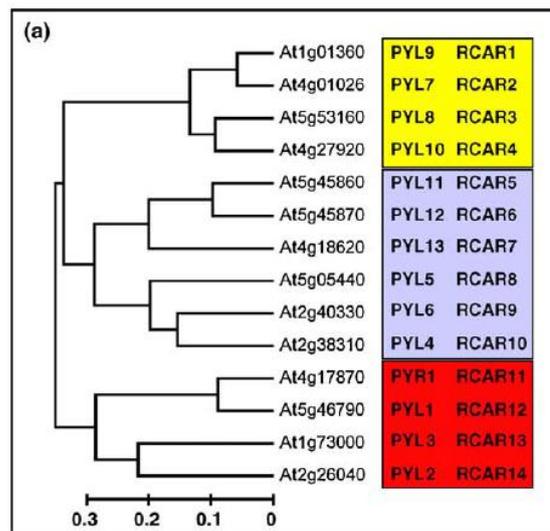
**Abb. 3 Abscisinsäure Katabolismus**

Die Abbildung wurde nach Kepka *et al.* 2011 modifiziert.

### 1.1.3. Regulatory Components of ABA Receptors (RCARs)

Im Jahr 2009 wurden *Regulatory Components of ABA Receptors* (RCARs) auch bekannt als *Pyrabactin Resistant1/Pyrabactin Resistant 1-Like* (PYR/PYL) als ABA Rezeptoren identifiziert (Ma *et al.* 2009, Park *et al.* 2009).

Die RCARs gehören zu einer Proteinfamilie bestehend aus 14 Mitgliedern (Abb. 4), die sich in 3 Unterklassen basierend auf ihrer Sequenz einteilen lassen (Raghavendra *et al.* 2010).

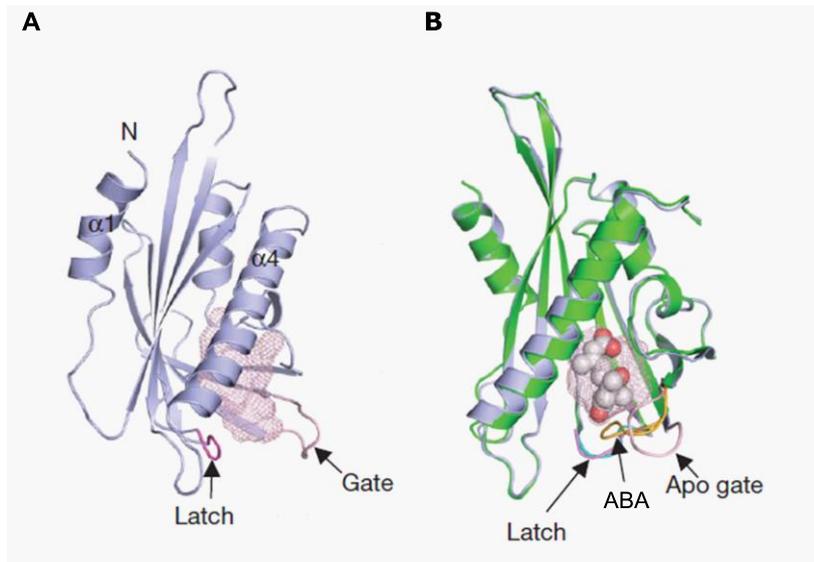


**Abb. 4 Die RCAR Proteinfamilie**

Die Abbildung wurde von Raghavendra *et al.* 2010 übernommen. Dargestellt sind die 14 Mitglieder der RCAR-Familie eingeteilt in 3 Unterklassen (gelb, blau und rot) basierend auf ihrer Sequenz.

Alle Rezeptoren dieser Familie sind in der Lage ABA zu binden (Fujii *et al.* 2009, Fuchs *et al.* 2014). Zunächst wurde angenommen, dass RCAR7 keine ABA bindet (Li *et al.* 2013, Zhao *et al.* 2013). Im Jahr 2014 konnte nachgewiesen werden, dass auch RCAR7 ein ABA Rezeptor ist (Fuchs *et al.* 2014).

Ausgehend von der Entdeckung der RCARs 2009 wurden zahlreiche Kristallstrukturen der ABA-Rezeptoren veröffentlicht (Melcher *et al.* 2009, Miyazono *et al.* 2009, Nishimura *et al.* 2009, Peterson *et al.* 2010, Santiago *et al.* 2009, Sun *et al.* 2012). Dabei konnten sowohl das apo-Protein ohne ABA, sowie der Rezeptor mit ABA kristallisiert werden (Abb. 5).



**Abb. 5 RCAR13 Apo-Protein und RCAR13 mit ABA**

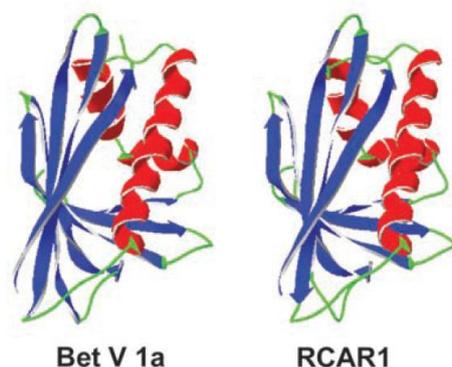
Die Abbildung von Melcher *et al.* 2009 wurde überarbeitet.

A: Apo-Form von RCAR13 mit offenem „Gate“ und „Latch“

B: zeigt eine Überlagerung von apo-RCAR13 und RCAR13 mit ABA. Es ist zu sehen, dass das „Gate“ (gelb) sich über dem gebundenen ABA schließt.

In der Apo-Form ist die Bindestelle des Rezeptors offen und erlaubt die Bindung von Liganden (Abb. 5, A). Durch die Bindung von ABA kommt es bei RCAR zu einer Änderung der Konformation. Die  $\beta$ 3- $\beta$ 4 Schleifen, sowie die  $\beta$ 5- $\beta$ 6 Schleifen schließen sich über ABA (Abb. 5, B gelb und cyan). Dieser Mechanismus wird auch als „Gate-latch-lock“ Mechanismus bezeichnet (Melcher *et al.* 2009).

RCARs gehören zur BetV1-like-Superfamilie (Ma *et al.* 2009, Radauer *et al.* 2008). Die Sequenzhomologie zwischen Bet V 1a als Vertreter dieser Familie und RCAR1 ist in der folgenden Abbildung (Abb. 6) dargestellt.



**Abb. 6 Sequenzhomologie zwischen Bet V 1a und RCAR1**

Die Abbildung wurde aus Ma *et al.* 2009 übernommen. Dargestellt sind die Übereinstimmungen zwischen Bet V 1a als Vertreter der Bet VI-like-Superfamilie und RCAR1.

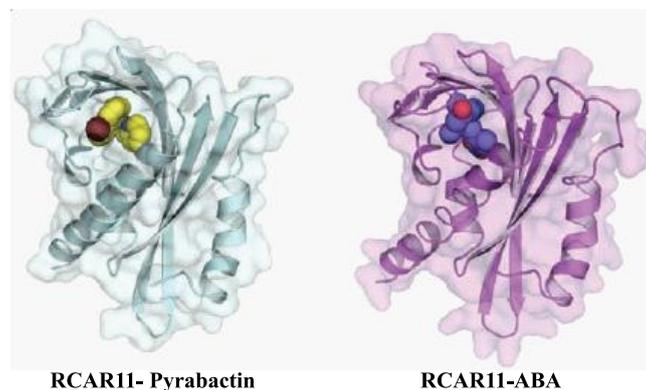
## Einleitung

Das Besondere an der BetV1-like-Superfamilie ist, dass deren Vertreter verschiedene niedermolekulare Liganden binden können (Radauer *et al.* 2008, Tab.1).

**Tab. 1** Liganden der BetV1-like-Superfamilie (überarbeitet nach Radauer *et al.* 2008)

Stoffklasse	Ligand	Familie	Unterfamilie, Protein
<b>Membranlipide</b>	Phosphatidylcholin	START	Phosphatidylcholin Transfer Protein
	Phosphatidylcholin	PITP	PITP
	Phosphatidylinositol	PITP	PITP
	Ceramide	START	Ceramid bindenden Proteinen
<b>Pflanzenhormone</b>	Cholesterol	START	STAR
	Brassinosteroide	Bet V I	PR-10 CSBP
	Cytokinine	Bet V I	Bet V I, PR-10c UBP34
<b>Sekundärmetabolite</b>	Flavonoide	Bet V I	Bet V I, PR-10c
	Dopamine und 4-Hydroxyphenylacetaldehyde	Bet V I	(S)-Norocclaurin Synthasen
	Emodin	Bet V I	Hyp-I
	Polyketide	Polyketid Cyclasen	Polyketid Cyclasen
	Enediyne	CaIC-verwandt	CaIC
<b>Polycyclische aromatische Hydrocarbone</b>	Polycyclische aromatische Hydrocarbone	Ring-Hydroxylasen Alphakette Homodimerische Ring-Hydroxylasen	

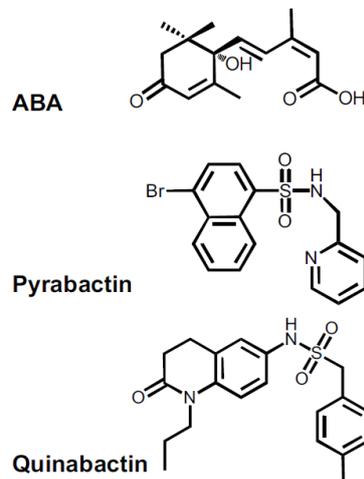
Bei einem *Screening* wurde im Jahr 2007 ein synthetischer Ligand gefunden, der ABA-ähnliche physiologische Reaktionen bei den Versuchspflanzen hervorrief (Zhao *et al.* 2007). Dabei handelte es sich um die Substanz Pyrabactin. Später konnte nachgewiesen werden, dass Pyrabactin und ABA sich in derselben Bindetasche anlagern (Peterson *et al.* 2010, Abb. 7).



**Abb. 7** Bindung von Pyrabactin und ABA in der Bindetasche von RCAR11

Die Abbildung wurde aus Peterson *et al.* 2010 entnommen. Es ist zu sehen, dass sowohl ABA als auch Pyrabactin dieselbe Bindestelle haben.

Im Jahr 2013 bzw. 2014 wurde parallel von zwei Arbeitsgruppen ein weiterer synthetischer Ligand für RCAR11 gefunden. Er wurde Quinabactin bzw. AM1 genannt (Cao *et al.* 2013, González-Guzmán *et al.* 2014, Okamoto *et al.* 2013). Auch diese Substanz verursachte die gleichen physiologischen Reaktionen wie ABA. Abb. 8 zeigt die Unterschiede zwischen den synthetischen Liganden und ABA.



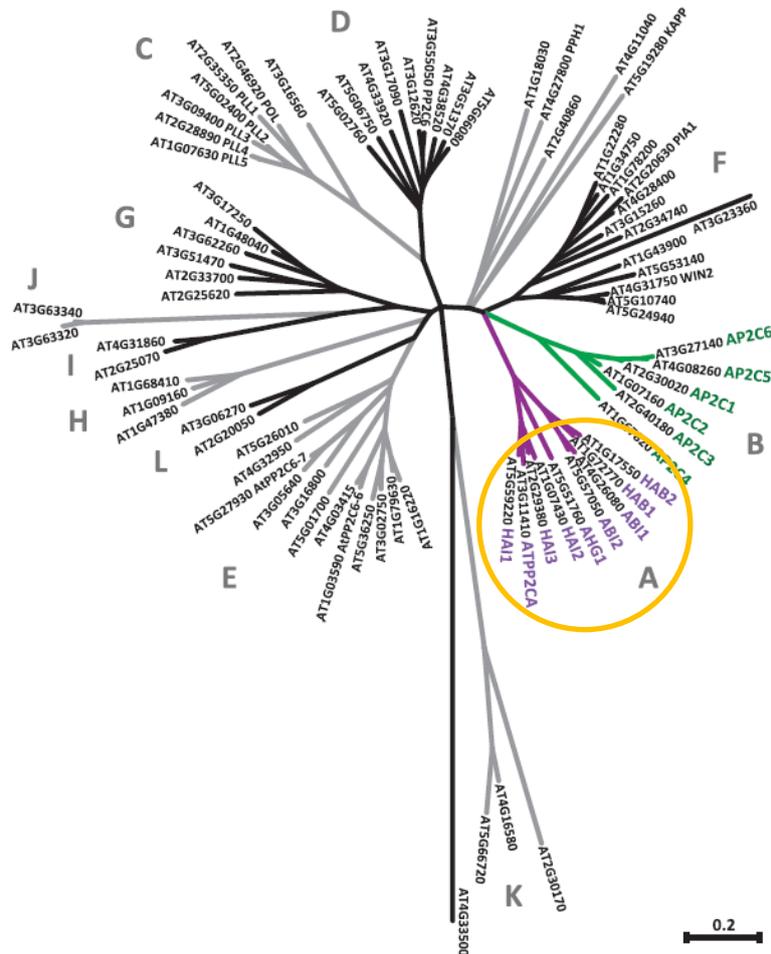
**Abb. 8 Gegenüberstellung der Strukturen von ABA, Pyrabactin und Quinabactin**

Die Abbildung stammt aus der Veröffentlichung von Okamoto *et al.* 2013. Es ist zu sehen, dass sich die Strukturen der synthetischen Liganden stark von der von ABA unterscheiden.

Die Tatsache, dass sich die synthetischen Liganden sich stark von ABA unterscheiden, weist auf eine flexible Bindetasche bei den untersuchten RCARs hin. Hinzu kommt, dass die RCARs zu den bereits erwähnten BetV1-like Proteinen gehören, was darauf hindeutet, dass diese Proteine unterschiedliche natürliche Liganden binden können.

### 1.1.4. Typ 2C Proteinphosphatasen (PP2Cs) Subklasse A

Die PP2Cs gehören zu einer Proteinfamilie, die in Arabidopsis 80 Mitglieder umfasst (Fuchs *et al.* 2013, Schweighofer *et al.* 2004). Abb. 9 gibt einen Überblick über die Proteinphosphatasen und ihre Einteilung in verschiedene Klassen.

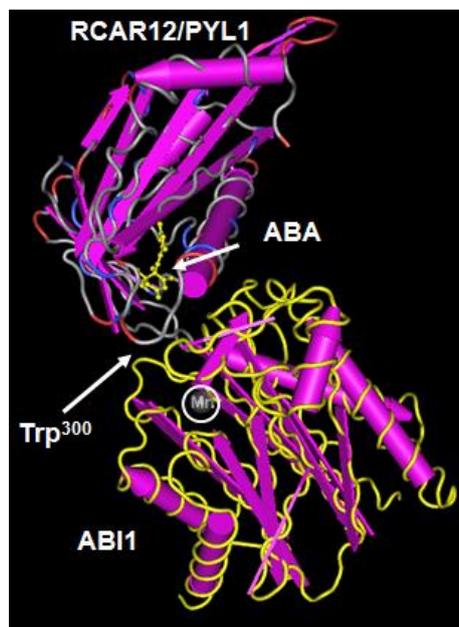


**Abb. 9 Die PP2C Proteinfamilie in Arabidopsis**

Die Abbildung wurde aus einem Review von Fuchs *et al.* 2013 in überarbeiteter Form übernommen. Die für diese Arbeit relevante PP2C Subklasse A wurde gelb hervorgehoben.

Für diese Arbeit waren die Phosphatasen der PP2C Subklasse A von besonderem Interesse (Abb. 9). Diese Klasse umfasst 9 Mitglieder (Schweighofer *et al.* 2004). Die erste identifizierte Proteinphosphatase dieser Klasse war *Abscisic Acid Insensitive 1* (ABI1) (Meyer *et al.* 1994). Drei Jahre später wurde ein Homolog von ABI1 gefunden (Leung *et al.* 1997). Das Protein wurde aufgrund seiner engen Verwandtschaft zu ABI1 *Abscisic Acid Insensitive 2* (ABI2) genannt. Im Jahr 1998 wurde dann *Homology to ABI1* (HAB1) entdeckt (Rodriguez *et al.* 1998). Dann wurde *Homology to ABI2* (HAB2) 2004 identifiziert (Saez *et al.* 2004). AHG3/PP2CA (*ABA Hypersensitive Germination 3*) wurde 2006 beschrieben (Yoshida *et al.* 2006). Ein Jahr später dann wurde AHG1 (*ABA Hypersensitive*

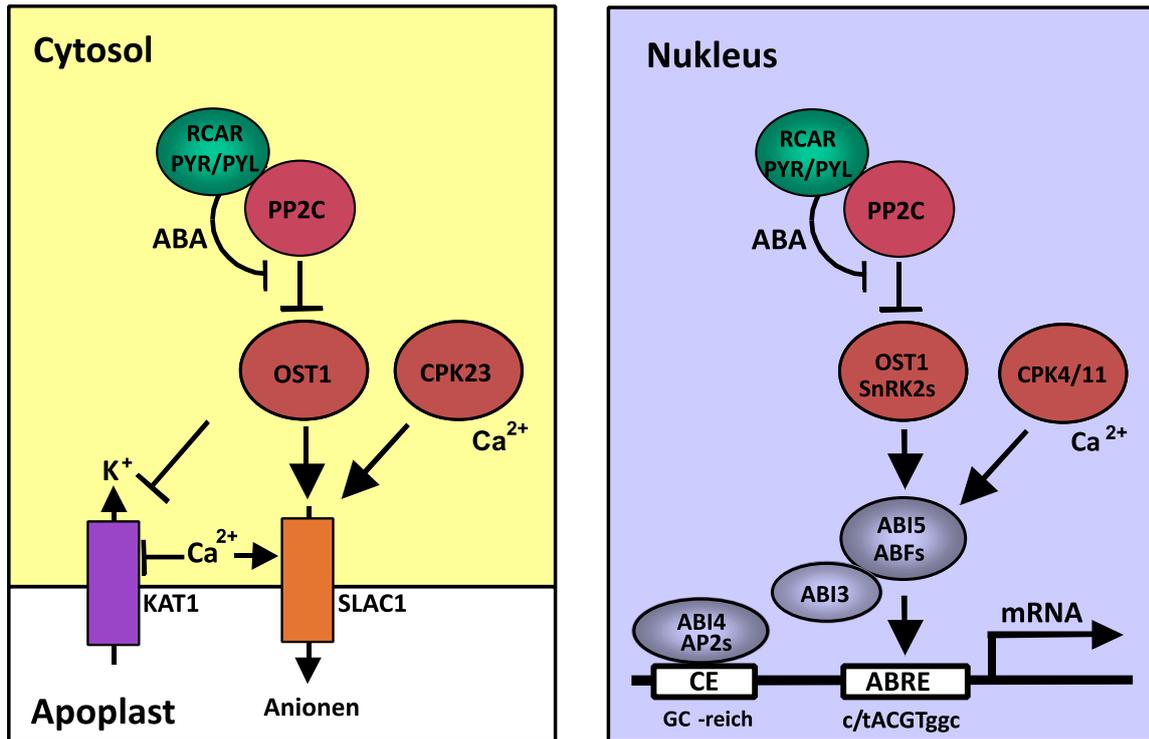
*Germination 1*) charakterisiert (Nishimura *et al.* 2007). Die letzten identifizierten Mitglieder der Subklasse A waren *Highly ABA-induced PP2C 1-3* (HAI1-3) (Fujita *et al.* 2009). Es wurde herausgefunden, dass die Mitglieder der Subklasse A einander funktional ersetzen konnten (Yoshida *et al.* 2006). Erst multiple *knockouts* konnten ABA-hypersensitive Mutanten mit starken Phänotypen erzeugen (Rubio *et al.* 2009, Saez *et al.* 2006). Im Jahr 2009 wurde herausgefunden, dass Proteinphosphatasen der Subklasse A mit den RCARs interagieren (Ma *et al.* 2009, Park *et al.* 2009) und im ABA-Signalweg als negative Regulatoren auftreten. Die Interaktion zwischen RCAR12 und der PP2C ABI1 ist in Abb. 10 zu sehen. Dabei spielt ein bei der Subklasse A konservierter Tryptophanrest eine entscheidende Rolle (Santiago *et al.* 2012). Einzig AHG1 besitzt diesen Tryptophanrest nicht. Bei ABI1 befindet sich das Tryptophan an der Position 300. Wird dieser Rest gegen andere Aminosäuren ausgetauscht, kommt es zu einer Aufhebung der RCAR/PP2C Interaktion (Dupeux *et al.* 2011).



**Abb. 10 Interaktion zwischen RCAR12 und ABI1**

Die Abbildung wurde von Raghavendra *et al.* 2010 in abgewandelter Form übernommen. Die Kristallstruktur von RCAR12/PYL1 (oben) und der Phosphatase ABI1 (unten) ist hier dargestellt. Der Tryptophan 300 Rest befindet sich an der Kontaktstelle zwischen RCAR und PP2C. Im Weiteren ist ABA (gelb) in der Bindetasche des RCARs zu sehen.

Über die Interaktion zwischen RCAR und PP2C erfolgt die Regulation des ABA-Signalweges. Durch Bindung von ABA an RCAR kommt es zu einer Konformationsänderung in deren Folge der Rezeptor an die Proteinphosphatase bindet und sie so inaktiviert. Dadurch werden verschiedene *downstream targets* aktiviert (Raghavendra *et al.* 2010). Ein Schema der Regulation ist in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11 Regulation des ABA-Signalweges**

Die Abbildung wurde überarbeitet von Raghavendra *et al.* 2010 übernommen. Dargestellt ist die Regulation des ABA-Signalweges im Cytosol (gelb) und im Nucleus (blau).

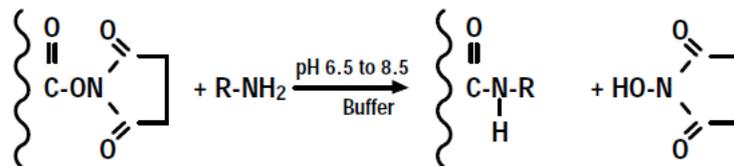
In Abb. 11 ist zu sehen, dass nach der Bindung der Proteinphosphatase deren hemmende Wirkung auf Proteinkinasen (OST1, CPK4/11/23) aufgehoben wird. Dadurch werden die Proteinkinasen aktiviert und phosphorylieren weitere Ziele wie z.B. Ionen-Kanäle (KAT1, SLAC1) oder Transkriptionsfaktoren (ABI5, ABFs, ABI3). Die Interaktion von Proteinphosphatasen und Proteinkinasen basiert auf dem Prinzip „*molecular mimicry*“ (Soon *et al.* 2012). Was bedeutet, dass sich Proteinkinasen und RCARs in ihrer Oberflächenstruktur ähneln und daher beide als Bindungspartner für die PP2Cs in Frage kommen. Weitere Bindungspartner der PP2Cs sind Transkriptionsfaktoren wie AtHB6 (Himmelbach *et al.* 2002) oder das Prä-Protein von Fibrillin (Yang *et al.* 2006).

## 1.2. Analytische Methoden

### 1.2.1. Affinitätschromatografie

In dieser Arbeit wurde ein System basierend auf dem Prinzip der Affinitätschromatografie erstellt. Hierbei wird zunächst ein Bindungspartner an eine kompatible Matrix über einen sogenannten Spacer gebunden und anschließend ein oder mehrere spezifische Liganden aus einem Extrakt isoliert (Cuatrecasas *et al.* 1968). Ein Spacer ist ein Abstandshalter an dessen Ende sich eine reaktive Gruppe befindet, die für die kovalente Bindung des gewünschten Bindungspartners benötigt wird (Wilchek *et al.* 1987), er sollte ungeladen und hydrophob sein, um Ionenaustausch Effekte zu vermeiden. Die

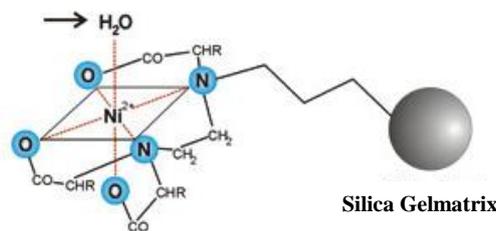
Matrix besteht entweder aus Agarose oder Polyacrylamid (Rehm *et al.* 2010) mit einer geeigneten Porengröße, sodass der zu bindende Ligand hindurch diffundieren kann. Außerdem sollte sie möglichst nicht mit Proteinen reagieren. Des Weiteren sollte sie eine hohe Dichte an aktivierten Gruppen aufweisen, um den ersten Bindungspartner in großer Quantität zu binden (Cuatrecasas *et al.* 1971). Die kovalente Bindung von Proteinen erfolgt häufig über deren primäre Aminogruppen (Puma *et al.* 1983, Rehm *et al.* 1988), wobei sich N-Hydroxysuccinimidester als aktivierte Gruppen an der Matrix (Abb. 12) befinden.



**Abb. 12 Kopplung von Proteinen an Affi 15 Gel über primäre Aminogruppen**

Die Abbildung wurde aus dem Handbuch für Affi 15 Gel von Bio-Rad® übernommen. Dargestellt ist die Konjugation eines Liganden über dessen primäre Aminogruppe. Dabei wird Imid als Abgangsgruppe von der aktivierten Gruppe der Matrix abgespalten.

Eine spezielle Form der Affinitätschromatografie ist die native Reinigung von Proteinen mit His<sub>6</sub>-tags durch reversible Nickel-Chelatierung (Hochuli *et al.* 1988). Die Struktur der Chelate kann Abb. 13 eingesehen werden.



**Abb. 13 Struktur des Nickel-Chelats einer His<sub>6</sub>-tag-Säule**

Die Abbildung wurde aus dem Handbuch für das Protino®-Ni-TED Kit von Macherey und Nagel übernommen.

Für die Reinigung werden His<sub>6</sub>-tags während der Klonierung an rekombinante Proteine fusioniert. Diese Proteine können dann über Nickel-Chelat-Säulen aufgereinigt werden. Dabei legen sich die geladenen His<sub>6</sub>-tags um das fixierte Nickel. Durch Eluieren mit einer hohen Konzentration von Imidazol kann das Protein wieder von der Säule gelöst werden (Hochuli *et al.* 1988). Das Imidazol konkurriert mit dem His<sub>6</sub>-tag um die Bindung an das chelatierte Nickel. Somit ist diese Methode ideal für die native Aufreinigung von rekombinanten Proteinen geeignet. Weitere Vorteile der Nickel-Chelatierung sind hohe Proteinausbeuten und hohe Kosteneffizienz durch kommerziell erhältliche Reinigungssysteme. In einigen Fällen kann es in diesem System zu geringerer Reinheit der Proteine kommen verglichen mit anderen Affinitäts-tags (Lichty *et al.* 2005). Nach bisherigen Erkenntnissen haben His<sub>6</sub>-tags keine

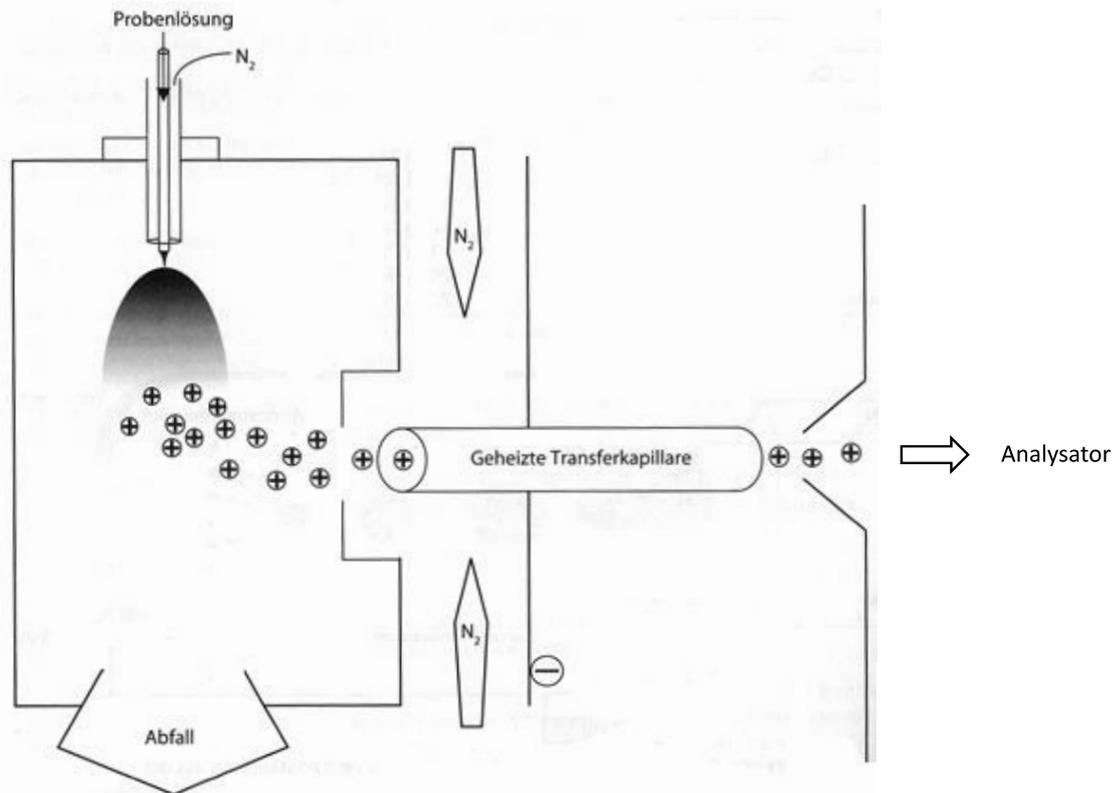
signifikanten Auswirkungen auf die native Struktur von rekombinanten Proteinen (Carson *et al.* 2007). In einigen Fällen kann jedoch die Position des His<sub>6</sub>-tags (N- oder C-terminal) einen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins haben. Sowohl ein N-, als auch ein C-terminal positionierter His<sub>6</sub>-tag kann mit der posttranslationalen Modifikation und der Interaktion zwischen Proteinen interferieren (Mason *et al.* 2002). Ein His<sub>6</sub>-tag kann auch die Löslichkeit der Proteine positiv oder negativ beeinflussen (Woestenenk *et al.* 2004).

Aufgrund der erwähnten Effekte des His<sub>6</sub>-tags müssen bei der rekombinanten Reinigung von Proteinen Reinigungs- und Funktionalitätsstudien vor Beginn der eigentlichen Versuche durchgeführt werden.

### 1.2.2. Fourier-Transform Massenspektrometrie

Eine weitere Grundlage des in dieser Arbeit neu entwickelten Systems ist die Analyse mit einem Fourier-Transform Massenspektrometer. Der Aufbau von Massenspektrometern wurde ursprünglich von J.J. Thomson entwickelt (Thomson 1897, Thomson 1913). Den Grundaufbau moderner Massenspektrometer entwarf A.J. Dempster im Jahr 1918 (Dempster 1921). Ausgehend davon wurde die Methode weiter modifiziert und überarbeitet. Heutige Massenspektrometer sind häufig mit einem chromatografischen Trennverfahren gekoppelt, von denen die bekanntesten Gas- (Gohlke *et al.* 1959) und Flüssigchromatografie (Lant *et al.* 1985) sind. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionisierungsquelle, einem Analysator und einem Detektor. Ionisierungsquellen können sein: Elektronenstoßionisation (EI), chemische Ionisation (CI), Photoionisation (PI), Feldionisation (FI), *Fast Atom Bombardement* (FAB), Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Elektrospray-Ionisation (ESI). Auf ESI soll hier besonders eingegangen werden.

Bei der ESI befinden sich die zu untersuchenden Moleküle meist in einem Gemisch aus organischem Lösungsmittel und Wasser. Sollen positiv geladene Moleküle untersucht werden wird häufig dem Gemisch eine schwache Säure hinzugefügt (Fenn *et al.* 1989). Der allgemeine Aufbau der ESI Apparatur ist in Abb. 14 dargestellt.



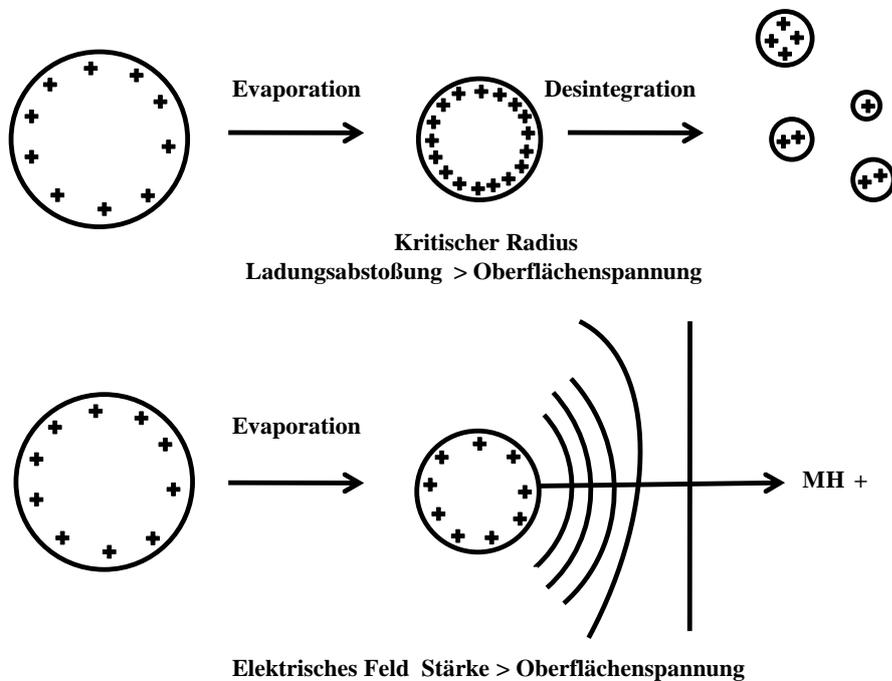
**Abb. 14 Allgemeiner Aufbau Elektrospray Ionisation**

Die Abbildung wurde aus dem Buch „Der Experimentator- Proteinbiochemie-Proteomics“ (2010) übernommen.

Wie in der schematischen Darstellung (Abb. 14) zu sehen, wird die zu analysierende Probe unter Einsatz von beheiztem Stickstoff zerstäubt. An der Spitze der Zerstäubungsnadel wird eine Spannung angelegt, welche die Ionen gleicher Ladung abstößt. In diesem Beispiel werden positiv geladene Ionen untersucht (*positive mode*). Durch den hier gezeigten Aufbau werden nicht geladene Moleküle und Ionen mit nicht erwünschter Ladung nach unten in den Abfall abgestoßen. Die positiv geladenen Ionen werden durch ein negativ geladenes Feld beschleunigt und in den Analysator befördert. Der Aufbau moderner ESI Apparaturen wurde durch die Arbeitsgruppe um John Fenn entwickelt (Fenn *et al.* 1989).

Grundlage der ESI ist die Evaporation der Ionen. Diese wird durch das sogenannte Rayleigh-Limit bestimmt (Rayleigh 1882). Rayleigh fand heraus, dass bei der Evaporation die Dichte der geladenen Moleküle zunimmt, bis die Abstoßung einen kritischen Punkt erreicht. An diesem Punkt wird die Oberflächenspannung des Lösungsmittels durch die Abstoßung der Ionen gleicher Ladung überwunden. Es gibt zwei Modelle zur Bildung freier Ionen in der Gasphase. Nach einer Theorie sammeln sich die gleich geladenen Ionen an der Oberfläche der Lösungsmitteltröpfchen. Dadurch kommt es zu einer Abstoßung der Moleküle welche in sogenannten Coulomb-Explosionen resultiert. Dies wiederholt sich und führt zu einer weiteren Verkleinerung der Tröpfchen bis nur noch ein Molekül pro Tröpfchen verbleibt. Das Lösungsmittel lässt sich dann durch erhitztes trockenes Stickstoffgas entfernen, sodass nur noch das geladene Ion zurückbleibt. Dieses Modell wird auch als *Charged*

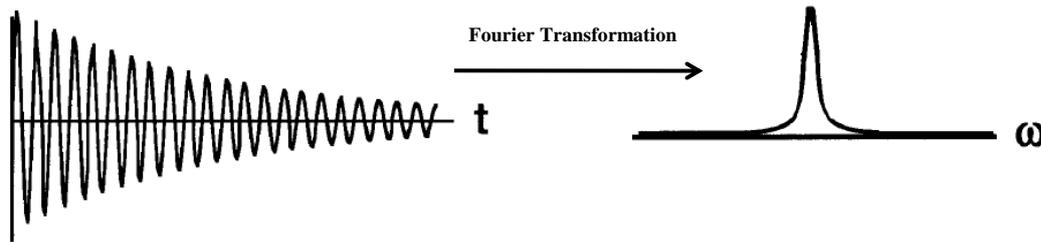
*Residue Model* bezeichnet (Dole *et al.* 1968). Ein zweites Modell geht davon aus, dass das angelegte elektrische Feld an der Oberfläche der Tröpfchen so stark ist, dass die Ionen aus dem Lösungsmittel in die Gasphase übergehen (Iribarne *et al.* 1976). Dieses Modell ist auch als *Ion Evaporation Model* bekannt. Die beiden Theorien sind in Abb. 15 grafisch dargestellt.



**Abb. 15 Modelle der Evaporation in Elektrospray Ionisation**

Die Grafik wurde aus der Nobelpreis Vorlesung von John Fenn (2002) in überarbeiteter Form übernommen.

Das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer ist ein Fourier-Transform Ionen Zyklotron Resonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS). Als Ionenquelle wurde ESI verwendet. FT-ICR-Massenspektrometer wurden im Jahr 1974 erstmals erwähnt (Comisarow *et al.* 1974). Das Grundprinzip dieses Massenspektrometers ist, dass geladene Ionen von einer Ionenquelle kommend in einer Ionenfalle gefangen werden. In diesem Fall handelte es sich um eine sogenannte Penning-Falle welche von Dehmelt beginnend in den 1950er Jahren entwickelt wurde (Dehmelt *et al.* 1954). Dabei werden Ionen bestimmter Ladung und Größe vorselektiert. Die verbleibenden Ionen werden dann in einem supraleitenden Magneten mit konstantem Magnetfeld auf einer Kreisbahn beschleunigt. Dazu wird senkrecht zum Magnetfeld ein oszillierendes elektrisches Feld angelegt. Der Radius auf dem sich die Ionen bewegen wird dadurch immer länger, bis sie schließlich aus dem Magnetfeld geschleudert werden (Marshall *et al.* 1998). In der FT-MS wird die Frequenz mit der sich die Ionen auf der Kreisbahn bewegen gemessen. Anhand dieser Frequenz wird dann durch Fourier-Transformation das Masse-zu-Ladungsverhältnis bestimmt. Die Umwandlung der gemessenen Frequenz eines Ions in das entsprechende Chromatogramm ist in der folgenden Grafik (Abb. 16) schematisch dargestellt.



**Abb. 16 Umrechnung einer Ionen-Frequenz in ein Massenspektrum durch Fourier Transformation**

Die gezeigte Abbildung wurde aus dem Review von Marshall *et al.* 1998 entnommen. Links ist die von dem Detektor aufgefangene Frequenz des Ions dargestellt. Auf der rechten Seite ist das durch Fourier-Transformation errechnete Chromatogramm dargestellt.

Das Besondere an der FT-ICR-MS ist ihre hohe Auflösung, Massengenauigkeit und Sensitivität. Massen können mit einem Fehler von maximal 0,1 ppm bestimmt werden. Ein weiterer Vorteil ist die nicht destruktive Messung der Ionen. Auf diese Weise können die Massenspektren mehrfach bestimmt werden und so Massensignale verstärkt werden. Das bedeutet, dass nur geringe Mengen der zu analysierenden Stoffe für die massenspektrometrische Analyse benötigt werden, um messbare Signale zu erhalten. Durch die hohe Genauigkeit der FT-ICR-MS kann zudem die elementare Zusammensetzung der analysierten Stoffe bestimmt werden (Marshall *et al.* 2008, Dunn *et al.* 2013). Die berechneten Summenformeln können dann durch Anwendung der sog. *seven golden rules* nach der Wahrscheinlichkeit ihres tatsächlichen Vorkommens eingegrenzt werden (Kind *et al.* 2007). Die erste anzuwendende Regel ist die Begrenzung der Anzahl der Elemente in der Summenformel abhängig von der gemessenen Masse. Die maximalen Werte der am häufigsten vorkommenden Elemente in natürlichen Molekülen für verschiedene Massenbereiche sind in Tab. 2 zusammengestellt.

**Tab. 2** Begrenzung der Elemente für Summenformeln in bestimmten Massenbereichen (Kind *et al.* 2007)©

Masse [Da]	Quelle	C <sub>max</sub>	H <sub>max</sub>	N <sub>max</sub>	O <sub>max</sub>	P <sub>max</sub>	S <sub>max</sub>	F <sub>max</sub>	Cl <sub>max</sub>	Br <sub>max</sub>	Si <sub>max</sub>
< 500	DNP	29	72	10	18	4	7	15	8	5	
	Wiley	39	72	20	20	9	10	16	10	4	8
< 1000	DNP	66	126	14	27	6	8	16	11	8	
	Wiley	78	126	20	27	9	14	34	12	8	14
< 2000	DNP	115	236	32	63	6	8	16	11	8	
	Wiley	156	180	20	40	9	14	48	12	10	15
< 3000	DNP	162	208	48	78	6	9	16	11	8	

Vor Anwendung der zweiten „goldenen Regel“ müssen die ermittelten Massen neutralisiert werden, indem je nach Messmodus (positiv oder negativ) die Masse eines Protons (1,007825 u) abgezogen, bzw. addiert wird. Anschließend wird überprüft, ob die Oktettregel nach Lewis (Lewis 1916) zutrifft. Nach dieser Regel teilen stabile Moleküle, die aus Hauptgruppenelementen bestehen Elektronen so

## Einleitung

---

auf, dass die äußeren s- und p-Schalen vollständig besetzt sind. Dann wird dazu noch die Senior Regel überprüft (Senior 1951). Nach dieser müssen 3 Voraussetzungen erfüllt werden.

1. Die Summe der Valenzen oder die Gesamtanzahl von mit Atomen ungeraden Valenzen muss gerade sein.
2. Die Summe der Valenzen ist größer, gleich oder doppelt so hoch wie die Maximalvalenz
3. Die Summe der Valenzen ist größer, gleich oder doppelt so hoch wie die Anzahl der Atome minus 1.

Bei der dritten Regel wird das natürliche Vorkommen von stabilen Isotopen berücksichtigt (Laeter *et al.* 2003). Dabei werden die ermittelten Massen auf das Vorhandensein der natürlichen Isotope überprüft. Zum Beispiel kommt Kohlenstoff in der Natur in zwei stabilen Isotopen vor. Das  $^{12}\text{C}$ -Isotop macht dabei ca. 99% des Kohlenstoffs aus und das  $^{13}\text{C}$ -Isotop in etwa 1%. Liegt ein Massensignal vor, so kann man überprüfen, ob es sich um eine natürliche Kohlenstoffverbindung handelt, indem man in einem Abstand von 1,003355 nach dem schweren Kohlenstoff-Isotop in der beschriebenen Abundanz sucht. Ähnliche Untersuchungen kann man auch für Schwefel, Sauerstoff und Stickstoff durchführen. Auf diese Weise können die Massen natürlicher Substanzen aus einem Spektrum gefiltert werden.

Die vierte Regel untersucht das Verhältnis von Wasserstoff zu Kohlenstoff. Kind und Fiehn fanden heraus, dass sich die 99,7% der analysierten Massen ein Wasserstoff/Kohlenstoff-Verhältnis zwischen 0,2 bis 3,1 aufwiesen. Sollten bei einer errechneten Formel diese Werte unter-oder überschritten werden, können die Formeln als unwahrscheinlich angenommen werden.

In der fünften Regel werden die Verhältnisse der Heteroatome zu Kohlenstoff berücksichtigt. Heteroatome sind in der organischen Chemie solche Atome, die weder Wasserstoff noch Kohlenstoff sind. Die Tab. 3 zeigt die häufigsten Verhältnisse für Heteroatome und Kohlenstoff, die bei 45.000 untersuchten Formeln vorkamen.

**Tab. 3** Die am häufigsten beobachteten Verhältnisse zwischen Heteroatomen und Kohlenstoff (Kind *et al.* 2007)©

Element Verhältnisse	Hauptbereich (bis 99,7% Abdeckung)	Erweiterter Bereich (bis 99,99% Abdeckung)	Extremer Bereich (über 99,99%Abdeckung)
H/C	0,2-3,1	0,1-6	<0,1 und 6-9
F/C	0-1,5	0-6	>15
Cl/C	0-0,8	0-2	>0,8
Br/C	0-0,8	0-2	>0,8
N/C	0-1,3	0-4	>1,3
O/C	0-1,2	0-3	>1,2
P/C	0-0,3	0-2	>0,3
S/C	0-0,8	0-3	>0,8
Si/C	0-0,5	0-1	>0,5

Die sechste Regel betrachtet das Vorkommen verschiedener Heteroatome in einer Formel. Die Regeln für die Zusammensetzung der Formeln sind in Tab. 4 einzusehen.

**Tab. 4** Regeln für die Zusammensetzung von Formeln mit mehreren Heteroatomen (Kind *et al.* 2007)©

Elemente	Heuristische Regel	Datenbank Beispiele für Maximalwerte
NOPS alle >1	N < 10, O < 20, P < 4, S < 3	C <sub>15</sub> H <sub>34</sub> N <sub>9</sub> O <sub>8</sub> PS, C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>14</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub> , C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub> P <sub>3</sub> S
NOP alle > 3	N < 11, O < 22, P < 6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>10</sub> O <sub>21</sub> P <sub>4</sub> , C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>5</sub> O <sub>20</sub> P <sub>5</sub>
OPS alle > 1	O < 14, P < 3, S < 3	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>14</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub> , C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
PSN alle > 1	P < 3, S < 3, N < 4	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>14</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub> , C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
NOS alle > 6	N < 19, O < 14, S < 8	C <sub>59</sub> H <sub>64</sub> N <sub>18</sub> O <sub>14</sub> S <sub>7</sub>

Die siebente Regel gilt nur für Massen, die aus GC-MS Analysen stammen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die durch Derivatisierung angehängten Trimethylsilylgruppen von den errechneten Formeln subtrahiert werden müssen. Erst dann sollten die Regeln 4-6 auf die Formeln angewendet werden.

Trotz der hohen Massengenauigkeit und der zur Verfügung stehenden Werkzeuge zur Ermittlung natürlicher Massen gibt es einen entscheidenden Nachteil bei der FT-MS. Anhand der Massen lassen sich nur die Summenformeln ermitteln. Dadurch gibt es keinen Aufschluss zu Isomeren oder der Struktur der analysierten Moleküle. Daher müssen zur Klärung von Eigenschaften und Struktur unbekannter Substanzen chromatografische, sowie MS/MS-Analysen vorgenommen werden (Ding *et al.* 2007).

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob es für den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex noch weitere natürliche Liganden außer Abscisinsäure gibt. Eine Grundlage für diese Arbeitshypothese war, dass die RCARs zu der *BetV1-like* Superfamilie gehören. Vertreter dieser Proteinfamilie sind dafür bekannt mehrere Liganden zu binden (Radauer *et al.* 2008). Daher lag die Vermutung nahe, dass auch die RCARs mehr als einen Liganden binden könnten. Ein weiteres unterstützendes Argument für diese Hypothese ist die Entdeckung von synthetischen Liganden, namentlich Pyrabactin und Quinabactin/AM1, für den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex (Zhao *et al.* 2007, Peterson *et al.* 2010, Cao *et al.* 2013, Okamoto *et al.* 2013, González-Guzmán *et al.* 2014). Die Struktur dieser synthetischen Liganden unterscheidet sich stark von der von Abscisinsäure. Dennoch binden die Substanzen an derselben Bindestelle wie ABA. Dies lässt auf eine Flexibilität in der RCAR-Bindestasche schließen, was bedeutet, dass weitere natürliche Liganden für den Rezeptor möglich sind. Um diese natürlichen Liganden zu finden sollte eine Methode basierend auf Affinitätschromatografie mit dem RCAR/PP2C Rezeptorkomplex als Bindungselement entwickelt werden. Zur Analyse der Eluate dieser Affinitätschromatografie wurde FT-MS verwendet. Da vorher nicht bekannt war welche weiteren Liganden außer ABA an den Komplex binden würden, war es nötig eine besonders sensible Analyse-Methode mit hoher Auflösung und Messgenauigkeit zu verwenden. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass nur geringe Stoffmengen des Liganden für eine Detektion notwendig sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass anhand des gemessenen Massensignals eine Summenformel berechnet werden kann (Marshall *et al.* 2008). Auf Basis dieser Analyse sollten neue Liganden für den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex identifiziert und beschrieben werden. Zudem sollte ermittelt werden, welchen Einfluss diese Liganden auf die Regulation der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe haben.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Etablierung einer *Ligand Fishing* Methode mit ABA-Rezeptorkomplexen

Um natürliche Liganden für den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex zu finden, wurde eine Methode basierend auf Affinitätschromatografie entwickelt. Dazu waren mehrere Voruntersuchungen notwendig. Zunächst wurden Phosphatase-Assays durchgeführt, um die Regulation der PP2Cs ABI1, der N-terminal verkürzten Phosphatase  $\Delta$ ABI1 und ABI2 durch die RCARs 8 und 11 zu untersuchen, da diese als Interaktionspartner für die Erstellung der Methode zur Liganden-Isolation vorgesehen waren. Ebenso wurde die Interaktion der Rezeptorkomplexe mit ABA untersucht, um die Regulation der gewählten Komplexe durch ABA zu untersuchen. Zur Bestimmung der Ligandenbindekapazität des Rezeptorkomplexes wurde die Effizienz der Immobilisierung des Proteins  $\Delta$ ABI1 an eine Affinitätsmatrix und etwaige Aktivitätseinbußen der gebundenen Proteinphosphatase analysiert. Zudem wurde eine Methode zur effizienten Elution der potentiell gebundenen Liganden entwickelt. Der Nachweis der eluierten Liganden erfolgte durch Verwendung einer quantitativen *reversed phase* Flüssigchromatografie.

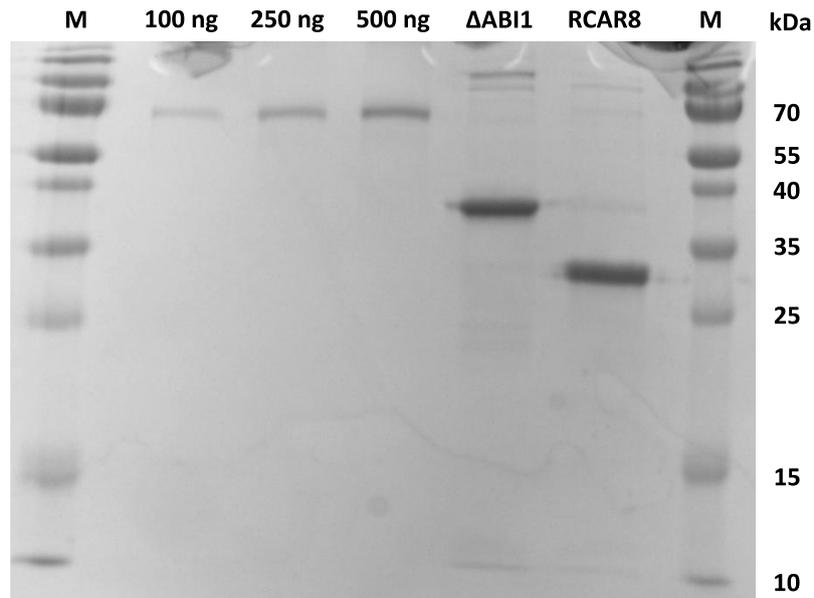
#### 2.1.1. Regulation von PP2Cs durch RCARs und ABA

Grundlage dieser Arbeit war die Regulation von PP2Cs durch RCARs und ABA. In Gegenwart von ABA binden die RCARs an die PP2Cs und inhibieren deren Aktivität. Dabei unterscheiden sich die Interaktionspartner in Bezug auf ABA- $K_D$  und Bindungsaffinität zu den Proteinphosphatasen (Okamoto *et al.* 2013). Für die Experimente wurden solche Proteine verwendet, die sich im Milligramm-Bereich aufreinigen ließen. Als Vertreter der PP2Cs wurden die Proteinphosphatase ABI1, das N-terminal verkürzte  $\Delta$ ABI1 (Aminosäuren 125-429, Miyazono *et al.* 2009) und ABI2 ausgewählt. Bei den RCARs wurden die Vertreter 8 und 11 verwendet. Die Ausbeuten der heterologen Expression für die Proteine wurden durch Bradford Assay bestimmt. Bei den Proteinphosphatasen konnten zwischen 0,4 mg/l bis 1,4 mg/l isoliert werden. Höhere Ausbeuten konnten bei den RCARs mit 8,0 mg/l für RCAR8 und 7,5 mg/l für RCAR11 erzielt werden (Tab. 5). Zudem wurde eine Bestimmung des Reinheitsgrades der Proteine unter Verwendung einer SDS-PAGE vorgenommen (Abb. 17). Die Proteine wurden mit His<sub>6</sub>-tags kloniert und über reversible Nickel-Chelatierung nativ gereinigt. Bisher sind keine oder nur sehr geringe Auswirkungen von His<sub>6</sub>-tags auf die Struktur und Aktivität von rekombinanten Proteinen bekannt (siehe 1.2.1.). Das Nickel-His<sub>6</sub>-tag System wurde aufgrund hoher Kosteneffizienz und hoher Proteinausbeuten für die Expression und Reinigung der Proteine verwendet.

**Tab. 5** Proteinausbeuten nach Reinigung von ABI1,  $\Delta$ ABI1, ABI2, RCAR8 und RCAR11

Protein	Molekülmasse [kDa]	Medium	Ausbeute [mg/l]	Protein Konzentration [ $\mu$ g/ $\mu$ l]
ABI1	48	TB	0,4	0,05
$\Delta$ ABI1	33,5	LB	1,4	1,2
ABI2	46	TB	0,4	0,2
RCAR8	25	TB	8,0	2,0
RCAR11	22	LB	7,5	5

Der Reinheitsgrad der rekombinant gereinigten Proteine wurde über SDS-PAGE bestimmt (Abb. 17).

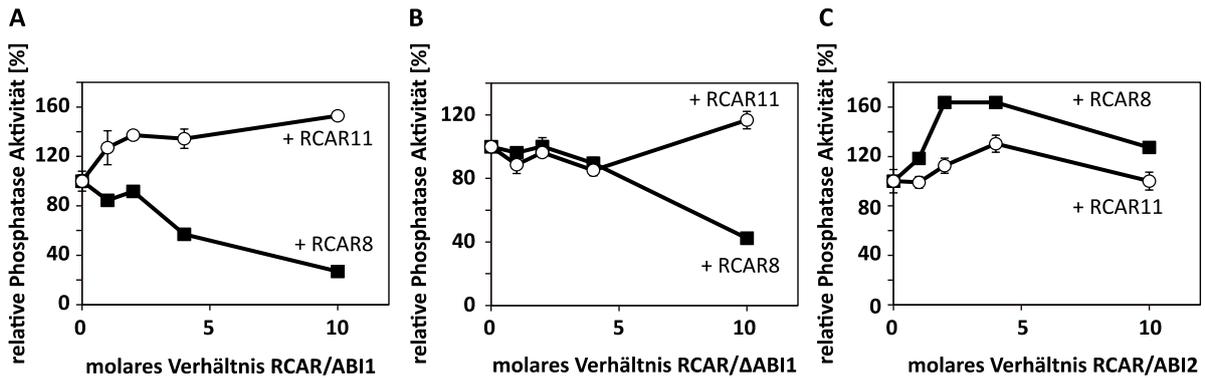


**Abb. 17 Bestimmung des Reinheitsgrades rekombinant gereinigter Proteine**

Je 1  $\mu$ l der gereinigten Proteine  $\Delta$ ABI1 und RCAR8 wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zudem wurde ein BSA-Standard (100 ng, 250 ng und 500 ng) zum Abgleich der Konzentration aufgetragen.

Der Reinheitsgrad der rekombinant gereinigten Proteine wurde unter Verwendung einer SDS-PAGE durch optischen Abgleich untersucht. In diesem Fall betrug die Reinheit von  $\Delta$ ABI1 und RCAR8 etwa 90%. Auch in späteren Untersuchungen konnte für alle in Tab. 5 erwähnten Proteine ein Reinheitsgrad in dem erwähnten Bereich festgestellt werden. Nach Bestimmung des Reinheitsgrades wurden die in einem Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glycerin pH 8,0) befindlichen Proteine bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Zunächst wurde die Regulation der Proteinphosphatasen ABI1,  $\Delta$ ABI1 und ABI2 durch die RCARs 8 und 11 ohne ABA untersucht. Dazu wurde je 1  $\mu$ g der Proteinphosphatasen mit steigenden molaren Überschüssen an RCAR8 und 11 inkubiert (Abb.18). Anschließend wurde die Phosphatase-Aktivität durch photometrische Messung des Umsatzes des synthetischen Substrates Methylumbelliferylphosphat zu Methylumbelliferyl bestimmt.



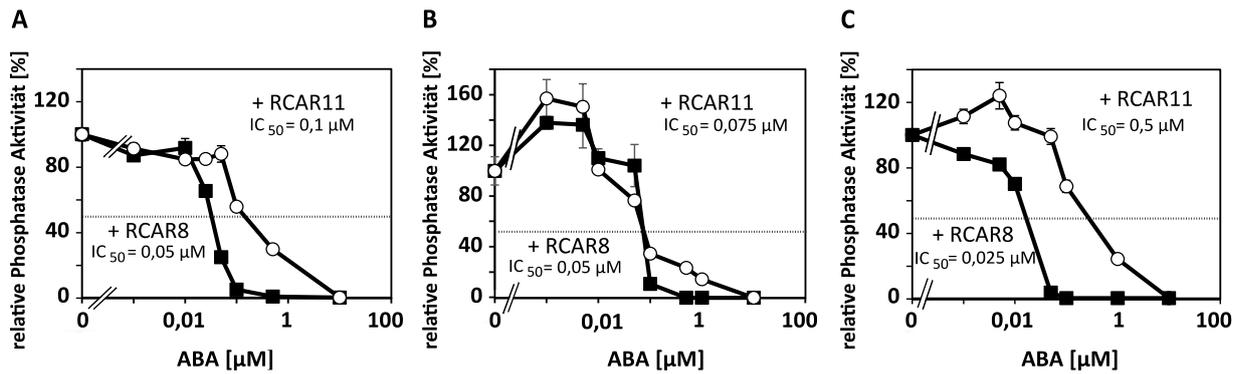
**Abb. 18 Regulation der PP2Cs ABI1, ΔABI1 und ABI2 durch die RCARs 8 und 11 ohne ABA**

Je 1  $\mu$ g der Proteinphosphatasen ABI1 (A),  $\Delta$ ABI1 (B) und ABI2 (C) wurde mit steigenden molaren Überschüssen RCAR8 (schwarz) und RCAR11 (weiß) inkubiert. Die molaren Verhältnisse zwischen Phosphatase und RCARs waren 1:0, 1:1, 1:2, 1:4 und 1:10. Als 100 % wurde die Aktivität der Phosphatasen ohne RCAR angenommen. Für ABI1 war die Ausgangsaktivität 274,5 nkatal/mg Phosphatase. Die Ausgangsaktivität von  $\Delta$ ABI1 war 242,9 nkatal/mg und die von ABI2 war 78,6 nkatal/mg. Die Abbildungen zeigen repräsentative Einzelerperimente mit je drei technischen Replikaten pro Messpunkt.

Die RCARs zeigen je nach Proteinphosphatase als Interaktionspartner eine unterschiedliche Regulation. Die Phosphatasen ABI1 und  $\Delta$ ABI1 wurden durch RCAR8 gehemmt. Bei ABI1 (Abb. 18, A) betrug die Aktivität bei der höchsten RCAR8-Konzentration nur noch 20%. Die Aktivität von  $\Delta$ ABI1 (Abb. 18, B) lag bei dem höchsten RCAR8 Überschuss noch bei etwa 50%. RCAR11 wirkte auf ABI1 und  $\Delta$ ABI1 stimulierend. Im Fall von ABI1 stieg die Aktivität um 50% bei dem höchsten RCAR11-Überschuss. Die Aktivität von  $\Delta$ ABI1 stieg bei der höchsten RCAR11-Konzentration um 20%. Bei  $\Delta$ ABI1 waren die Effekte im Vergleich zu ABI1 deutlich schwächer, was vermutlich darauf zurückzuführen war, dass die Phosphatase N-terminal verkürzt war und somit hier potentielle Kontaktflächen fehlten. Jedoch lässt sich sagen, dass sich beide ABI1 Varianten ähnlich mit RCAR8 bzw. RCAR11 verhielten.

Im Fall von ABI2 (Abb. 18, C) hatte RCAR8 eine aktivierende Wirkung um etwa 20% (bei maximaler RCAR8 Konzentration). RCAR11 hingegen hatte keinen Effekt auf die Phosphatase-Aktivität von ABI2.

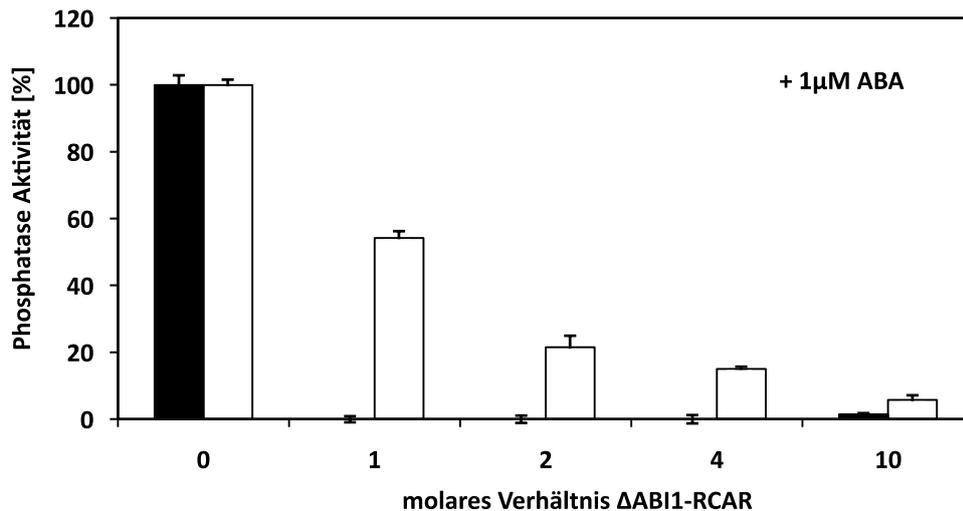
Für eine nachfolgende Untersuchung der Regulation der Proteinphosphatasen ABI1,  $\Delta$ ABI1 und ABI2 mit den RCARs 8 und 11 in Anwesenheit von ABA wurden je 1  $\mu$ g der Phosphatasen und RCARs im molaren Verhältnis 1:2 miteinander inkubiert und mit steigenden ABA-Konzentrationen versetzt. Die relative Phosphatase-Aktivität wurde in Abhängigkeit zur ABA-Konzentration bestimmt und in Relation zur Phosphatase-Aktivität mit RCAR, aber ohne ABA gesetzt (Abb. 19).



**Abb. 19 Regulation der PP2Cs ABI1,  $\Delta$ ABI1 und ABI2 mit den RCARs 8 und 11 und ABA**

Je 1  $\mu$ g der Proteinphosphatasen ABI1 (A),  $\Delta$ ABI1 (B) und ABI2 (C) wurden mit den RCARs 8 (weiß) und 11 (schwarz) im molaren Verhältnis 1:2 für 10 min. vorinkubiert und dann mit steigenden ABA-Konzentrationen vor der Aktivitätsbestimmung versetzt. Der Mittelwert der relativen Phosphatase-Aktivität (%) wurde gegen die ABA-Konzentration mit SD aufgetragen. Als 100% wurde die Phosphatase-Aktivität mit RCAR und ohne ABA gesetzt. Die Ausgangsaktivität von ABI1 (A) mit RCAR8 war 279,3 nkatal/mg und mit RCAR11 234,3 nkatal/mg, die von  $\Delta$ ABI1 (B) war 137 nkatal/mg mit RCAR8 und 188,4 nkatal/mg mit RCAR11. Die Ausgangsaktivität von ABI2 (C) war mit RCAR8 76,8 nkatal/mg und mit RCAR11 474,7 nkatal/mg. Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von ABA wurde mit einer gestrichelten Linie markiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse von Einzelversuchen mit je drei technischen Wiederholungen pro Messpunkt.

Abbildung 20 zeigt eine ABA-Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von ABI1,  $\Delta$ ABI1 und ABI2 mit RCAR8 und RCAR11. Außerdem ist zu beobachten, dass die Inhibition mit RCAR8 effizienter war als mit RCAR11. Alle untersuchten Proteinphosphatasen zeigten ein ähnliches Verhalten in Bezug auf Inhibition durch die RCARs 8 und 11. Jedoch waren die halmaximalen inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ -Werte) von ABA bei den verschiedenen Rezeptorkomplexen unterschiedlich. Bei ABI1 (Abb. 19, A) lag der  $IC_{50}$ -Wert für ABA mit RCAR8 bei 0,05  $\mu$ M und mit RCAR11 fünfmal höher bei 0,25  $\mu$ M. Die Proteinphosphatase  $\Delta$ ABI1 (Abb. 19, B) wies mit RCAR8 einen  $IC_{50}$ -Wert von 0,05  $\mu$ M und mit RCAR11 einen ähnlich hohen Wert mit 0,075  $\mu$ M für ABA auf. Bei ABI2 (Abb. 19, C) lagen die  $IC_{50}$ -Werte für RCAR8 bei 0,025  $\mu$ M und für RCAR11 etwa zwanzigmal höher bei 0,5  $\mu$ M. Somit zeigten alle untersuchten Proteinphosphatasen eine stärkere Inhibition durch ABA in Gegenwart von RCAR8 gegenüber RCAR11, wobei ABI2 stärker gegen RCAR11 zu diskriminieren scheint. Allgemein ist festzuhalten, dass RCAR11 und ABA die Proteinphosphatasen ABI1,  $\Delta$ ABI1 und ABI2 vergleichsweise ineffizient regulieren, aber alle PP2Cs mit beiden RCARs einen trimeren Komplex mit ABA ausbilden. Aufgrund der Effizienz der Aufreinigung wurde für die Etablierung der Affinitätschromatografie zur Isolation von möglichen Liganden an den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex bevorzugt das verkürzte ABI1,  $\Delta$ ABI1, verwendet (Tab. 5). Zudem wies  $\Delta$ ABI1 eine vergleichbare ABA-Regulation in Anwesenheit von RCAR8 und RCAR11 wie ABI1 auf (Abb. 18, Abb. 19). Als nächster Schritt wurde für diese Proteinphosphatase das optimale stöchiometrische Verhältnis in Bezug auf eine maximale Ausbeute an Liganden bei minimalem Einsatz an RCAR8 und RCAR11 in Gegenwart von 1  $\mu$ M ABA bestimmt (Abb. 20).



**Abb. 20 Bestimmung eines geeigneten PP2C-RCAR Verhältnisses für die Affinitätschromatografie**

In diesem Versuch wurde 1  $\mu$ g der Phosphatase  $\Delta$ ABI1 mit steigenden molaren Überschüssen der RCARs 8 (schwarz) und 11 (weiß) bei konstanter ABA-Konzentration von 1  $\mu$ M inkubiert. Als 100 % wurde die Aktivität der Phosphatase ohne RCAR und ABA gesetzt, welche für beide gemessenen Reihen bei etwa 100 nkatal/mg Phosphatase lag. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit 3 technischen Replikaten je Messpunkt. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Resultaten wiederholt.

Abbildung 20 ist zu entnehmen, dass bei RCAR8 ein molares Verhältnis von 1:1 ausreichte um die Aktivität der Proteinphosphatase vollständig zu hemmen. Bei RCAR11 war keine vollständige Inhibition der Phosphatase-Aktivität zu beobachten. Die Restaktivität der Phosphatase bei zehnfachem Überschuss an RCAR11 betrug noch etwa 5%. Dieser Überschuss hätte zu viel RCAR11 Protein verbraucht, daher wurde für weitere Versuche ein vierfacher Überschuss gewählt. Bei diesem Verhältnis lag die Restaktivität bei 15%. Um bei allen Versuchen das gleiche stöchiometrische Verhältnis zwischen RCAR und PP2C zu verwenden, wurde RCAR8 ebenfalls in einem vierfachen Überschuss beigefügt.

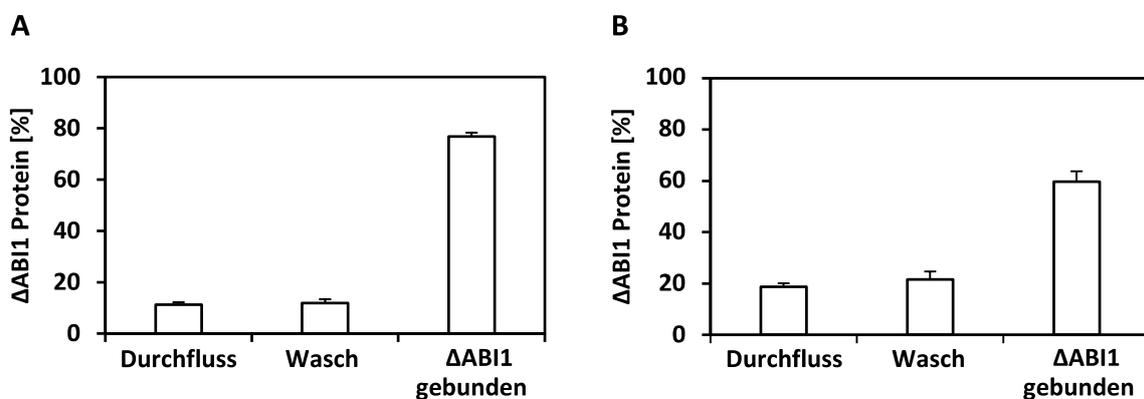
### 2.1.2. Immobilisierung von $\Delta$ ABI1

Für die Affinitätschromatografie wurde  $\Delta$ ABI1 an die Affinitätsmatrix Affi 15 Gel (BioRad©) gebunden. Dabei handelt es sich um ein Gelmaterial bestehend aus quervernetzter Agarose an dessen Oberfläche N-Succimidester gebunden sind (Rehm 2010). Die Immobilisierung erfolgt durch kovalente Bindung primärer Aminogruppen (siehe Abb. 12 unter 1.2.1) unter Abspaltung einer Imidgruppe. Der Hersteller bietet zwei verschiedene Gelmatrizen an Affi 15 Gel und Affi 10 Gel. Das Gelmaterial unterscheidet sich durch eine unterschiedliche Länge der gebundenen Spacer. Die Wahl der entsprechenden Gelmatrix wird durch den isoelektrischen Punkt des zu bindenden Proteins bestimmt. Der Hersteller gibt eine Bindekapazität des Materials von maximal 1 mg Protein je 100 mg Gelmaterial bei optimalem isoelektrischem Punkt (pI) an. Zudem sollte ein Volumenverhältnis zwischen Gelmaterial und

## Ergebnisse

Proteinlösung von 1:4 für ein optimales Kopplungsergebnis nicht überschritten werden. Um zu überprüfen, mit welcher Matrix das Protein  $\Delta$ ABI1 kompatibel war, wurde dessen pI unter Verwendung der Internetseite: [web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/) ermittelt. Für  $\Delta$ ABI1 konnte ein pI von 6,6 errechnet werden, womit sowohl Affi 15 Gel, als auch Affi 10 Gel als Bindungsmatrizen in Frage kamen (siehe 4.3.6.). Laut der vom Hersteller BioRad® zur Verfügung gestellten Tabelle zeigen beide Agarosematerialien für einen isoelektrischen Punkt von 6,5 eine Kopplungseffizienz von etwa 60%. Das heißt an 100 mg Gelmaterial können etwa 600  $\mu$ g der Proteinphosphatase gekoppelt werden.

Basierend auf Voruntersuchungen in denen das Affi 10 Gelmaterial nur etwa 40% der angebotenen Proteinphosphatase band, wurde Affi 15 Material mit durchschnittlich etwa 60% Bindungsrate bevorzugt und die Bindungseffizienz für ABA-Rezeptorkomplexe eingehender geprüft. Die Proteinphosphatase  $\Delta$ ABI1 konnte aufgrund von Präzipitation nur bis zu einer maximalen Konzentration von 1,2  $\mu$ g/ $\mu$ l konzentriert werden. Das heißt für 1 mg Protein müssten bei maximal konzentriertem Protein auf 100 mg Gelmaterial etwa 800  $\mu$ l Proteinlösung eingesetzt werden. Das entspricht einem achtfachen Volumenüberschuss, welcher eine optimale Kopplung verhindert. Um das Volumenverhältnis einzuhalten könnten also nur maximal 500  $\mu$ g der Proteinphosphatase mit 100 mg Gelmaterial inkubiert werden. Weitere Voruntersuchungen zeigten zudem, dass die tatsächliche Bindekapazität des Gelmaterials nur etwa halb so hoch war wie vom Hersteller angegeben. Daher wurden jeweils 500  $\mu$ g  $\Delta$ ABI1 und 200 mg Gelmaterial miteinander für 4 Stunden bei 4°C in einem Kippschüttler in einem Volumen von 700  $\mu$ l inkubiert. Anschließend wurde das Gelmaterial in Säulen mit einem Volumen von 3 ml gefüllt. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die Säulen wurden mit 1 ml Waschpuffer 1 (siehe 4.3.6.) gewaschen. Die Proteinverluste im Durchfluss und Waschschrift konnten mit der Bradford-Methode ermittelt werden. Über die Differenz von Ausgangsmenge Protein und den Proteinverlusten bei den Waschschriften wurde die gebundene Proteinmenge bestimmt (Abb. 21).



**Abb. 21 Überprüfung der Bindungsaffinität von  $\Delta$ ABI1 für die Affinitätsmatrix Affi 15**

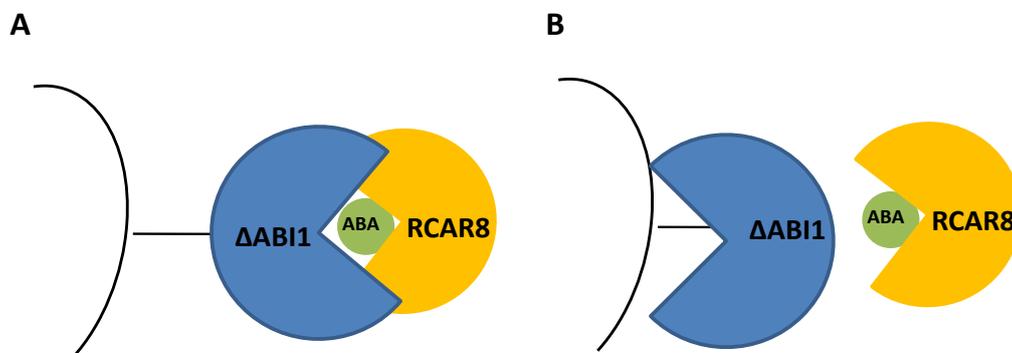
Für den Versuch wurden 500  $\mu$ g  $\Delta$ ABI1 Protein mit 200 mg Affi 15 Gelmaterial 4 h bei 4°C in einem Kippschüttler inkubiert. Das Material wurde in Säulen mit einem Volumen von 3 ml gefüllt. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Anschließend wurden die Säulen mit 1 ml Waschpuffer 1 (siehe 4.3.6.) gewaschen. Die Proteinverluste in Durchfluss und Waschschriften (Wasch), sowie das an der Säule verbliebene Protein ( $\Delta$ ABI1 gebunden) wurde

bestimmt. Als 100 % wurde die eingesetzte Proteinmenge von 500 µg gesetzt, welche zuvor durch Bradford Bestimmung ermittelt wurde. Die Grafik zeigt zwei repräsentative Experimente. Der Versuch wurde viermal mit je drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Kopplungsrate schwankte dabei zwischen 60-80%.

Die Abbildung 21 zeigt, dass etwa 20-40% des eingesetzten Proteins in Durchfluss und Waschsritten verloren gingen. Somit band im Schnitt etwa 60-80% des eingesetzten Proteins an der Säule. Die Verluste können auf der Tatsache begründet sein, dass das Material mit N-Succinimidestern als reaktive Gruppe zu einer instabilen kovalenten Bindung neigt (Wilchek *et al.* 1987). Jedoch erschien die Affinitätsmatrix Affi 15 Gel für die Immobilisierung von  $\Delta$ ABI1 geeignet.

### 2.1.3. Phosphatase-Aktivität nach Immobilisierung von $\Delta$ ABI1

Um die Aktivität und Funktionalität der an Affi 15 Gel immobilisierten Phosphatase  $\Delta$ ABI1 zu überprüfen, wurde ein Phosphatase-Assay durchgeführt. Insbesondere war die Frage zu klären, inwieweit sich die PP2C durch RCAR und ABA regulieren ließ, also einen funktionalen trimeren Komplex auszubilden vermochte. Bei unbeschränkter Zugänglichkeit der fixierten Proteinphosphatase sollte diese durch RCAR8 und 1 µM ABA vollständig gehemmt werden. Die Immobilisierung des Proteins erfolgt jedoch zufällig und somit kann das Protein an den RCAR Kontaktflächen oder am aktiven Zentrum mit der Gelmatrix vernetzt sein, was eine RCAR Bindung verhindert und mit einem Verlust der Funktionalität des Proteinkomplexes einhergeht (Abb. 22).



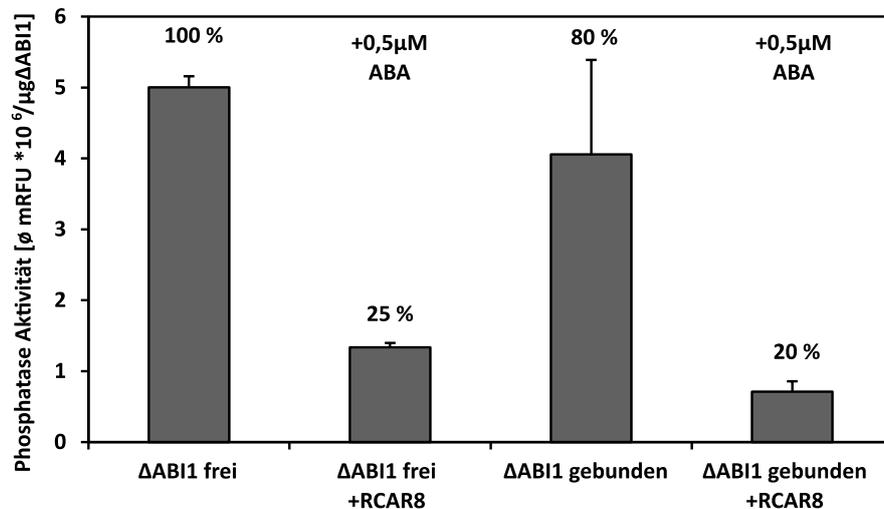
**Abb. 22 Immobilisierung der Proteinphosphatase  $\Delta$ ABI1 an die Affinitätsmatrix**

A: Die optimale Bindung von  $\Delta$ ABI1 an das Gelmaterial. Sowohl die Bindestellen für RCAR8 als auch das aktive Zentrum der Phosphatase sind zugänglich. Die Phosphatase sollte im Assay eine normale Aktivität und Regulation durch RCAR8 und ABA zeigen. In B verliert die Proteinphosphatase ihre Aktivität und/oder RCAR Regulation aufgrund einer kovalenten Modifikation des aktiven Zentrums mit dem Gelmaterial bzw. einer nicht zugänglichen RCAR-Bindestelle.

Abb. 22 verdeutlicht zwei mögliche Zustände, die bei der Immobilisierung der Phosphatase an die Affinitätsmatrix auftreten können. Somit ist ein Verlust der Phosphatase-Aktivität und der RCAR-Regulation nach der Immobilisierung von  $\Delta$ ABI1 aufgrund ungünstiger Ausgangslage zu erwarten.

In der Tat waren solche Einbußen nach PP2C-Immobilisierung festzustellen, jedoch fielen sie vergleichsweise gering aus. Dies ist repräsentativ an einem Experiment gezeigt, in welchem

ungebundene und immobilisierte  $\Delta$ ABI1 mit RCAR8 inkubiert und die Phosphatase-Aktivität und Regulation in Gegenwart von ABA miteinander verglichen wurde (Abb. 23).



**Abb. 23 Phosphatase-Aktivität von  $\Delta$ ABI1 nach Immobilisierung**

Die Phosphatase-Aktivität freier und gebundener  $\Delta$ ABI1 Phosphatase und ihre Regulation durch RCAR8 wurde untersucht. 5 µg freie und 20 µg immobilisierte PP2C wurden mit und ohne RCAR8, sowie 0,5 µM ABA im molaren Verhältnis 1:4 analysiert. Die Phosphatase Aktivitäten pro µg  $\Delta$ ABI1 wurden für die Proben angegeben. Über den Säulen ist die prozentuale Phosphatase-Aktivität relativ zur Aktivität der freien Phosphatase dargestellt. Diese Abbildung zeigt repräsentative Daten mit SD eines Versuchs mit 4 technischen Replikaten.

Die Phosphatase-Aktivität nahm nach der Fixierung in etwa um 20% ab (Abb. 23). Die Reduktion der Phosphatase-Aktivität in verschiedenen Experimenten schwankte stark. Die Aktivität konnte abhängig vom jeweiligen Versuch um 20% bis hin zu 80% verringert sein. Im Durchschnitt war die Phosphatase Aktivität um etwa 50% durch die Immobilisierung verringert. Es konnte jedoch in jedem Versuch eine Inhibition der Proteinphosphatase durch RCAR und ABA zwischen 75-100% festgestellt werden (Tab. 6). Die Variation der Phosphatase-Aktivität der immobilisierten PP2C könnte durch experimentell bedingte Schwankungen bei der Probenentnahme des Gelmaterials mit dem gebundenen  $\Delta$ ABI1 erklärt werden (siehe Abb. 23). Eine Regulation von  $\Delta$ ABI1 war auch nach der Fixierung über RCAR8 und ABA möglich. In Abb. 23 kann ebenfalls die Hintergrundaktivität durch Kontamination mit Phosphatasen aus *E.coli* in der Proteinprobe beobachtet werden. Die Aktivität dieser Phosphatasen kann nicht mit RCAR8 und ABA inhibiert werden. In diesem Fall betrug die Hintergrundaktivität ca.  $1 \times 10^6$  Ø mRFU\*10<sup>6</sup>/µg Protein sowohl bei freier als auch bei gebundener Phosphatase, was einer Kontamination durch *E.coli* Phosphatasen von ca. 20% entspräche. In den Versuchswiederholungen konnten Schwankungen der Kontaminationen durch nicht RCAR-regulierte *E.coli* Phosphatasen zwischen 0-20% festgestellt werden (Tab. 6). In der folgenden Tabelle sind repräsentative Daten zu Restaktivität, Inhibition und Kontamination der Proteinphosphatase nach Immobilisierung an die Affinitätsmatrix zusammengestellt.

Tab. 6 Daten zu Restaktivität, Inhibition und Kontamination der immobilisierten Phosphatase  $\Delta$ ABI1

Replik	$\Delta$ ABI1 Restaktivität nach Immobilisierung [%]	$\Delta$ ABI1 Inhibition durch RCAR8 und ABA [%]	<i>E. coli</i> Phosphatasen Kontamination [%]
1	54	96	4
2	52	88	12
3	80	80	20
4	57	75	25

Die Ergebnisse zeigen, dass die Immobilisierung von  $\Delta$ ABI1 über das gewählte Verfahren zwar einen negativen Einfluss auf dessen Funktionalität hatte, das System aber grundsätzlich für eine Affinitätschromatografie zur Isolation potentieller Liganden geeignet ist.

#### 2.1.4. Quantifizierung von ABA durch HPLC

Für den Nachweis einer erfolgreichen Ligandenanreicherung über immobilisierte ABA Rezeptorkomplexe sollte zunächst ABA in einem Rekonstruktionsexperiment angereichert werden. Die quantitative Erfassung der ABA kann grundsätzlich über ELISA (Maldiney *et al.* 1986), massenspektroskopische (Gómez-Cadenas *et al.* 2002, Ross *et al.* 2004) bzw. gaschromatografische Analysen (Rivier *et al.* 1977), sowie durch die charakteristische Absorption der ABA bei 264 nm nach chromatografischer Trennung erfolgen (Ciha *et al.* 1977). Hier sollte der ABA-Nachweis über HPLC aufgrund des geringeren experimentellen Aufwandes nach beschriebener Methodik durchgeführt werden. ABA wurde in einem Laufmittel bestehend aus 0,25 % Essigsäure, pH 3,9 aufgenommen und durch einen linearen Methanolgradienten auf einer reversen C18-Säule getrennt (Abb. 24). ABA eluierte bei etwa 75% Methanol.

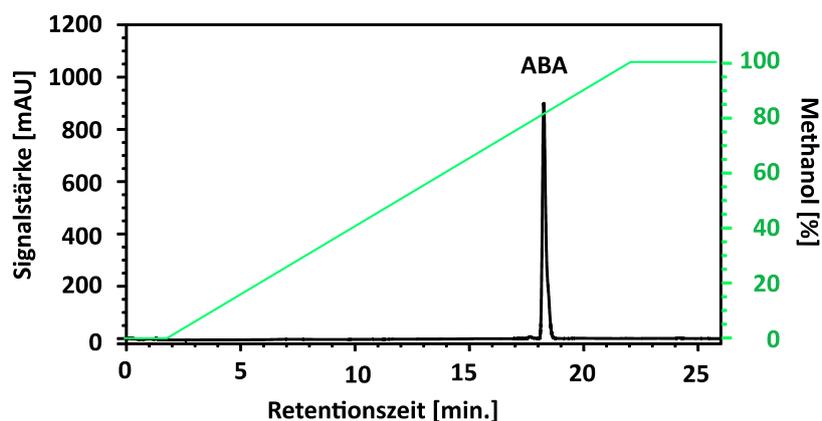
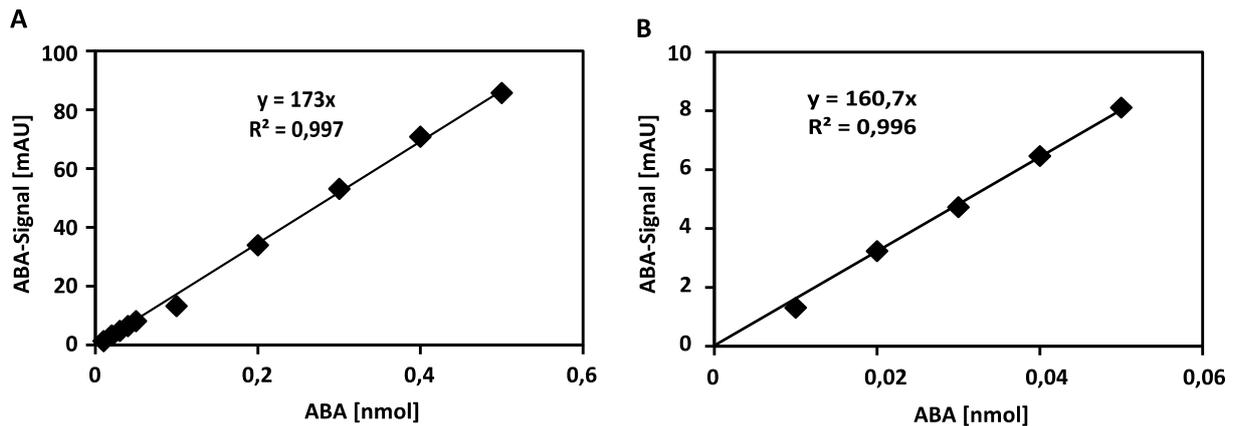


Abb. 24 ABA Analyse durch HPLC

Es wurde 5 nmol ABA als Reinsubstanz unter Verwendung einer HPLC mit einer reversen C18-Säule aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-20 min. und 0,25% Essigsäure in Wasser zu 100% Methanol. Die relative Absorption (mAU) wurde gegen die Retentionszeit (min.) aufgetragen. Der Verlauf des Methanolgradienten (grün) wurde in der Grafik eingezeichnet.



**Abb. 25 ABA-Kalibrierung**

ABA wurde als Reinsubstanz in dem Laufmittel A, 0,25% Essigsäure (pH=3,9), in der Konzentration 4  $\mu$ M gelöst und in verschiedenen Mengen injiziert. Als unpolares Laufmittel B wurde Methanol verwendet. Das relative Absorptionssignal bei 264 nm wurde in einer ABA-Konzentrationsreihe durch HPLC-Analyse bestimmt. Abbildung A zeigt den gesamten Messbereich der ABA-Konzentrationsreihe. In Abbildung B wurde die untere Detektionsgrenze von ABA dargestellt.

Unter Anwendung der in Abb. 24 dargestellten Analytik wurde eine ABA-Standardkurve gemessen (Abb.25), die sich durch ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,997$  im Bereich 0,01 bis 0,6 nmol auszeichnete. Die Nachweisgrenze für ABA lag bei 10 pmol. Die Standardkurve diente als Grundlage für die ABA-Quantifizierung bei der Rekonstruktion der Methode für das *Ligand Fishing*.

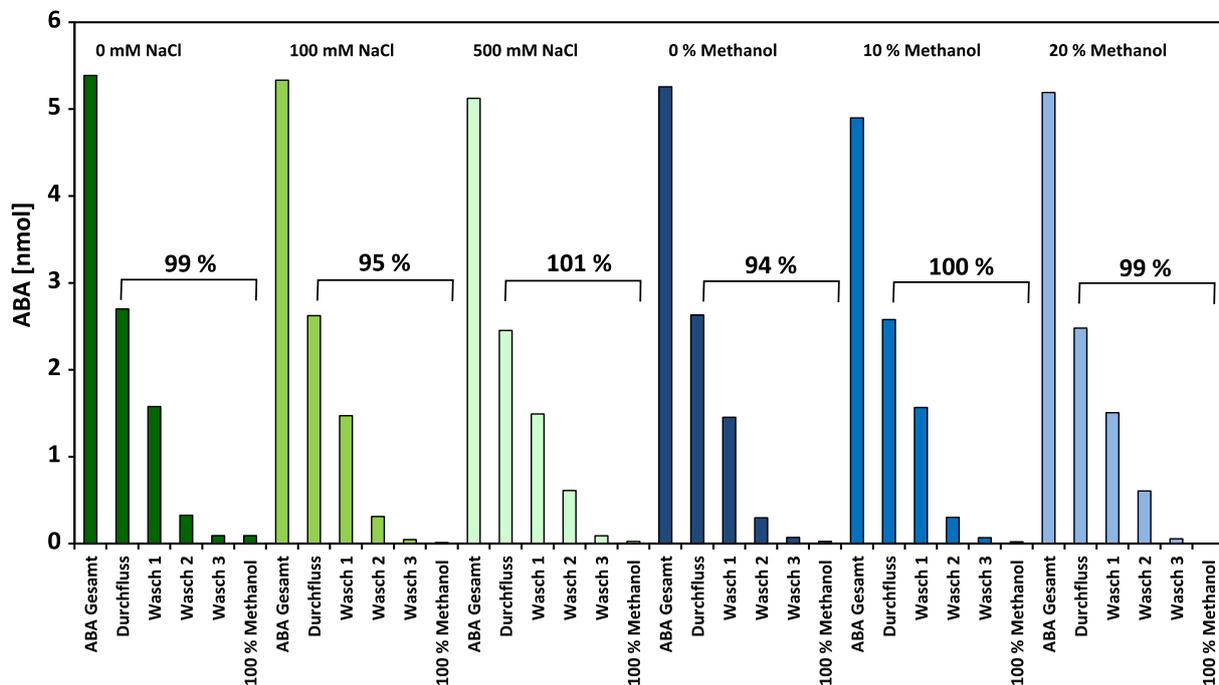
## 2.2. ABA-Affinitätschromatografie mit Rezeptorkomplexen

Um zu überprüfen, ob das etablierte System zur Isolierung von Liganden des RCAR/PP2C Rezeptorkomplexes funktionierte, wurde ein Rekonstruktionsexperiment mit  $\Delta$ ABI1, RCAR8 und ABA durchgeführt. Bei Funktionieren des *Ligand Fishing* Systems sollte eine Anreicherung von ABA erfolgen. Kritisch war die Nachweisgrenze der ABA von 10 pmol. Insofern musste genügend ABA-Bindekapazität bereitgestellt werden.

Als Kontrolle dienten Säulen mit  $\Delta$ ABI1 ohne RCAR8, sowie Leersäulenmaterial, wo keine ABA-Bindung vorhanden sein sollte. Da die PP2C kein ABA binden kann, sollte das Waschen des Säulenmaterials so erfolgen, dass kein ABA in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden kann, wohl aber im Ansatz mit einem funktionalen ABA-Rezeptorkomplex. Vor diesem Hintergrund musste der geeignete Wasch- und Elutionspuffer identifiziert werden.

Um unspezifisch gebundene ABA aus den Säulen zu entfernen, wurde eine Optimierung des Waschpuffers 2 (siehe Material und Methoden 4.3.6.) vorgenommen. Grundlage des Waschpuffers 2 war die Rezeptur für den bei der Protein Isolation verwendeten Dialysepuffer ohne DTT (100 mM Tris, 100 mM NaCl pH 7,9). Bei der Optimierung wurden dem Ausgangswaschpuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl pH 7,9) verschiedene Konzentrationen an Natriumchlorid und Methanol beigefügt.

Natriumchlorid sollte ionische Wechselwirkungen unterbinden, wohingegen Methanol hydrophobe Wechselwirkungen verringern sollte. Für diese Studie wurde zunächst Leersäulenmaterial, das mit 5 nmol ABA inkubiert wurde, verwendet um unspezifische ABA Bindung zu simulieren (Abb. 26).



**Abb. 26 Optimierung des Waschpuffers der Affinitätschromatografie**

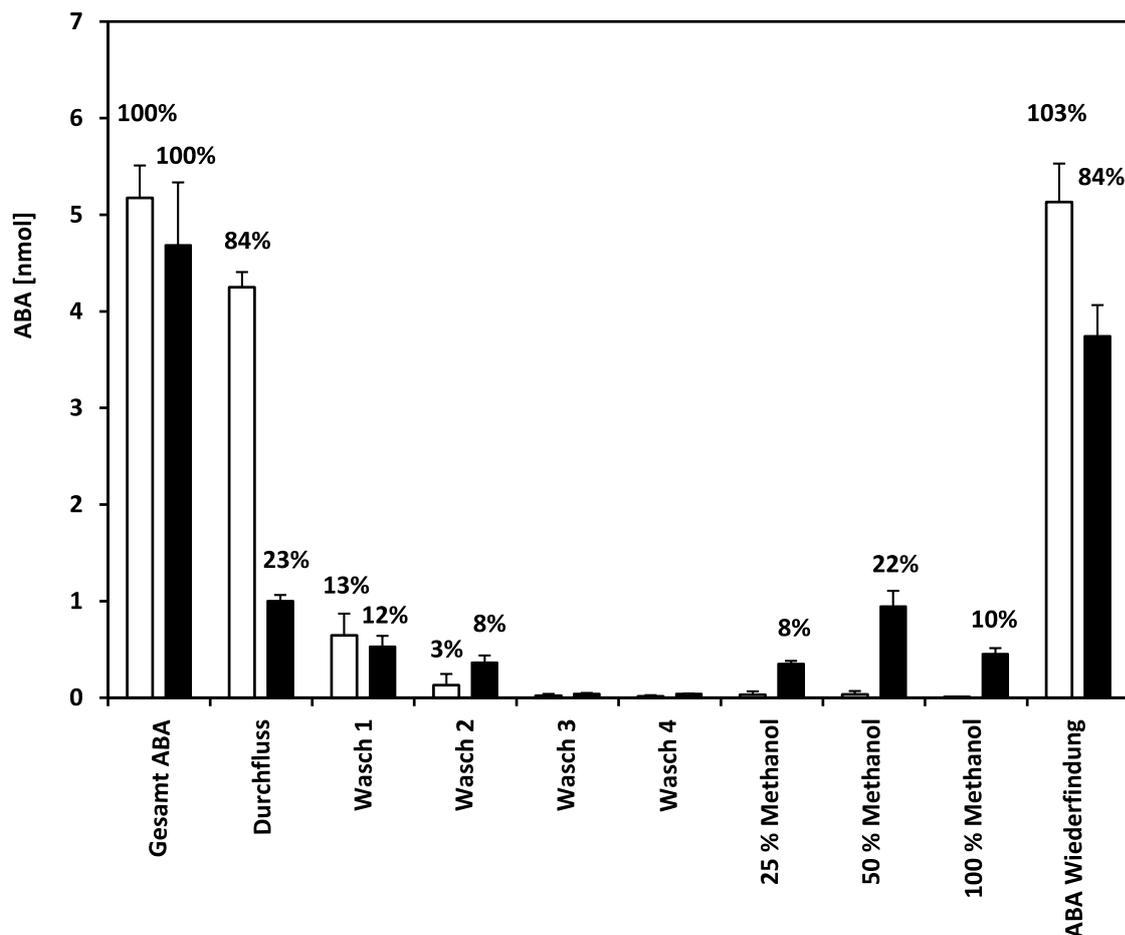
Leersäulenmaterial wurde mit 5 nmol ABA inkubiert und mit Waschpuffer, welcher sich aus 100 mM Tris (pH 7,9) und den in der Grafik angegebenen Konzentrationen von NaCl (grün) oder Methanol (blau) zusammensetzte. Die ausgewaschene ABA wurde durch HPLC Analyse bestimmt. Über den schwarzen Klammern wurde die Wiederfindungsrate in % angegeben. Dargestellt sind Punktmessungen eines Versuches.

Die Optimierung des Waschpuffers 2 (Abb. 26) ergab, dass hohe Konzentrationen von Natriumchlorid und Methanol eine effiziente Entfernung unspezifisch gebundener ABA ermöglichten. Da jedoch Methanol den Proteinkomplex eventuell schädigen könnte, wurde für zukünftige Versuche eine höhere Salzkonzentration (500 mM) in dem Waschpuffer 2 verwendet. Die hohe Salzkonzentration sollte zudem die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Rezeptorkomplexes zusätzlich erhöhen, um ein Ausbluten des Komplexes zu verhindern.

Nach Optimierung des Waschpuffers wurde das Rekonstruktionsexperiment durchgeführt. Für den Versuch wurden 3 mg  $\Delta$ ABI1 an 1,2 g Affinitätsmatrix immobilisiert. Das Gelmaterial wurde in eine Säule mit dem Volumen 6 ml gefüllt, der Durchfluss aufgefangen und das Gelmaterial mit drei Gelbettvolumen Waschpuffer1 (siehe Material und Methoden 4.3.6.) gewaschen.

Anschließend wurde das Material in zweifachem Gelbettvolumen 1X Puffer reeluiert. Durch Bradford-Analyse wurde die Bindungseffizienz des Gels (hier 40%) ermittelt. Anschließend wurde die Aktivität und Funktionalität der gebundenen PP2C durch Phosphatase-Assays (siehe 2.1.3.) überprüft. Die Aktivität der Proteinphosphatase in dem hier dargestellten Versuch war nach der Kopplung um etwa 50% verringert. Es konnte eine Inhibition der Phosphatase von 90% erzielt werden. Im Anschluss an

diese Untersuchung wurde das Gelmaterial gleichmäßig auf sechs Reaktionsgefäße (1,5 ml) verteilt. Die Kontrollen wurden mit 8xPuffer, Wasser und 5 nmol ABA versetzt. Die Proben mit dem Rezeptorkomplex wurden ebenfalls mit 8xPuffer und mit einem vierfachen molaren RCAR8-Überschuss und 5 nmol ABA inkubiert. Für die Bestimmung der ABA-Konzentration jeder Probe wurden 50 µl Aliquots genommen. Die Proben wurden in einem Kippschüttler invertiert und 35 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 1 ml Säulen übertragen und der Durchfluss aufgefangen. Die Säulen wurden viermal mit jeweils 600 µl Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend wurde versucht ABA in drei Schritten mit 500 µl 25, 50 und 100% Methanol zu eluieren (Abb. 27).



**Abb. 27 ABA-Anreicherung durch den  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex**

Je Probe wurden 200 mg Affinitätsmatrix mit 0,2 mg gebundener  $\Delta$ ABI1 eingesetzt. Jede Probe wurde mit 5 nmol ABA versetzt. Bei den Rezeptorkomplex Ansätzen wurde ein vierfacher molarer Überschuss an RCAR8 zugegeben. Dann wurden die Proben 35 min. bei 37°C in einem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurden sie in 3 ml Säulen überführt und der jeweilige Durchfluss aufgefangen. Im Anschluss daran wurden die Säulen viermal mit 600 µl Waschpuffer 2 gewaschen. Abschließend wurde ABA mit je 500 µl 25%, 50% und 100% Methanol eluiert. Dargestellt sind die ABA-Gehalte aus zu Beginn des Versuches (Gesamt ABA), die ABA-Mengen in Durchfluss und Waschsritten (Wasch 1-4), sowie die ABA-Mengen in den Elutionsfraktionen (25, 50 und 100% Methanol). Zuletzt ist die Wiederfindungsrate für die eingesetzte ABA-Menge gezeigt. Die Messwerte der Kontrolle sind weiß markiert und die des Rezeptorkomplexes schwarz. Dargestellt sind Daten mit SD eines repräsentativen Versuches. Der Versuch wurde viermal wiederholt mit je drei technischen Replikaten. In den Wiederholungen konnte für die Kontrolle eine Wiederfindungsrate für ABA zwischen 95-100% festgestellt werden. Bei den ABA-Rezeptorkomplexen schwankte die wiedergefundene ABA-Menge zwischen 85-95%. In allen Versuchen war eine spezifische Bindung und Elution von ABA festzustellen.

ABA wurde bei der Kontrolle beinahe vollständig ausgewaschen (Abb. 27). Es konnten nur noch etwa 0,1 nmol Abscisinsäure in den Elutionsfraktionen der Kontrolle nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Rückstände aus den Waschfraktionen. Dahingegen wurde ABA an der Säule mit dem  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex gegenüber der Kontrolle zurückgehalten. In den Elutionsfraktionen des Rezeptorkomplexes fanden sich etwa 1,8 nmol ABA. Die Wiederfindung ist für die Kontrolle etwa 100% des eingesetzten ABA. Bei den Rezeptorkomplex Proben konnten 84% der eingesetzten ABA nachgewiesen werden. Diese reduzierte Wiederfindungsrate ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass noch immer Reste von ABA an den Komplex gebunden waren und nicht vollständig eluiert werden konnten. Es wurde zudem ein „Bluten“ des gebundenen Rezeptorkomplexes in den Waschfraktionen festgestellt (Abb. 27), was auf eine Destabilisierung des Komplexes durch die Waschschrte hinwies. Zwei Waschschrte reichten aus, um unspezifisch gebundene ABA zu 98% aus den Säulen zu entfernen. Um den Effekt des Ausblutens der Rezeptorkomplexe zu minimieren, wurden in zukünftigen Experimenten nur noch drei Waschschrte angewendet.

Ausgehend von der Molmenge an gekoppelter PP2C pro Säule ließ sich die maximale Bindekapazität der Säulen für ABA errechnen. Die Aktivitätsverluste der Phosphatase (hier 50%) wurden nach der Immobilisierung von der maximalen Bindekapazität abgezogen. Um die erwartete Bindekapazität der Säulen zu bestimmen, wurde die Inhibition der gekoppelten Phosphatase durch RCAR und ABA (hier 90%) miteinbezogen.

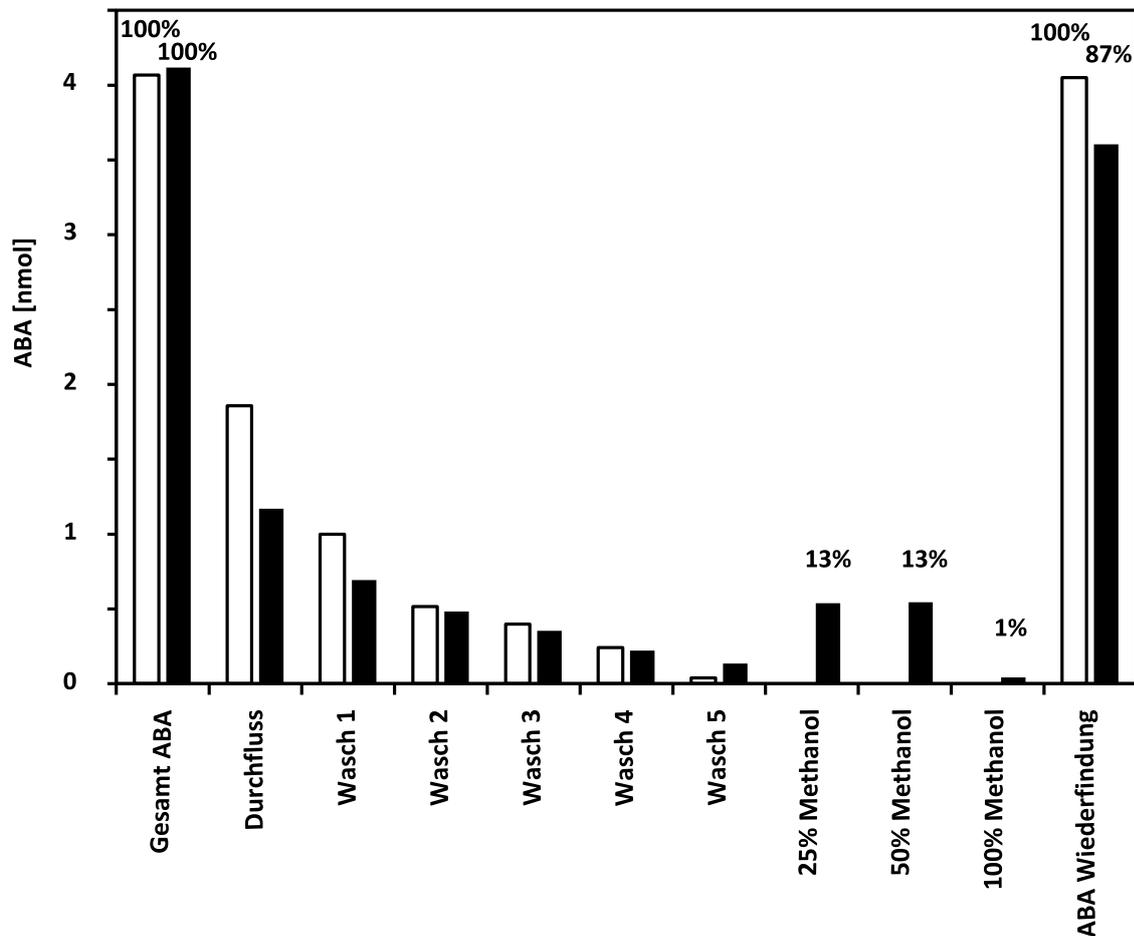
Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung exemplarischer Ergebnisse der berechneten Bindekapazität für drei exemplarische Experimente und die tatsächlich von der Säule eluierte ABA Menge. Die Daten von Experiment 1 sind dem in Abb. 27 gezeigten Versuch zuzuordnen.

**Tab. 7** ABA Bindekapazität der immobilisierten ABA-Rezeptorkomplexe

	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	nmol	Bindekapazität [%]	nmol	Bindekapazität [%]	nmol	Bindekapazität [%]
<b>PP2C eingesetzt</b>	5,8	100	7,2	100	9,8	100
<b>PP2C funktional nach Immobilisierung</b>	2,9	50	4,3	60	7,9	81
<b>Erwartete ABA Bindekapazität</b>	2,6	45	4,1	57	6,5	66
<b>ABA Elution</b>	1,8	31	1,3	32	2,8	29

Ausgehend von den Berechnungen in Tab. 7 sollten in dem in Abb. 27 gezeigten Experiment 1 etwa 2,6 nmol ABA an die Säulen mit funktionalem Rezeptorkomplex binden. Es konnte 1,8 nmol ABA eluiert werden. Die Wiederfindungswerte für den Komplex in Abb. 27 verdeutlichen, dass nicht die gesamte gebundene ABA eluiert wurde. Das heißt, dass ein Rest ABA möglicherweise noch an der Säule gebunden war. In der Zusammenstellung der drei Experimente ist zu sehen, dass die eluierte ABA Menge immer in etwa 30% der maximalen Bindekapazität entsprach.

In einem Testversuch wurde überprüft, ob die Ergebnisse des RCAR8-Rezeptorkomplexes auch auf den Rezeptorkomplex mit RCAR11 übertragen werden können (Abb. 28).



**Abb. 28 ABA-Anreicherung in RCAR11-Rezeptorkomplex**

Proben von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex (schwarz) und Leersäule (weiß) wurden durch HPLC analysiert. Die Säulen wurden mit je 4 nmol ABA inkubiert und in fünf Waschschrinen mit Waschpuffer 2 (100 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7,9) gewaschen. In den ersten drei Waschschrinen wurde dem Waschpuffer 0,5  $\mu$ M ABA beigegeben. In den folgenden zwei Waschschrinen war kein ABA im Waschpuffer. Das  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Verhältnis war 1:4. Dargestellt sind Einzelmessungen eines Testversuches.

Auch für die Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex und ABA konnte eine Anreicherung von ABA von etwa 30% der insgesamt eingesetzten ABA-Menge festgestellt werden.

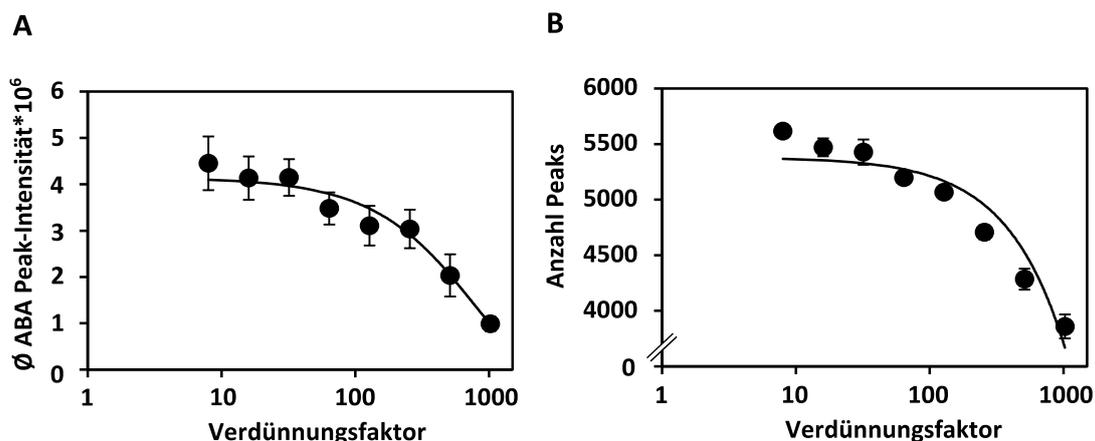
Ausgehend von den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich sagen, dass die hier entwickelte Methode eine Isolation des Liganden ABA über Affinitätschromatografie erlaubt.

### 2.3. Ergebnisse der FT-MS Analyse

Das erfolgreich etablierte *Ligand Fishing* System für Liganden sollte mit Zellextrakt aus Arabidopsis Wildtyp Columbia und Wirsing als Ligandenquelle in Kombination mit FT-MS Analyse getestet werden. Da dieser Ansatz eine nicht zielgerichtete Methode darstellt, wurde ein Massenspektrometer mit möglichst hoher Auflösung, Sensitivität und Massengenauigkeit benötigt. Die hohe Auflösung ist essentiell, um möglichst viele verschiedene Metabolite parallel untersuchen zu können. Eine hohe Sensitivität der FT-MS im femtomolaren Bereich ermöglicht die Erfassung von Metaboliten aus komplexen Stoffgemischen, welche in nur sehr geringer Konzentration in den analysierten Proben vorkommen. Zudem kann durch die hohe Massengenauigkeit für Massensignale in der Regel eine Summenformel errechnet werden (Marshall *et al.* 2008, Dunn *et al.* 2013). Die angereicherten Massen können durch Anwendung der sog. *seven golden rules* (Kind *et al.* 2007) weiter selektiert werden. Dabei werden die Massensignale von natürlichen Substanzen z.B. durch  $^{13}\text{C}$ -Isotope und Verhältnisse von Elementen der errechneten Summenformeln zueinander identifiziert.

#### 2.3.1. Optimierung FT-MS Analyse

Vor der vergleichenden FT-MS Analyse von Rezeptorkomplex und Kontrollen mussten optimale Bedingungen für die MS-Messungen ermittelt werden. Dazu wurden zunächst Zellextrakte in einer Verdünnungsreihe und mit steigender Scanzahl untersucht (Abb. 29 A, B). Abscisinsäure wurde als Vergleichsparameter aufgrund ihres natürlichen Vorkommens in Pflanzen ausgewählt, zudem wurde ABA in der späteren vergleichenden Analyse als spezifisch angereicherte Masse der PP2C/RCAR Rezeptorkomplexe erwartet.

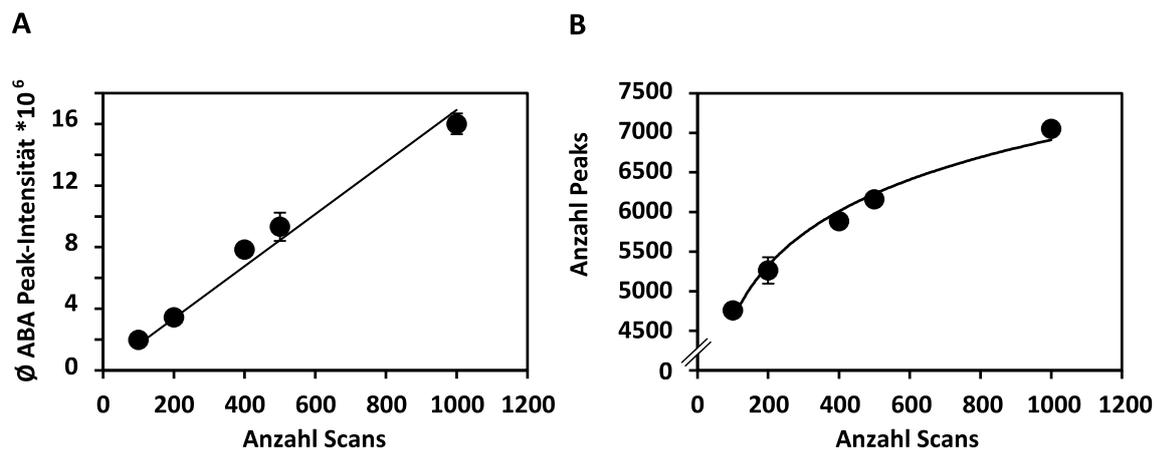


**Abb. 29 Bestimmung der optimalen Probenverdünnung für die FT-MS Analyse**

Zellextrakt aus 20 g (FW) Wirsing wurde in 200 µl 70% Methanol aufgenommen und 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 und 1:1024 verdünnt. Von jeder Probe wurden 70 µl in das Massenspektrometer manuell injiziert. Die Messung erfolgte mit drei technischen Replikaten je Verdünnung bei 200 Scans im negativen Modus. Abbildung A zeigt die mittlere Peak-Intensität von ABA. In Grafik B ist die Anzahl der gemessenen Peak-Signale aufgetragen. Dargestellt sind Daten mit SD eines repräsentativen Versuches. Die Messung wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Die Verdünnungsreihe in Abb. 29 A, B zeigt den Zusammenhang zwischen der Verdünnung der Probe und der mittleren Peak-Intensität am Beispiel von ABA (Abb. 29, A), sowie der Anzahl an erfassten Peaks (Abb. 29, B). Es war ein exponentieller Abfall bei den Kurven mit steigendem Verdünnungsfaktor zu beobachten. Dies korrespondierte mit der exponentiellen Verdünnung der Probe um den Faktor 2 beginnend bei 1:8 und endend bei 1:1024. Ausgehend von dieser Analyse wurde in zukünftigen Versuchen eine Verdünnung der Zellextrakte von 1:50 gewählt, um eine Überladung des Detektors zu vermeiden. Zudem konnte dadurch eine hohe Anzahl an erfassten Signalen und eine gute Signal-Intensität gewährleistet werden.

Zur Ermittlung der optimalen Scanzahl, um möglichst viele Signale mit hoher Signalintensität zu erhalten, wurde der Einfluss der Scanzahl auf die Peak-Intensität, wieder am Beispiel ABA, und die Anzahl der gefundenen Massen-Signale untersucht. Dazu wurde erneut verdünnter Zellextrakt aus Wirsing analysiert. Zunächst wurde am Beispiel von ABA der Einfluss der Scanzahl auf die Peak-Intensität untersucht. Anschließend wurde die Gesamtzahl der erfassten Peaks in Abhängigkeit von der Anzahl der Scans ermittelt (Abb. 30, A, B).



**Abb. 30 Einfluss der Scanzahl auf Peak-Intensität und Peakanzahl in der FT-MS Analyse**

Zellextrakt aus 20 g Wirsing wurde in 200 µl 70% Methanol gelöst und anschließend mit dem selben Lösungsmittel 1:50 verdünnt. Es wurden 70 µl Probe injiziert und im negativen Modus gemessen. Abbildung A zeigt die Peak-Intensität von ABA gegen die Scanzahl. In Abbildung B wurde die Anzahl der erfassten Peaks gegen die Anzahl der Scans aufgetragen. Dargestellt sind Daten eines repräsentativen Versuches mit SD aus drei technischen Wiederholungen.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Peak-Intensität und Scanzahl, wie beispielhaft an ABA zu beobachten ist (Abb. 30, A). Je mehr Scans desto höher die Peak-Intensität, daher lassen sich schwache Signale mit einer höheren Scanzahl verstärken.

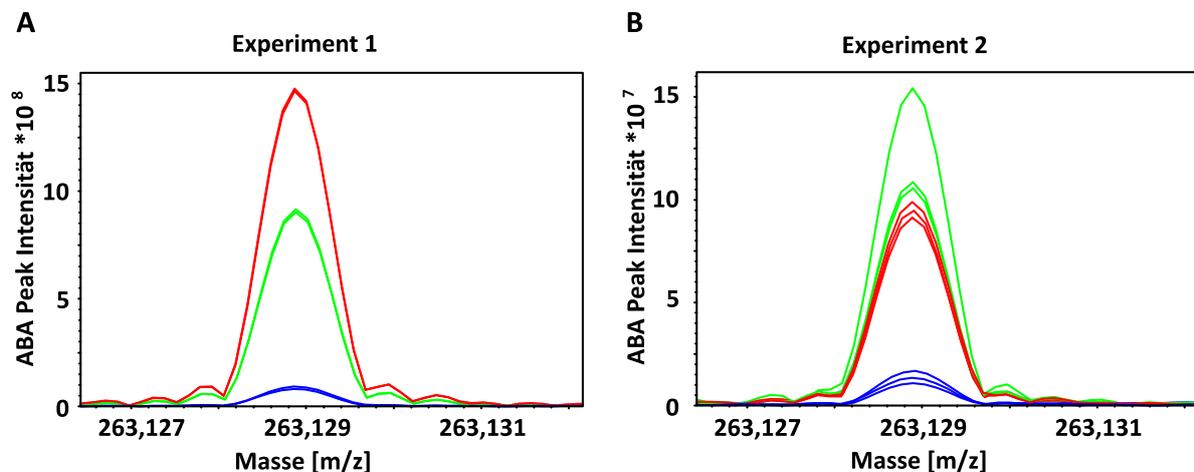
Es konnte ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Scans und der Anzahl an Peaks festgestellt werden (Abb. 30, B). Die höchste Scanzahl zeigt demzufolge auch die höchste Anzahl an Peaks. Dieser Effekt entsteht durch eine Akkumulation der Massen im Massenspektrometer, welche eine steigende Peak-Intensität nach sich zieht. Da kein linearer Zusammenhang zwischen Scanzahl und der Anzahl der Peaks nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass noch andere

Einflussfaktoren, die Erfassung der Peak-Signale beeinflussen. Ein möglicher Faktor könnte die Ionensuppression sein, bei der Signale durch andere stärkere Peak-Signale in dem unmittelbaren Massenbereich unterdrückt werden.

Bei steigender Scanzahl können mehr Massen die Messungsgrenze von  $1,5 \times 10^6$  m/z überwinden. Es empfiehlt sich somit für die spätere vergleichende Analyse eine möglichst hohe Scanzahl zu wählen. Für weitere Analysen wurden daher 500 bzw. 1000 Scans für die Messungen verwendet.

### 2.3.2. Validierung der Funktionalität des *Ligand Fishing* Systems mit Zellextrakt

Zur Ermittlung, ob das *Ligand Fishing* System aus 2.2. mit Zellextrakt funktionierte, wurden Säulen mit  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und PP2C/RCAR Rezeptorkomplexen mit Zellextrakt aus Arabidopsis inkubiert, gewaschen und eluiert. Anhand von ABA als bereits bekanntem Liganden der Rezeptorkomplexe sollte festgestellt werden, ob das System grundsätzlich für die Isolation von Liganden geeignet war. Die ersten Versuche dazu wurden mit Zellextrakt aus Arabidopsis Wildtyp Columbia vorgenommen, da die untersuchten Rezeptorkomplexe aus dieser Pflanze stammten (Abb. 31).



**Abb. 31 ABA Anreicherung in PP2C/RCAR Rezeptorkomplexen mit Arabidopsis Zellextrakt**

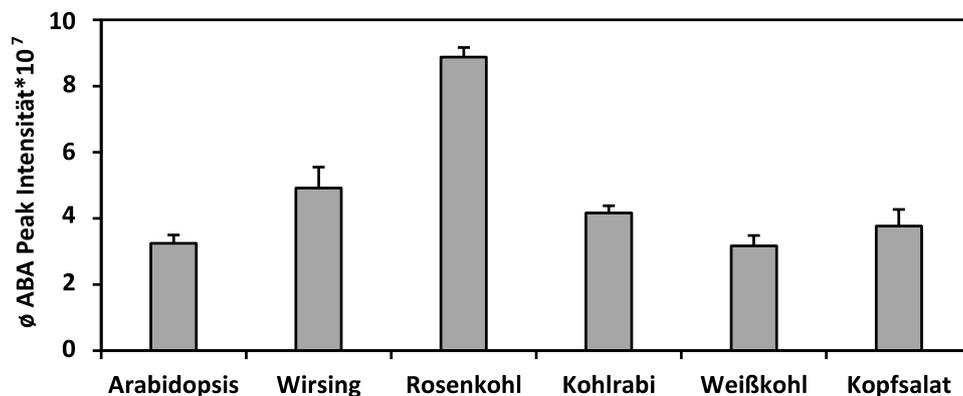
In den Experimenten wurden Proben aus der Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1 Kontrolle (blau) und den Rezeptorkomplexen  $\Delta$ ABI1/RCAR8 (rot) und  $\Delta$ ABI1/RCAR11 (grün) durch FT-MS analysiert. Experiment 1 zeigt Messungen mit zwei technischen Replikaten. Experiment 2 wurde mit drei technischen Replikaten wiederholt. Die Proben wurden in 400  $\mu$ l 70% Methanol gelöst und mit 500 Scans im negativen Modus gemessen.

In der vergleichenden Analyse von  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und den Rezeptorkomplexen  $\Delta$ ABI1/RCAR8 bzw.  $\Delta$ ABI1/RCAR11 konnte eine Anreicherung von ABA um den Faktor 10-15 in den Proben der Rezeptorkomplexe festgestellt werden (Abb. 31). Somit kann davon ausgegangen werden, dass das *Ligand Fishing* System mit Zellextrakt aus Arabidopsis funktionierte. Für die Durchführung der Versuche war sehr viel Biomasse notwendig. Jede Säule wurde mit Zellextrakt aus 20 g Pflanzenmaterial behandelt. Dies basierte auf zwei theoretischen Betrachtungen: zum einen wird in

## Ergebnisse

der Literatur eine ABA-Menge zwischen 0,8-4 nmol pro Gramm Frischgewicht (FW) in Pflanzen angegeben (Zeevaart *et al.* 1980, Guerrero *et al.* 1986) und zum anderen lag die maximale theoretische Bindekapazität der Säulen im Durchschnitt bei etwa 6 nmol (siehe Tab. 7). Somit waren ausgehend von minimaler ABA-Menge und maximaler Bindekapazität mindestens 10 g (FW) Pflanzenmaterial notwendig um eine Sättigung der Säulen mit ABA zu gewährleisten. Für die Liganden konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese in geringerer Abundanz in den Pflanzen vorlagen, daher wurde Zellextrakt aus 20 g Pflanzenmaterial für die Versuche verwendet.

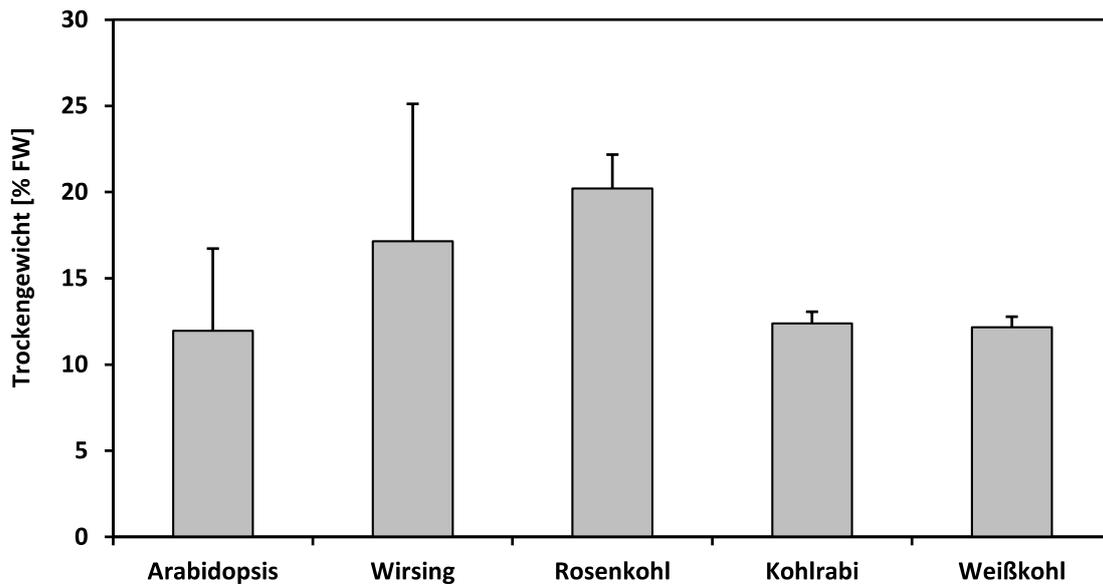
Um den hohen Bedarf an Biomasse zu decken wurde nach Alternativen für *Arabidopsis* gesucht. Dazu wurden zunächst Zellextrakte aus verschiedenen *Brassicaceen* und der *Asteraceae* Kopfsalat durch FT-MS Analyse verglichen (Abb. 32).



**Abb. 32 ABA in *Brassicaceen***

In der Analyse wurden Zellextrakte aus 20 g Pflanzenmaterial je Pflanze hergestellt und durch FT-MS mit 500 Scans im negativen Modus analysiert. Dargestellt sind zusammengefasste Daten mit SD aus drei biologischen Wiederholungen mit drei technischen Replikaten.

Die Analyse der Zellextrakte (Abb. 32) ergab, dass das ABA Signal in einigen *Brassicaceen* wie z.B. Wirsing und Rosenkohl etwa zwei- bis dreimal höher war, als in *Arabidopsis*. Dies würde für eine Verwendung dieser *Brassicaceen* für zukünftige Versuche sprechen. Allerdings musste zunächst festgestellt werden, ob die Unterschiede des ABA-Signals auf Unterschiede des Trockengewichts der Pflanzen zurück zu führen waren. Dazu wurde eine Trockengewichtsbestimmung mit fünf der sechs vorher analysierten Pflanzen durchgeführt (Abb. 33, modifiziert nach Garnier *et al.* 2001). Es wurden drei Pflanzen je *Brassicaceae* verwendet und von diesen je drei Proben à 2 g genommen. Das Frischgewicht der Proben wurde bestimmt und die Proben wurden drei Tage bei 60°C getrocknet und erneut gewogen. Anhand der Gewichts Differenz wurde der prozentuale Gewichtsverlust errechnet.

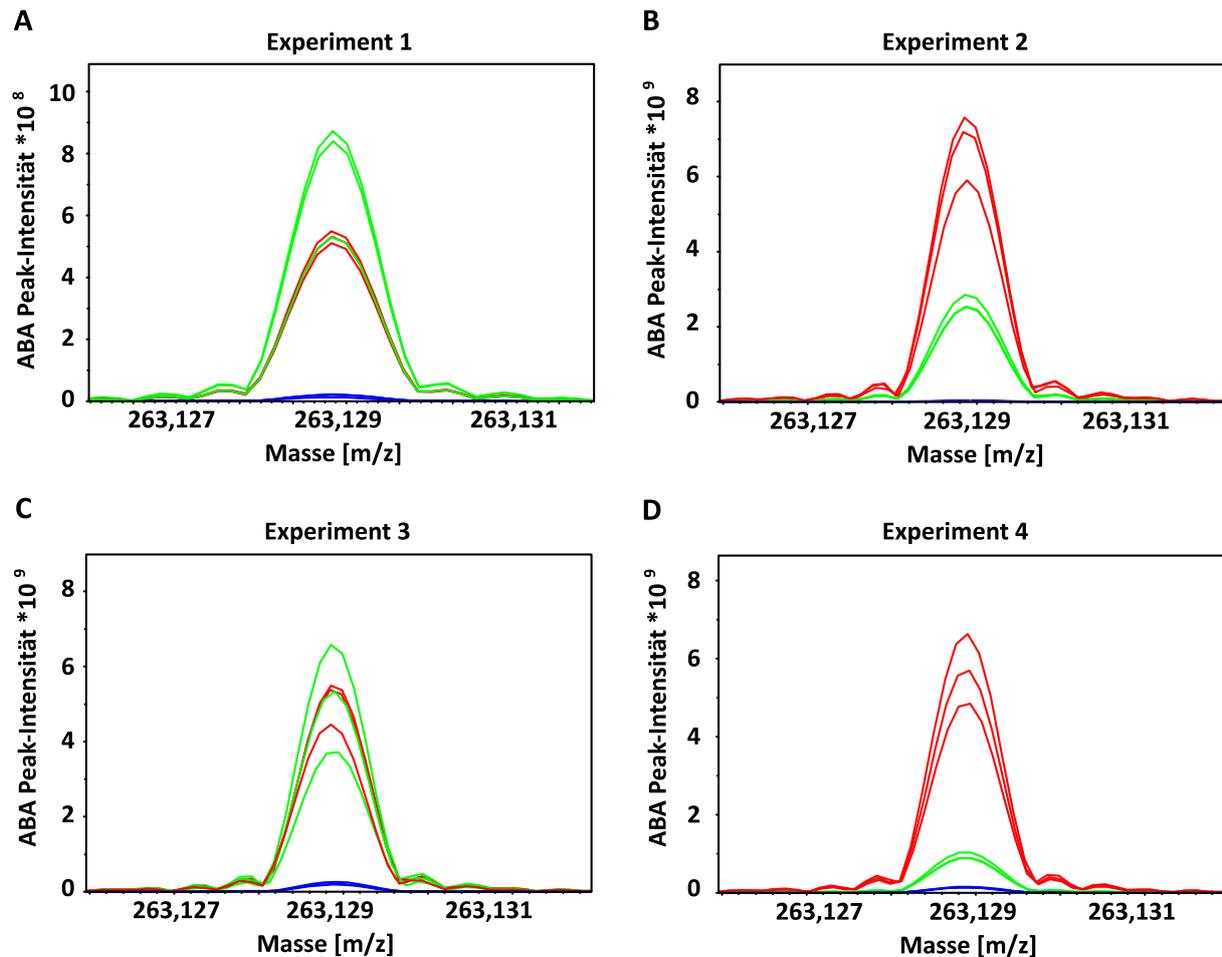


**Abb. 33 Trockengewichtsbestimmung von fünf Brassicaceen**

Zur Bestimmung des Trockengewichtes anteilig vom Frischgewicht (% FW) wurden zunächst 2 g frisches Pflanzenmaterial mit einer Feinwaage eingewogen. Anschließend wurden die Proben drei Tage bei 60°C getrocknet. Dann wurde erneut das Gewicht bestimmt. Anhand der Differenz wurde der prozentuale Gewichtsverlust pro Probe errechnet. Je Pflanzenart wurden drei verschiedene Pflanzen untersucht, von denen je drei Proben entnommen wurden. Dargestellt sind Daten eines repräsentativen Versuches mit SD. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Resultaten wiederholt.

Die Trockengewichtsbestimmung (Abb. 33) zeigte, dass alle Proben in etwa den gleichen Gewichtsverlust von 80-90% aufwiesen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede der ABA Peak-Intensitäten der in der FT-MS Analyseerfassten Signale nicht durch unterschiedliches Trockengewicht hervorgerufen wurden. Die Signalunterschiede könnten daher auf unterschiedliche ABA-Konzentrationen in den untersuchten Pflanzen zurückzuführen sein.

Aufgrund der hohen Biomasse wurde schließlich Wirsing als Quelle für den Zellextrakt zukünftiger Experimente verwendet. Auch für diesen Zellextrakt wurde die ABA Anreicherung in den Rezeptorkomplexen verglichen mit der Kontrolle  $\Delta$ ABI1 überprüft (Abb. 34).



**Abb. 34 ABA Anreicherung in PP2C/RCAR Rezeptorkomplexen mit Wirsing Zellextrakt**

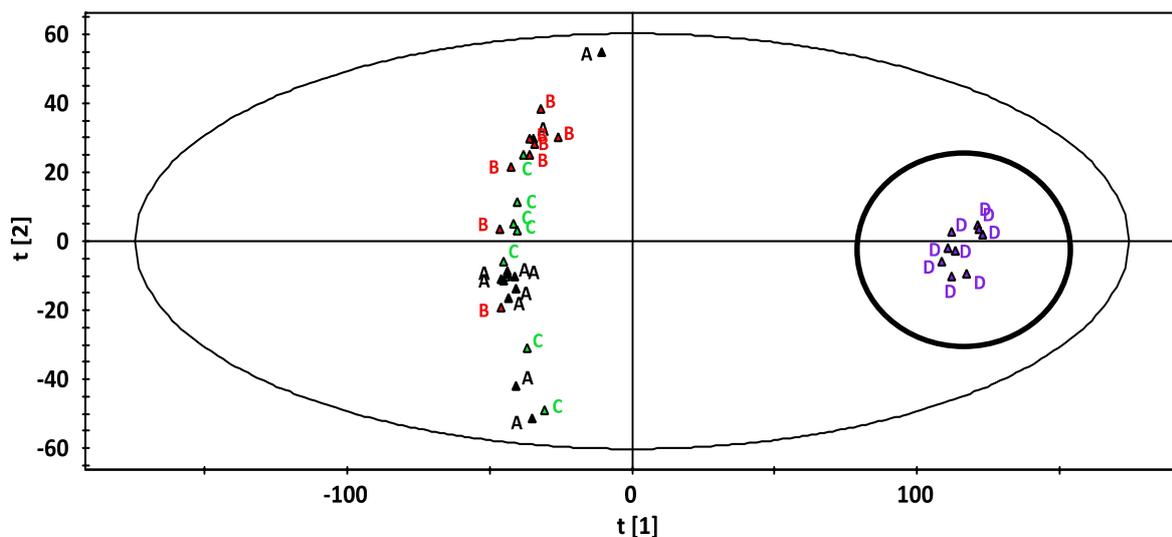
Proben der Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1 Kontrolle (blau) und den Rezeptorkomplexen  $\Delta$ ABI1/RCAR8 (rot) bzw.  $\Delta$ ABI1/RCAR11 (grün) wurden in 400  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen und durch FT-MS mit 500 Scans im negativen Modus analysiert. Dargestellt sind Daten aus 4 Versuchen (A-D) mit 3 technischen Replikaten.

Auch die Versuche mit Wirsing Zellextrakt zeigten eine ABA Anreicherung um den Faktor 10-240 für den  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und den Faktor 10-80 für den  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex. Somit war das *Ligand Fishing* System auch mit Wirsing Zellextrakt funktional. Aufgrund dieser Ergebnisse und der hohen Biomasse wurde Zellextrakt aus Wirsing für zukünftige Experimente verwendet.

### 2.3.3. Principal component analysis (PCA)

Im Zentrum dieser Dissertation stand die vergleichende Analyse von Proben aus PP2C/RCAR Rezeptorkomplexen und Kontrollen, wie  $\Delta$ ABI1 ohne RCAR bzw. Leersäulen. Ziel war es, durch die in 2.2. erstellte Methode für den Rezeptorkomplex spezifische Liganden zu finden. Dazu wurden die Affinitätssäulen mit Zellextrakt aus Wirsing inkubiert, dann gewaschen, eluiert und durch FT-MS analysiert (siehe Material und Methoden 4.3.6.). Die daraus resultierenden Daten wurden in einer PCA-Analyse (Abdi *et al.* 2010) untersucht, um allgemeine Unterschiede zwischen Datensätzen

verschiedener Klassen herauszufinden. Dazu wurden vor Beginn des Versuchs vier Klassen festgelegt. Klasse A waren Eluate, die von Leersäulen ohne Protein stammten. Die zweite Klasse (B) enthielt MS-Daten von Eluaten der Säulen mit gebundenem  $\Delta$ ABI1. In Klasse drei (C) waren Daten von Eluaten des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes zusammen gefasst. Die vierte Klasse (D) repräsentierte MS-Daten des für den Versuch verwendeten Zellextraktes. Die Proben der Klassen eins bis drei wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen und direkt manuell in die FT-MS injiziert (je 70  $\mu$ l). Die Proben der Klasse vier wurden ebenfalls in 200  $\mu$ l 70 % Methanol gelöst und anschließend 1:10 mit 70% Methanol verdünnt. Die Verdünnung des Zellextraktes war notwendig, weil diese Proben deutlich mehr Substanzen in höherer Konzentration enthielten, als die Klassen eins bis drei und sonst den Detektor überladen hätten. Die Messung aller Proben erfolgte bei 500 Scans im negativen Modus. Aus den Datensätzen wurden die Satelliten-Peaks entfernt. Es wurden nur natürliche Massen berücksichtigt, welche über die Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -Isotope herausgefiltert wurden. Zur Überprüfung der Effizienz der Waschschritte bei den Säulen der Klassen A-C wurden die Klassen A-D miteinander verglichen. Bei erfolgreichem Waschen der Säulen der Klassen A-C sollten deren Proben deutlich entfernt von den Zellextrakt-Proben der Klasse D entfernt clustern (Abb. 35).



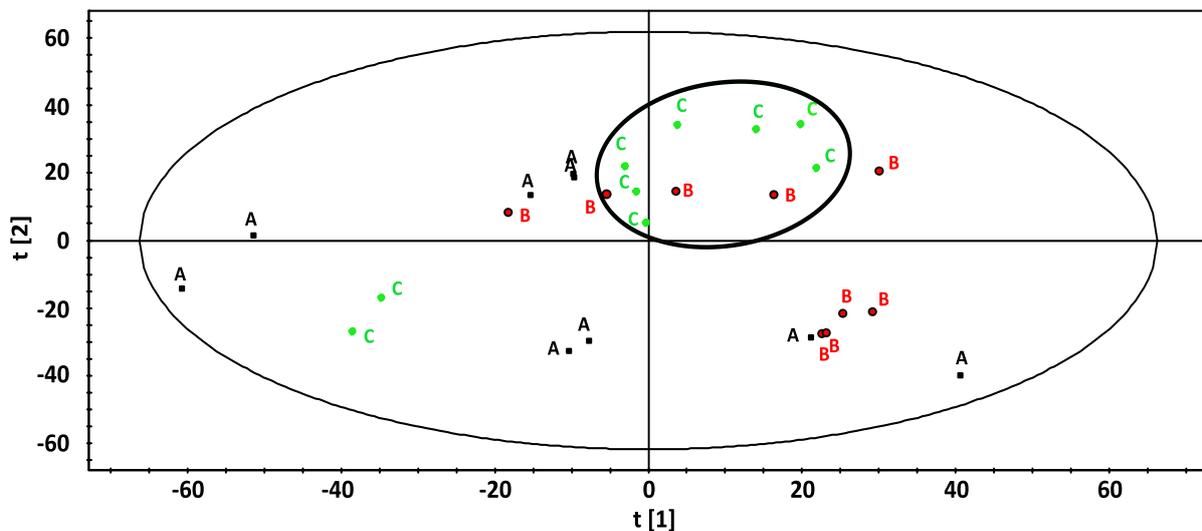
**Abb. 35 Principal Component Analysis (PCA) mit 4 Versuchsklassen**

In der Abbildung sind die Daten von vier Versuchsklassen mit je neun Replikaten einander gegenüber gestellt. Klasse A (schwarz) repräsentierte Daten von Leersäulen mit 200 mg Affinitätsmatrix, Klasse B (rot) Daten von 280  $\mu$ g immobilisiertem  $\Delta$ ABI1 mit 200 mg Affinitätsmatrix, Klasse C (grün) Daten von 280  $\mu$ g  $\Delta$ ABI1 immobilisiert an 200 mg Affinitätsmatrix und dem vierfachen molaren Überschuss an RCAR8 und Klasse D (lila) enthielt Daten von Wirsing Zellextrakt aus 20 g Pflanzenmaterial (FW). Für die FT-MS Analyse wurden die Proben der Klasse 1-3 in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst und direkt manuell injiziert (je 70  $\mu$ l). Die Proben der Klasse D wurden vor der Injektion in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen und 1:10 verdünnt. Klasse D wurde hier gesondert hervorgehoben (schwarzer Kreis). Die Proben wurden mit 500 Scans im negativen Modus gemessen.

Die Gegenüberstellung der *Principal Component Analysis* (PCA) der vier Klassen in einem Scatter Plot zeigt, dass Klasse deutlich entfernt von den anderen Klassen clustert (Abb. 35). Die Proben der Klassen A-C verteilen sich auf der linken Seite des Scatter Plots. Ein Scatter Plot zeigt die generellen

Unterschiede zwischen Proben verschiedener Versuchsklassen an. Das bedeutet, dass sich in diesem Fall die Klasse D, welche Proben des Zellextraktes enthielt, eindeutig von den anderen drei Klassen in ihrer Komposition unterschied. Dies ließ darauf schließen, dass das Waschen der Säulen der Klassen A-C effizient war, da keine Überlappung der Proben mit den Zellextrakt Proben festgestellt wurde.

In einer weiteren PCA-Analyse wurden Unterschiede zwischen den Klassen A-C untersucht (Abb. 36). Im Idealfall sollten sich die Proben der Klasse C (Rezeptorkomplex) von den Proben der Klasse A und B (Kontrollen) abheben, da erwartet wurde, dass bestimmte Massen sich in den Proben des Rezeptorkomplexes anreichern.



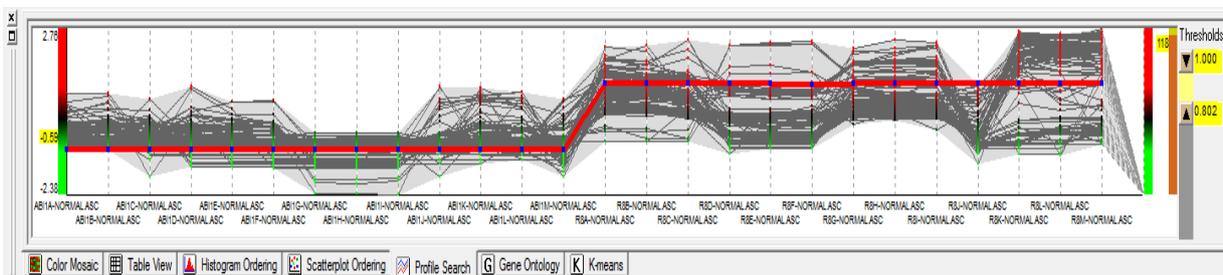
**Abb. 36 Scatter Plot von *Principal Component* Analyse (PCA) mit drei Versuchsklassen**

Die Abbildung enthält Daten aus drei Versuchsklassen. Klasse A (schwarz) waren Daten von Leersäulen mit 200 mg Affinitätsmatrix, Klasse B (rot) Daten von  $\Delta$ ABI1-Säulen mit 200 mg Affinitätsmatrix und 280  $\mu$ g immobilisierter Phosphatase und Klasse C (grün) Daten von Säulen mit 280  $\mu$ g immobilisiertem  $\Delta$ ABI1/RCAR8Rezeptorkomplex. Es wurden neun Proben je Klasse in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen und direkt in die FT-MS manuell injiziert (je 70  $\mu$ l). Die Datenerfassung erfolgte bei 500 Scans im negativen Modus. Klasse C wurde hier gesondert hervorgehoben (schwarzer Kreis).

Die Proben der Klasse C ( $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex) clustern zusammen im oberen Teil des Scatter Plots clustern (Abb. 36). Lediglich zwei Proben dieser Klasse zeigen Abweichungen. Die Proben der anderen Klassen A und B verteilen im restlichen Bereich des Scatter Plots. Die Proben 9, 10, 11 und 13 der Klasse B ( $\Delta$ ABI1) clustern in der Nähe der Proben der Klasse C, was eventuell auf unzureichende Waschschriffe hindeutet. Jedoch waren ausreichend Unterschiede zwischen der Klasse C mit dem Rezeptorkomplex gegenüber den Kontrollklassen A und B festzustellen. Somit konnte der bestehende Versuchsaufbau für die Isolierung Rezeptorkomplex spezifischer Liganden verwendet werden.

### 2.3.4. Identifikation $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex spezifischer Massen

Wie die *Principal Component Analyse* in 2.3.2 zeigte, bestanden Unterschiede in Zusammensetzung und Intensität bestimmter Massen der Proben von Rezeptorkomplex und Kontrollklassen. Somit konnte das in 2.2. etablierte System angewendet werden, um Liganden zu finden, die spezifisch in den Proben des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes angereichert wurden. Dazu wurden Säulen mit immobilisiertem  $\Delta$ ABI1 und immobilisiertem Rezeptorkomplex mit Wirsing Zellextrakt aus 20 g Pflanzenmaterial (FW) inkubiert. Es wird davon ausgegangen, dass das RCAR als Rezeptor in dem PP2C/RCAR Komplex fungiert, daher sollte bei einem Vergleich der  $\Delta$ ABI Kontrolle mit den Rezeptorkomplex Proben eine spezifische Anreicherung von Ligandensignalen in dem Rezeptorkomplex zu beobachten sein. Für die vergleichende Analyse wurden zunächst Daten aus vier Versuchen und mit je drei technischen Wiederholungen je Klasse gepoolt und normalisiert, um Unterschiede, die aus eventuell ungleichmäßiger Injektion resultierten auszugleichen. Anschließend wurden die Rezeptorkomplex-Proben gegen die Kontrollen in einem „low to high“ Vergleich gegenübergestellt. Dazu wurde das Programm HCE (Hierarchical Clustering Explorer, MFC Application) verwendet (Abb. 37).

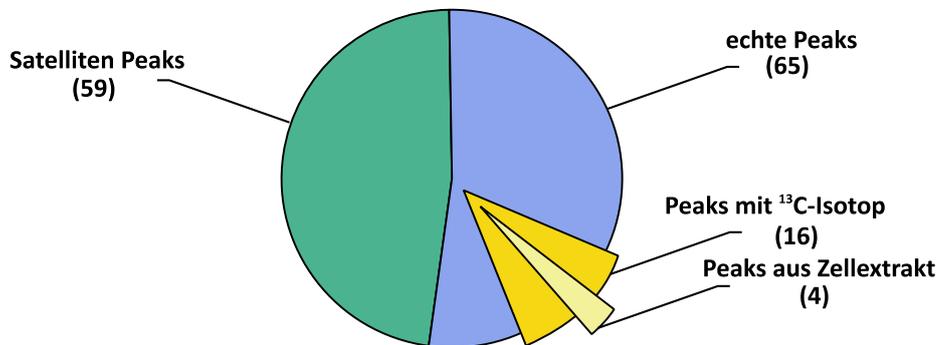


**Abb. 37 Hierarchical Clustering Analyse für statistischen Vergleich von  $\Delta$ ABI1 und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex**

Das Profil des Vergleichs enthält Daten aus vier Versuchen mit je drei technischen Wiederholungen pro Klasse ( $\Delta$ ABI1 Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex). Die Proben wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen, 1:2 verdünnt und 70  $\mu$ l manuell in die FT-MS injiziert. Die Messung erfolgte bei 1000 Scans im negativen Modus. Die Bedingungen für den statistischen Vergleich wurden für die Kontrolle als „low“ mit Pearson Koeffizient -1 eingestellt und für den Komplex als „high“ mit Pearson Koeffizient +1. Als Threshold wurde 0,8 gesetzt.

Unter Anwendung des Profils in Abb. 37 konnte eine Liste mit 124 Massen, die die eingegebenen Parameter erfüllten ermittelt werden. Um die Liste weiter zu prozessieren wurden weitere Bedingungen für die in dem  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex angereicherten Massen als Filter festgelegt. Zum einen sollten nur „echte“ Massen berücksichtigt werden. Dazu wurden sogenannte Satelliten-Peaks aus der Liste entfernt. Außerdem wurden nur natürliche Massen gesucht, welche durch ihre  $^{13}\text{C}$ -Isotope identifiziert wurden. Abschließend wurde überprüft, ob die verbliebenen

Massen aus dem für die Versuche verwendeten Zellextrakt stammten indem die Massenliste mit den in dem Zellextrakt erfassten Massen abgeglichen wurde (Abb. 38).



**Abb. 38 Prozessierung der Liste potentieller Liganden des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes**

Die Liste potentieller Liganden aus dem statistischen Vergleich der Daten des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes und der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle wurde durch verschiedene Filter weiter eingegrenzt. In dem Kreisdiagramm ist die Anzahl der Peaks dargestellt, die dem jeweiligen Filter zugeordnet werden konnten. Der erste Filter war Satelliten Peaks (grün) welcher 59 Signale beinhaltetete. Echte Peaks (blau) waren 65 Massen, die nach Abzug der Satelliten Peaks verblieben. Diese wurden dann auf das Vorhandensein des schweren <sup>13</sup>C-Isotops überprüft, um festzustellen, ob es sich um natürliche Massen handelte (orange). Auf diese Weise wurde die Liste auf 16 Massen reduziert. Die in Gelb dargestellte Fläche repräsentiert vier Massen, die in einer finalen Analyse dem Zellextrakt zugeordnet werden konnten. Grundlage dieser Abbildung sind Daten aus vier Versuchen mit drei technischen Replikaten je Versuchsklasse.

Abb. 38, in welcher das Vorgehen beim Anwenden der Filter grafisch dargestellt ist, verdeutlicht, dass nicht alle statistisch ermittelten Massen des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes tatsächlich relevant als natürliche Liganden sind. Von ursprünglich 124 ausgegebenen Massen, konnten 59 Signale sogenannten Satelliten Peaks zugeordnet werden, welche auf eine Überladung des Detektors zurückzuführen waren. Von den verbliebenen 65 Massen konnten nur für 16 die schweren <sup>13</sup>C-Isotope nachgewiesen werden, was dafür sprach, dass es sich bei diesen Massen um natürliche Substanzen handelte. Nur vier der 16 natürlichen Massen konnten eindeutig dem Pflanzenzellextrakt zugeordnet werden (Tab. 8). Vermutlich handelt es sich bei den 12 nicht im Pflanzenzellextrakt nachweisbaren Massen um Kontaminationen aus dem *E.coli*-Hintergrund der rekombinanten Proteine. Durch die hohe Massengenauigkeit der FT-MS-Analyse konnten Summenformeln für die vier verbliebenen Rezeptorkomplex spezifischen Massen unter Verwendung der Internetseite <http://www.chemcalc.org/> errechnet werden.

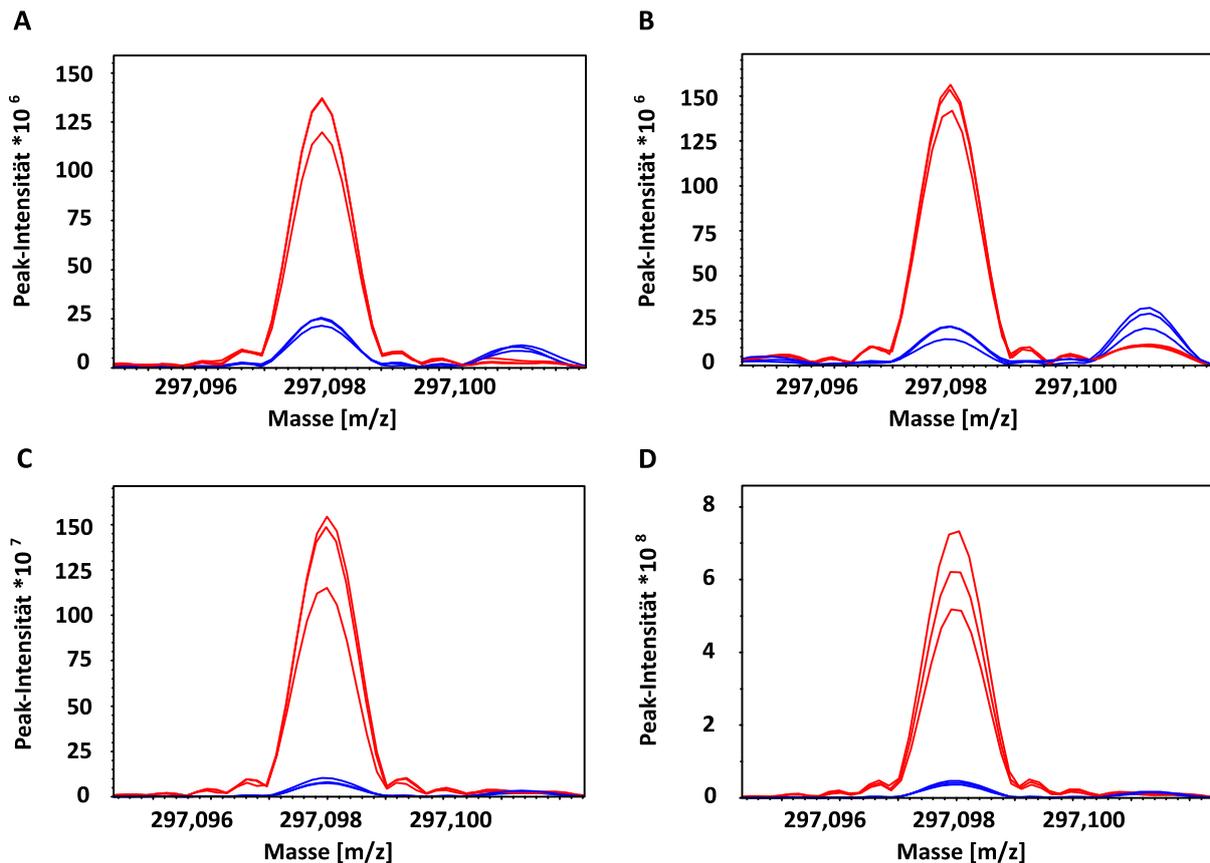
**Tab. 8  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex spezifische Massen**

Detektierte Masse (M -H)	Neutrale Masse	Prädiktive Summenformel	Abweichung (ppm)
219,1390	220,1463	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,09
263,1289	264,1361	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	0,037
297,0979	298,1052	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	0,006
		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	0,023
384,2027	385,2100	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0,081
		C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>	0,094

Bei zwei von diesen Massen (219,1390 und 263,1289) handelte es sich um Abscisinsäure und decarboxylierte Abscisinsäure. Somit verblieben effektiv noch zwei Massen, die bisher nicht als Liganden des Rezeptorkomplexes bekannt waren.

Die statistisch ermittelten Massen wurden in den Massenspektren zur Verifizierung der Ergebnisse überprüft.

Die Signale des neu identifizierten Peaks L298 wurden einer vergleichenden Analyse auf Basis der Chromatogramme unterzogen (Abb. 39).



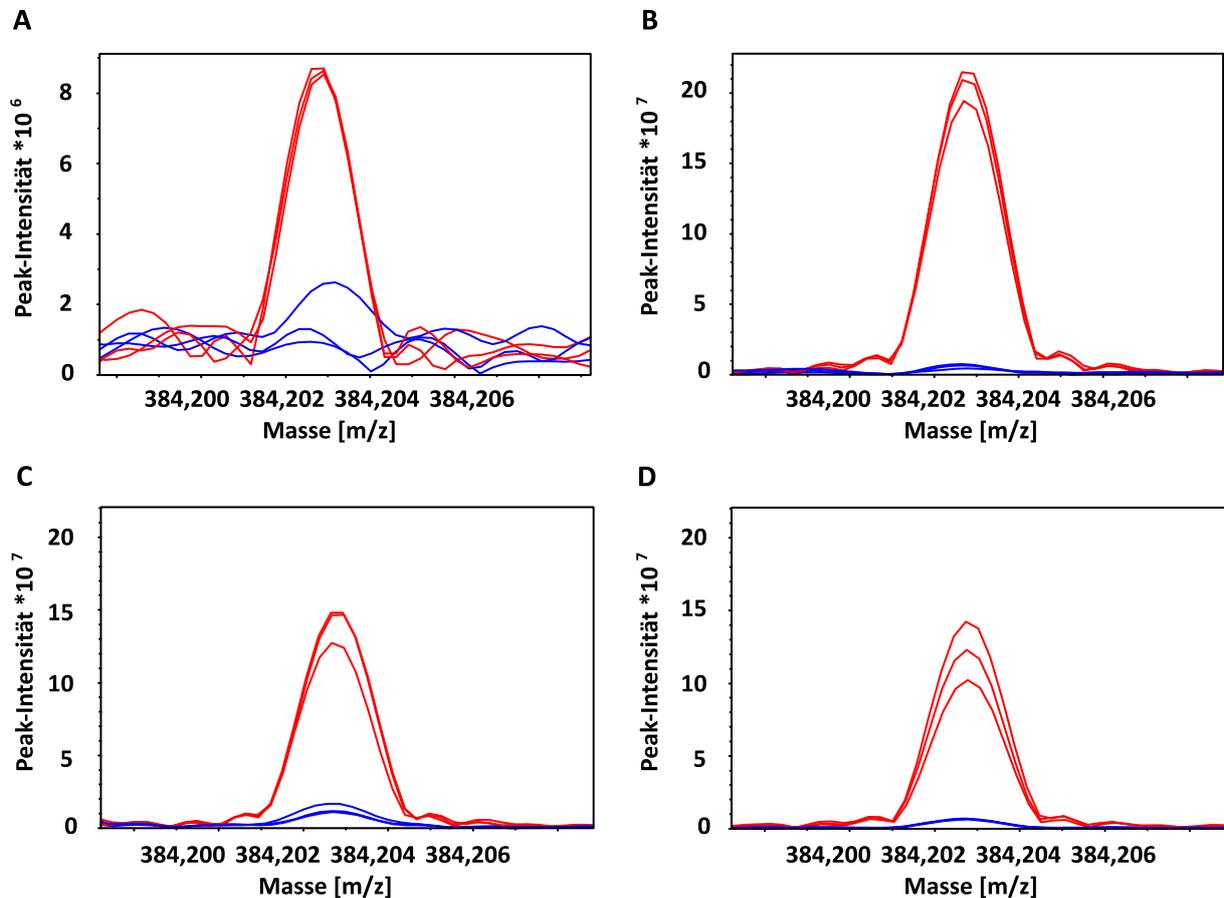
**Abb. 39 L298 Peak in der Analyse von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle**

Die Proben der Affinitätschromatografie von  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, 1:2 verdünnt und bei 1000 Scans im negativen Modus erfasst. Es wurden 70  $\mu$ l je Probe injiziert. Die Peak-Intensität des Liganden L298 wurde gegen dessen Masse aufgetragen. Dabei wurden die Signale aus Kontrolle (blau) und Komplex (rot) übereinander gelegt und in den jeweiligen Versuchen (A-D) miteinander verglichen. In dem Graphen wurden Daten aus vier Versuchen mit je drei technischen Wiederholungen pro Gruppe verwendet.

Eine Gegenüberstellung von Rezeptorkomplex und Kontrolle verdeutlicht eine Signalanreicherung des Liganden L298 in den Komplex Proben gegenüber der Kontrolle (Abb. 39). Da dies in vier unabhängigen Versuchen beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass L298 ein Ligand des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes ist.

## Ergebnisse

In einer weiteren Untersuchung wurden die Signalintensitäten des ebenfalls neu identifizierten Liganden L385 in einer Gegenüberstellung von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Komplex und der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle analysiert (Abb. 40).



**Abb. 40 L385 Peak in der Analyse von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle**

Die Proben der Affinitätschromatografie von  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, 1:2 verdünnt und bei 1000 Scans im negativen Modus erfasst. Es wurden 70  $\mu$ l je Probe injiziert. Die Peak-Intensität des Liganden L385 wurde für Proben aus  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Komplex (rot) und Kontrolle  $\Delta$ ABI1 (blau) aufgetragen. Dabei wurden Daten aus vier verschiedenen Versuchen (A-D) mit je drei technischen Wiederholungen gegeneinander verglichen.

Der Vergleich der Signalintensitäten des Liganden L385 in  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex-Proben gegen die Kontrolle  $\Delta$ ABI1 (Abb. 40) zeigt eine Anreicherung des Ligandensignals im Rezeptorkomplex gegenüber der Kontrolle. Dies konnte in vier unabhängigen Versuchen beobachtet werden, daher ist auch L385 ein potentieller Ligand des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes. In Tab. 9. ist die Anreicherung der Liganden ABA, L298 und L385 mit dem  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex gegenüber der Kontrolle  $\Delta$ ABI1 zusammengefasst.

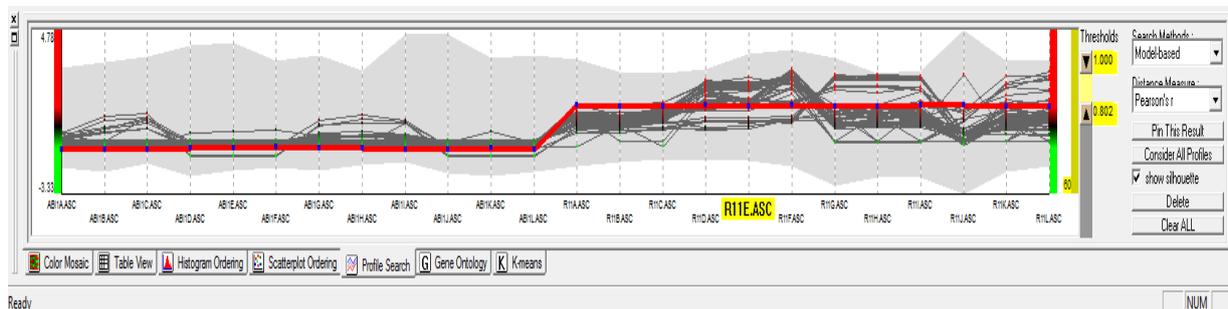
Tab. 9 Anreicherung der Liganden ABA, L298 und L385 mit  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex

Ligand	Masse (M-H)	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
ABA	263.1289	7	238	23	40
L298	297.098	8	8	16	15
L385	384.2028	2	34	11	19

Zusammenfassend ist für die vergleichende FT-MS Analyse der Proben von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle zu postulieren, dass das entwickelte System grundsätzlich zu Isolation von potentiellen Liganden des Komplexes geeignet ist. Dies begründet sich auf der Tatsache, dass die biologische Kontrolle ABA als Ligand bestätigt werden konnte. Zudem wurden zwei bisher unbekannte Liganden (L298 und L385) sowohl durch statistischen Vergleich, als auch durch Vergleich der FT-MS Chromatogramme von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle identifiziert.

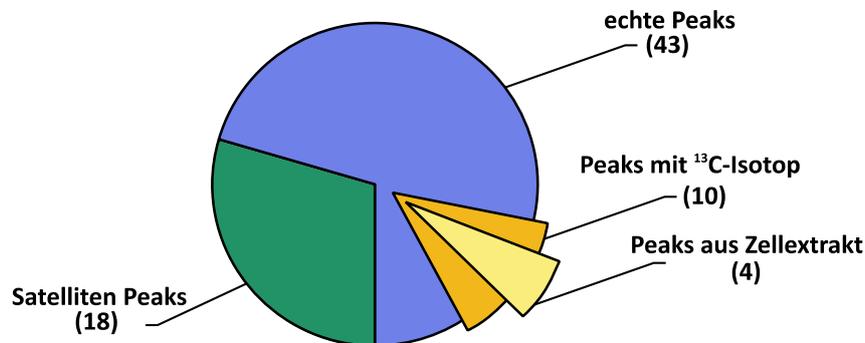
### 2.3.5. Identifikation $\Delta$ ABI1/RCAR11Rezeptorkomplex spezifischer Massen

Zum Vergleich der Ligandenspezifität der PP2C/RCAR Rezeptorkomplexe wurde RCAR11 als ein weiterer Vertreter der Bindungspartner des Rezeptorkomplexes verwendet. Um spezifische Massen für den  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex zu finden, wurden Datensätze aus vier Versuchen mit drei technischen Replikaten statistisch ausgewertet. Die aufgenommenen Daten wurden zunächst normalisiert und anschließend mit Hilfe des Programms Matrix Generator gepoolt. Mittels eines „low to high“ Vergleiches mit dem Programm HCE 3.0 wurde nach Massen gesucht, die niedrige Intensitäten in der Kontrolle  $\Delta$ ABI1 zeigten und hohe in den  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex-Proben (Abb. 41).

Abb. 41 HCE-Profil für den statistischen Vergleich von  $\Delta$ ABI1 und  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex

Proben von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, 1:2 verdünnt und mit 1000 Scans im negativen Modus gemessen. Es wurden 70  $\mu$ l je Probe manuell injiziert. Dargestellt ist der Vergleich der Daten von Kontrolle  $\Delta$ ABI1 gegen den  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex. Die rote Linie zeigt das Profil des Vergleichs. Die Kontrolle wurde als „low“ eingestellt und der Komplex als „high“. Der Pearson Koeffizient für „low“ betrug -1 und der für „high“ +1. Der Threshold wurde auf 0,8 eingestellt. Aus diesem Vergleich ergaben sich 61 Massen, die die angegebenen Bedingungen erfüllten. Es wurden Daten aus vier Versuchen mit drei technischen Wiederholungen analysiert.

Der statistische Vergleich von  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex (Abb. 41) ergab dass 61 Massen die vorgegebenen Parameter erfüllten. Diese Liste wurde weiter bearbeitet, um tatsächlich biologisch relevante Massen herauszufiltern (Abb. 42).

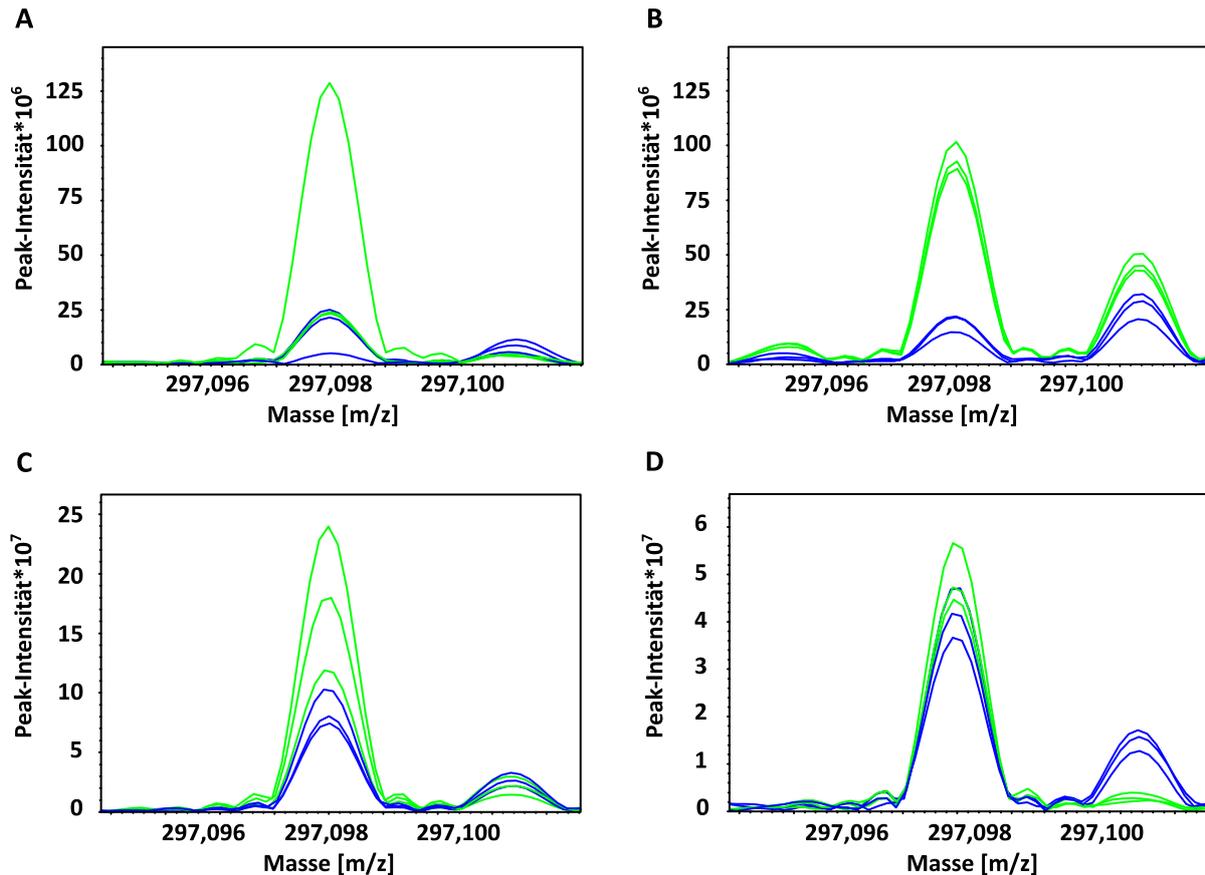


### Abb. 42 Prozessierung der Liste potentieller Liganden des $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplexes

Die Abbildung zeigt verschiedene Filter für die Prozessierung der Liste potentieller Liganden aus dem statistischen Vergleich von  $\Delta$ ABI1/RCAR11Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle unter Verwendung des Programms HCE 3.0. Es wurden Daten aus vier Versuchen mit drei technischen Wiederholungen untersucht. Die Proben wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, 1:2 verdünnt und mit 1000 Scans im negativen Modus erfasst. Je Probe wurden 70  $\mu$ l manuell injiziert. Von insgesamt 61 ermittelten Peaks waren 18 Satelliten Peaks (grün) und 43 echte Peaks (blau). Die echten Massen wurden auf <sup>13</sup>C-Isotope überprüft. Dadurch verblieben 10 Massen (orange), welche auf ihr Vorhandensein in dem verwendeten Zellextrakt überprüft wurden. Es konnten vier Massen identifiziert werden, die sich dem Zellextrakt zuordnen ließen (gelb).

Bei der Prozessierung der Liste potentieller Liganden wurden zunächst 18 Satelliten -Peaks entfernt, die aus einer Überladung des Detektors resultierten. Es verblieben 43 „echte“ Peaks, welche auf das Vorhandensein des <sup>13</sup>C-Isotops überprüft wurden. Nach dieser Analyse verblieben zehn Massen, die mit den Zellextrakt-Proben abgeglichen wurden. Es konnten vier Massen dem Zellextrakt zugeordnet werden. Dabei handelte es sich um die selben Massen, die auch bei dem RCAR8-Komplex identifiziert wurden (siehe Tab. 8). Im Anschluss an diese Analyse wurden die Massen nochmals optisch mit den jeweiligen Spektren abgeglichen.

Für den potentiellen Liganden L298 wurde ein Vergleich der Chromatogramme von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle vorgenommen (Abb. 43). Es sollte festgestellt werden, ob L298 ein Ligand des Rezeptorkomplexes ist. In diesem Fall wäre das Signal des L298 Liganden in den Komplex Proben gegenüber der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle angereichert.

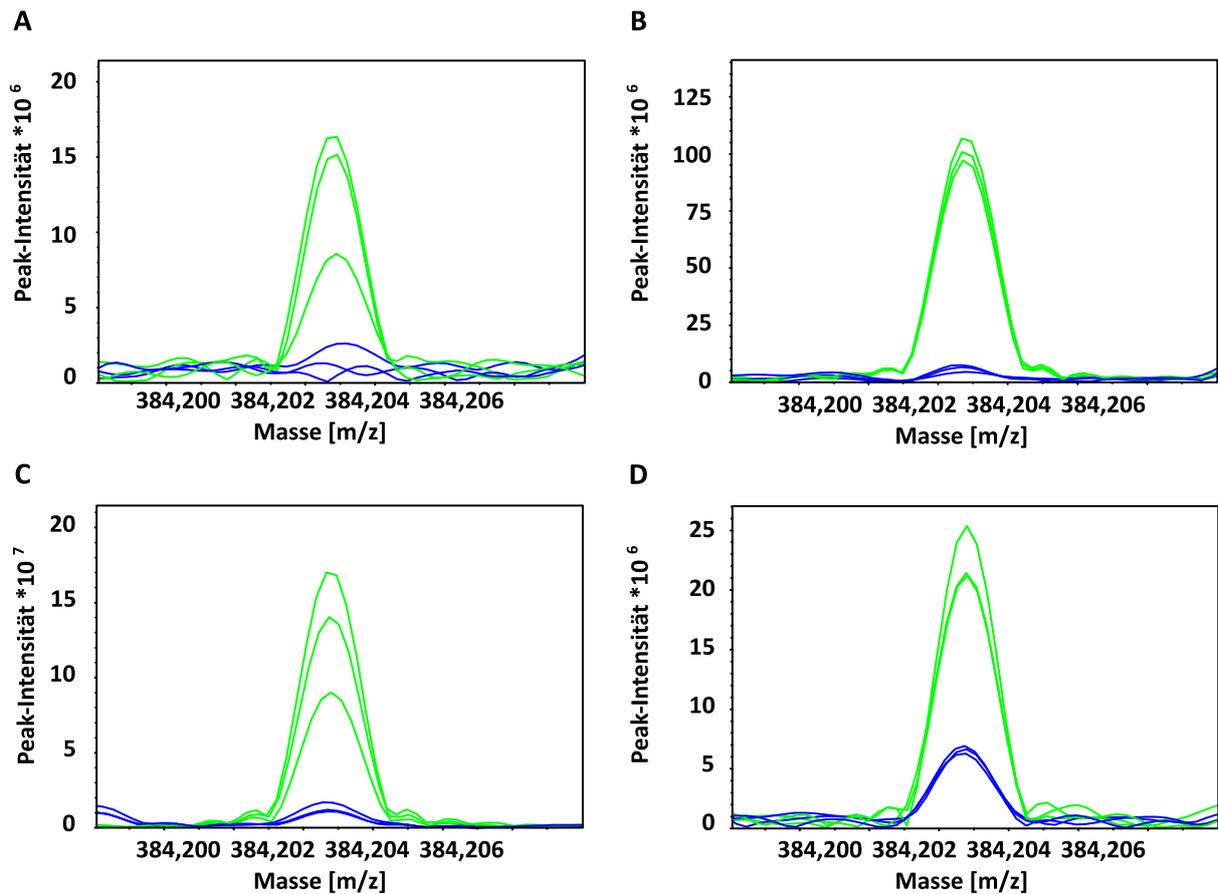


**Abb. 43 L298 Peak im Vergleich von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex gegen  $\Delta$ ABI1 Kontrolle**

Die Proben von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, 1:2 verdünnt und bei 1000 Scans im negativen Modus gemessen. Es wurden 70  $\mu$ l je Probe manuell in die FT-MS injiziert. Dargestellt sind die Chromatogramme des Peaks des Liganden L298 von vier Versuchen (A-D). Die Peak-Intensität wurde gegen die Masse aufgetragen. Es wurde der  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex (grün) gegen die Kontrolle  $\Delta$ ABI1 (blau) verglichen. Pro Gruppe wurden drei technische Wiederholungen durchgeführt.

Ein Vergleich der Chromatogramme von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex und Kontrolle  $\Delta$ ABI1 für den Liganden L298 (Abb. 43 A-D) zeigte, dass die Ergebnisse rein optisch nicht eindeutig waren. In Versuch 1 und 4 (Abb. 43 A, D) ist keine deutliche Anreicherung des Peaks gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Die mangelnde Eindeutigkeit der Daten könnte auch auf einer geringeren Affinität des  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplexes für den Liganden L298 zurückzuführen sein.

Als weiterer potentieller Ligand des  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplexes wurde L385 untersucht (Abb. 44). Ist L385 ein Ligand des Rezeptorkomplexes so sollte eine Anreicherung des Ligandensignals gegenüber der Kontrolle zu beobachten sein.



**Abb. 44 L385 Peak im Vergleich von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex gegen  $\Delta$ ABI1 Kontrolle**

Die Proben von  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1 Kontrolle wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, 1:2 verdünnt und bei 1000 Scans im negativen Modus gemessen. Es wurden 70  $\mu$ l je Probe manuell in die FT-MS injiziert. In dieser Abbildung ist der Vergleich der Chromatogramme des  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Komplexes (grün) gegen die  $\Delta$ ABI1 Kontrolle dargestellt. Dabei wurde jeweils die Masse von L385 gegen die Peak-Intensität aufgetragen. Es wurden Daten von vier Versuchen (A-D) mit je drei technischen Wiederholungen pro Gruppe analysiert.

Eine Anreicherung des Ligandensignals von L385 in den  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex-Proben war im Vergleich zur  $\Delta$ ABI1 Kontrolle zu erkennen, was darauf hindeutet, dass L385 ein Ligand des Rezeptorkomplexes ist. Dieser Effekt war durchgängig in allen vier Versuchen (Abb. 44 A-D) zu beobachten. Somit ist davon auszugehen, dass L385 ein Ligand des  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplexes ist.

Die Anreicherung der Liganden ABA, L298 und L385 für den  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex gegen die Kontrolle  $\Delta$ ABI1 wurde in Tab. 10 zusammengestellt.

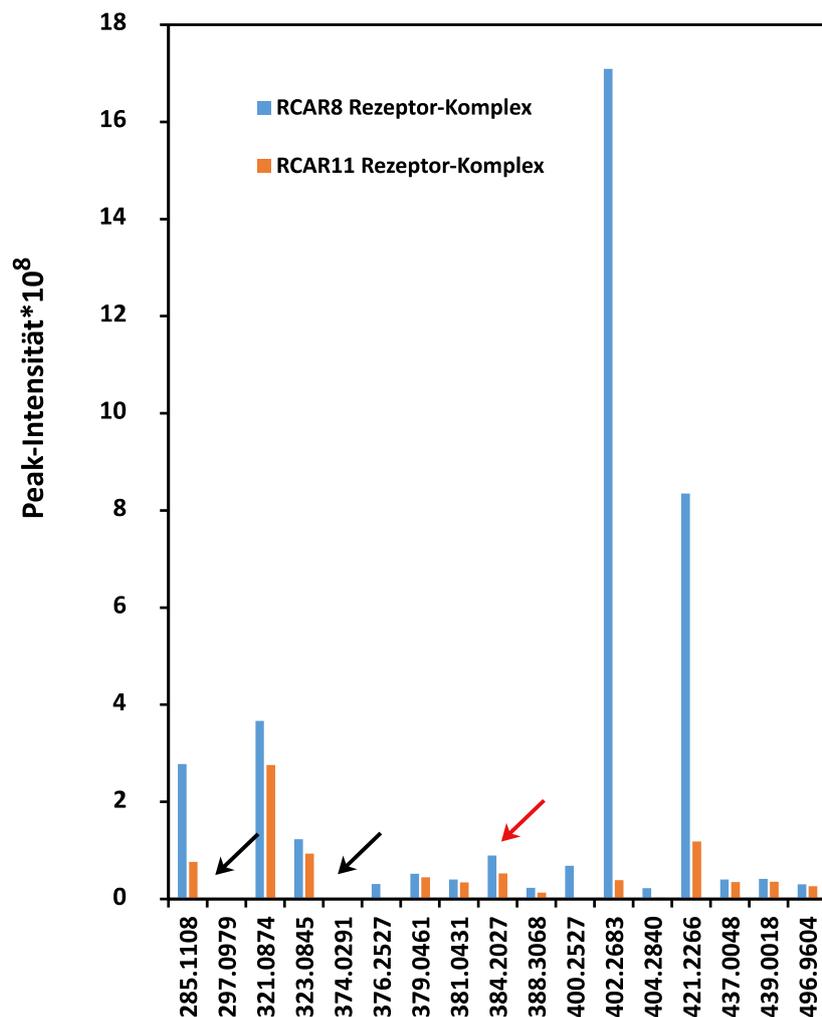
**Tab. 10** Anreicherung der Liganden ABA, L298 und L385 mit  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex

Ligand	Masse (M-H)	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
ABA	263.1289	41	92	24	7
L298	297.098	5	5	2	1
L385	384.2028	14	102	10	4

Zusammenfassend ist zu sagen, dass L385 ein Ligand des  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplexes ist wohingegen für L298 die Daten diesbezüglich nicht eindeutig sind. Dies könnte, wie bereits erwähnt, auf einer unterschiedlichen Affinität der Rezeptorkomplexe für die Liganden beruhen.

### 2.3.6. Nachweis von *E.coli* Liganden

Um mögliche *E.coli* Liganden zu identifizieren, wurde das *Ligand Fishing* System mit den Rezeptorkomplexen mit RCAR8 und RCAR11 und ABA-Reinsubstanz angewendet und durch FT-MS analysiert (Abb. 45).



**Abb. 45 Identifizierung von *E.coli* Liganden durch FT-MS Analyse**

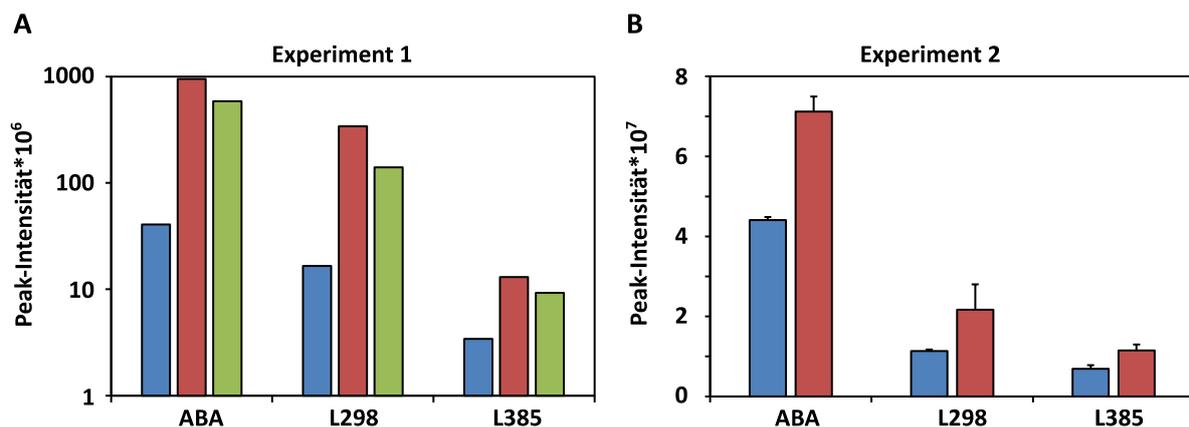
Dargestellt ist eine Messung der Affinitätschromatografie Rezeptorkomplex-Proben mit RCAR8 und RCAR11 und 5 nmol ABA Reinsubstanz. Die Proben wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen und 1:2 verdünnt. Die Messung erfolgte mit 500 Scans im negativen Modus. Es handelt sich um Daten aus Einzelmessungen. Mit schwarzen Pfeilen wurden Liganden markiert, die in den analysierten Proben nicht detektiert werden konnten. Der Ligand L385 wurde mit einem roten Pfeil markiert.

Die Daten der Einzelmessungen mit den RCA8- und RCAR11-Rezeptorkomplexen zeigen, dass die zwei Liganden L298 und L375 (Abb. 45, schwarzer Pfeil) nicht in den Proben der Affinitätschromatografie mit ABA-Reinsubstanz nachgewiesen werden konnten. Der Ligand L298 konnte in

Pflanzenzellextrakten nachgewiesen werden (siehe 2.3.8.), womit davon auszugehen ist, dass der Ligand pflanzlichen Ursprungs ist. L375 konnte in keinem Zellextrakt nachgewiesen werden, womit es sich wahrscheinlich um eine Kontamination unbekanntes Ursprungs handelt. Überraschenderweise konnte auch der Ligand L385 (Abb. 45, roter Pfeil) nachgewiesen werden, dieser Ligand findet sich auch in Pflanzenzellextrakten (siehe 2.3.8.) was bedeuten könnte, dass sowohl *E.coli* als auch verschiedene Pflanzen diese Substanz enthalten.

### 2.3.7. Ligand Fishing mit *aba2*-Zellextrakt

Es wurde angenommen, dass die neu entdeckten Liganden L298 und L385 mit ABA um die Bindestelle in dem PP2C/RCAR Rezeptorkomplex konkurrieren. Daher wurde Zellextrakt der ABA-defizienten Arabidopsis Mutante *aba2* in dem *Ligand Fishing* System verwendet, um eine verminderte Konkurrenz durch ABA zu gewährleisten (Abb. 46). Theoretisch sollten dadurch die Ligandensignale in den untersuchten Komplex Proben durch bessere Anreicherung erhöht werden.



**Abb. 46 Ligand Fishing mit *aba2* Zellextrakt**

Es wurden Daten aus zwei Versuchen (A, B) zusammengestellt. Experiment 1 (A) enthält Daten eines Vorversuches mit Einzelmessungen von den Proben  $\Delta$ ABI1 Kontrolle (blau),  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex (rot) und  $\Delta$ ABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex (grün). Die y-Achse wurde logarithmisch skaliert. Experiment 2 (B) wurde mit  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und je drei technischen Replikaten wiederholt. Die Daten sind mit SD abgebildet. Die Messung aller Proben erfolgte mit 500 Scans im negativen Modus.

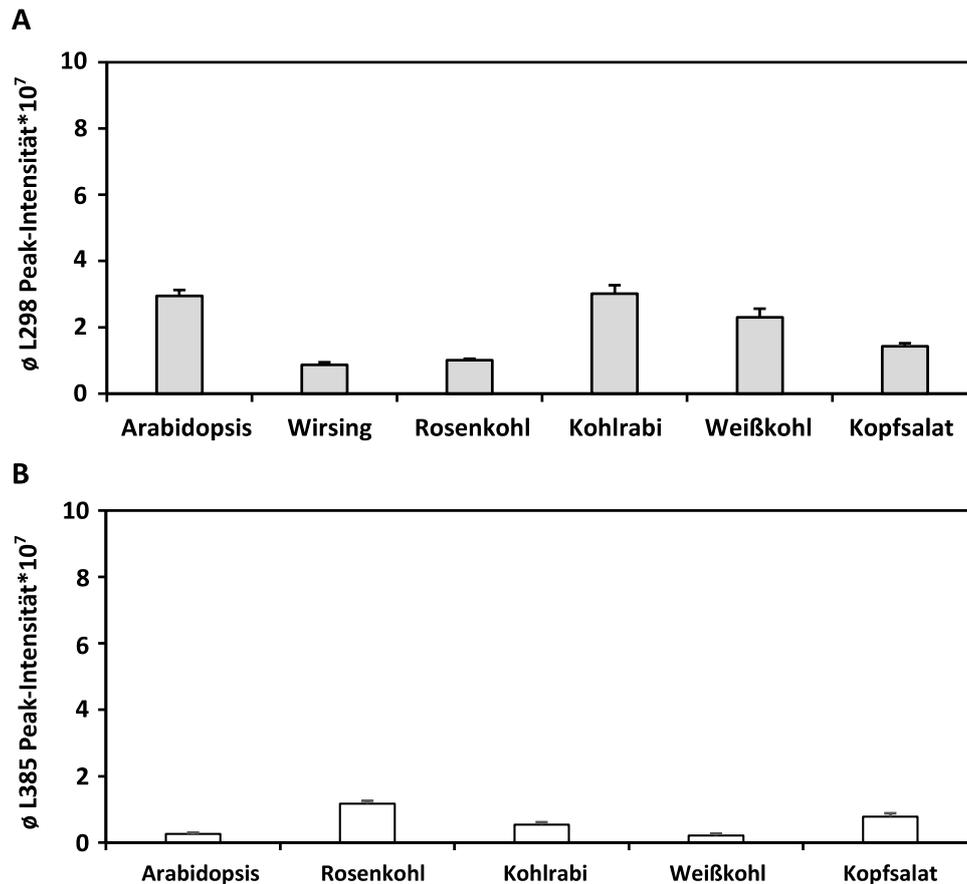
Die Daten in Abb. 46 zeigen, dass auch in der ABA-defizienten Mutante *aba2* noch Abscisinsäure enthalten war. In beiden dargestellten Versuchen konnte eine ABA-Anreicherung verglichen mit der Kontrolle  $\Delta$ ABI1 um den Faktor 20 (Abb. 46, A) und Faktor 2 (Abb. 46, B) in den Rezeptorkomplexen beobachtet werden. Auch die Liganden L298 und L385 waren in den Rezeptorkomplex-Proben angereichert. Bei L298 konnte eine Anreicherung um den Faktor 30 (Abb. 46, A) und um den Faktor 2 (Abb. 46, B) festgestellt werden. Für den Liganden L385 konnte in beiden abgebildeten Versuchen eine Anreicherung um den Faktor 2 beobachtet werden. Ausgehend von diesen Daten konnte keine deutliche Verbesserung der Anreicherung der Liganden mit Zellextrakt von *aba2* festgestellt werden. Es ist empfehlenswert den Versuch nochmals zu wiederholen. Jedoch kann ohne eine vollständige

Entfernung von ABA aus den Proben die Konkurrenz zu den Liganden L298 und L385 nicht verringert werden. Dies begründet sich vermutlich auf der Tatsache, dass die Rezeptorkomplexe eine höhere Affinität für ABA als für die erwähnten Liganden aufweisen.

### 2.3.8. Nachweis der Liganden L298 und L385 in verschiedenen

#### *Brassicaceen* durch FT-MS Analyse

Für die Isolierung von potentiellen Liganden des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes und des  $\Delta$ ABI1/RCAR11Rezeptorkomplexes wurde in den Versuchen Zellextrakt von Wirsing (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda* L.) verwendet. Dieser Abschnitt behandelt die Untersuchung der *Brassicaceen* Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.), Wirsing, Rosenkohl (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.), Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba* L.), sowie von der Asteraceae Kopfsalat (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) auf das Vorkommen der im Vorfeld identifizierten Liganden L298 und L385 (Abb. 47 A, B). Der Ligand L385 konnte in dieser Studie für Wirsing nicht dargestellt werden, da er in den Proben der Studie durch ein Störsignal überlagert wurde und somit nicht nachgewiesen werden konnte. Dieser Effekt ist als Ionensuppression bekannt (Marshall *et al.* 1998) und wird in einem späteren Kapitel (siehe 2.3.7) behandelt. Um festzustellen, ob die Liganden L298 und L385 spezifisch für *Brassicaceen* sind, wurde Kopfsalat analysiert. Die Extrakte wurden nach dem in 4.4.1. beschriebenen Protokoll aus 20 g Pflanzenmaterial (FW) hergestellt.

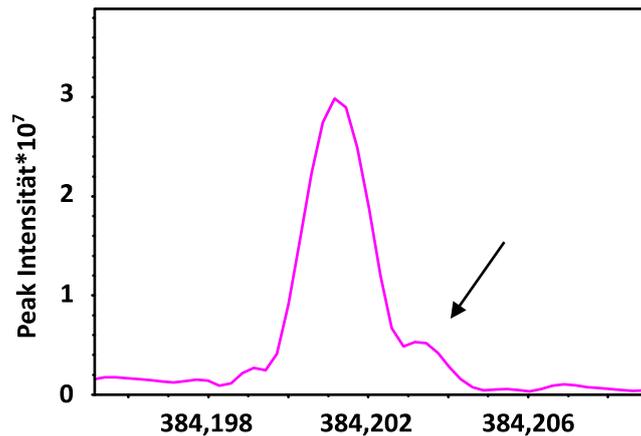


**Abb. 47 FT-MS Analyse von ABA und den Liganden L298 und L385 in *Brassicaceen***

Aus je 20 g (FW) den *Brassicaceen* Arabidopsis, Wirsing, Rosenkohl, Kohlrabi und Weißkohl, sowie der *Asteraceae* Kopfsalat wurden Extrakte gewonnen (siehe 4.4.1.). Diese wurden in 200 µl 70% Methanol aufgenommen, 1:10 verdünnt und im negativen Modus mit 500 Scans gemessen. Die mittleren Intensitäten der Signale von ABA (A) und Ligand L298 (B) mit SD wurden gegen die verschiedenen Pflanzen aufgetragen. Dargestellt sind Daten aus drei Extraktionen mit drei technischen Replikaten je Pflanzensorte.

Der Ligand L298 konnte in den untersuchten *Brassicaceen*, sowie der *Asteraceae* Kopfsalat nachgewiesen werden (Abb. 47 A). Die mittlere Intensität des Signals schwankte zwischen  $1-3 \times 10^7$ , was als gleichmäßige Verteilung des Liganden in den jeweiligen Pflanzen gewertet werden konnte. Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich sagen, dass der Ligand L298 in allen analysierten Pflanzen konserviert war.

Der Ligand L385 konnte ebenfalls in allen untersuchten Pflanzen bis auf Wirsing nachgewiesen werden (Abb. 47 B). Die Ursache für das Fehlen des Signals des Liganden L385 in dem hier verwendeten Wirsing-Zellextrakt ist, die Unterdrückung des Signals von L385 durch eine in den Zellextrakten enthaltene Kontamination (Abb. 48).



**Abb. 48 Ionensuppression von L385 in Wirsing Zellextrakt in FT-MS Analyse**

Die Abbildung zeigt den Ausschnitt eines Chromatogramms der FT-MS Analyse von Wirsing Zellextrakt im Massenbereich des Liganden L385. Der Pfeil markiert einen Schulterpeak bei dem es sich wahrscheinlich um den Liganden L385 handelt. Die Probe aus 20 g (FW) Wirsing wurde in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, 1:10 verdünnt und bei 500 Scans im negativen Modus gemessen.

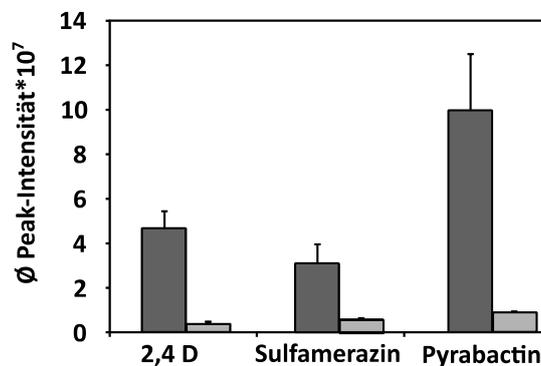
Wie in dem Chromatogramm gezeigt (Abb. 48), konnte im unmittelbaren Massenbereich von L385 ein starkes Störsignal beobachtet werden, welches das Signal des Liganden unterdrückt. Der Ligand selbst ist als Schulterpeak (schwarzer Pfeil) auszumachen. Es ist davon auszugehen, dass das Ligandensignal durch Ionensuppression unterdrückt wurde.

In anderen Datensätzen im Zusammenhang mit anderen Versuchen konnte das Ligandensignal von L385 eindeutig in Wirsing nachgewiesen werden (siehe 2.3.4.), jedoch nicht in dem hier verwendeten Datensatz. Die erfassten Intensitäten des Liganden L385 waren verglichen mit ABA (siehe 2.3.2.) und L298 deutlich geringer. In der vorliegenden Analyse bewegte sich der Mittelwert der Intensitäten zwischen  $2 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$ , was auf eine geringere Ionisierbarkeit des Liganden L385 zurückzuführen sein könnte. Jedoch zeigte sich, dass der Ligand L385 in allen untersuchten Pflanzen konserviert war. Somit kommen die neu entdeckten Liganden in allen untersuchten Pflanzen vor und könnten daher eine essentielle Rolle in Pflanzen spielen.

### 2.3.9. FT-MS Analyse von Matrix-Effekten

Um festzustellen, ob die beobachteten Anreicherungen von Liganden in den Rezeptorkomplexen durch Ionensuppression hervorgerufen worden sein konnten, wurde eine Analyse mit Zellextrakt und einem synthetischen Reinstandard vorgenommen. Matrix Effekte und Ionensuppression sind in der Massenspektrometrie allgemein bekannt (Buhrman *et al.* 1996, Taylor *et al.* 2005) und müssen bei der Analyse berücksichtigt werden. Zellextrakt aus 20 g Wirsing wurde als Matrix-Hintergrund verwendet. Als Reinstandard diente eine Mischung aus den drei synthetischen Substanzen 2,4 D (10 mM), Sulfamerazin (100 mM) und Pyrabactin (100 mM) in 200  $\mu$ l 70% Methanol. Von jeder Probe wurden 70  $\mu$ l manuell in die FT-MS injiziert. Der Reinstandard wurde in einer 1:1000 Verdünnung analysiert. Je 100  $\mu$ l Zellextrakt (1:10 verdünnt) und Standard (1:500 verdünnt) wurden gemischt, um den

Reinstandard in Mischung mit Zellextrakt wieder in der selben Konzentration zu messen. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass eventuelle Signalunterschiede zwischen Reinstandard und Mischung aus Reinstandard und Zellextrakt durch unterschiedliche Konzentration des Standards verursacht wurden.



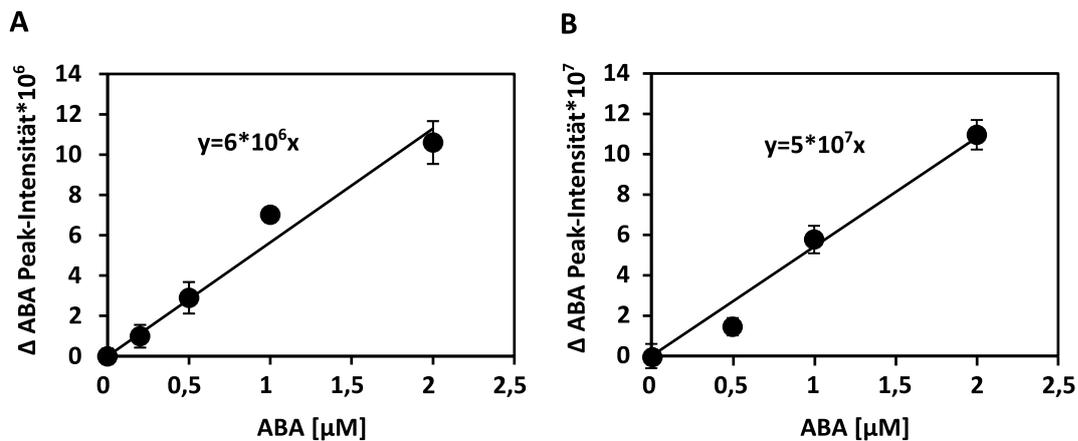
**Abb. 49 Matrix-Effekte in der FT-MS Analyse**

Ein Standard mit den Reinsubstanzen (dunkelgrau) 2,4 D (10 mM), Sulfamerazin (100 mM) und Pyrabactin (100 mM) wurde in 200 µl 70% Methanol aufgenommen und 1:1000 verdünnt gemessen. Der Zellextrakt aus 20 g Wirsing wurde ebenfalls in 200 µl 70% Methanol aufgenommen. Anschließend erfolgte die Messung einer Mischung aus 100 µl Standard in 1:500 Verdünnung und 100 µl Zellextrakt in 1:10 Verdünnung (hellgrau). Die mittleren Peak-Intensitäten der Stoffe wurden mit SD aufgetragen. Die Erfassung der Daten erfolgte mit 200 Scans im negativen Modus. Abgebildet wurden Daten eines repräsentativen Versuches mit drei technischen Replikaten.

Die Matrix-Umgebung beeinflusste die Signalstärke der drei untersuchten synthetischen Substanzen 2,4 D, Sulfamerazin und Pyrabactin (Abb. 49). Die Peak-Intensität wurde durch die Matrix deutlich verringert. Bei 2,4 D sank die Signalstärke um 92 %, bei Sulfamerazin um 81 % und bei Pyrabactin um 91 %. In der Mischung aus Reinstandard und Zellextrakt konkurrierten die Ionen aus der Zellextrakt-Matrix mit denen des Reinstandard um die Ladung in der ESI, was die Verringerung der Peak-Intensitäten der synthetischen Substanzen zur Folge hatte. Dieser Effekt muss berücksichtigt werden, wenn verschiedene Proben quantitativ miteinander verglichen werden sollen. Beispielsweise können die Proben aus der Affinitätschromatografie nicht mit dem Zellextrakt quantitativ verglichen werden, weil der Matrix-Hintergrund des Zellextraktes mehr Substanzen enthält, ähnlich wie bei dem hier durchgeführten Versuch. Dahingegen ist ein Vergleich der Affinitätschromatografie-Proben untereinander möglich weil der Matrix-Hintergrund ausreichend ähnlich ist. Diese Feststellung begründet sich auf den Ergebnissen der PCA-Analyse in 2.3.2. Es ist erkennbar, dass die Zellextrakt-Proben getrennt von den Proben aus der Affinitätschromatografie clustern (siehe Abb. 35), was für starke Unterschiede in Bezug auf Komposition und Signalintensität zwischen den erwähnten Versuchsklassen spricht. Die Proben der Affinitätschromatografie waren zudem von der Grundmatrix her relativ ähnlich zueinander, da sie in dem Scatter Plot in Abb. 35 zusammen clusterten. Somit ist sehr wahrscheinlich, dass die Ergebnisse der vergleichenden FT-MS Analyse nicht durch Matrix-Effekte verursacht wurden.

## 2.3.10. Quantitative ABA-Bestimmung mit FT-MS

Unter Verwendung einer Standardreihe wurde eine quantitative Bestimmung der ABA-Konzentration in Zellextrakten und in  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex-Proben vorgenommen. Dazu wurden Proben von Zellextrakt und Affinitätschromatografie des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes mit steigenden ABA-Konzentrationen versetzt und in der FT-MS erfasst (Abb. 50 A, B). Das Vorgehen bei der Quantifizierung stimmt mit der Methode von Gläser *et al.* 2014 überein. Von den mit ABA versetzten Spektren wurde jeweils die ABA-Signalintensität aus der Probe ohne ABA-Spiking abgezogen.



**Abb. 50 ABA-Quantifizierung in Zellextrakt und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex in FT-MS**

Es wurde Zellextrakt (A) aus 20 g Wirsing (FW) in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen und 1:25 verdünnt. Die Proben des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes (B) wurden ebenfalls in 200  $\mu$ l 70% Methanol gelöst, jedoch unverdünnt analysiert. Die Messung der Proben erfolgte bei 200 Scans im negativen Modus mit drei technischen Replikaten. Die mittlere Peak-Intensität nach Abzug der Intensität aus den nicht mit ABA versetzten Proben ( $\Delta$  ABA Peak-Intensität) wurde gegen die hinzu gegebene ABA-Konzentration aufgetragen. Es wurde eine Trendlinie durch die gemessenen Punkte gelegt und eine Geradengleichung für die Quantifizierung der ABA-Konzentration bestimmt. Die Grafik zeigt Daten mit SD von zwei repräsentativen Versuchen. Die Experimente wurden je zweimal mit vergleichbaren Resultaten wiederholt.

Die Geradengleichung der Standardkurven (Abb. 50) wurde verwendet, um ABA in den untersuchten Proben zu quantifizieren. Dazu wurde die mittlere Peak-Intensität von ABA aus dem Zellextrakt als x in die Geradengleichung eingesetzt. Die Intensität betrug in Versuch 1  $1,4 \times 10^7$ , woraus sich eine ABA-Konzentration von  $2,8 \mu$ M in der 1:25 verdünnten Zellextrakt Probe ergab, was ca.  $70 \mu$ M ABA in der unverdünnten Probe entsprach und einer Menge von ca. 14 nmol ABA (Abb. 50 A). In einer zweiten ABA-Quantifizierung mit Wirsing-Zellextrakt wurde eine ABA-Menge von 20 nmol aus 20 g Pflanzenmaterial ermittelt. Somit konnte etwa 1 nmol ABA pro Gramm Frischgewicht aus Wirsing gewonnen werden.

Bei der Quantifizierung von ABA in der  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex Probe wurde genauso vorgegangen wie bei dem Zellextrakt. Es ließ sich eine ABA Konzentration in der 1:2 verdünnten Probe von ca.  $3,7 \mu$ M errechnen, was einer ABA Konzentration von etwa  $7,4 \mu$ M in der unverdünnten Probe

entsprach und einer ABA-Menge von ca. 1,5 nmol. Bei einer Wiederholung wurde eine ABA-Menge von 1,2 nmol ermittelt. Ausgehend von den Ergebnissen bei der Etablierung des Systems (siehe 2.2.) lag dies im Bereich der Bindekapazität der Affinitätsäulen. Somit ist davon auszugehen, dass die Quantifizierung von ABA durch FT-MS Analyse sehr präzise ist. Es ist jedoch anzumerken, dass die ABA-Quantifizierung für jede Komplex-Probe und jeden Zellextrakt individuell vorgenommen werden muss. Dies begründet sich auf den beobachteten Matrix-Effekten, d.h. je nach Zusammensetzung der Probe können die Signalstärken der verschiedenen Massen variieren (siehe 2.3.6). Die Methode zur Quantifizierung von ABA kann auch zur Quantifizierung anderer Liganden verwendet werden, sofern Reinsubstanzen erhältlich sind.

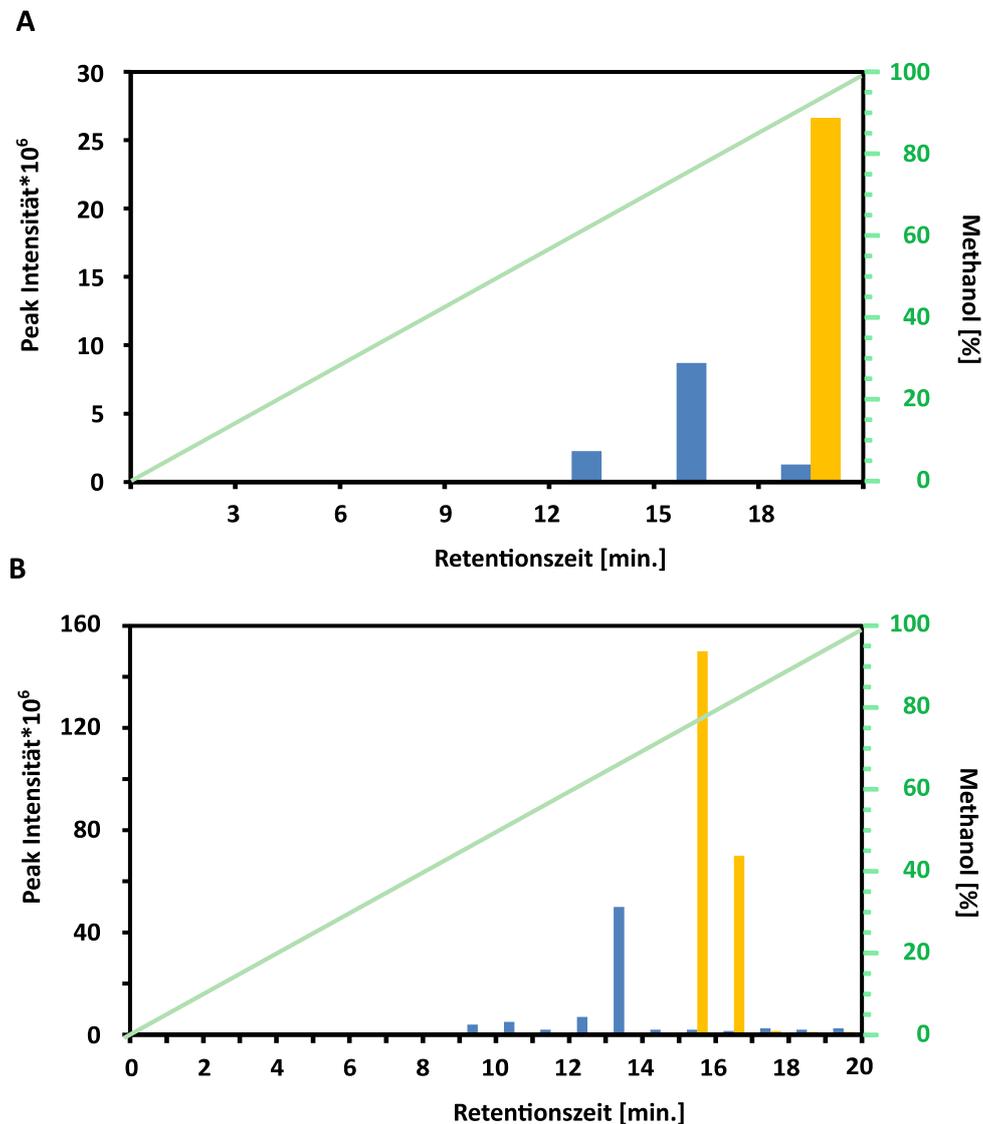
### 2.4. Charakterisierung des Liganden L298 mit HPLC und Phosphatase-Assays

Nachdem L298 als möglicher Ligand der RCAR8- und RCAR11 Rezeptorkomplexe identifiziert wurde, sollte dieser weiter charakterisiert werden. Der Ligand L385 wurde nicht näher analysiert, da dessen Signalstärke zu schwach war. Die Laufeigenschaften des Liganden L298 wurden durch HPLC-Fraktionierung von Extrakten der Affinitätschromatografie mit RCAR/PP2C Rezeptorkomplex untersucht. Der Ligand L298 wurde in einer präparativen HPLC gereinigt und es wurde überprüft, ob der Ligand in Phosphatase-Assays Effekte vergleichbar mit ABA zeigte.

#### 2.4.1. Präparative HPLC des Liganden L298

Um den Liganden L298 präparativ per HPLC aufzureinigen, wurde Eluat der Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und Wirsing-Zellextrakt (siehe 2.3.3) fraktioniert und durch FT-MS analysiert. Dieses Vorgehen ist mit einer präparativen HPLC gleichzusetzen (Hamburger *et al.* 2003). Für die Versuche wurde ein *Upscaling* der Affinitätschromatografie vorgenommen. 4 mg  $\Delta$ ABI1 wurden an 2 g der Affinitätsmatrix Affi 15 Gel gekoppelt und das immobilisierte  $\Delta$ ABI1 Protein mit RCAR8 in einem molaren Verhältnis von 1:2 inkubiert. Zellextrakt aus 200 g (FW) Wirsing wurde in 2 ml Puffer (40 mM Tris HCl pH 7,9) gelöst und zu der Probe gegeben. Das Material wurde in eine Säule mit 6 ml Füllvolumen übertragen und mit dreimal 6 ml Waschpuffer 2 (siehe 4.3.6.) gewaschen. Nach einer Elution der Liganden mit 6 ml 75% Methanol wurde das Eluat unter Verwendung einer C18-Säule entsalzt und getrocknet. Für die präparative HPLC wurde die Probe in 1 ml Laufpuffer (0,25% Essigsäure pH 3,9) aufgenommen. Um den Liganden L298 aufzureinigen, wurde das HPLC-Protokoll aus 2.1.4. verwendet. Es wurden viermal 200  $\mu$ l Probe in die HPLC injiziert und ab Beginn des Gradienten alle drei Minuten eine Fraktion aufgefangen. Die Fraktionen der verschiedenen Injektionen wurden gepoolt und abgedampft. Später wurden die Fraktionen durch FT-MS analysiert (Abb. 51, A). Die präparative Reinigung von L298 wurde dreimal wiederholt. Mit dem Eluat von Versuch 2 (Abb. 51, B) wurde eine

Feinauftrennung mit einer Probennahme pro Minute vorgenommen, um eine genauere Auftrennung der Probe vorzunehmen.



#### Abb. 51 Reinigung des Liganden L298 durch präparative HPLC

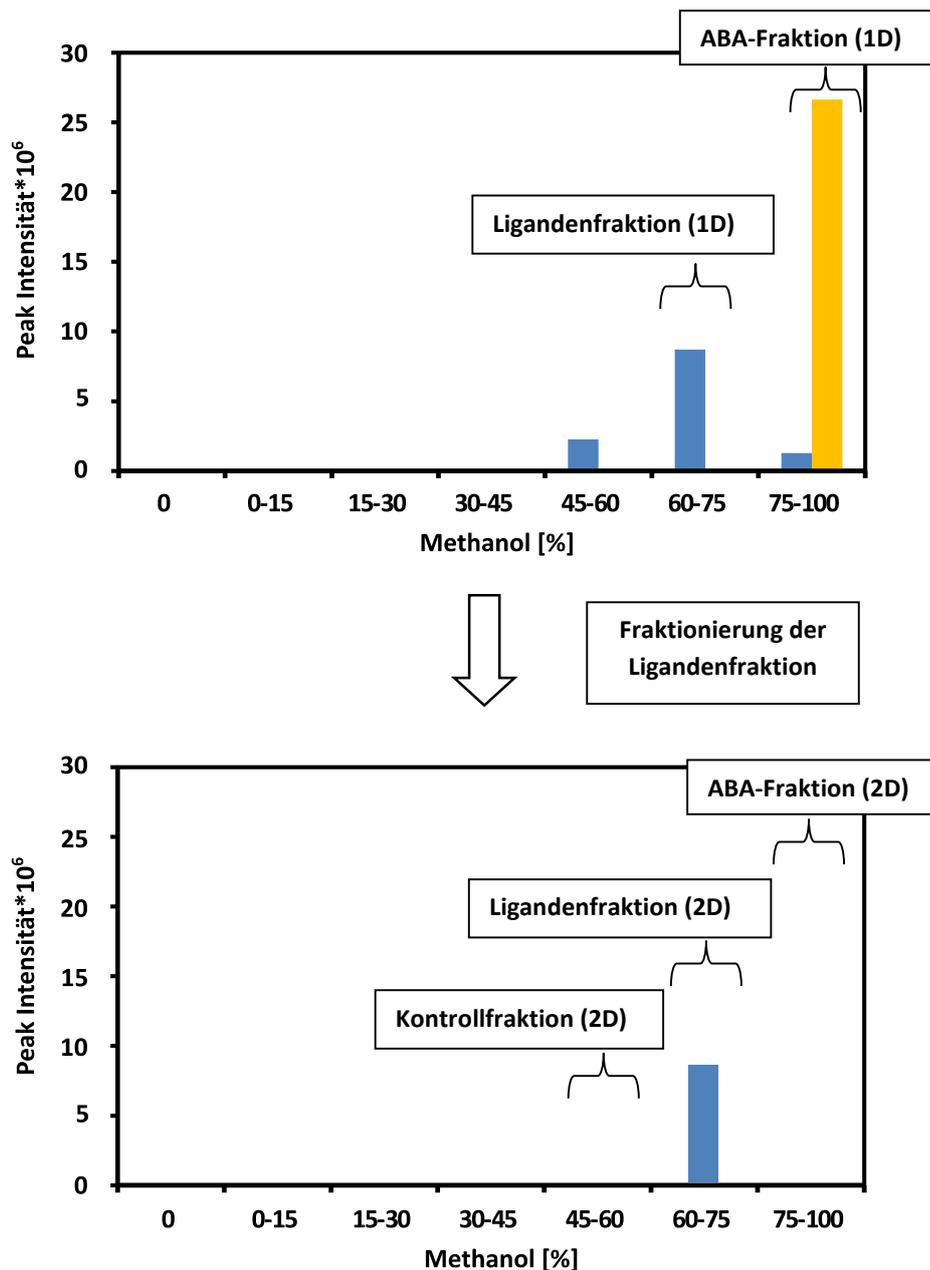
Das Eluat einer Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und Wirsing Zellextrakt wurde in 1 ml Laufpuffer (0,25% Essigsäure pH 3,9) aufgenommen. Die Probe wurde viermal a´ 200  $\mu$ l in die HPLC injiziert. Es wurde ein Gradient von 0-100% Methanol über einen Zeitraum von 20 min. eingestellt. Die Proben der Fraktionen wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen. Die Messung FT-MS Analyse erfolgte bei 200 Scans im negativen Modus. In dem Versuch A wurde alle drei min. eine Fraktion genommen. In Versuch B erfolgte eine Feinauftrennung mit einer Probennahme pro Minute. Die Signal Intensität des Liganden L298 (blau) und von ABA (gelb) wurde gegen den Methanol Gradienten in % aufgetragen. Signale unterhalb des Detektionslimits von  $2 \cdot 10^6$  wurden nicht berücksichtigt. Die Abbildung zeigt Daten einer Auftrennung von zwei Proben aus zwei verschiedenen Versuchen ohne technische Replikate.

Der Ligand L298 eluierte früher von der HPLC-Säule als ABA (Abb. 51), was bedeutete, dass der Ligand weniger hydrophob war als ABA, da eine schwächere Interaktion mit dem Material der C18-HPLC Säule vorlag. Außerdem konnte festgestellt werden, dass der Ligand bei einer Methanolkonzentration von 65-75% eluierte, wohingegen ABA bei 80-90% Methanol eluierte. Somit war eine Abtrennung des

Liganden L298 von ABA und anderen Substanzen in der Probe durch das verwendete Protokoll in der präparativen HPLC möglich. Die ABA-Abreicherung in den ABA-Fractionen gegenüber den Ligandenfraktionen lag zwischen Faktor 13-70 über dem Detektionslimit.

### 2.4.2. Analyse von Fraktionen der Affinitätschromatografie in Rezeptorkomplex- Assays

Nachdem festgestellt wurde, dass der Ligand L298 von ABA durch präparative HPLC abgetrennt werden konnte, wurden Fraktionen von Eluaten einer Affinitätschromatografie von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex mit Wirsing-Zellextrakt (siehe 2.4.1.) in Phosphatase-Assays (Kepka *et al.* 2011) untersucht. In dieser Studie sollte herausgestellt werden, ob der Ligand L298 eine vergleichbare Regulation der Proteinphosphatasen wie ABA mit RCAR8 zeigte. Die Fraktion des Liganden L298 wurde zweimal fraktioniert, um eventuelle Kontaminationen durch ABA zu minimieren und damit sicherzustellen, dass die beobachteten Ergebnisse auf den Liganden L298 zurückgingen. Die Probennahme wurde zum besseren Verständnis in Abb. 52 schematisch dargestellt.



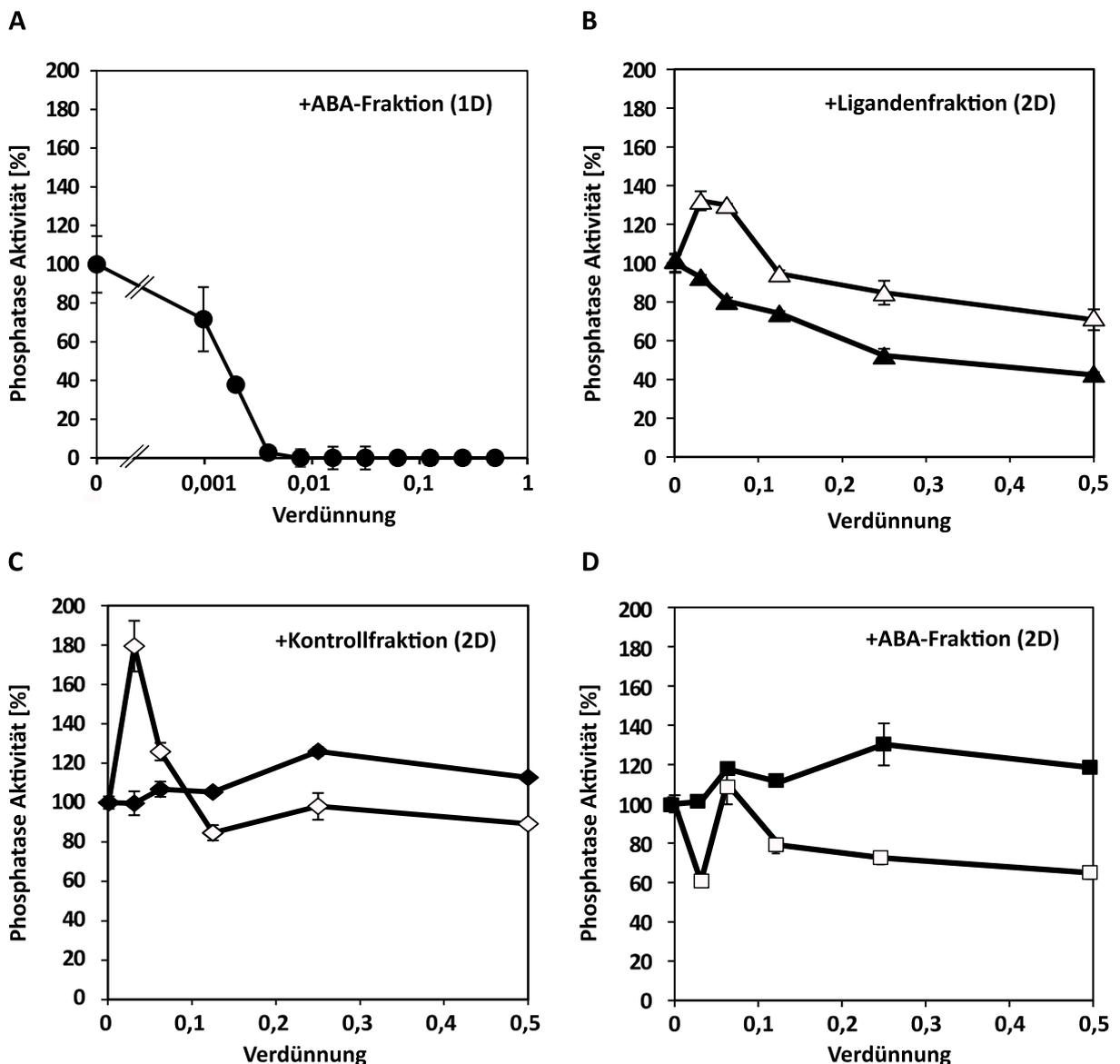
**Abb. 52 Schema der Probennahme der präparativen HPLC**

Dargestellt ist das Vorgehen bei der Probennahme nach der Affinitätschromatografie. Im ersten Schritt wurden ABA (gelb) und Ligand L298 (blau) voneinander abgetrennt. Anschließend wurde die Ligandenfraktion (1D) noch einmal aufgetrennt. Hier wurden dann die Fraktionen Kontrollfraktion (2D), Ligandenfraktion (2D) und ABA-Fraktion (2D) genommen.

Die Proteinphosphatase ABI2 mit und ohne RCAR8 wurde in einem molaren Verhältnis von 1:2 und 80  $\mu$ l der jeweiligen Verdünnung der verschiedenen HPLC-Fraktionen inkubiert. Im Falle einer ABA-ähnlichen Regulation der Proteinphosphatase durch den Liganden müsste eine RCAR-abhängige Hemmung der Phosphatase-Aktivität durch die Ligandenfraktion beobachtet werden. Die Messungen der Phosphatase-Aktivität ohne RCAR8 wurden vorgenommen, um sicher zu stellen, dass die beobachtete Regulierung der Phosphatase-Aktivität RCAR-abhängig ist.

Zunächst wurde die ABA-Fraktion der ersten Auftrennung gemessen, dann die Kontrollfraktion, Ligandenfraktion und ABA-Fraktion der zweiten Auftrennung. Die ABA-Fraktion der zweiten Auftrennung wurde untersucht um festzustellen, ob ABA-Reste in der Ligandenfraktion vorhanden waren.

Die Regulierung der Phosphatase durch die verschiedenen Fraktionen kann in den folgenden Abbildungen (Abb. 53, Abb. 54 und Abb. 55) nachvollzogen werden. Dabei handelt es sich um eine Zusammenstellung von Daten aus drei Wiederholungen.



**Abb. 53 Rezeptorkomplex-Assays mit Fraktionen der Affinitätschromatografie Versuch 1**

Das Eluat der Affinitätschromatografie von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und Wirsing Zellextrakt wurde durch HPLC fraktioniert. Die Fraktionen wurden in 250  $\mu$ l Puffer (40 mM Tris pH 7,9) aufgenommen und verdünnt. Für die Untersuchung wurde die ABA-Fraktion aus der ersten Fraktionierung (A), die Ligandenfraktion aus der zweiten Fraktionierung (B), die Kontrollfraktion der zweiten Fraktionierung (C) und die ABA-Fraktion der zweiten Fraktionierung untersucht. Für das Experiment wurden 1  $\mu$ g der Phosphatase ABI2 mit 80  $\mu$ l der Verdünnung der jeweiligen Fraktion mit und ohne RCAR8 im molaren Verhältnis 1:2 in einem 200  $\mu$ l Ansatz inkubiert. Als 100 % wurde für die Messungen ohne RCAR8 (weiß) die Aktivität der Phosphatase ABI2 ohne zugegebene Fraktion mit

188,5 nkatal/mg angegeben. Für die Messungen mit ABI2 und RCAR8 (schwarz) wurde die Ausgangsaktivität von 186,6 nkatal/mg des Ansatzes ohne Fraktion als 100% angenommen. Die niedrigste Verdünnung der Fraktionen war 0,5. Diese entsprach umgerechnet einer Verdünnung von 1:2. Es erfolgte eine Verdünnung der Fraktionen um den Faktor 2 bis zum Erreichen der jeweils größten Verdünnung.

A: Hier wurde die ABA-Fraktion aus der ersten Fraktionierung des Eluates der Affinitätschromatografie von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und Wirsing Zellextrakt in einer Verdünnungsreihe gemessen. Die X-Achse ist logarithmisch skaliert. Die höchste Verdünnung war hier 0,0009, was einer Verdünnung von 1:1024 entsprach.

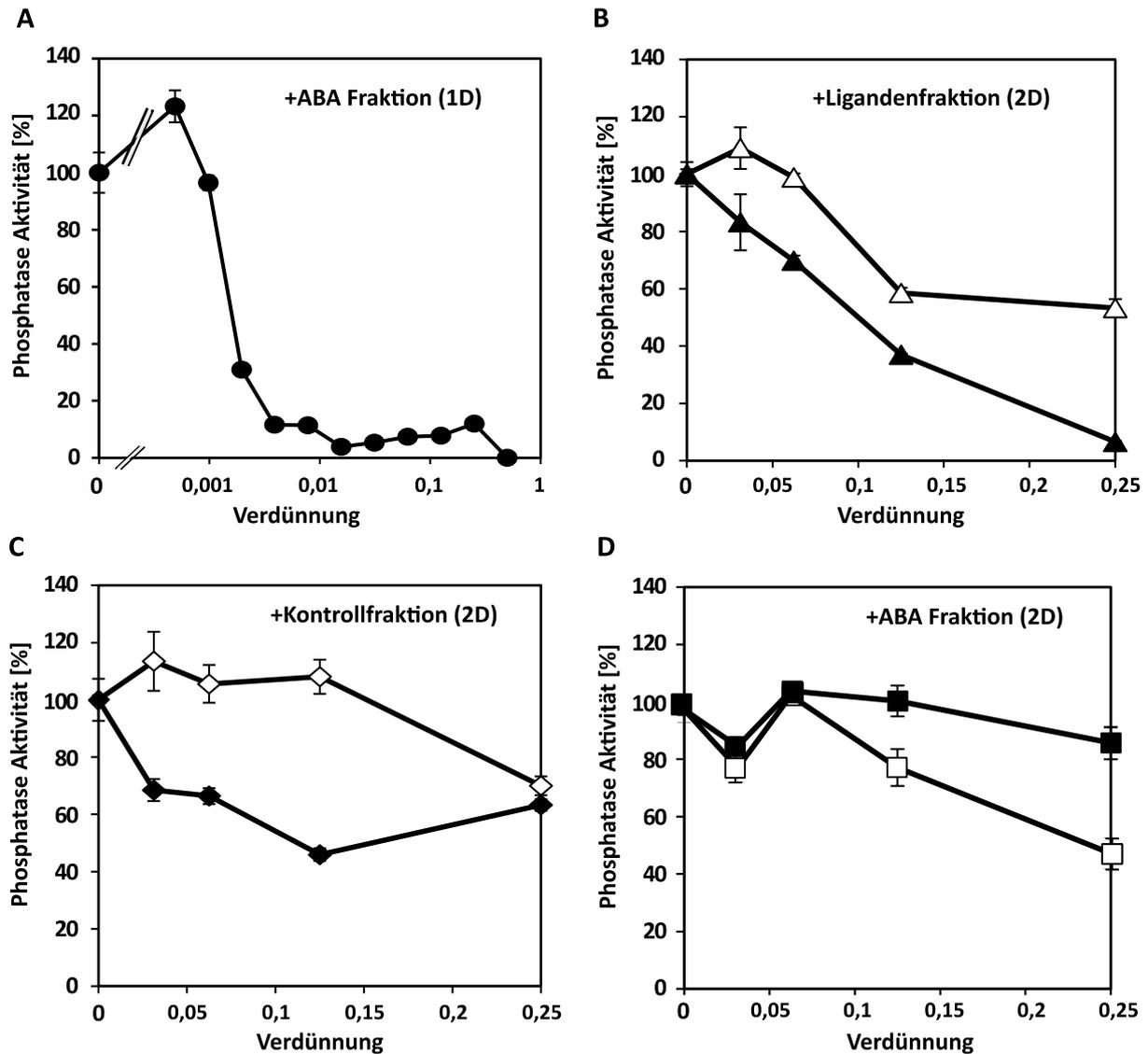
B: Messung der Ligandenfraktion aus der zweiten Fraktionierung in einer Verdünnungsreihe. Die Phosphatase ABI2 wurde mit (schwarz) und ohne RCAR8 (weiß) inkubiert. Die höchste Verdünnung war hier 0,0313 was 1:32 entspricht.

C: Messung der Verdünnungsreihe der Kontrollfraktion aus der zweiten Fraktionierung der Ligandenfraktion mit und ohne RCAR8. Die höchste Verdünnung war hier mit B identisch.

D: Messung der verdünnten ABA-Fraktion (2D) der zweiten Fraktionierung mit und ohne RCAR8. Auch hier war die höchste Verdünnung 1:32.

Dargestellt sind Daten eines Versuches mit SD aus drei technischen Replikaten je Verdünnung.

Die ABA-Fraktion (1D) der ersten Fraktionierung (Abb. 51, A) bewirkte eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität bei Inkubation mit RCAR8. Bereits bei der höchsten Verdünnung von 1:1024 konnte eine Verringerung der Aktivität um 30% registriert werden. Die Aktivität konnte mit höher konzentrierten Proben der ABA-Fraktion vollkommen gehemmt werden. Die Ligandenfraktion (Abb. 50, B) zeigte eine ähnliche Wirkung wie die ABA-Fraktion. Auch hier wurde die Aktivität der Proteinphosphatase ABI2 gehemmt. Allerdings war dieser Effekt nicht vergleichbar mit der ABA-Fraktion (1D). Die Aktivität wurde bei der niedrigsten Verdünnung um 65% verringert. Weder in der Kontrollfraktion noch in der ABA-Fraktion (Abb. 53, C und D) der Ligandenfraktion war eine RCAR-abhängige Hemmung der Phosphatase zu erkennen. Es war eine unspezifische Hemmung der Phosphatase-Aktivität ohne RCAR8 zu beobachten. Diese schwankte zwischen 20-30% (Abb.53, B-D).



**Abb. 54 Rezeptorkomplex Assays mit Fraktionen der Affinitätschromatografie Versuch 2**

Es erfolgte eine Fraktionierung des Eluates der Affinitätschromatografie von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und Wirsing Zellextrakt per HPLC. Die Fraktionen wurden in Phosphatase-Assays auf deren Regulation der Phosphatase ABI2 überprüft. Für die Untersuchung wurde die ABA-Fraktion aus der ersten Fraktionierung (A), die Ligandenfraktion aus der zweiten Fraktionierung (B), die Kontrollfraktion der zweiten Fraktionierung (C) und die ABA-Fraktion der zweiten Fraktionierung untersucht. Die Proben wurden in 250  $\mu$ l Puffer (40 mM Tris pH 7,9) aufgenommen und verdünnt. In dem Experiment wurde ein Ansatz von 200  $\mu$ l mit 1  $\mu$ g der Phosphatase ABI2, 80  $\mu$ l der verdünnten Fraktion, sowie mit und ohne RCAR8 im molaren Verhältnis 1:2 inkubiert. Als 100 % wurde für die Messungen ohne RCAR8 (weiß) die Aktivität der Phosphatase ABI2 ohne zugegebene Fraktion mit 134,2 nkatal/mg verwendet. Für die Messungen mit ABI2 und RCAR8 (schwarz) in einem molaren Verhältnis von 1:2 wurde die Ausgangsaktivität von 67 nkatal/mg des Ansatzes ohne Fraktion als 100% angenommen. Auch in diesem Versuch wurde die Phosphatase-Aktivität von ABI2 in % gegen die Verdünnungen der verschiedenen Fraktionen aufgetragen. Die mit Messungen mit RCAR8 sind schwarz markiert, die ohne weiß. Bei der ABA-Fraktion war die niedrigste Verdünnung 0,5 und bei den anderen Verdünnungsreihen 0,25.

A: Diese Messung zeigt eine Verdünnungsreihe mit der ABA-Fraktion aus der ersten Auftrennung des Extraktes der Affinitätschromatografie. Die Skalierung der X-Achse ist logarithmisch. Die höchste Verdünnung war hier 0,0005 was einer 1:2048 Verdünnung entsprach.

B: Hier wurde eine Verdünnungsreihe mit der Ligandenfraktion gemessen. Die Inkubation erfolgte jeweils mit und ohne RCAR8. Die höchste Verdünnung war hier 1:32.

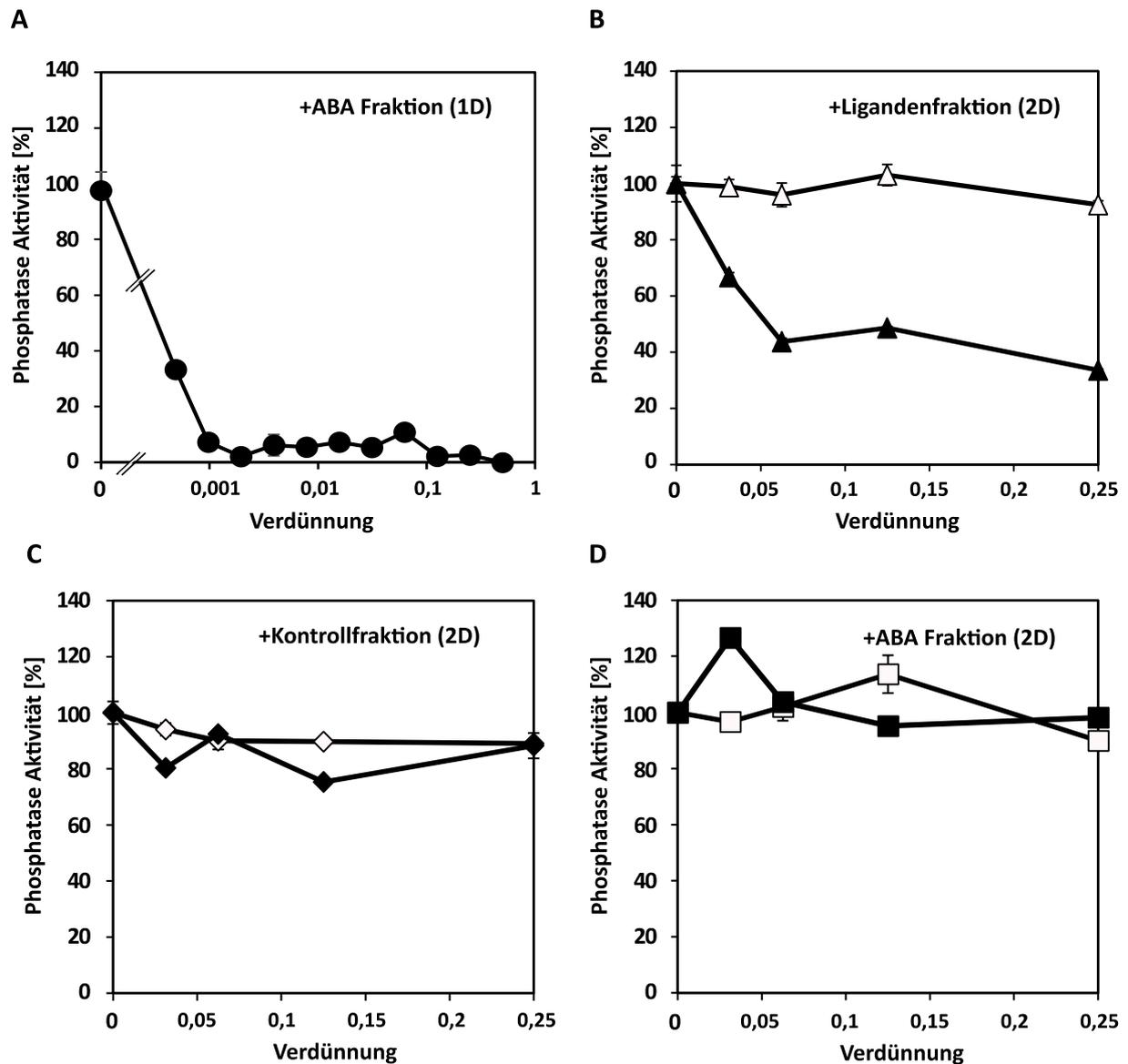
C: Die Kontrollfraktion wurde in verschiedenen Verdünnungen mit und ohne RCAR8 gemessen. Auch hier war die höchste Verdünnung 1:32.

D: Es erfolgte eine Messung der ABA-Fraktion aus der zweiten Fraktionierung der Ligandenfraktion in einer Verdünnungsreihe. Auch hier wurde die Regulierung der Phosphatase mit und ohne RCAR8 untersucht. Die höchste Verdünnung war 1:32.

Dargestellt sind Daten mit SD aus einem Versuch mit drei technischen Replikaten.

Bei der zweiten Wiederholung konnte eine vollständige Hemmung der Proteinphosphatase mit RCAR8 und der ABA-Fraktion der ersten Fraktionierung (Abb. 54, A) erzielt werden. Die Ligandenfraktion zeigte eine RCAR8 abhängige Hemmung der Phosphatase-Aktivität um 90% bei der niedrigsten Verdünnung (Abb. 54, B). Auch die Kontrollfraktion zeigte hier eine RCAR8 abhängige Hemmung um 40-50%. Dies könnte auf eine Verunreinigung der Fraktion mit Ligand L298 durch unsaubere Fraktionierung zurückzuführen sein. Mit der ABA-Fraktion der Ligandenfraktion konnte keine RCAR8-abhängige Hemmung der Phosphatase-Aktivität beobachtet werden (Abb. 54, D). Es zeigte sich eine unspezifische Hemmung der Phosphatase ABI2 ohne RCAR8, welche zwischen 20-40% lag (Abb. 54, B-D) und durch eine Störung der Fluoreszenz-Messung durch die Farbigkeit der Fraktion verursacht worden sein könnte.

Auch in einer weiteren Wiederholung des Experimentes mit Fraktionen aus der Affinitätschromatografie (Abb. 55, A-D) konnte eine Regulation der Phosphatase ABI2 durch die Fraktionen mit RCAR8 beobachtet werden.



**Abb. 55 Rezeptorkomplex Assays mit Fraktionen der Affinitätschromatografie Versuch 3**

Das Eluat der der Affinitätschromatografie von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex mit Wirsing Zellextrakt wurde in der HPLC fraktioniert. Die Fraktionen wurden per Phosphatase-Assay auf Regulation der Phosphatase ABI2 überprüft. Für die Untersuchung wurde die ABA-Fraktion aus der ersten Fraktionierung (A), die Ligandenfraktion aus der zweiten Fraktionierung (B), die Kontrollfraktion der zweiten Fraktionierung (C) und die ABA-Fraktion der zweiten Fraktionierung untersucht. In dem Experiment wurde ein Ansatz von 200  $\mu$ l mit 1  $\mu$ g der Phosphatase ABI2, 80  $\mu$ l der verdünnten Fraktion, sowie mit und ohne RCAR8 im molaren Verhältnis 1:2 inkubiert. Als 100 % wurde für die Messungen ohne RCAR8 (weiß) die Aktivität der Phosphatase ABI2 ohne zugegebene Fraktion mit 125,4 nkatal/mg verwendet. Für die Messungen mit ABI2 und RCAR8 (schwarz) in einem molaren Verhältnis von 1:2 wurde die Ausgangsaktivität von 107,5 nkatal/mg des Ansatzes ohne Fraktion als 100% angenommen. Die Phosphatase-Aktivität von ABI2 in % wurde gegen die verschiedenen Verdünnungen der untersuchten Fraktionen aufgetragen. Die geringste Verdünnung der ABA-Fraktion war 0,5. Die niedrigste Verdünnung der anderen Fraktionen war 0,25, was einer 1:4 Verdünnung entspricht.

A: Messung einer Verdünnungsreihe mit der ABA-Fraktion der Affinitätschromatografie. Die X-Achse dieser Messung ist logarithmisch skaliert. Die höchste Verdünnung war 0,0005, was einer 1:2048 Verdünnung entsprach.

B: Hier wurde die Ligandenfraktion in verschiedenen Verdünnungen gemessen. Die höchste Verdünnung war 1:32. Die Messung erfolgte mit und ohne RCAR8.

C: Die Kontrollfraktion wurde ebenfalls mit und ohne RCAR8 gemessen. Höchste Verdünnung war hier ebenfalls 1:32.

D: Messung der ABA-Fraktion zur Detektion von ABA-Rückständen mit und ohne RCAR8. Mit 1:32 also höchster Verdünnung.

Die Messung erfolgte bei 460 nm über einen Zeitraum von 20 min mit drei technischen Wiederholungen.

Für die dritte Wiederholung ist zu bemerken, dass die ABA-Konzentration in der Ausgangsprobe sehr hoch gewesen sein muss, da bereits in der höchsten Verdünnung von 1:2048 eine Hemmung der PP2C mit RCAR8 um 70% zu registrieren war. Die Ligandenfraktion zeigte ebenfalls eine RCAR8-abhängige Hemmung der Proteinphosphatase von etwa 60% bei der geringsten Verdünnung von 1:4 (Abb. 55 B). Die Kontrollfraktion (2D) und die ABA-Fraktion (2D) zeigten keine RCAR-spezifische Hemmung der Phosphatase. Es waren unspezifische Schwankungen der Messwerte bei den Proben ohne RCAR8 zu erkennen. Diese zeigten eine zwischen 10-20% verringerte Phosphatase-Aktivität an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ABA-Konzentrationen in der ABA-Fraktion (1D) abhängig vom Versuch stark schwankten. Vergleicht man die Hemmung der Phosphatase-Aktivität bei der Verdünnung 1:1024 so erhält man Werte von 30, 10 und 90% Hemmung der Proteinphosphatase ABI2 (Abb. 53 A, Abb. 54 A, Abb. 55 A).

Bei der Liganden-Fraktion konnte die gleiche Beobachtung gemacht werden, da die RCAR8-abhängige Inhibition der Proteinphosphatase ABI2 mit der niedrigsten Verdünnung 1:4 zwischen 40, 90 und 60% schwankte (Abb. 53 B, Abb. 54 B, Abb. 55 B).

Auch die unspezifische Hemmung der Proteinphosphatase mit der Ligandenfraktion (Abb. 53 B, Abb. 54 B, Abb. 55 B) schwankte stark mit einer unspezifischen Hemmung von 10, 40 und 5% bei einer 1:4 Verdünnung, was durch eine Interferenz der Fluoreszenz-Messung durch die Farbigkeit der untersuchten Fraktionen verursacht worden sein könnte.

Die Kontrollfraktion aus der zweiten Fraktionierung der Ligandenfraktion zeigte nur in einer Wiederholung (Abb. 54 C) mögliche Reste des Liganden L298 an. Diese Annahme wurde aufgrund der RCAR8-abhängigen Hemmung der Phosphatase-Aktivität von etwa 40% bei der geringsten Verdünnung getroffen. Da in den Kontrollfraktionen der anderen Wiederholungen (Abb. 53 C, Abb. 55 C) dieser Effekt nicht auftrat, wurde davon ausgegangen, dass in diesen Fraktionen keine Reste des Liganden L298 vorhanden waren.

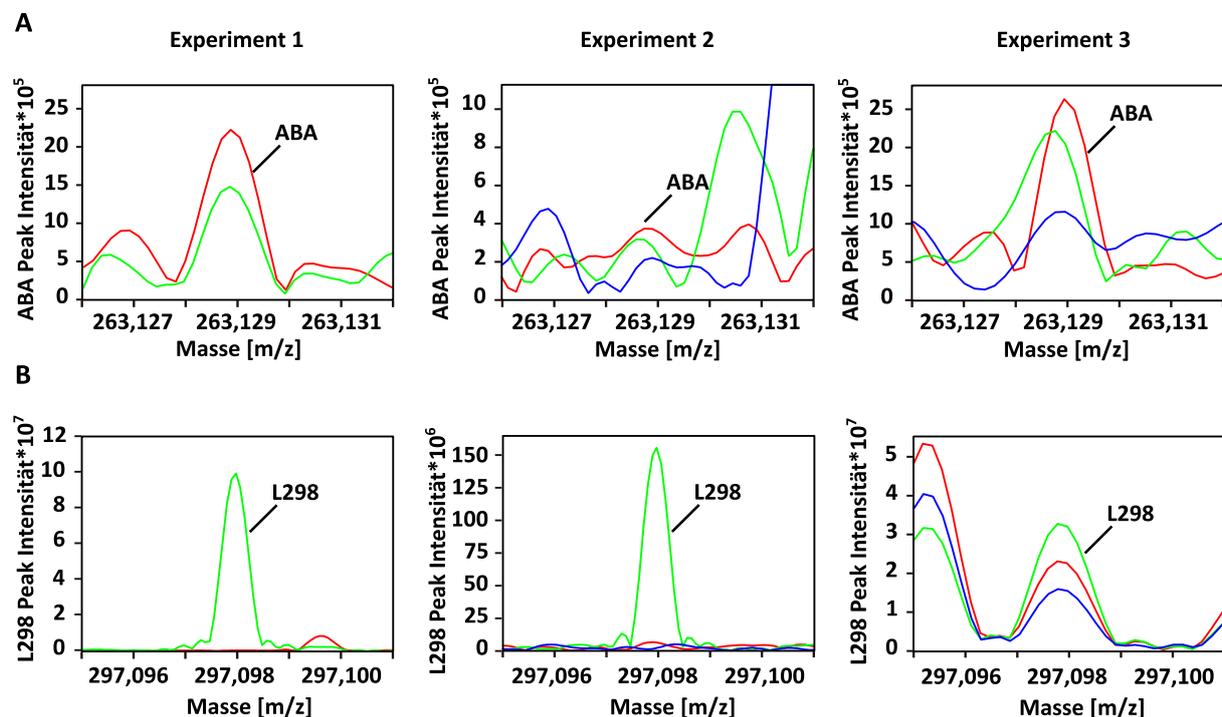
Die vierte untersuchte Fraktion war die ABA-Fraktion (2D) der zweiten Fraktionierung der Ligandenfraktion. Hier sollte festgestellt werden, ob die beobachtete Regulierung der Proteinphosphatase ABI2 eventuell durch ABA Kontaminationen in der Ligandenfraktion verursacht wurden. In allen drei Wiederholungen konnte keine RCAR8-abhängige Regulierung der Proteinphosphatase ABI2 durch die ABA-Fraktion (2D) beobachtet werden (Abb. 53 D, Abb. 54 D, Abb.

## Ergebnisse

55 D). Somit wird davon ausgegangen, dass die beobachteten Effekte auf den Liganden L298 zurückzuführen waren.

Abschließend lässt sich sagen, dass der Ligand eine ähnliche Wirkung in Bezug auf RCAR-abhängige Inhibition zeigte wie ABA.

Um analytisch sicherzustellen, dass die beobachtete Hemmung der Phosphatase Aktivität durch die Ligandenfraktion nicht auf ABA-Kontaminationen zurückzuführen waren, wurden die Fraktionen der Versuche durch FT-MS analysiert. Die folgende Grafik zeigt die Überprüfung der Fraktionen auf das Vorhandensein von ABA (Abb. 56) und die Signal-Intensitäten des Liganden L298.



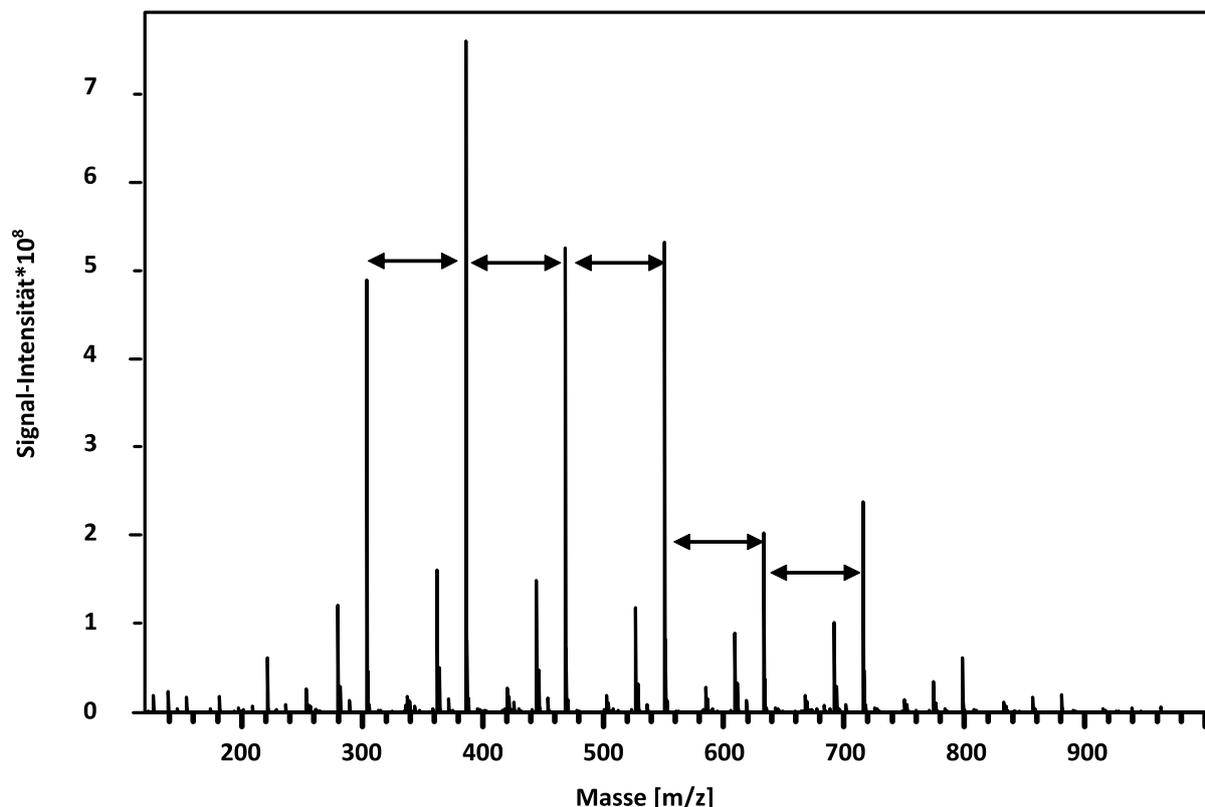
**Abb. 56 ABA- und L298 Signale nach FT-MS Analyse mit Fraktionen der Affinitätschromatografie**

Die HPLC-Fractionen der Eluate der Affinitätschromatografie des  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplexes mit Wirsing Zellextrakt wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen. Es wurden 70  $\mu$ l je Probe manuell in die FT-MS injiziert und mit 200 Scans im negativen Modus gemessen. In dieser Abbildung wurden die Peak-Intensitäten ABA (A) und dem Liganden L298 (B) aufgetragen. Es handelt es sich um Daten der zweiten Fraktionierung des Liganden L298 aus drei Experimenten. Die Kontrollfraktion wurde blau markiert, die Ligandenfraktion grün und die ABA-Fraktion der rot. Bei Experiment 1 lagen keine Daten zur Kontrollfraktion vor.

Die Untersuchung der Fraktionen der Affinitätschromatografie auf das Vorhandensein von ABA ergab, dass nur in der ABA-Fraktion der zweiten Fraktionierung der Ligandenfraktion ABA detektierbar war (Abb. 56, A). In den anderen Fraktionen wurden keine ABA-Signale oberhalb des Detektionsminimums von  $2 \times 10^6$  erfasst. Zusätzlich spricht das Fehlen einer Inhibition durch die ABA Fraktion der zweiten Fraktionierung (siehe Abb. 53-Abb. 55, D) gegen eine Kontamination der Ligandenfraktion durch ABA. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte der Ligandenfraktion höchstwahrscheinlich auf den Liganden L298 zurückzuführen waren.

Reste des Liganden L298 waren bei der dritten Wiederholung in der Kontrollfraktion vorhanden (Abb. 56, B). Das Signal des Liganden-Peaks in den Ligandenfraktionen schwankte zwischen  $3 \times 10^7$  und  $1,5 \times 10^8$  abhängig von der Wiederholung. Die Intensität des Liganden-Signals war jeweils in der Ligandenfraktion der zweiten Fraktionierung am höchsten. Daher wird davon ausgegangen, dass in dieser Fraktion die höchste Konzentration des Liganden L298 vorhanden war. Zudem ist in dem Spektrum der dritten Wiederholung (Abb. 56, B) der Einfluss einer Kontamination auf die Signalstärke des Liganden zu beobachten. Hier wurde das Signal des Liganden wahrscheinlich durch das starke Signal des Peaks in der selben Massenregion durch Ionensuppression unterdrückt, weshalb das Signal des Peaks mit  $3 \times 10^7$  am schwächsten war.

In Versuch 2 (Abb. 54) wurde mit der Kontrollfraktion eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität von bis zu 60% beobachtet. Dies spricht für eine Kontamination der Fraktion mit dem Liganden L298. Jedoch konnte kein Ligandensignal in der Kontrollfraktion in der späteren FT-MS Analyse der Fraktionen erfasst werden (Abb. 56). Die Ursache dafür liegt vermutlich in einer Kontamination der Kontrollfraktion mit langkettigen Fettsäuren aus der C18-Säule der HPLC. Die Abb. 57 zeigt, das in der FT-MS aufgenommene Spektrum der Kontrollfraktion von Versuch 2.

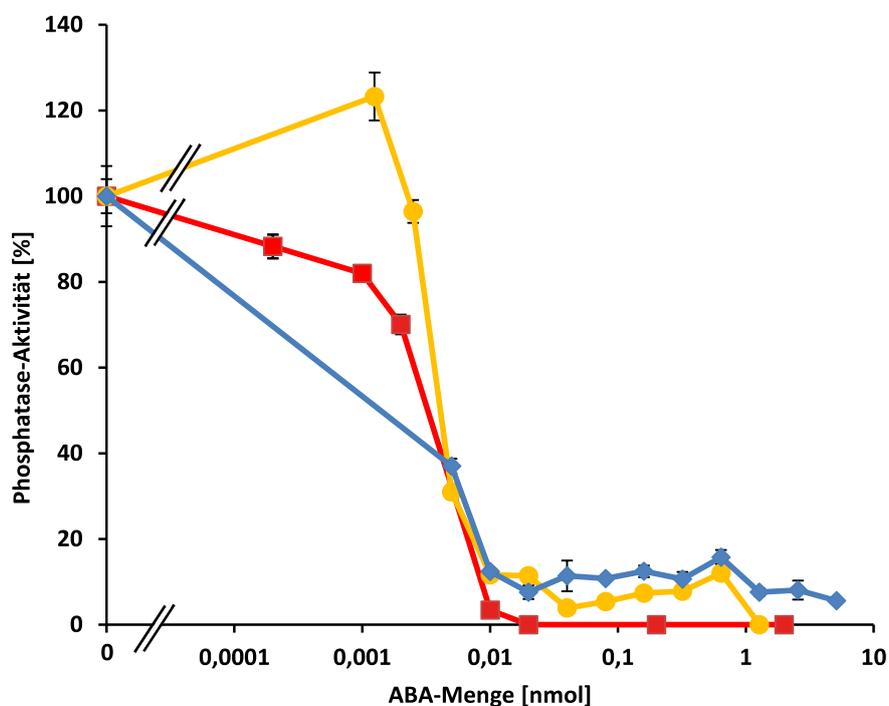


**Abb. 57 Ionensuppression durch Kontamination mit langkettigen Fettsäuren**

Die Abbildung zeigt ein Spektrum der Kontrollfraktion von Versuch 2. Die Signalintensität wurde gegen die Masse ( $m/z$ ) aufgetragen. Die Probe wurde in  $200 \mu\text{l}$  70% Methanol aufgenommen. Es wurden  $70 \mu\text{l}$  der Probe injiziert und mit 200 Scans im negativen Modus gemessen. Die schwarzen Pfeile markieren den Massenabstand zwischen den prominentesten Peaks. Dieser war immer genau  $82,004$ .

In dem Chromatogramm (Abb. 57) fallen Peaks auf, die den gleichen Massenabstand von 82,004 aufweisen. Diese Masse entspricht der errechneten Summenformel  $C_4H_2O_2$ , was auf 3 Methylgruppen und eine Carboxylgruppe als Abgangsgruppe hinweist. Die Abgangsgruppen bei Fettsäuren sind gleich, jedoch variiert die Länge der Fettsäureketten. Daher die Unterschiede in der Masse der erfassten Moleküle mit jedoch immer dem gleichen Massenabstand zwischen einander. Da Fettsäuren sehr gut ionisieren konkurrieren sie in der ESI-MS um Ladungen mit anderen Molekülen und können so deren Signale unterdrücken. Die Fettsäuren stammen wie bereits erwähnt höchstwahrscheinlich von dem Säulenmaterial der für die Fraktionierung verwendeten HPLC. Dies kann 2 Ursachen haben: Möglichkeit Nummer 1 wäre eine Verunreinigung der Anlage durch unsaubere Lösungsmittel. Möglichkeit Nummer 2 wäre, dass die Säule „blutet“ das heißt die Verbindung zwischen Säulenmaterial daran gebundenen C18-Fettsäuren ist nicht mehr stabil genug, sodass die Fettsäuren durch Lösungsmittel ausgewaschen werden. Dies kann auf dauerhaft Verwendung von Lösungsmitteln mit zu hohem oder zu niedrigen pH-Wert zurückzuführen sein (Middleditch *et al.* 1987, Middleditch *et al.* 1989). Es empfiehlt sich die Säule auszutauschen und das HPLC-System mit hochreinen Lösungsmitteln zu reinigen.

Die ABA-Menge in der ABA-Fraktion der ersten Fraktionierung wurde bestimmt durch Vergleich von Rezeptorkomplex Assays mit Verdünnungsreihen der ABA-Fraktion und einer ABA-Standardkurve (Abb. 58).



**Abb. 58 Bestimmung der ABA-Menge in der ABA-Fraktion durch Abgleich mit ABA-Standardkurve**

Die Kurven der Verdünnungsreihen von Versuch 2 (gelb) und Versuch 3 (blau) wurden mit einer ABA-Standardkurve (rot) übereinandergelegt. Die Proteinphosphatase ABI2 wurde mit RCAR8 im Verhältnis 1:2 inkubiert und anschließend mit ABA bzw. der Verdünnung der jeweiligen Fraktion versetzt. Als 100% wurde die Phosphatase-Aktivität mit RCAR und ohne ABA angenommen.

Die Kurven der Verdünnungsreihen der ABA-Fractionen und des ABA-Standards wurden übereinander gelegt, um die ABA-Konzentration in der ABA-Fraktion zu ermitteln (Abb. 58). Die Daten wurden von den Versuchen 2 und 3 entnommen. Die ABA-Menge der ABA-Fraktion von Versuch 2 war 6,4 nmol. Für Versuch 3 konnte eine ABA-Menge von 32,5 nmol ermittelt werden. Die theoretisch bestimmte ABA-Menge der Versuche wurde mit der theoretischen Bindekapazität der Säulen der Affinitätschromatografie abgeglichen. Die theoretische Bindekapazität für Versuch 2 war 40 nmol und für Versuch 3 75 nmol. Das entspricht bei Versuch 2 einer Auslastung der Bindekapazität von 16% und bei Versuch 3 von 43%, was im bisher beobachteten Bereich von durchschnittlich 30% der Säulenbindekapazitäten liegt.

Ausgehend von der mit den Bioassays errechneten ABA-Menge in der ABA-Fraktion der ersten Fraktionierung wurde für Versuch 3 exemplarisch die mögliche ABA-Kontamination nach der ersten Fraktionierung berechnet (Tab. 11)

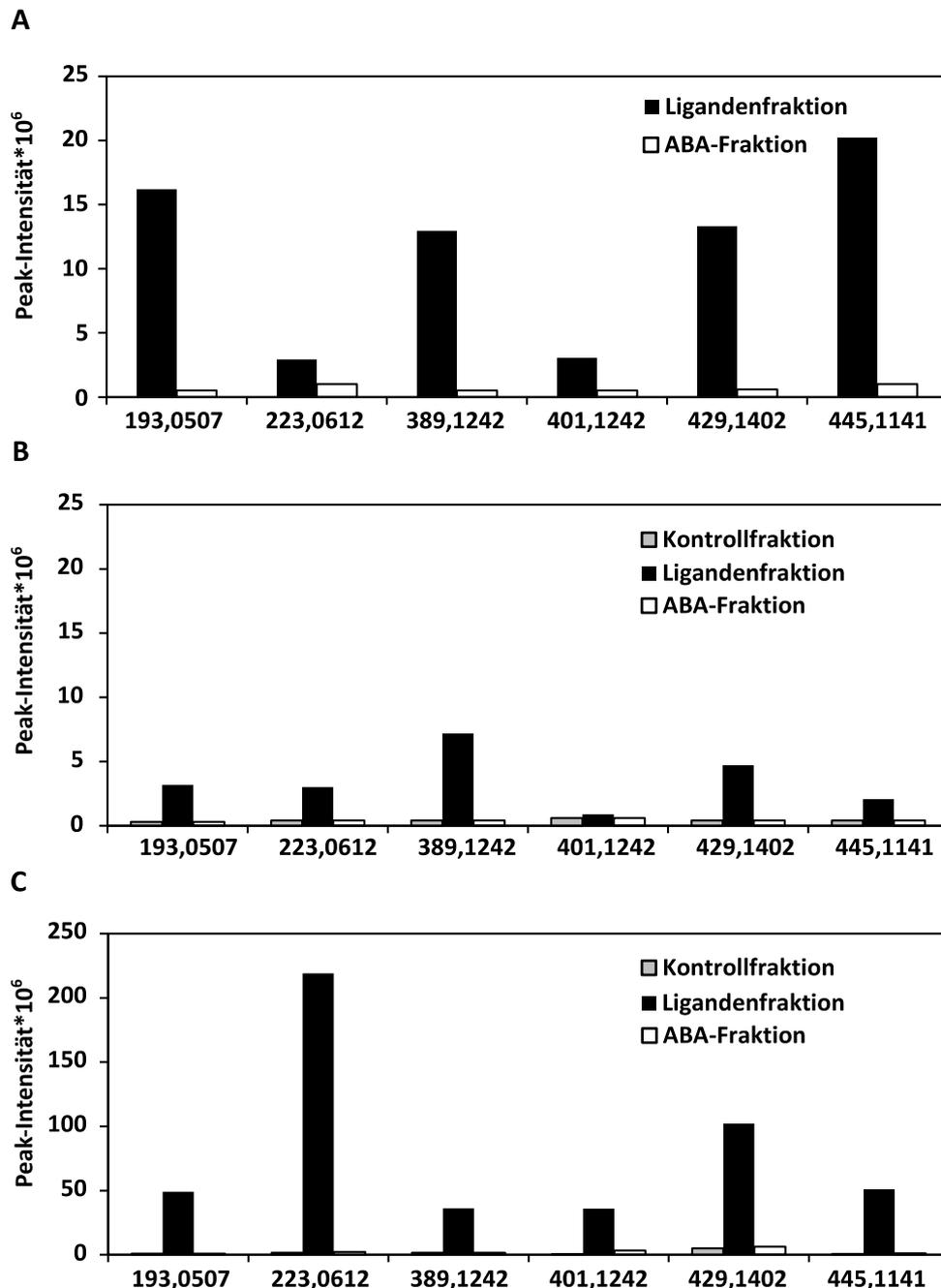
**Tab. 11** Berechnung der ABA-Kontamination für Versuch 3

	MS-ABA-Signal	ABA [ $\mu$ M] *0,2 ml	ABA-Gesamtmenge [nmol]	ABA-Gehalte Relation [%]
<b>ABA-Fraktion (1. Fraktionierung)</b>	$2,5 \cdot 10^8$	162,5	32,5	100
<b>Ligandenfraktion (1. Fraktionierung)</b>	$>2 \cdot 10^6$	1,3	0,26	0,8

Es wurde ein Abreicherungsfaktor zwischen ABA-Fraktion und Ligandenfraktion von 125 ausgehend von den MS-Signalen angenommen. Die Berechnung der ABA-Kontamination zeigt, dass nach der ersten Fraktionierung theoretisch noch regulatorisch aktive Mengen von ABA (0,26 nmol) in der Ligandenfraktion vorhanden sein könnten (Tab. 11). Basierend auf diesen Betrachtungen wurde die Ligandenfraktion nochmals fraktioniert, um die möglichen ABA-Rückstände zu verdünnen. Da diese Fraktionierung identisch zu der ersten war und kein ABA-Signal in der Ligandenfraktion der zweiten Fraktionierung detektierbar war, wurde erneut der selbe Abreicherungsfaktor von 125 angenommen. Hieraus ergab sich eine mögliche ABA-Kontamination von 0,002 nmol in der Ligandenfraktion der zweiten Fraktionierung. Von den 200  $\mu$ l Ligandenfraktion wurden maximal 20  $\mu$ l in den Rezeptorkomplex-Assays mit 200  $\mu$ l Ansätzen gemessen. Daraus ergab sich eine nochmalige Verdünnung um den Faktor 10, womit die maximal mögliche ABA-Kontamination in den Rezeptorkomplex-Assays etwa 0,2 pmol war. In den Rezeptorkomplex-Assays mit ABI2 und RCAR8 war eine ABA-Menge von 5 pmol für eine halbmaximale Inhibierung notwendig. Eine mögliche ABA-Kontamination von 0,2 pmol reicht daher nicht aus, um die in Versuch 3 beobachtete Inhibierung von 65% zu erklären.

### 2.4.3. Vergleichende Analyse auf mögliche alternative Liganden in der Ligandenfraktion

Es sollte ermittelt werden, ob andere Liganden für die in 2.4.2. beobachtete Regulierung der PP2C ABI2 durch die Ligandenfraktion und RCAR8 in Frage kommen. Dazu wurden die Kontrollfraktion, die Ligandenfraktion und die ABA-Fraktion der zweiten Fraktionierung miteinander verglichen. Es wurden solche Massen gesucht, die in der Ligandenfraktion gegenüber den beiden Kontrollfraktionen in den drei Versuchswiederholungen mindestens um den Faktor 2 angereichert waren (Abb. 59).



**Abb. 59** Mögliche alternative Liganden in der Ligandenfraktion

Die Proben (gelöst in 200 µl 70% Methanol) wurden mit 100 Scans im negativen Modus gemessen. Dargestellt sind Daten von drei Versuchswiederholungen (A-C) mit Einzelmessungen.

Die vergleichende Analyse von Kontrollfraktion, Ligandenfraktion und ABA-Fraktion ergab, dass sechs Massen spezifisch in der Ligandenfraktion gegenüber den anderen Fraktionen angereichert waren (Abb. 59). Auffällig sind die Schwankungen der Signalintensitäten der Massen in den verschiedenen Versuchswiederholungen, die zwischen durchschnittlich  $5 \cdot 10^6$  und  $5 \cdot 10^7$  schwankten. Dies könnte darauf beruhen, dass die zugrunde liegende Affinitätschromatografie unterschiedlich effizient war. Ausgehend von den Peak-Intensitäten der Massen wurde der Faktor der Anreicherung gegenüber der Kontrollfraktion und der ABA-Fraktion berechnet (Tab. 12).

**Tab. 12** Anreicherung möglicher Liganden in der Ligandenfraktion gegenüber Kontrollfraktion und ABA-Fraktion

Masse (M-H)	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	ABA-Fraktion	Kontrollfraktion	ABA-Fraktion	Kontrollfraktion	ABA-Fraktion	Kontrollfraktion
193,0507	32	11	11	49	49	49
223,0612	3	7	7	147	103	103
389,1242	26	18	18	24	24	24
401,1242	6	2	2	90	11	11
429,1402	22	12	12	21	16	16
445,1141	20	5	5	85	42	42

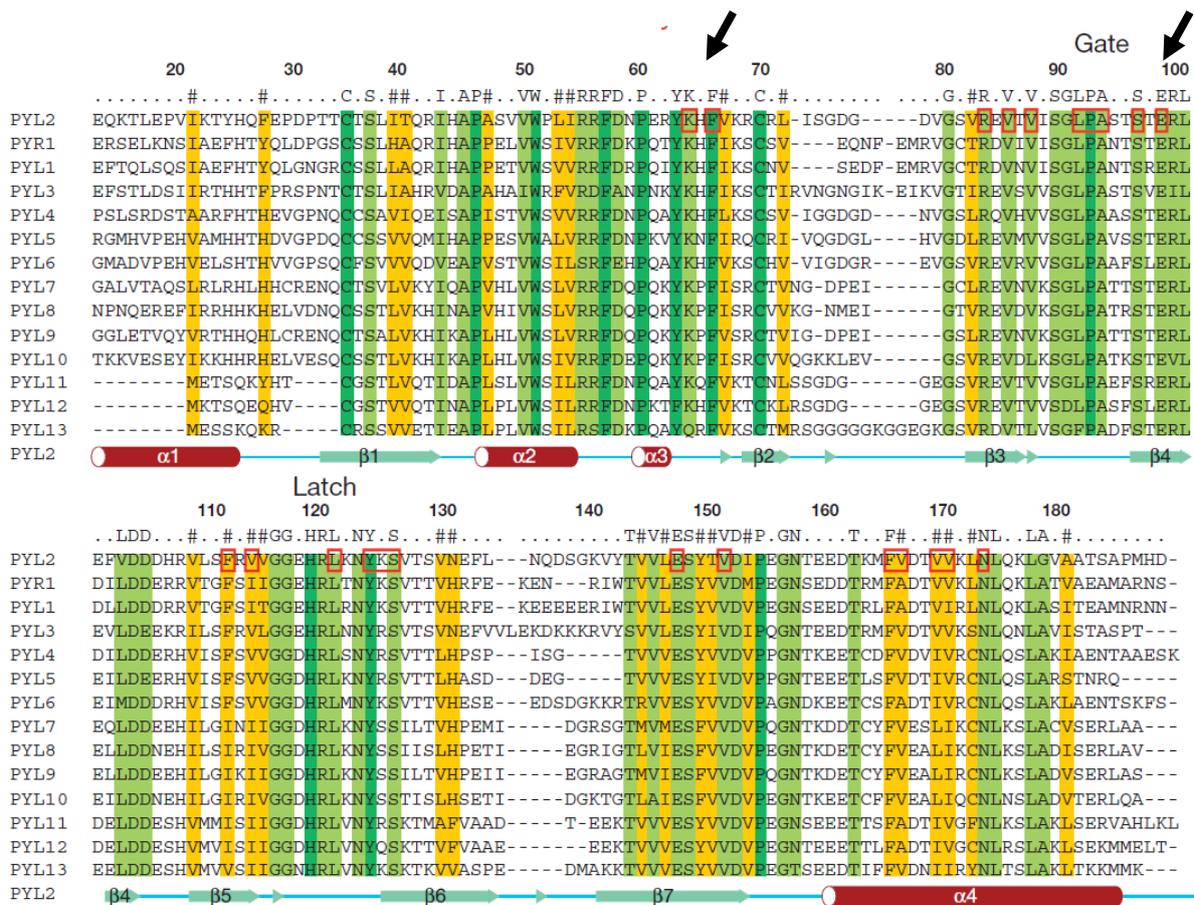
Bei der Berechnung der in Tab. 12 zusammengestellten Anreicherungsfaktoren ist zu beachten, dass weder in der Kontrollfraktion noch in der ABA-Fraktion Signale der erwähnten Massen gemessen werden konnten. Die Faktoren wurden daher basierend auf dem Signalhintergrund im jeweiligen Massenbereich errechnet, womit die angegebenen Faktoren als Mindestwerte zu verstehen sind. Wird eine Mindestanreicherung um den Faktor zehn als Filter für die Massen angelegt, so verbleiben die Massen 193,0507, 389,1242 und 429,1402 als mögliche alternative Liganden in der Ligandenfraktion.

### 2.5. Site directed mutagenesis von RCAR8

Ob die beobachtete Regulation der PP2C ABI2 durch Bindung des Liganden L298 in der Bindetasche von RCAR8 verursacht wurde, wurde durch eine *site directed back to back* Mutagenese von konservierten Aminosäuren des RCAR-Bindezentrums untersucht. Es wurde das Protokoll von NEB auf der Internetseite: <http://nebasechanger.neb.com/> verwendet. Ziel der Mutagenese war es, eine RCAR8-Variante zu erzeugen, die keine Liganden mehr binden konnte. Hierfür sollten Aminosäuren ausgewählt werden, die eine Bedeutung für die ABA-Bindung haben könnten. Dazu wurden die Sequenzen der RCARs miteinander verglichen, um festzustellen, welche Aminosäurereste in der Bindetasche konserviert sind und in unmittelbarer Nähe zum Liganden ABA liegen (Abb. 60). Ausgehend von dieser Betrachtung wurden zwei Aminosäuren ausgewählt, bei welchen es sich um

## Ergebnisse

Lysin an der Position 87 und Serin an der Position 120 in der Aminosäuresequenz handelte. Das Lysin befindet sich am Eingang der Bindetasche und das erwähnte Serin befindet sich direkt in der Bindetasche an der Kontaktfläche von ABA. Durch Mutation des Lysins zu Leucin sollte ein Verschließen der Bindetasche erzielt werden. Das Serin wurde zu Alanin, Tryptophan bzw. Phenylalanin mutiert. Durch die Substitution von Serin zu Alanin sollte überprüft werden, ob der Aminosäure-Austausch die Raumstruktur der Proteins und damit dessen Funktion beeinflusst. Die Mutation des Serins zu Phenylalanin und Tryptophan sollte die Bindetasche so verkleinern, dass kein Ligand mehr binden kann.



**Abb. 60 Aminosäure Alignment der RCARs**

Die Abbildung aus der Veröffentlichung von Melcher *et al.* 2009 zeigt ein *Alignment* der Aminosäuresequenzen der 14 RCARs (PYR/PYLs). Die konservierten Aminosäuren sind farbig unterlegt. Aminosäuren, die weniger als 5 Angström von dem Liganden in der Bindetasche entfernt sind wurden in roten Boxen eingefasst. Die beiden in RCAR8 modifizierten Aminosäuren K87 und S120 wurden mit schwarzen Pfeilen markiert. Im unteren Bereich der Sequenzen befindet sich die Struktur von RCAR14 (PYL2) als Referenz.

### 2.5.1. Phosphatase-Assays mit RCAR8 Mutanten

Die durch *site directed mutagenesis* erzeugten RCAR8 Mutanten wurden in Phosphatase-Assays auf Regulierung der PP2Cs mit ABA überprüft. Ziel war es Mutanten zu erzeugen, die keine Liganden mehr binden konnten. Somit sollte in Phosphatase-Assays keine Regulierung der Proteinphosphatase ABI1

durch die RCAR8-Varianten und ABA feststellbar sein. Zunächst wurden die RCAR8 Mutanten mit His<sub>6</sub>-tags heterolog exprimiert und über Nickel-Chelat-Säulen isoliert. Die Proteinausbeuten aus der Expression der Mutanten bewegten sich zwischen 1-5 mg Protein je Liter TB-Medium (Tab. 13).

Tab. 13 Proteinausbeuten aus der Expression der RCAR8 Mutanten

Protein	Medium	Proteinausbeute [mg/l Medium]	Proteinkonzentration [µg/µl]
RCAR8 K87L	TB	1	0,1
RCAR8 S120A	TB	2,5	0,2
RCAR8 S120W	TB	5	2,0
RCAR8 S120F	TB	1	0,1

Ob die RCAR8-Mutanten eine ABA-vermittelte Inhibition der Proteinphosphatase zeigten wurde in einem Vorversuch analysiert (Abb. 61). Hierfür wurde die Regulation von ABI1 mit den verschiedenen RCAR8-Mutanten und ABA durch Punktmessungen untersucht.

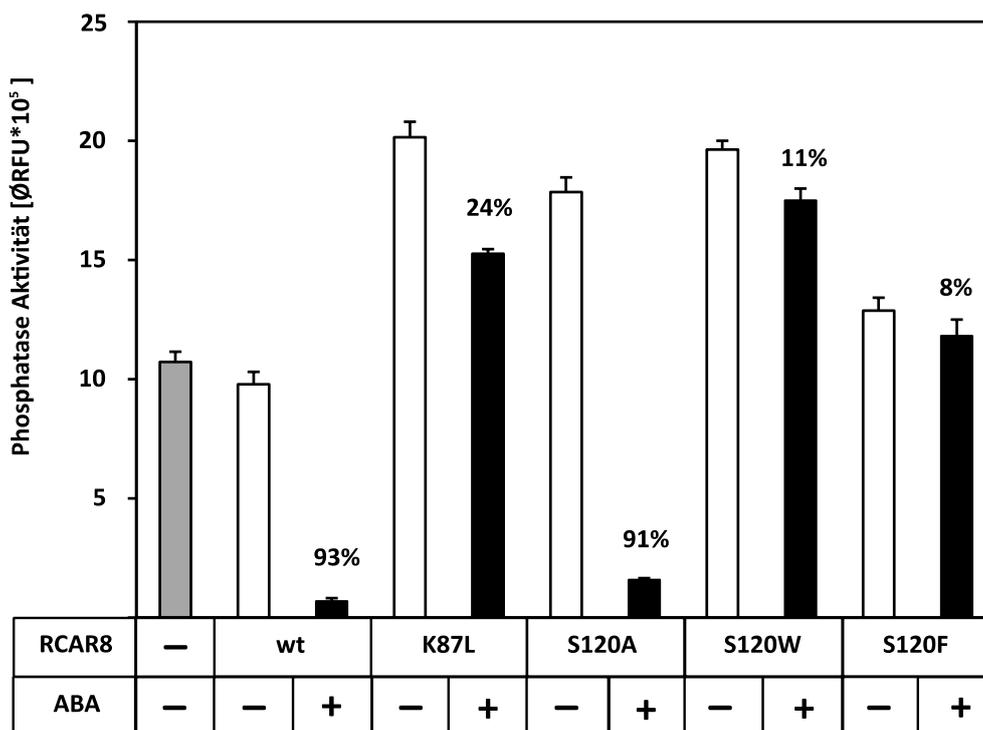


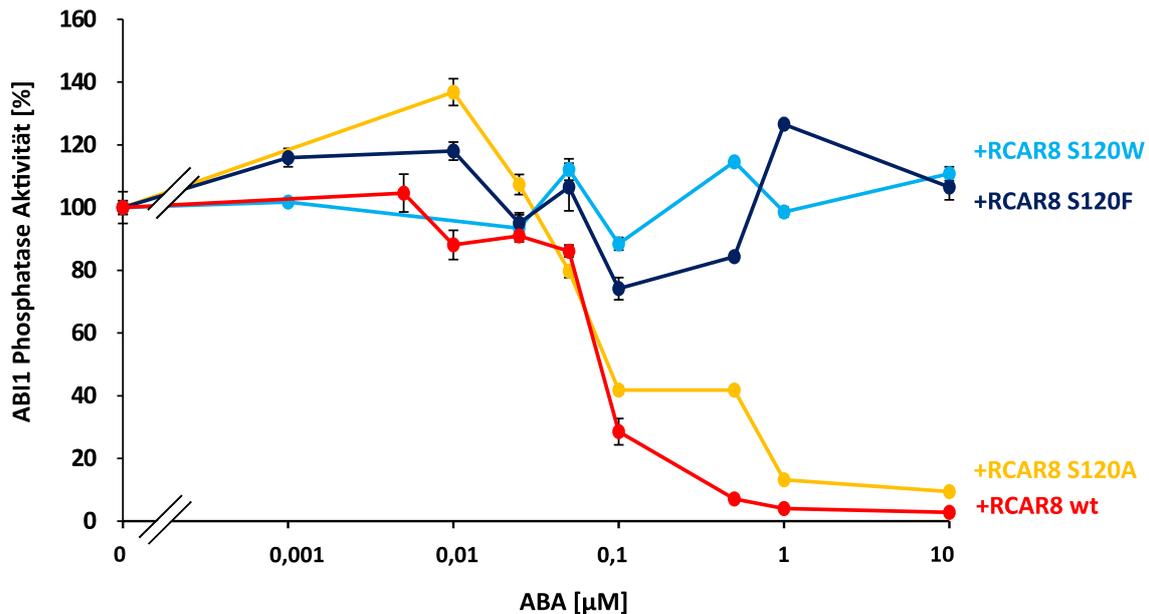
Abb. 61 Voruntersuchung mit RCAR8 Mutanten auf Regulierung der Phosphatase ABI1 mit ABA

Für den Versuch wurde 1 µg der Phosphatase ABI1 (grau) mit verschiedenen Varianten von RCAR8 im molaren Verhältnis 1:2 mit (schwarz) und ohne 10 µM ABA (weiß) in einem 200 µl Ansatz inkubiert. Bei RCAR8 wt handelt es sich um die natürliche Variante. RCAR8 K87L, S120A, S120W und S120F sind die RCAR8 Mutanten. Zusätzlich wurde die Hemmung der Phosphatase in % im Vergleich zur Probe mit RCAR ohne ABA abgebildet. Dargestellt sind Daten eines Versuches mit SD aus drei technischen Replikaten pro Probe.

Die Voruntersuchung der RCAR8-Varianten ergab, dass die RCAR8-Mutante S120A eine vergleichbare Regulierung von ABI1 mit ABA zeigte wie Wildtyp RCAR8 (Abb. 61). Bei beiden wurde eine Inhibierung der Proteinphosphatase-Aktivität von etwa 90% festgestellt. Bei dem Wildtyp RCAR8 war bei einer ABA-Konzentration von 10 µM noch eine Restaktivität von 70 000Ø RFU zu vermerken und bei der

Variante S120A eine Restaktivität von 160 000 $\emptyset$  RFU, was auf eine Kontamination der Proben mit *E. coli* Phosphatasen zurückzuführen war. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Variante S120A noch in der Lage war ABA zu binden. Die anderen Mutanten K87L, S120W und S120F zeigten keine Hemmung der PP2C mit ABA.

Um diese Resultate zu bestätigen, wurden in einem weiteren Versuch ABA-Standardreihen mit den RCAR8-Varianten RCAR8 wt, RCAR8 S120A, RCAR8 S120W und RCAR8 S120F gemessen (Abb. 62).



**Abb. 62 ABA-Standardreihen mit RCAR8 wt und RCAR8 Mutanten**

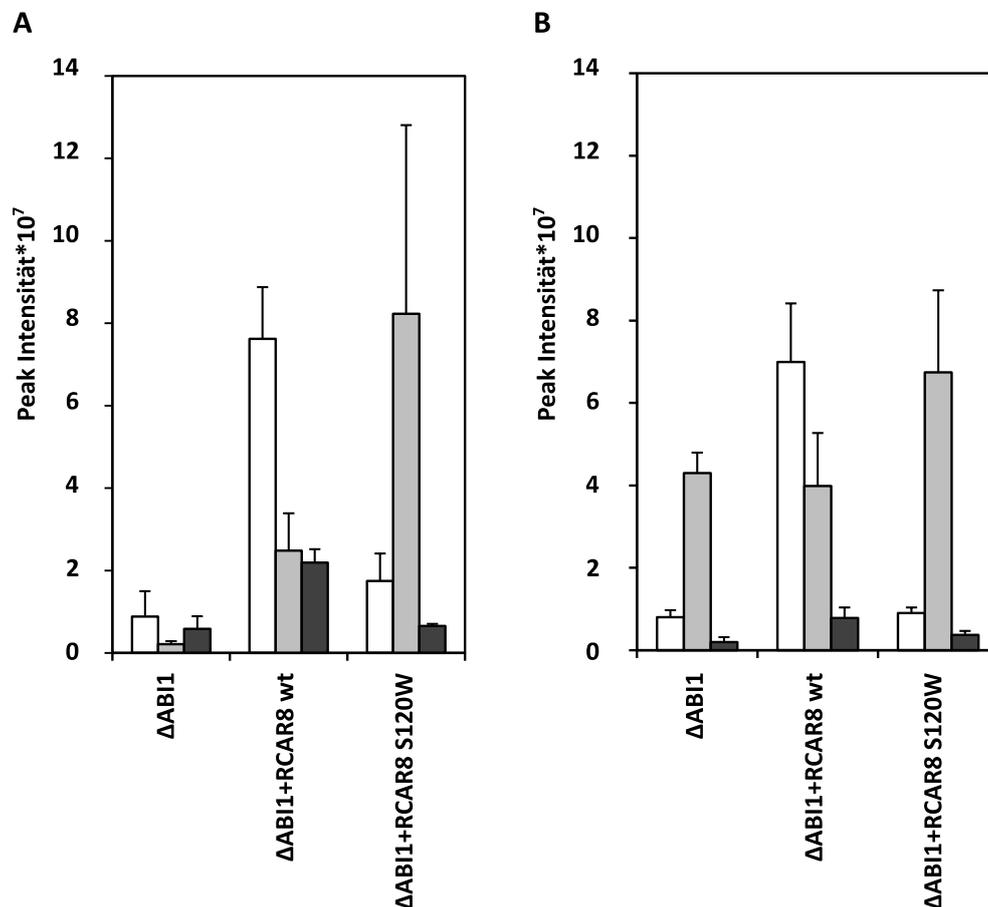
Je 1 µg der Phosphatase ABI1 wurde mit RCAR8 Wildtyp (rot) und den RCAR8-Mutanten S120A (gelb), S120W und S120F im molaren Verhältnis 1:2 inkubiert und steigenden ABA-Konzentrationen ausgesetzt. Die Phosphatase-Aktivität (%) wurde gegen die ABA-Konzentration (µM) aufgetragen. Die X-Achse ist logarithmisch skaliert. Als 100% wurde die Aktivität der Phosphatase mit dem jeweiligen RCAR ohne ABA angenommen. Die Ausgangsaktivitäten waren für ABI1 mit RCAR8 wt 200 nkatal/mg, für ABI1 mit RCAR8 S120A 195 nkatal/mg, für ABI1 mit RCAR8 S120W etwa 86 nkatal/mg und für ABI1 mit RCAR8 S120F etwa 123 nkatal/mg. Die Messung erfolgte bei 460 nm mit drei technischen Replikaten.

Die Messung der ABA-Standardreihen mit ABI1 und den RCAR8-Varianten (Abb. 62) bestätigte die Ergebnisse des Vorversuchs. Es zeigte sich, dass RCAR8 Wildtyp und RCAR8 S120A die Proteinphosphatase mit ABA in etwa gleich regulierten. Dagegen war bei den Varianten RCAR8 S120W und RCAR8 S120F keine ABA-abhängige Hemmung von ABI1 zu beobachten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese RCAR8-Varianten keine ABA binden.

### 2.5.2. MS-Analyse mit RCAR8 Mutante S120W

Um zu ermitteln, ob das mutierte Protein RCAR8 S120W tatsächlich keine Bindung von ABA und den Liganden L298 und L385 mehr zeigt, wurde erneut ein Experiment, das auf Affinitätschromatografie (siehe 2.1.) basierte, durchgeführt. Die RCAR8 Variante S120W wurde gewählt, da von diesem Protein

die höchste Ausbeute erzielt wurde (siehe Tab.12). Die Säulen mit den gekoppelten Proteinen bzw. Proteinkomplexen wurden mit Zellextrakt aus 20 g Wirsing (FW) inkubiert, gewaschen und eluiert. Die Eluate wurden über 100 mg C18-Säulen entsalzt, getrocknet, in 200  $\mu$ l 70% Methanol aufgenommen und durch FT-MS Analyse untersucht (Abb. 63).



**Abb. 63 FT-MS-Analyse von  $\Delta$ ABI1,  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W Komplex**

In den Versuchen wurden Eluate aus einer Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1 Kontrolle,  $\Delta$ ABI1+RCAR8 wt und  $\Delta$ ABI1+RCAR8 S120W und Zellextrakt aus 20 g Wirsing (FW) untersucht. Die Proben wurden in 200  $\mu$ l 70% Methanol eluiert. Von jeder Probe wurden 70  $\mu$ l manuell in die FT-MS injiziert und mit 500 Scans im negativen Modus erfasst. Aufgetragen wurde die Signal Intensität von ABA (weiß), Ligand L298 (hellgrau) und L385 (dunkelgrau) für die Proben  $\Delta$ ABI1 Kontrolle,  $\Delta$ ABI1+RCAR8 wt und  $\Delta$ ABI1+RCAR8 S120W Mutante. Dargestellt sind Daten aus zwei Versuchen und vier technischen Replikaten je Gruppe (A, B) mit SD.

ABA wurde bei zwei Versuchswiederholungen in dem Rezeptorkomplex  $\Delta$ ABI1+RCAR8 wt im Vergleich zur Kontrolle angereichert. Bei dem Komplex mit der RCAR8 Mutante S120W war das ABA-Signal auf dem Niveau der Kontrolle und somit wurde keine ABA spezifisch an den Komplex aus  $\Delta$ ABI1 und RCAR8 S120W gebunden (Abb. 63 A, B).

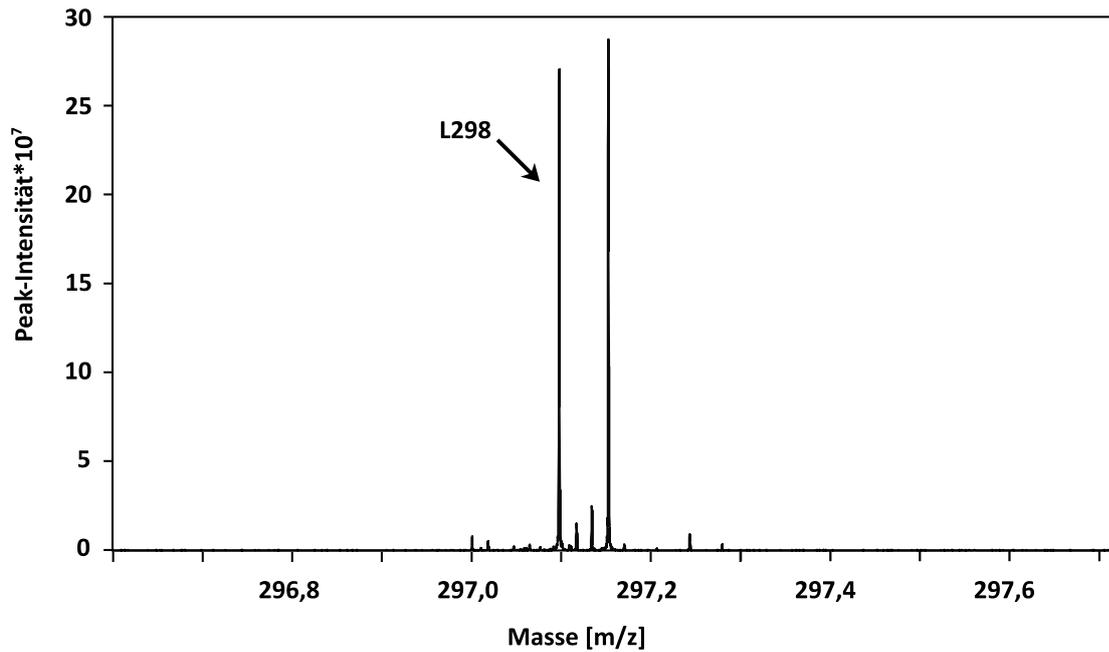
Die Ergebnisse für den Liganden L298 waren nicht eindeutig. Betrachtet man die Daten der ersten Wiederholung (Abb. 63, A) ist eine Anreicherung des Liganden im  $\Delta$ ABI1+RCAR8 wt Komplex gegenüber der Kontrolle zu sehen. Im Vergleich von  $\Delta$ ABI1/RCAR8 wt Komplex und  $\Delta$ ABI1+RCAR8 S120W Komplex sah man eine Anreicherung des Liganden. In der zweiten Wiederholung (Abb. 63, B) war kein

Unterschied zwischen  $\Delta$ ABI1+RCAR8 wt Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1-Kontrolle zu beobachten. Bei Vergleich von  $\Delta$ ABI1+RCAR8 wt Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1+RCAR8 S120W Komplex ist jedoch eine Anreicherung des Liganden sichtbar.

Für den Liganden L385 lässt sich ein ähnliches Verhalten wie bei ABA feststellen. Es war eine Anreicherung des Ligandensignals in dem Komplex mit Wildtyp RCAR8 gegenüber der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle zu beobachten. Jedoch war bei der Probe mit dem Komplex aus  $\Delta$ ABI1 und RCAR8 S120W ein Abfall des Signals auf das Niveau der Kontrolle zu sehen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine spezifische Bindung des Liganden L385 an die RCAR8 Mutante S120W stattfand. Es empfiehlt sich aufgrund der Resultate für den Liganden L298 den Versuch mit der RCAR8 Mutante S120W noch mindestens zweimal zu wiederholen, um statistisch belastbare Ergebnisse zu erhalten.

### 2.6. Fragmentierung des potentiellen Liganden L298

Um die Aufschluss über die strukturelle Zusammensetzung der potentiellen Liganden der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe zu erhalten, wurde eine Fragmentierung des Liganden L298 in einer MS/MS-Analyse in der FT-MS vorgenommen. Dabei wurde die interessante Masse zunächst durch Verwendung eines Quadropols selektiert, isoliert und akkumuliert (Abb. 64). Zur Erzeugung einer hohen kinetischen Energie wurden die isolierten Ionen durch Anlegen eines elektrischen Feldes beschleunigt und mit Argon beschossen, um die Fragmentierung einzuleiten. Dieser Vorgang wird als kollisionsinduzierte Dissoziation bezeichnet (Laskin und Futrell 2005). Als Probe wurde fraktionierter Extrakt von der Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex in 100  $\mu$ l 70% Methanol verwendet.

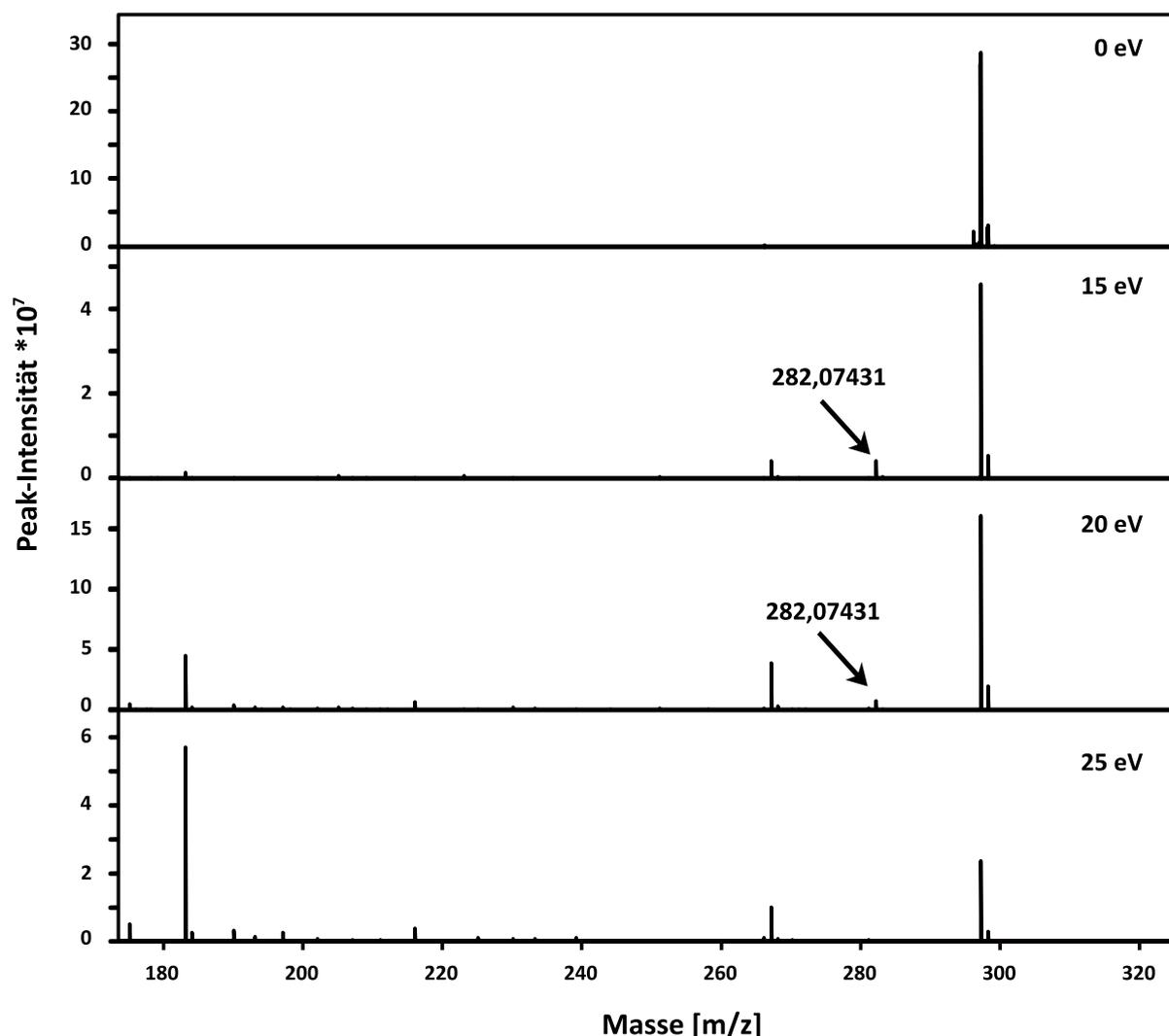


**Abb. 64 Isolierung des Liganden L298 in der FT-MS**

Der Ligand L298 (schwarzer Pfeil) wurde in dem Massenbereich 297,0-298,0 isoliert. Die Ionenakkumulationszeit betrug etwa zehn Millisekunden. Das Spektrum wurde bei 25 Scans im negativen Modus erfasst.

Der Ligand L298 wurde für die anschließende Fragmentierung in einem nominalen Massenbereich von 297,0-298,0 isoliert (Abb. 64). Dabei wurde festgestellt, dass im selben Massenbereich neben L298 ein zweites Signal mit vergleichbarer Signalintensität vorhanden war, was bei der späteren Fragmentierung unter Umständen Störsignale liefern könnte.

Für die Fragmentierung müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. Zum einen sollte die zu fragmentierende Masse ein starkes Signal von mindestens etwa  $1 \cdot 10^8$  aufweisen und zum anderen sollte sie die stärkste Masse in dem gewählten Massenbereich sein. Es ist erkennbar, dass das Ligandensignal mit  $2 \cdot 10^8$  ausreichend stark ist, jedoch nicht das stärkste Signal im Massenbereich 297,0-298,0 ist. Unter Berücksichtigung dieser Umstände wurde die Fragmentierung fortgeführt.



**Abb. 65 Fragmentierung des Liganden L298 in FT-MS**

Der Ligand L298 wurde nach einer Akkumulationszeit von zehn Millisekunden mit einer steigenden kinetischen Energie von 15, 20 und 25 eV fragmentiert. Die Erfassung der Fragmentierung erfolgte mit 25 Scans im negativen Modus. Der mit 0 eV markierte Teil der Grafik zeigt die Ionen vor der Fragmentierung. Ein zu L298 gehöriges Fragment wurde mit der entsprechenden Masse markiert (schwarzer Pfeil).

Die Fragmentierung des Liganden L298 konnte erfolgreich durchgeführt werden, dabei wurde ein Fragment mit der Masse 282,07431 erfasst (Abb. 65). Es traten noch zwei weitere starke Signale auf, welche dem in Abb. 64 gezeigten Störsignal zugeordnet wurden. Ausgehend von der Masse des Fragments wurden Summenformeln unter Verwendung der Internetseite <http://www.chemcalc.org/> berechnet (Tab. 14).

**Tab. 14** Fragmentierung des Liganden L298

	Masse	Prädiktive Summenformeln	Abweichung [ppm]
Ligand L298	297,09775	$C_{14}H_{17}O_7$	1,084
		$C_{13}H_{11}N_7O_2$	1,102
Fragment von L298	282,07431	$C_{13}H_{14}O_7$	1,164
		$C_{12}H_8N_7O_2$	1,266
Abgangsgruppe von L298	15,02344	$CH_3$	2,336

Durch die Fragmentierung des Liganden konnte eine Methylgruppe als Abgangsgruppe identifiziert werden. Die hohen Abweichungen resultierten daraus, dass die Spektren aufgrund eines Mangels an Referenzsignalen nicht kalibriert werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass die Struktur des Liganden L298 eine Methylgruppe enthält. Diese Information könnte bei der Annotierung des Liganden durch Datenbankrecherche ein wichtiges Ausschlusskriterium für vorgeschlagene Strukturen darstellen.

### 3. Diskussion

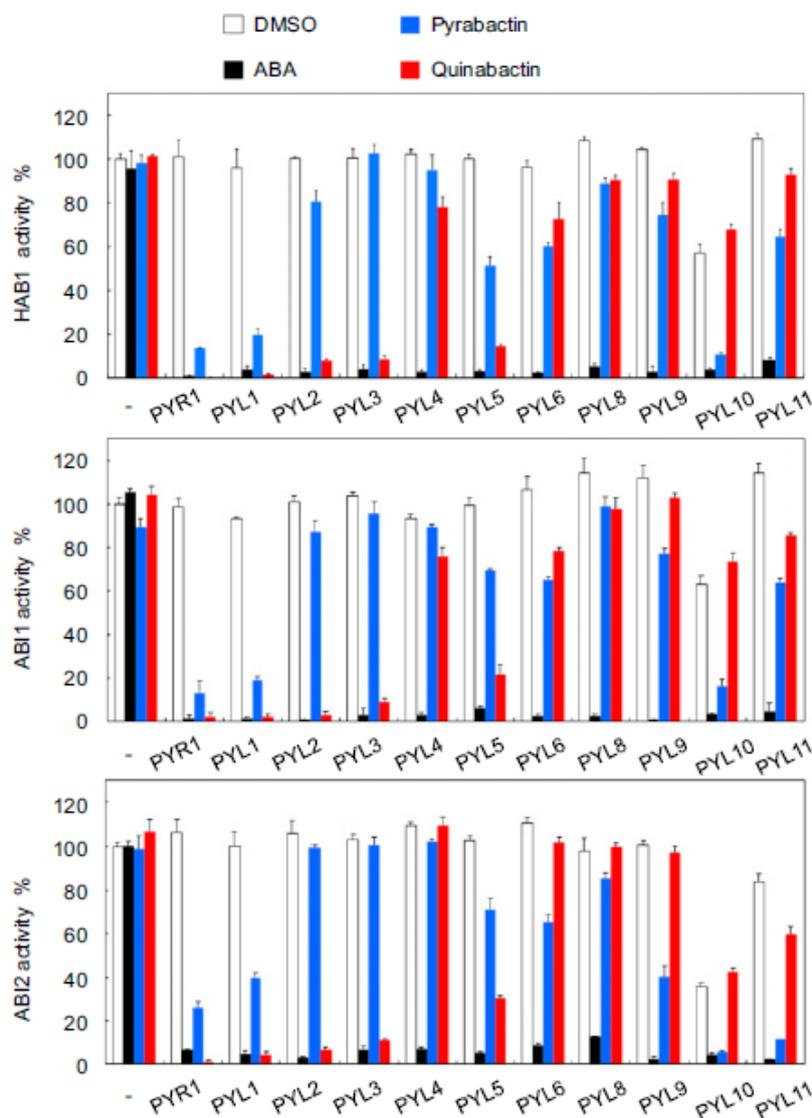
Biomasse und Ertrag von Nutzpflanzen werden erheblich durch biotische und abiotische Stressfaktoren beeinflusst (Atkinson *et al.* 2012). Insbesondere Trockenstress bei Nutzpflanzen verursacht durch den Klimawandel ist in den letzten Jahren in den Fokus der Öffentlichkeit gerückt (Ciais *et al.* 2005). Da Abscisinsäure als ein bedeutender Regulator der abiotischen Stresstoleranz unter anderem den Wasserhaushalt der Pflanze steuert, wurde in der Vergangenheit intensiv an dem Abscisinsäure Signalweg geforscht (Cutler *et al.* 2010). Die Entdeckung der Abscisinsäure-Rezeptoren RCAR/PYR/PYL und deren Interaktion mit PP2Cs im Jahr 2009 (Ma *et al.* 2009, Park *et al.* 2009) stellte einen entscheidenden Durchbruch in der Trockenstressforschung dar. Es stellte sich nun die Frage wie der Rezeptorkomplex reguliert wird. Die RCARs gehören zur BetV1-like Superfamilie (Radauer *et al.* 2008) welche dafür bekannt ist, dass deren Vertreter mehr als einen spezifischen Liganden binden können. Somit lag die Vermutung nahe, dass RCARs auch andere Liganden als ABA binden könnten. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung mehrerer synthetischer Liganden wie Pyrabactin (Zhao *et al.* 2007, Park *et al.* 2009, Peterson *et al.* 2010) und AM2/Quinabactin (Cao *et al.* 2013, Okamoto *et al.* 2013) unterstützt. Die synthetischen Liganden weisen eine grundlegend andere Struktur auf als ABA, was für eine Flexibilität in Bezug auf Ligandenspezifität der Bindetasche der RCARs spricht. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein System für die Isolation von möglichen Liganden des RCAR/PP2C Rezeptorkomplexes erstellt.

#### 3.1. System zur Isolation von Liganden des RCAR/PP2C Rezeptorkomplexes

Zur Isolierung von RCAR/PP2C Rezeptorkomplex spezifischen Liganden wurde ein System basierend auf Affinitätschromatografie in Kombination mit Massenspektrometrie Analyse entwickelt. Daten von Lagercrantz *et al.* 1979, Tateno *et al.* 2007 und Dixon *et al.* 2010 legen nahe, dass Affinitätschromatografie gekoppelt mit analytischen Nachweismethoden ein vielversprechender Ansatz für die Isolierung von spezifischen Liganden ist. Lagercrantz *et al.* gelang die Anreicherung von verschiedenen Fettsäuren über Affinitätschromatografie mit immobilisiertem *Bovine Serum Albumin* (BSA). Tateno *et al.* zeigten die Ligandenspezifität von immobilisierten Lektinen für verschiedene Glycane und Dixon *et al.* konnten zeigen, dass Glutathion-S-Transferasen eine unterschiedliche Spezifität für Flavonole hatten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine *Ligand Fishing* Methode basierend auf Affinitätschromatografie in Kombination mit MS-Analyse für die Identifikation von spezifisch angereicherten Metaboliten geeignet ist.

Für die Etablierung des *Ligand Fishing* Systems mit RCAR/PP2C Rezeptorkomplexen wurde ABA als bereits bekannter Ligand (Maet. *al* 2009, Park *et al.* 2009) in einem Rekonstruktionsexperiment verwendet. Der Entwicklung des Systems lagen mehrere grundlegende Betrachtungen zugrunde.

Derzeitig sind neun PP2Cs (Fuchs *et al.* 2013) und 14 RCARs (Raghavendra *et al.* 2010) bekannt, d.h. es könnten theoretisch 126 verschiedene RCAR/PP2C Kombinationen auf Ligandenspezifität und -anreicherung getestet werden. Jedoch stellt sich, die Frage, ob dies notwendig ist und ob die PP2Cs einen Einfluss auf die Ligandenspezifität der Rezeptorkomplexe haben. Daten von Okamoto *et al.* 2013 (Abb. 66) weisen darauf hin, dass PP2Cs offenbar nur einen geringen Einfluss auf die Ligandenspezifität der Rezeptorkomplexe haben.



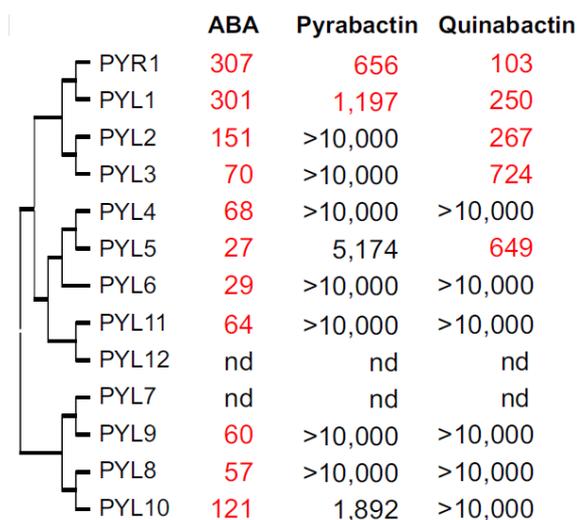
**Abb. 66 Inhibierung von drei PP2Cs mit elf RCARs und ABA, Pyrabactin und Quinabactin**

Die Abbildung aus Okamoto *et al.* 2013 zeigt die Inhibierung von HAB1, ABI1 und ABI2 mit elf RCARs (PYR/PYL) und 10  $\mu$ M der Liganden ABA, Pyrabactin und Quinabactin. Für die Phosphatase-Assays wurden 50 nM je Phosphatase eingesetzt und 100 nM je RCAR. Als Kontrolle wurden die Ansätze mit 10  $\mu$ M DMSO inkubiert.

## Diskussion

Die Daten in Abb. 66 zeigen, dass die untersuchten Proteinphosphatasen wenig Einfluss auf die Effizienz der Regulation durch RCARs mit den Liganden ABA, Pyrabactin und Quinabactin haben. Eine Ausnahme bilden die RCARs 4 und 5 (PYL10 und PYL11), diese zeigen eine Phosphatase-spezifische Hemmung für die Liganden Pyrabactin und Quinabactin. Es ist außerdem anzumerken, dass die RCARs 2, 6 und 7 nicht in diesem Versuch untersucht wurden und daher keine Aussage über den Einfluss der Phosphatasen auf die Bindungsaffinität der Liganden ABA, Pyrabactin und Quinabactin getroffen wurde. Die Erkenntnisse von Okamoto *et al.* weisen darauf hin, dass die Bindung der Liganden an die Rezeptorkomplexe primär von den RCARs und der Beschaffenheit ihrer Bindungszentren abhängig ist. Daher wurde bei der Etablierung des Systems ausschließlich die verkürzte Proteinphosphatase  $\Delta$ ABI1 (125-429) verwendet (Miyazono *et al.* 2009), welche sich mit Ausbeuten um 1,5 mg je Liter Medium aufreinigen ließ.

In einer weiteren Annahme wurde davon ausgegangen, dass die RCARs Liganden unterschiedlich diskriminieren. Hinweise darauf finden sich bei Untersuchungen von Okamoto *et al.* 2013 (Abb. 67).



**Abb. 67 Unterschiedliche Affinität von RCARs für die Liganden ABA, Pyrabactin und Quinabactin**

Die Abbildung aus Okamoto *et al.* 2013 zeigt eine Zusammenstellung von  $IC_{50}$ -Werten in nM bzw. in  $\mu$ M (bei Werten mit Dezimalstellen) für ABA, Pyrabactin und Quinabactin aus Phosphatase-Assays mit HAB1 und 11 RCARs. Die Werte wurden rot markiert, wenn 10  $\mu$ M der jeweils angebotenen Substanz mit dem jeweiligen RCAR mehr als 80% Hemmung der Phosphatase bewirkten.

Okamoto *et al.* konnten nachweisen, dass abhängig von dem jeweiligen RCAR (PYR/PYL) eine unterschiedliche Regulation durch die Liganden ABA, Pyrabactin und Quinabactin stattfand (Abb. 67). Zum Beispiel ist der  $IC_{50}$ -Wert für ABA mit RCAR8 (PYL5) 27 nM und bei RCAR11 (PYR1) mit 307 nM etwa um das 10-fache höher, was für RCAR11 eine schwächere Regulation durch ABA bedeutet. Es konnte zudem festgestellt werden, dass die RCARs sich selektiv gegenüber den angebotenen Liganden verhielten. Beispielsweise kann mit PYL4 (RCAR10) und ABA eine Regulation von HAB1 beobachtet werden, nicht aber mit Pyrabactin oder Quinabactin. Weitere Hinweise für eine unterschiedliche Ligandenspezifität der RCARs finden sich bei Benson *et al.* 2015, wo 13 RCARs mit verschiedenen ABA-

Analoga in Assays auf Regulation der Proteinphosphatase ABI2 getestet wurden. Auch hier zeigte sich eine unterschiedliche Selektivität der RCARs für verschiedene ABA-Analoga.

Die Ursache für die unterschiedliche Affinität der Rezeptorkomplexe für verschiedene Liganden könnte in der Beschaffenheit der Bindetasche liegen. Diese These konnten Yuan *et al.* 2010 unterstützen, indem sie nachwiesen, dass die unterschiedliche Spezifität von RCAR12 (PYL1) und RCAR13 (PYL2) für Pyrabactin auf einem einzigen Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Valin in der Bindetasche beruhte. In einem anderen Beispiel gelang es Park *et al.* 2015 die Bindetasche von RCAR11 so zu modifizieren, dass statt ABA, das Pflanzenschutzmittel Mandipropamid gebunden wurde. Es liegt also nahe, dass die verschiedenen RCARs durch die unterschiedliche Beschaffenheit ihrer Bindetasche Liganden unterschiedlich binden könnten.

Es können alle 14 Vertreter der RCARs aufgereinigt werden (Fuchs *et al.* 2014, Benson *et al.* 2015). In dieser Arbeit wurden die zwei Vertreter RCAR8 und RCAR11 aufgrund ihrer guten Expression und Aufreinigung im Milligramm Bereich für die Etablierung des Systems verwendet. Um ein möglichst vollständiges Bild über die Ligandenspezifitäten der RCARs zu erhalten, wäre es grundsätzlich wünschenswert auch die anderen Vertreter dieser Proteinfamilie mit der *Ligand Fishing* Methode zu untersuchen.

Das *Ligand Fishing* System für die Isolierung von Liganden konnte mit ABA erfolgreich etabliert werden. In der vergleichenden Analyse von Rezeptorkomplex-Proben war eine Anreicherung von ABA mit durchschnittlich etwa 1,5 nmol gegenüber der Kontrolle  $\Delta$ ABI1 ohne RCAR mit durchschnittlich 0,3 nmol festzustellen.  $\Delta$ ABI1 diente als Kontrolle, da die Proteinphosphatase nicht als Rezeptor in dem Rezeptorkomplex fungiert (Melcher *et al.* 2009) und daher keine ABA binden sollte, was sich durch mehrere Versuche bestätigen ließ. Die Wiederfindungsrate von ABA in Proben der Kontrolle lag zwischen 95-100% wohingegen in den Komplex Proben zwischen 85-95% der eingesetzten ABA nach Elution der ABA vom Trägermaterial wieder gefunden werden konnten. Dies war darauf zurückzuführen, dass noch Rest-ABA in dem Komplex gebunden war und nicht vollständig eluiert wurde. Ausgehend von diesem Rekonstruktionsexperiment wurde postuliert, dass das *Ligand Fishing* System in dem gegebenen Versuchsaufbau grundsätzlich funktional war.

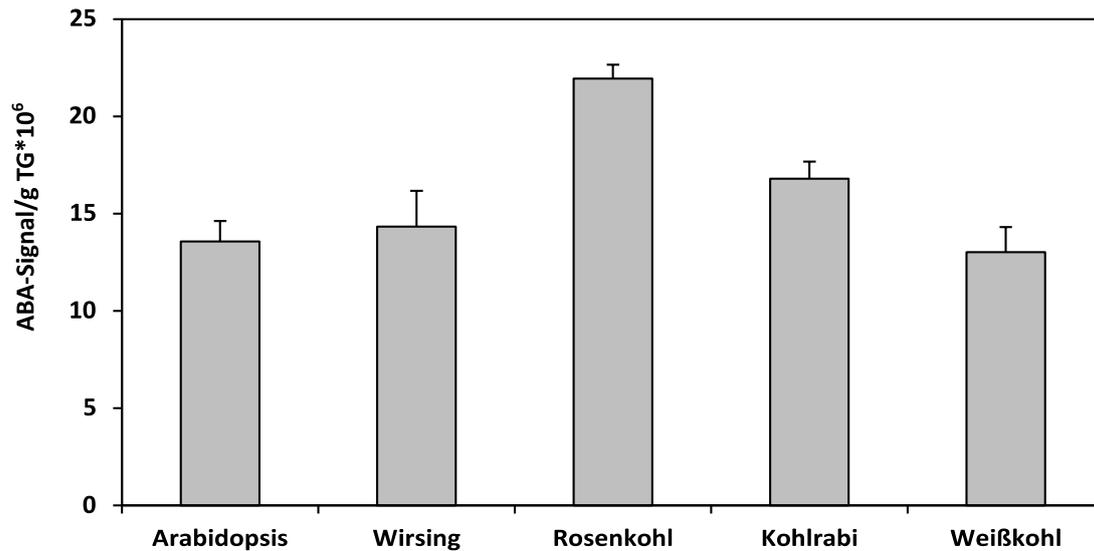
Die etablierte *Ligand Fishing* Methode wurde mit Zellextrakt anstelle von ABA-Reinsubstanz durchgeführt, um das Ligandenanreicherungssystem zu validieren. Da neben dem bereits bekannten Liganden ABA, nach bisher unbekanntem Liganden gesucht wurde, war seitens der Analyse eine hohe Sensitivität und Auflösung erforderlich, um möglichst viele Molekülsignale zu erfassen. Deshalb wurden die Proben mit FT-MS analysiert, welche aktuell die sensitivste Analyse mit der höchsten Auflösung ermöglicht (Marshall *et al.* 1998, Marshall *et al.* 2008). Zudem ist es, aufgrund der hohen

## Diskussion

---

Auflösung und Massengenauigkeit der FT-MS, möglich ausgehend von den Massensignalen Summenformeln zu berechnen (Marshall *et al.* 2008, Dunn *et al.* 2013).

Bei der Anwendung des *Ligand Fishing* Systems mit Zellextrakt von Arabidopsis Wildtyp Columbia konnte eine Anreicherung von ABA in den Rezeptorkomplex-Proben gegenüber der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle um den Faktor zehn festgestellt werden. Das System war demnach auch mit Zellextrakt funktional. Es stellte sich heraus, dass für die Durchführung der Versuche ein sehr hoher Bedarf an Pflanzenmaterial bestand, welcher durch Arabidopsis nicht ausreichend abgedeckt werden konnte. Daher wurde nach Alternativen als Lieferanten für Pflanzenmaterial gesucht. Es wurden Zellextrakte anderer Vertreter der *Brassicaceen*, vor allem Kohlpflanzen analysiert, da diese eine ähnliche Zusammensetzung des Metaboloms, wie Arabidopsis aufweisen sollten. Diese Annahme wurde durch Erkenntnisse aus der Chemotaxonomie gestützt, wo gezeigt wurde, dass Pflanzen einer Pflanzenfamilie mit ähnlichen genetischen Aufbau auch ein ähnliches Metabolom aufweisen (Paterson *et al.* 2001; Town *et al.* 2006). Arabidopsis wird als Modellorganismus für *Brassicaceen* verwendet, da sich gewonnene Erkenntnisse auch auf andere Pflanzen dieser Familie übertragen lassen (Haberer *et al.* 2006). Jedoch ist auch darauf hinzuweisen, dass Pflanzen der selben Familie oder Art durchaus größere Unterschiede im Metabolom aufweisen können, wie Untersuchungen von Cook *et al.* 2004 mit verschiedenen Arabidopsis Ökotypen zeigen. Die Vergleichsstudie mit Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.), Wirsing (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda* L.), Rosenkohl (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.), Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba* L.) zeigte, dass andere *Brassicaceen* mit mehr Biomasse wie z.B. Wirsing als Quelle für Zellextrakt in Frage kamen. Parallel dazu wurde überprüft, ob das Frischgewicht einen Einfluss auf die Signalstärke von ABA hatte. Der Wassergehalt in den untersuchten Pflanzen variierte abhängig von Erntezeitpunkt oder der Lagerung. Die Bestimmung des Trockengewichtes ergab einen Trockengewichtsanteil zwischen 12-20% bei den untersuchten Pflanzen (Abb. 68).



**Abb. 68 ABA-Signal in Bezug auf Trockengewicht**

Die Peak-Intensitäten von ABA je Gramm (g) Trockengewicht (TG) wurden für verschiedene *Brassicaceae* aufgetragen. Die Erfassung der Daten erfolgte mit 500 Scans im negativen Modus. Dargestellt sind Daten aus vier biologischen Replikaten mit je drei technischen Wiederholungen je Pflanze.

Die untersuchten *Brassicaceae* zeigten in etwa das gleiche Verhältnis zwischen ABA-Signal und Trockengewicht. Einzig bei Rosenkohl war das relative ABA-Signal um etwa den Faktor 1,5 höher verglichen mit den anderen Pflanzen. Somit konnte nach dieser Studie davon ausgegangen werden, dass das Trockengewicht keinen wesentlichen Einfluss auf das relative ABA-Signal hatte. Wegen der guten Verfügbarkeit von großen Mengen Pflanzenmaterial wurde Wirsing als Quelle für Zellextrakt verwendet. Versuche mit Wirsing Zellextrakt zeigten eine signifikante Anreicherung von ABA in den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex-Proben gegenüber der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle, welche sich zwischen dem Faktor 10 bis 40 bewegte. Somit war sichergestellt, dass das *Ligand Fishing* System auch mit Zellextrakt aus Wirsing funktionierte.

### 3.2. Potentielle Liganden der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe

Nach Validierung des Systems auf Anreicherung des Rezeptorkomplex-Liganden ABA wurden potentielle Liganden der RCAR/PP2C-Rezeptorkomplexe durch vergleichende Analyse der Datensätze aus der FT-MS-Analyse mit PCA (*Principal Component Analysis*) und dem Programm HCE (*Hierarchical Clustering Explorer*) identifiziert. Sowohl bei PCA-Analyse, als auch bei der HCE-Analyse muss beachtet werden, dass die Daten vor der Analyse normalisiert werden müssen. Die Ursache dafür liegt, darin dass Schwankungen der Gesamtintensitäten der Spektren falsch-positive Ergebnisse liefern könnten. Solche Schwankungen der Gesamtintensitäten können z.B. durch Unregelmäßigkeiten bei der manuellen Injektion oder der Präparation der Proben verursacht werden (Callister *et al.* 2006; Katajamaa und Orešič 2007).

Eine PCA ist sinnvoll, wenn mehrere Unterschiede zwischen gewählten Versuchsklassen erwartet werden, dabei wird jeder Probe basierend auf ihren Unterschieden zu den anderen Proben ein Wert zugeordnet, welcher später in Relation zu den anderen Proben gesetzt wird. Die Analyse funktioniert nur bei Mehrfachunterschieden, nicht aber bei Einzelunterschieden, da sonst die durch die PCA zugeordneten Werte zu gering sind, um in dem ausgegebenen Diagramm Unterschiede zu zeigen (Abdi *et al.* 2010). Kritisch ist außerdem die Varianz innerhalb der einzelnen Versuchsklassen, welche, wenn sie zu hoch ist, Unterschiede zwischen den Versuchsklassen überdecken kann (Wise *et al.* 1999). Unter Berücksichtigung der erwähnten Einflussfaktoren konnten mit der PCA globale Unterschiede zwischen den Versuchsklassen Zellextrakt,  $\Delta$ ABI1 Kontrolle, Leersäule Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex festgestellt werden. Es zeigte sich, dass die Proben des Zellextraktes getrennt von denen der anderen Versuchsklassen clusterten, was auf Unterschiede in der Abundanz der untersuchten Massensignale hindeutete. Ausgehend von diesen Resultaten wurde postuliert, dass das beobachtete Verhalten der Proben in der Clusteranalyse für eine hohe Effizienz der Waschschritte sprach, da es andernfalls zu Überlappungen zwischen den Versuchsklassen mit der Zellextraktklasse gekommen wäre. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Versuchsklassen Leersäule,  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex in dem Diagramm zusammen clusterten, was auf eine ähnliche Hintergrund-Matrix hinwies. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Effekte der Ionensuppression in diesen Klassen ähnlich wirkten, was eine semiquantitativ vergleichende Analyse der Klassen untereinander ermöglichte. Bei einer PCA mit den drei Versuchsklassen Leersäule,  $\Delta$ ABI1 Kontrolle und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex konnte festgestellt werden, dass die Proben des Rezeptorkomplexes separat von den Kontrollen clusterten. Es bestanden demnach generelle Unterschiede zwischen der Rezeptorkomplex-Klasse und den beiden Kontrollklassen. Zudem clusterten die Kontrollklassen nicht getrennt voneinander, das heißt, weder das verwendete Säulenmaterial, noch die  $\Delta$ ABI1 Kontrolle zeigten eine spezifische Bindung von Liganden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine vergleichende Analyse zur Ermittlung von angereicherten Massen in dem Rezeptorkomplex mit dem Programm HCE vorgenommen.

Das Programm HCE ermöglicht ähnlich wie die PCA eine Untersuchung von Unterschieden zwischen verschiedenen Versuchsklassen. Dabei wird vorher ein Faktor (hier die Signalintensität) als Vergleichsparameter festgelegt (Jinwook Seo und Shneiderman 2002). Im Gegensatz zur PCA ermöglicht das Programm nicht nur eine globale Analyse der Proben, sondern zeigt zudem für welche Faktoren der Vergleichsparameter die vorgegebenen Bedingungen des Vergleichs erfüllt. In diesem Fall wurde nach Massen gesucht, die eine niedrige Signalstärke in den Kontrollen aufwiesen und eine hohe in den Proben mit RCAR/PP2C Rezeptorkomplexen, was auch als „*low to high*“ Vergleich bezeichnet wird. Das Programm gab eine Liste mit Massen aus, welche die vorgegebenen Bedingungen erfüllten (Tab. 15).

Die in Tab. 15 dargestellte Liste enthält Massen, die unter Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopen von 1% (Kind und Fiehn 2007) eingegrenzt wurden. Abschließend wurde die Massenliste mit Massenlisten des verwendeten Zellextraktes verglichen. Basierend darauf konnten zwei bisher nicht bekannte Massen identifiziert werden, die aus dem Pflanzenzellextrakt stammten und in den Rezeptorkomplexen  $\Delta\text{ABI1}/\text{RCAR8}$  und  $\Delta\text{ABI1}/\text{RCAR11}$  angereichert waren. Dabei handelte es sich um den potentiellen Liganden L298 mit der Masse (M-H) 297,0979 und L385 (M-H) 384,2027. Die nicht im Pflanzenzellextrakt nachgewiesenen Massen stammten aus dem *E.coli* Hintergrund der gereinigten Proteine.

**Tab. 15** Liste von Liganden der RCAR8/RCAR11-Rezeptorkomplexe mit prädiktiven Summenformeln  
\*cut-off der Summenformeln bei 0,5 ppm

Masse M-H	$^{13}\text{C}$ -Isotop Masse	Summenformel (M+H)	ppm Abweichung	Angereichert in Komplex	$\emptyset$ Anreicherung	Quelle
219,13904	220,1462395	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2$	0,063	RCAR8	64	Pflanze
				RCAR11	40	
263,12889 (ABA)	264,1322480	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$	0,037	RCAR8	77	Pflanze
				RCAR11	41	
285,11083	286,1141933	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_2\text{P}$	0,07	RCAR8	29	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{P}$	0,089	RCAR11	63	
297,09797	298,101325	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_7\text{O}_2$	0,006	RCAR8	12	Pflanze
		$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_7$	0,023	RCAR11	3	
		$\text{C}_9\text{H}_{23}\text{N}_4\text{OPS}_2$	0,523			
321,08748	322,090835	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$	0,157	RCAR8	220	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NP}_2\text{S}$	0,196	RCAR11	207	
		$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_7\text{O}_3\text{P}_2$	0,373			
323,08458	324,087935	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{P}_2$	0,044	RCAR8	77	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{OS}$	0,155	RCAR11	72	
		$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{PS}_3$	0,332			
		$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_9$	0,395			
374,29121	375,294568	$\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{NO}_5$	0,041	RCAR8	10	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_8$	0,056			
376,25272	377,256075	$\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{NO}_4\text{S}$	0,044	RCAR8	26	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{17}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{OP}_2$	0,228			
379,04613	380,049488	$\text{C}_{27}\text{H}_{10}\text{NS}$	0,037	RCAR11	44	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_9\text{S}_3$	0,051			
		$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_3$	0,065			
		$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_2\text{P}_2\text{S}_2$	0,115			
		$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_8\text{O}_3\text{P}$	0,299			
		$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_8\text{P}$	0,313			
		$\text{C}_5\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2$	0,414			
		$\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_8$	0,504			
381,04319	382,046545	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$	0,024	RCAR8	29	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_9\text{O}_3\text{S}_2$	0,037	RCAR11	29	
		$\text{C}_{26}\text{H}_8\text{NO}_3$	0,125			
		$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}_2\text{S}$	0,204			
		$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{S}_3$	0,444			
384,20274	385,206095	$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}_2$	0,081	RCAR8	17	Pflanze
		$\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{NO}_7$	0,094	RCAR11	32	
		$\text{C}_{14}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{OPS}_2$	0,355			
388,30689	389,310243	$\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{NO}_5$	0,104	RCAR8	29	<i>E.coli</i>
		$\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}_8$	0,118			
400,25270	401,256058	$\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_4\text{S}$	0,001	RCAR8	19	<i>E.coli</i>

## Diskussion

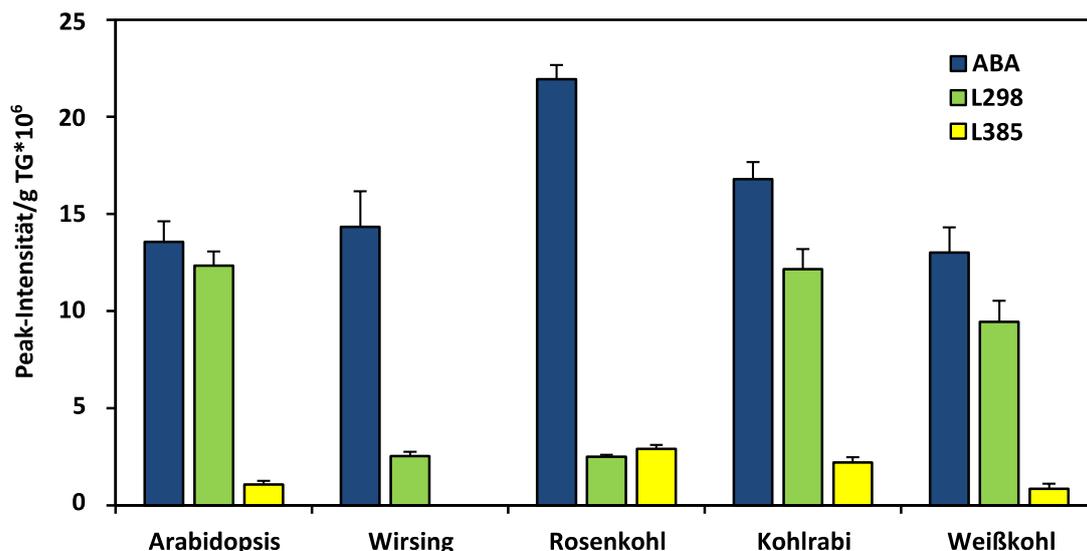
		C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>P</sub> <sub>2</sub>	0,172			
		C <sub>13</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	0,455			
402,26838	403,271735	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	0,066	RCAR8	27	
		C <sub>19</sub> H <sub>41</sub> N <sub>4</sub> O <sub>P</sub> <sub>2</sub>	0,238			<i>E.coli</i>
404,28406	405,287413	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	0,134	RCAR8	9	
		C <sub>19</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>P</sub> <sub>2</sub>	0,305			<i>E.coli</i>
421,22660	422,229955	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub> S	0,123	RCAR8	13	
		C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> S	0,134			
		C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub>	0,287			<i>E.coli</i>
437,00487	438,008225	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P <sub>3</sub> S	0,096	RCAR11	24	
		C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> PS	0,164			
		C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>	0,243			
		C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>8</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub>	0,323			
		C <sub>22</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	0,467			<i>E.coli</i>
439,00180	440,005155	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	0,094	RCAR8	19	
		C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> S <sub>3</sub>	0,164			
		C <sub>21</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	0,254			
		C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> N <sub>9</sub> O <sub>2</sub> P <sub>3</sub>	0,294			
		C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub>	0,306			
		C <sub>5</sub> H <sub>16</sub> N <sub>9</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	0,322			
		C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>7</sub> P <sub>2</sub>	0,4			
		C <sub>19</sub> H <sub>6</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	0,412			
		C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> PS	0,452			<i>E.coli</i>
496,96045	497,963805	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> P <sub>3</sub> S	0,062	RCAR8	6	<i>E.coli</i>
		C <sub>24</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	0,065			
		C <sub>27</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P	0,123			
		C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> PS <sub>2</sub>	0,191			
		C <sub>22</sub> H <sub>8</sub> N <sub>6</sub> OP <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	0,204			
		C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> N <sub>7</sub> OP <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	0,42			
		C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub> P <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	0,43			
		C <sub>16</sub> H <sub>4</sub> N <sub>9</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	0,433			
		C <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>	0,501			

In der Liste wurden nur solche Summenformeln berücksichtigt, die mit einer maximalen Abweichung von 0,5 ppm zugeordnet werden konnten. Die Begründung für diese Eingrenzung liegt darin, dass die Spektren mit einer Genauigkeit von 0,05 ppm kalibriert wurden, was der Genauigkeit der Massenbestimmung entspricht. Summenformeln mit einer Abweichung größer als 0,5 ppm wurden als unwahrscheinlich eingestuft.

Interessant an der in Tab. 15 gezeigten Liste, ist, dass die aus *E.coli* stammenden möglichen Liganden mit den Massen (M-H) 374,29121, 376,25272, 402,26838, 404,28406, 421,22660, 439,00180 und 496,96045 offenbar spezifisch für den Rezeptorkomplex mit RCAR8 sind. Zudem fiel bei den vergleichenden MS-Analysen auf, dass die Anreicherung des potentiellen Liganden L298 um den Faktor 3 in dem ΔABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex relativ gering ausfiel, was auf eine geringere Bindung des möglichen Liganden an diesen Komplex hindeutete. Jedoch zeigen die Daten, dass sowohl ΔABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex als auch ΔABI1/RCAR11 Rezeptorkomplex den potentiellen Liganden L385 um den Faktor 10-15 anreichern. Diese Beobachtungen decken sich mit den Daten zur

Ligandenspezifität von Okamoto *et al.* 2013 und Benson *et al.* 2015, die zeigten, dass verschiedene RCARs Liganden unterschiedlich diskriminieren.

Die vergleichende FT-MS Analyse von Extrakten von Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.), Wirsing (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda* L.), Rosenkohl (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.), Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.), Weißkohl (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba* L.) ergab, dass der mögliche Ligand L298 in allen analysierten Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Abb. 69).

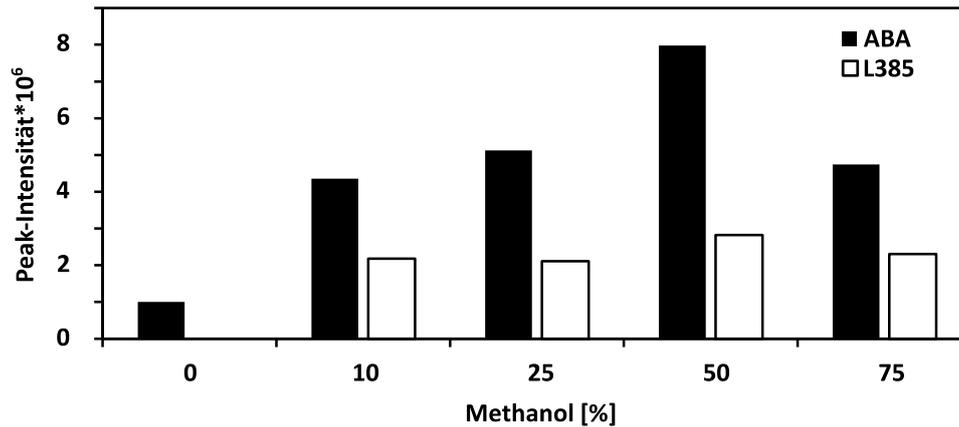


**Abb. 69 Signalintensitäten von ABA, L298 und L385 in Brassicaceen**

Die mittleren Peak-Intensitäten von ABA (blau), dem Liganden L298 (grün) und L385 (gelb) in verschiedenen Brassicaceen pro Gramm Trockengewicht (TG) wurden einander gegenüber gestellt. Die untersuchten Zellextrakte wurden aus je 20 g (FW) Pflanzenmaterial hergestellt, getrocknet und in 200 µl 70% Methanol aufgenommen. Anschließend wurden die Proben 1:10 mit 70% Methanol verdünnt und mit 500 Scans im negativen Modus gemessen. Die Daten setzen sich aus drei biologischen und drei technischen Wiederholungen mit SD je Pflanze zusammen.

Der mögliche Ligand L298 zeigte durchschnittlich etwa um den Faktor 2 geringere Intensitäten im Vergleich zu ABA (Abb. 69). Dafür kann es verschiedene Gründe geben: zum einen könnte der Ligand L298 in geringerer Menge in den Pflanzen vorkommen, zum anderen könnte der Ligand schlechter ionisieren und damit weniger starke Signale liefern, oder schlechter an den Rezeptorkomplex binden. Der potentielle Ligand L385 zeigte, verglichen mit ABA, etwa vier- bis achtfach schwächere Signale, was vermutlich durch die selben Effekte, wie bei L298 hervorgerufen wurde.

Der Ligand L385 konnte in dieser Studie in allen untersuchten Pflanzen außer Wirsing nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte in der niedrigen Signalintensität bzw. Ionensuppression bei den untersuchten Wirsing-Extrakten liegen. In Vorversuchen war der potentielle Ligand L385 in Wirsing-Zellextrakt nachweisbar (Abb.70).



**Abb.70 Potentieller Ligand L385 in Wirsing-Zellextrakt**

Dargestellt sind exemplarische Daten einer Extraktionsoptimierung mit Extrakten aus Wirsing. Es wurden 2g (FW) Pflanzenmaterial mit 20% TCA (w/v) und verschiedenen Methanolkonzentrationen extrahiert. Die getrockneten Extrakte wurden in 200 µl 70% (v/v) Methanol gelöst und mit 100 Scans im negativen Modus gemessen.

Auffällig war, dass das Signal des potentiellen L385 mit Werten um  $2 \cdot 10^6$  relativ gering war (Abb.70). Auch in der Studie mit Zellextrakten anderer *Brassicaceen* (Abb. 69) waren die gemessenen Werte vergleichbar gering.

Die beobachteten Schwankungen der Signalstärken der Liganden L298 und L385 könnten durch Ionensuppression verursacht worden sein, welche in einer Studie mit den synthetischen Substanzen 2,4 D, Sulfamerazin und Pyrabactin und mit Zellextrakt von Wirsing untersucht wurde. Es war eine deutliche Reduktion der Signale von 2,4 D, Sulfamerazin und Pyrabactin um 80-90% in dem Zellextrakt Hintergrund festzustellen. Dies ist ein Beispiel dafür wie sich die Probenzusammensetzung auf die Stärke einzelner Signale auswirken kann. Dieser Effekt wird durch die Konkurrenz der Ionen bei der Elektrospray Ionisierung verursacht. Dabei nehmen Substanzen, die leichter ionisieren die angebotene Energie schneller auf, sodass schwer ionisierbare Substanzen benachteiligt werden. Die Signale dieser Substanzen werden somit schwächer oder werden gänzlich unterdrückt. Das heißt je komplexer die stoffliche Zusammensetzung einer Probe, desto größer der Effekt der Ionensuppression (Annesley *et al.* 2003, Taylor *et al.* 2005). Die Ionensuppression kann durch Fraktionierung oder Verdünnung der zu analysierenden Proben, sowie durch Reduktion der Flussrate bei der Probeninjektion verringert werden (Jessome *et al.* 2006). Dieser Effekt muss bei der vergleichenden Analyse in der FT-MS berücksichtigt werden.

### 3.3. Sind die potentiellen Liganden L298 und L385 echte Liganden der RCAR/PP2C-Rezeptorkomplexe?

Um zu untersuchen, ob die durch vergleichende FT-MS Analyse ermittelten potentiellen Liganden tatsächlich echte Liganden der Rezeptorkomplexe mit regulatorischer Funktion sind, wurden Versuche mit zweimal fraktionierten Extrakten der Affinitätschromatografie von RCAR/PP2C Rezeptorkomplexen und mit der RCAR8-Mutanten durchgeführt.

Die Fraktionen der Affinitätschromatografie wurden in Rezeptorkomplex-Assays auf ihre Regulation untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Ligandenfraktion mit RCAR8 eine hemmende Wirkung auf die PP2C ABI2 hatte. Um ausschließen zu können, dass die beobachtete Regulation auf ABA-Kontamination zurückzuführen war, wurde zusätzlich die ABA-Fraktion der zweiten Fraktionierung untersucht, welche in den Versuchswiederholungen keine inhibierende Wirkung auf den Rezeptorkomplex in den Assays zeigte.

Zusätzlich wurde die mögliche ABA-Kontamination in der Ligandenfraktion am Beispiel eines Versuches berechnet (Tab. 11). Dabei wurde ein maximaler ABA-Rückstand von 0,2 pmol berechnet. In vorangegangenen Rezeptorkomplex-Assays konnte gezeigt werden, dass für eine halbmaximale Inhibierung der PP2C ABI2 mit RCAR8 eine ABA-Menge von 5 pmol notwendig war. Somit reicht eine ABA-Kontamination von 0,2 pmol nicht aus, um die mit der Ligandenfraktion beobachtete Inhibierung von 65% bei Versuch 3 durch ABA-Kontamination zu erklären. Jedoch ist an dieser Stelle anzumerken, dass ABA in den Ligandenfraktionen nicht oberhalb der Messgrenze von  $2 \cdot 10^6$  detektiert werden konnte. Da der Abreicherungs faktor mit dem Wert der Messuntergrenze berechnet wurde, handelt es sich bei der errechneten ABA-Kontamination um die maximal mögliche Menge.

Ein weiteres Argument, das gegen ABA-Rückstände in der Ligandenfraktion spricht, ist dass keine Inhibierung durch die ABA-Fraktion der zweiten Fraktionierung beobachtet werden konnte. Zudem konnte in dieser Fraktion kein ABA-Signal oberhalb der Messgrenze von  $2 \cdot 10^6$  detektiert werden. Somit war davon auszugehen, dass die negative Regulation der Phosphatase ABI2 mit RCAR8 und Ligandenfraktion wahrscheinlich auf einen anderen Regulator als ABA zurückging. Die als L298 bezeichnete Substanz wäre ein möglicher Kandidat, da sie in der Ligandenfraktion angereichert war, jedoch zeigte eine vergleichende Analyse der Fraktionen, dass noch weitere Substanzen als Regulatoren in Frage kommen, da sie ebenfalls in der Ligandenfraktion gegenüber den anderen Fraktionen angereichert waren (Tab. 16).

## Diskussion

**Tab. 16** Mögliche alternative Liganden in der Ligandenfraktion

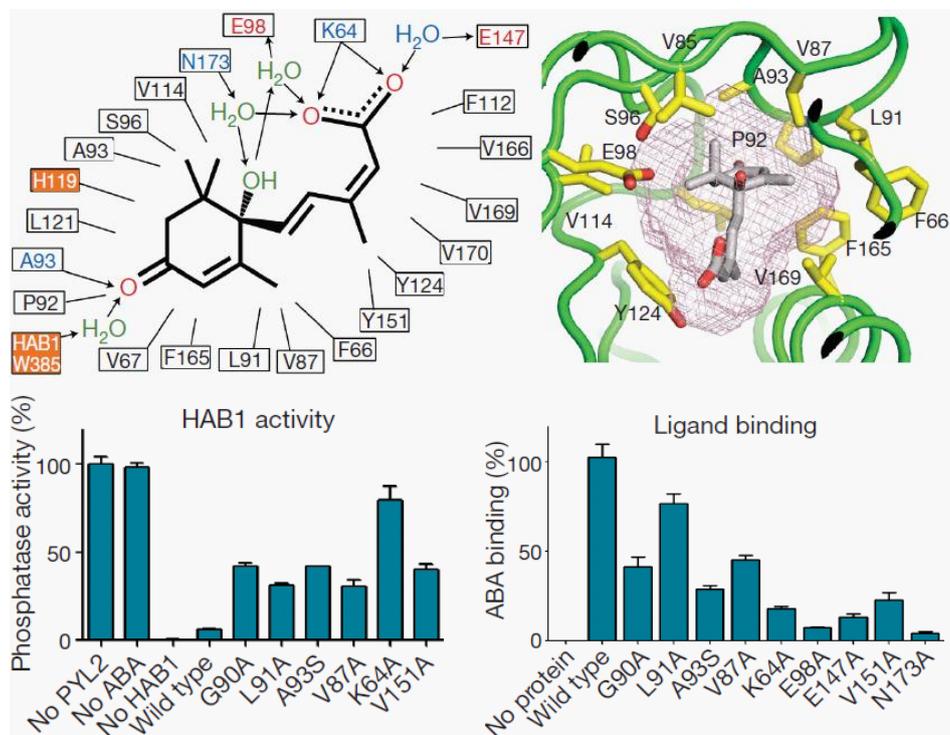
\**Cut-off* der prädiktiven Summenformeln bei 1,5 ppm

Masse (M-H)	Prädiktive Summenformeln	Abweichung [ppm]	Ø Anreicherung
<b>193,0507</b>	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	0,36	30
	C <sub>8</sub> H <sub>26</sub> N <sub>10</sub> PS <sub>3</sub>	0,089	
<b>389,1242</b>	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>9</sub> O <sub>3</sub> P <sub>2</sub>	0,151	
	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub>	0,165	
	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> PS	0,176	
	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	0,33	
	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> P <sub>2</sub> S	0,622	
	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>8</sub> P	0,634	22
	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub> P	0,647	
	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	0,801	
	C <sub>13</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>3</sub>	0,874	
	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	0,887	
	C <sub>7</sub> H <sub>24</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub> P <sub>3</sub>	0,95	
	C <sub>27</sub> H <sub>19</sub> NS	0,975	
	C <sub>11</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	1,052	
	C <sub>9</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> PS	1,129	
	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	1,421	
	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	1,446	
	<b>429,1402</b>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	0,057
C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>5</sub> P <sub>3</sub>		0,22	
C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub> P <sub>2</sub>		0,24	
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> S		0,402	
C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> P		0,484	
C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P <sub>2</sub> S		0,667	
C <sub>11</sub> H <sub>27</sub> N <sub>9</sub> O <sub>3</sub> S <sub>3</sub>		0,702	17
C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> S		0,782	
C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> OS <sub>2</sub>		0,817	
C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>		0,829	
C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> P <sub>2</sub>		0,944	
C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>		1,209	
C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> P <sub>3</sub> S		1,391	
C <sub>30</sub> H <sub>22</sub> OP		1,461	

Für die in der Ligandenfraktion gegenüber den Kontrollfraktionen angereicherten möglichen Alternativ-Liganden wurden die prädiktiven Summenformeln, sowie die durchschnittlichen Anreicherungen zusammengestellt (Tab. 16). Der *Cut-off* der Summenformeln wurde hier bei 1,5 ppm gesetzt, da die Spektren der Fraktionen aufgrund des Fehlens von Referenzpeaks nicht genau kalibriert werden konnten.

Um festzustellen, ob die Liganden ABA, sowie L298 und L385 an der selben Bindestelle von RCAR8 binden, wurden RCAR8 Mutanten erzeugt. Ziel war es durch Mutation der Aminosäuren K87 und S120 bei RCAR8 die Bindetasche so zu verändern, dass eine Ligandenbindung verhindert wird. Die erfolgreiche Anwendung dieses Vorgehens findet sich bei Melcher *et al.* 2009, die ABA-insensitive Varianten von RCAR14 (PYL2) durch Mutation der Aminosäuren K64, V87, G90, L91, A93, E98, E147,

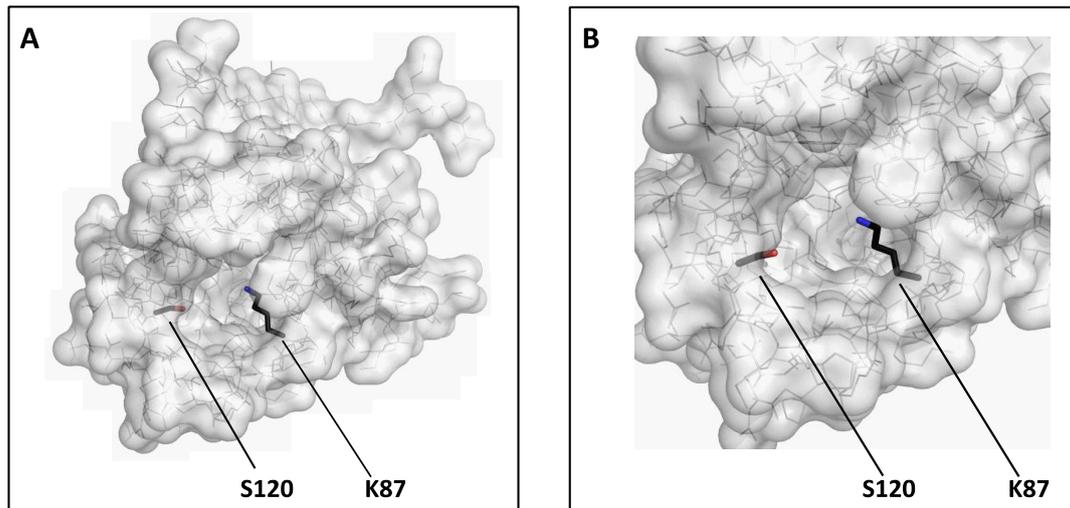
V151 und N173 im Bindezentrum generierten. Die Mutanten wurden mit Phosphatase-Assays und radioaktiv markiertem ABA in Bindungsassays untersucht (Abb. 71).



**Abb. 71 Site directed mutagenesis von RCAR14**

Die Abbildung von Melcher *et al* 2009 zeigt die Aminosäuren im Bindezentrum von RCAR14, die mit ABA in Kontakt treten (oben) und die Regulation von HAB1 durch RCAR14 Mutanten mit ABA, sowie das ABA-Bindevermögen der RCAR14 Mutanten (unten).

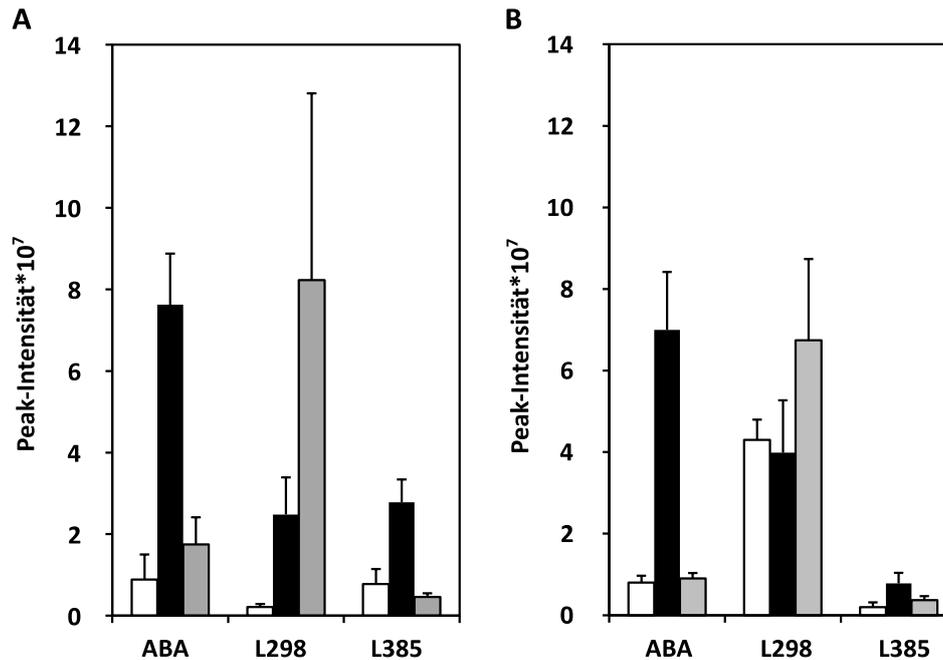
Die von Melcher *et al.* generierten RCAR14 Mutanten zeigten im Vergleich zum RCAR14 Wildtyp eine um 50-90% verminderte Inhibierung von HAB1. Zudem wurde eine verringerte ABA-Bindung, welche zwischen 5-70% (je nach Mutante) verglichen mit dem Wildtyp Protein schwankte, festgestellt (Abb. 71). Besonders hervorzuheben ist hier der Aminosäurerest K64, da dieser mit dem Aminosäurerest K87 von RCAR8 korrespondiert. In der ABA-Interaktionsstudie ist außerdem der Aminosäurerest S96, welcher mit S120 in RCAR8 gleichzusetzen ist, abgebildet (Abb. 71, oben). Diese beiden Aminosäuren wurden bei der gezielten Mutation von RCAR8 modifiziert (Abb. 72), da sie nah an ABA positioniert waren und generell in den RCARs konserviert sind (Melcher *et al.* 2009).



**Abb. 72 Site directed mutagenesis der Aminosäuren K87 und S120 in RCAR8**

Die Abbildung zeigt eine Oberflächenansicht des RCAR8 Gesamtproteins (A) und eine Nahansicht des RCAR8 Bindetasche (B). Die zu mutierenden Aminosäuren K87 und S120 sind gesondert hervorgehoben. Die Kristallstruktur wurde von Zhang *et al.* 2013 entnommen.

Die Untersuchung der RCAR8 Mutanten mittels Rezeptorkomplex-Assay ergab, dass die Varianten RCAR8 K87L und RCAR8 S120A die PP2C ABI1 in Anwesenheit von ABA um 25% bzw. 90% hemmen konnten. Diese Varianten sind daher wahrscheinlich noch in der Lage ABA zu binden und deshalb für weitere Liganden-Bindungsstudien ungeeignet. Bei den Mutanten RCAR8 S120W und RCAR8 S120F konnte keine ABA-abhängige Regulierung der Proteinphosphatase nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass diese Varianten keine ABA mehr binden konnten. Diese Annahme konnte durch vergleichende FT-MS-Analyse von  $\Delta$ ABI1,  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120W Komplex bestätigt werden (Abb. 73).



**Abb. 73 Vergleichende FT-MS-Analyse der RCAR8 Mutante S120W**

Daten der FT-MS Analyse von Proben einer Affinitätschromatografie mit  $\Delta$ ABI1 Negativkontrolle (weiß),  $\Delta$ ABI1/RCAR8 wt Rezeptorkomplex Positivkontrolle (schwarz) und  $\Delta$ ABI1/RCAR8 S120 Mutante Komplex (grau) inkubiert mit Wirsing Zellextrakt wurden zusammengestellt. Die Erfassung der Daten erfolgte mit 500 Scans im negativen Modus. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei Versuchen (A, B) mit vier technischen Replikaten pro Gruppe.

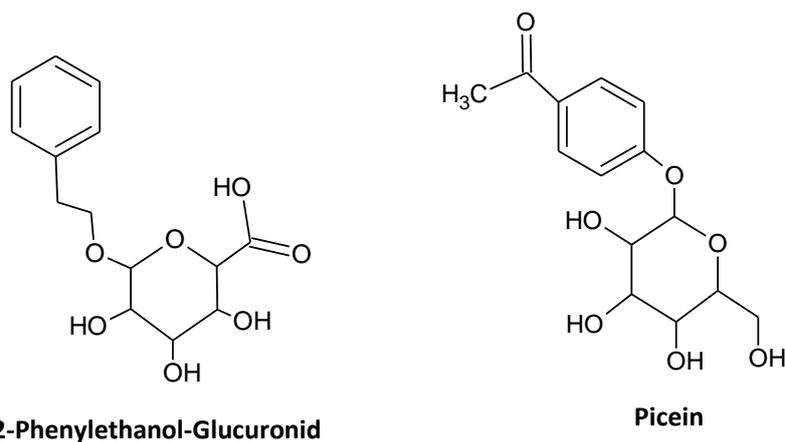
Es zeigte sich, dass das Signal von ABA in dem Komplex mit RCAR8 S120W um den Faktor 8 bzw. 4 verringert war gegenüber dem Wildtyp Komplex (Abb. 73 A, B). Damit entsprach das ABA-Signal in dem Komplex mit der Mutante in etwa dem der Negativkontrolle  $\Delta$ ABI1. Dies spricht dafür, dass ABA nicht in der Bindetasche der RCAR8 Mutante S120W gebunden werden konnte. Das Signal des potentiellen Liganden L385 war in dem Komplex mit der RCAR8 Mutante gegenüber dem Wildtyp-Komplex um den Faktor 6 bzw. 2 geringer, was ein Indiz dafür ist, dass der Ligand an der selben Bindestelle wie ABA bindet.

Bei dem Liganden L298 wurde überraschenderweise eine Anreicherung des Signals des Liganden gegenüber der Positivkontrolle mit RCAR8 Wildtyp Komplex um den Faktor 2-3 festgestellt. Das heißt, während die Mutation von RCAR8 S120W bei ABA und dem Liganden L385 die Bindung verhindert, scheint sie die Bindung von L298 zu fördern. Es bleibt zu klären, ob das unterschiedliche Bindungsverhalten der potentiellen Liganden L298 und L385 durch die Struktur des Bindezentrums von RCAR8 Wildtyp und RCAR8 S120W verursacht wurde.

Ausgehend von den Ergebnissen der Rezeptorkomplex-Assays mit den Ligandenfraktionen und den Versuchen mit der RCAR8 S120W Mutante kommen sowohl die potentiellen Liganden L298 und L385, als auch die in Tab. 16 erwähnten Substanzen als mögliche Liganden der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe in Frage.

Anhand der genauen Masse der potentiellen Liganden L298 und L385 ließen sich Summenformeln errechnen (Marshall *et al.* 2008). Für L298 ergaben sich die Summenformeln  $C_{13}H_{12}N_7O_2$  und  $C_{14}H_{18}O_7$  mit einer Genauigkeit unter 1 ppm. L385 konnten die Summenformeln  $C_{18}H_{25}N_8O_2$  und  $C_{19}H_{31}NO_7$  mit vergleichbarer Genauigkeit wie bei L298 zugeordnet werden. Unter Verwendung der Datenbanken von <http://www.chemspider.com/>, <https://metlin.scripps.edu/index.php> und <http://masstrix3.helmholtz-muenchen.de/masstrix3/> (Suhre *et al.* 2008) wurden die potentiellen Liganden annotiert und mögliche Strukturen ermittelt.

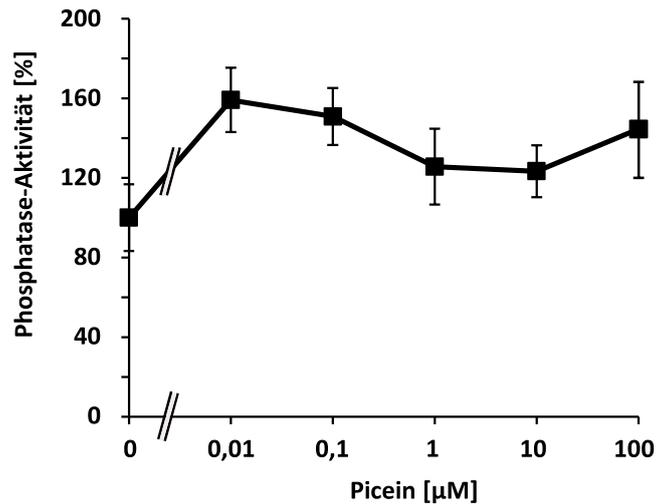
Bei L298 wurden für die Summenformel  $C_{14}H_{18}O_7$  in der Datenbank Chemspider 144 mögliche Verbindungen gefunden. Für die nähere Untersuchung wurden nur solche Verbindungen berücksichtigt, die einem pflanzlichen Hintergrund zugeordnet werden konnten, welche in diesem Fall 2-Phenylethanol Glucuronid und Picein waren (Abb. 74). Für die Summenformel  $C_{13}H_{12}N_7O_2$  konnten keine Strukturvorschläge gefunden werden.



**Abb. 74 Strukturvorschläge für den potentiellen Liganden L298**

Dargestellt sind die zwei mögliche Strukturen des potentiellen Liganden L298, die pflanzlichen Metaboliten zugeordnet werden konnten.

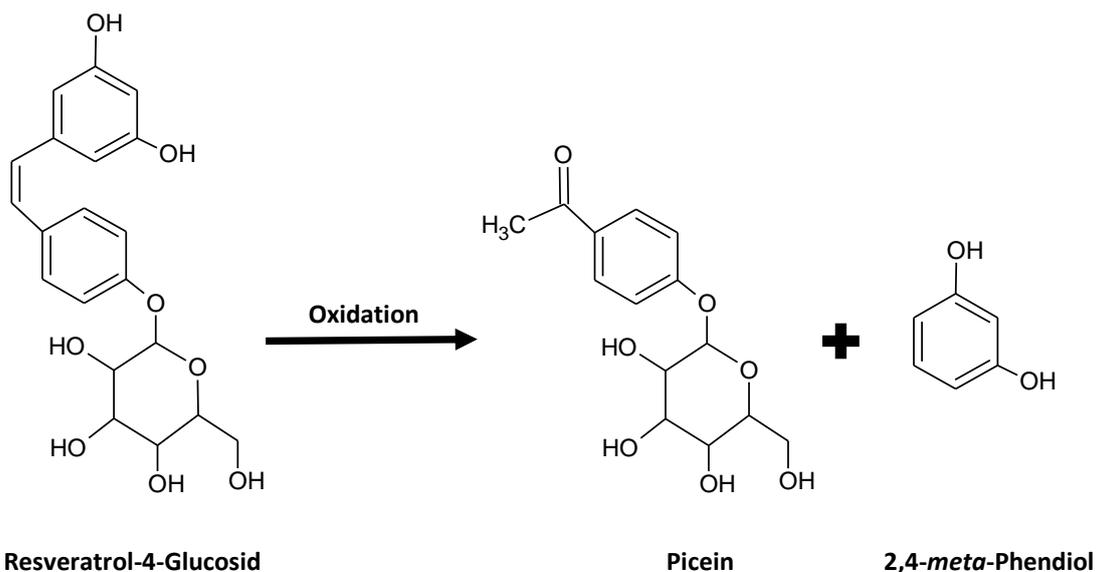
Die Fragmentierung von L298 ergab, dass die Verbindung eine Methylgruppe enthält. Ausgehend davon wurde 2-Phenylethanol-Glucuronid als mögliche Struktur ausgeschlossen, da diese Verbindung keine Methylgruppe aufweist. Weil Picein eine Methylgruppe aufwies wurde diese Verbindung als möglicher Ligand in Rezeptorkomplex-Assays mit RCAR8 und ABI2 in Vorversuchen untersucht (Abb. 75).



**Abb. 75 Rezeptorkomplex-Assays mit Picein als möglicher Ligand der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe**

1 µg der Proteinphosphatase ABI2 wurde in einem molaren Verhältnis von 1:2 mit RCAR8 inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit steigenden Konzentrationen an Picein versetzt. Die X-Achse ist logarithmisch skaliert. Dargestellt sind Daten eines Versuchs mit SD aus drei technischen Replikaten.

Es konnte in den Rezeptorkomplex-Assays keine Regulierung der Proteinphosphatase ABI2 mit RCAR und Picein festgestellt werden (Abb. 75). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dem Liganden L298 nicht um Picein handelt, oder dass L298 keine regulierende Wirkung auf den RCAR/PP2C Rezeptorkomplex hat. Diese Resultate führten zu einer erneuten Betrachtung der in der Ligandenfraktion angereicherten Substanzen. Die angereicherten Massen wurden einer Datenbankanalyse unterzogen, dabei stellte sich die Masse 389,1242 als interessant heraus, da sie Resveratrol-4-Glucosid zugeordnet werden konnte. Die Überlegung war, dass L298 ein durch Oxidation entstandenes Abbauprodukt von Resveratrol-4-Glucosid sein könnte (Abb. 76).



**Abb. 76 Abbau von Resveratrol-4-Glucosid durch Oxidation**

Dargestellt ist ein Modell zum Zerfall von Resveratrol-4-Glucosid zu Picein und 2,4-meta-Phendiol.

Untersuchungen von Jensen *et al.* 2010 zeigten, dass Resveratrol und Resveratrol-Glucosid in Lösung hydro- und photolabil waren. Da die Proben vor der FT-MS Analyse für die Lagerung unter Druckluft

ohne Lichtschutz abgedampft wurden, war es möglich, dass eventuell vorhandenes Resveratrol-Glucosid durch Oxidation zerstört wurde. Dies würde die Tatsache erklären, dass L298 als mögliches Abbauprodukt, angereichert in den Rezeptorkomplex-Proben gefunden wurde, nicht aber Resveratrol-Glucosid. Die Abgangsgruppe 2,4-meta-Phendiol konnte nicht in den Proben detektiert werden, da die Masse unter der Messgrenze von 150 m/z lag.

Die Annahme, dass Resveratrol-Glucosid ein möglicher RCAR-Ligand war, wurde durch Untersuchungen von Seutter von Loetzen *et al.* 2014 unterstützt, die zeigten, dass Bet v 1 (*Betula verrucosa 1*) das glucosylierte Polyphenol Quercetin-3-O-Sophorosid binden konnte. Bet v 1 und RCARs gehören zu der BetV 1-like Superfamilie (Radauer *et al.* 2008; Ma *et al.* 2009) was bedeuten könnte, dass die Proteine aufgrund struktureller Ähnlichkeit auch ähnliche Substanzen binden könnten. Resveratrol-Glucosid ist wie Quercetin-3-O-Sophorosid ein glucosyliertes Polyphenol (Delmas *et al.* 2011), was dafür spricht dass Resveratrol-Glucosid als Ligand für die RCARs in Frage kommen könnte. Resveratrol-4-Glucosid gehört zu den Stilbenen und wird funktional den Phytoalexinen zugeordnet (Chong *et al.* 2009). Dabei wird Resveratrol und Resveratrol-Glucosiden vor allem eine antifungale Wirkung zugeschrieben (Adrian *et al.* 1997; Schulze *et al.* 2005; Delaunois *et al.* 2009). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Resveratrol und Resveratrol-Glucoside in der Pflanze als Antioxidantien wirken (Tang *et al.* 2010). Dem gegenüber wurde für ABA nachgewiesen, dass erhöhte ABA-Konzentrationen die Empfindlichkeit der Pflanzen für Pilzbefall und den oxidativen Stress durch Unterdrückung der Phytoalexinsynthese erhöhen (Mauch-Mani und Mauch 2005). Es ist also möglich, dass ABA und Resveratrol-Glucosid als Gegenspieler zueinander an der Schnittstelle des RCAR/PP2C Rezeptorkomplexes wirken. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte die Regulation des Rezeptorkomplexes durch Resveratrol-4-Glucosid noch nicht untersucht werden.

Die für L385 errechneten Summenformeln wurden ebenfalls einer Datenbankanalyse unterzogen. Dabei wurden für die Summenformel  $C_{19}H_{31}NO_7$  in der Datenbank Chemspider 31 mögliche Strukturen gefunden, die jedoch nicht eindeutig einem pflanzlichen Hintergrund zugeordnet werden konnten. Für die Summenformel  $C_{18}H_{25}N_8O_2$  ergaben sich keine Strukturvorschläge.

Die in dieser Dissertation zusammengestellten Ergebnisse zeigten die erfolgreiche Etablierung eines Systems zur Ligandenanreicherung. Es gelang mehrere mögliche Liganden der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe anzureichern. Zudem weisen Bioassays mit Ligandenfraktionen darauf hin, dass der potentielle Ligand L298 eine mit ABA vergleichbare Regulierung der Rezeptorkomplexe zeigt.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Geräte

**Tab. 17** Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
ESI Quelle	Apollo II	Bruker Daltonics
Feinwaage	Handy	Sartorius Analytics
FT-ICR-Massenspektrometer	Solarix	Bruker Daltonics
Gelelektrophoresenetztteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Inkubator	Thermoshake	Gerhardt
Kippschüttler	RotoShake Genie	Scientific Industries
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Magnet	12 Tesla supraleitender Magnet	Magnex Scientific
Microplattenleser	Synergy 2	Biotek
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
Nano Photometer	NanoPhotometer	Implen
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
SDS-Gelelektrophorese	Mini Protean 3 System	Bio Rad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorff AG
Ultraschall	Sonoplus HD2070	Bandelin
UV-Fotosystem	P91D	Mitsubishi
UV-Gerät	Doc-It	UVP
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vakuumentrifuge	Vacuum Concentrator	Bachhofer
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius Analytics
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckmann
	Typ 5424	Eppendorff AG
	Typ 5415 C	Eppendorff AG
	Typ 5415 R (Kühlzentrifuge)	Eppendorff AG

#### 4.1.2. Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien und Lösungsmittel von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) oder New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Lösungsmittel in HPLC Analysequalität wurden von J. T. Baker (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande) erworben.

### 4.1.3. Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins (Ebersberg) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in sterilem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingestellt. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang gelistet.

### 4.1.4. Größenstandards

<i>HindIII</i> -Marker	MBI Fermentas
1kb DNA-Ladder	MBI Fermentas
100 bp DNA-Ladder	MBI Fermentas

## 4.2. Pflanzenmaterial

### 4.2.1. Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana* in Phytokammern

In dieser Arbeit wurden *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col) und die Knockout Mutante *aba2* im Hintergrund Columbia verwendet. Die *aba2* Mutante zeigt einen geringeren ABA-Gehalt aufgrund einer gestörten ABA-Biosynthese. Die Anzucht der Pflanzen auf Erde (Perlit-Einheitserde-Mischung Typ 7) erfolgte in Phytokammern unter Kurztagbedingungen für mehr Biomasse (12h Licht –  $100\ \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 65% Luftfeuchtigkeit; 12h Dunkelheit bei  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 75% Luftfeuchtigkeit). Die Pflanzen wurden nach 4 Wochen auf Erde geerntet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.2.2. Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana* im Gewächshaus

Die *Arabidopsis* Pflanzen Wildtyp Columbia wurden im Gewächshaus bei Durchschnittstemperaturen von  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer durchschnittlichen Luftfeuchte von 65-70% angezogen. Die Samen wurden in 20 Schalen a' 15 Töpfe ausgebracht. Nach etwa 4 Wochen wurden die Pflanzen dann abgeerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Pro Durchgang wurden etwa 3,5 kg Pflanzenmaterial geerntet.

### 4.2.3. Pflanzenmaterial anderer *Brassicaceen*

Neben *Arabidopsis* wurden auch andere Vertreter der *Brassicaceen* wie Wirsing (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda* L.), Rosenkohl (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongyloides* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba*) untersucht. Die Pflanzenproben wurden im Einzelhandel erstanden, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 4.3. Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1. Verwendete *Escherichia coli*-Stämme und ihre Kultivierung

Tab. 18 *E.coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Strainlist #	Quelle
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> <sup>-</sup>	-	62	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1</i> <i>lac</i> [F <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> ΔM15Tn10(Tetr)]	Tetracyclin	120	Stratagene (Heidelberg)
M15 pREP4	Abgeleitet aus K12-Stamm, <i>NalS</i> <i>Str</i> <i>S</i> <i>rif</i> <i>S</i> <i>thi- lac- ara- gal + mtl-</i> <i>F-recA + uvr + lon + [pREP4 KanR]</i>	Kanamycin	3343	Qiagen (Hilden)
BL21 (E3)	F <sup>-</sup> <i>ompThsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcmrne131</i> (DE3)	-	4481	Promega(Fitchburg, USA)
Rosetta pLys	F <sup>-</sup> <i>ompThsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>pLysSRARE</i> (Cam <sup>R</sup> )	Camalexin	2470	Merck Millipore (Billerica, USA)

Die *E.coli* Kulturen wurden in LB-Flüssigmedium (siehe unten) oder auf LB-Agarplatten bei 37°C angezogen. Eine Selektion auf Transformanden erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika (siehe unten) zum Nährmedium.

Tab. 19 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	50	200 in sterilem ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin	25	100 in sterilem ddH <sub>2</sub> O

### 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

Das Medium wurde autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach herunter kühlen des Mediums auf 60°C.

### 4.3.2. Transformation kompetenter *E.coli* mit Plasmid-DNA

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

Vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl Transformationsansatz (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) und 90 µl *E.coli*-Zellsuspension zusammen gegeben und 30 min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann einem Hitzeschock bei 42°C für 30 s ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz 10 min. auf Eis inkubiert und mit 400 µl LB-Medium versetzt. Dann wurden die Zellen für 1 h bei 37°C in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 2 min. bei 1000 g abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurden 440 µl des Überstandes abgenommen und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Die Zell-Lösung wurde auf eine LB-Platte mit Antibiotikum übertragen und mit dem Drigalski Spatel gleichmäßig verteilt. Abschließend wurde die Platte bei 37°C über Nacht in einem Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet.

#### Transformation elektrisch-kompetenter *E.coli*- Zellen durch Elektroporation

Die elektrisch-kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 10 µl Transformationsansatz (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) und 90 µl Zellsuspension mit einander vermischt und auf Eis vorinkubiert. Die Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 0,2 cm) wurden ebenfalls auf Eis vorgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz in die Küvetten gegeben und bei folgenden Bedingungen elektroporiert: V=2.000 V, C= 25 µFD, R=700 Ω, t=1,75 ms. Danach wurden 500 µl LB-Medium zugegeben. Die Probe wurde dann 1 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Abschließend wurde die Kultur abzentrifugiert bei 1000 g, 2 min., 4°C und 440 µl des Überstandes abgenommen. Die restliche Kultur wurde resuspendiert und auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

### 4.3.3. Plasmid DNA-Präparation aus *E.coli*

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

Diese Methode wurde verwendet um kleinere Mengen Plasmid-DNA durch alkalische Lyse aus *E.coli* zu isolieren. Dazu wurde zunächst 1 ml ÜN-Kultur 5 min. bei 4.000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 100 µl Lösung 1 und 200 µl Lösung 2 (Lysepuffer) hinzugegeben und die Probe mit einem Vortexer gemixt. Die Zellen wurden anschließend für 5 min. bei RT lysiert. Dann wurden 300 µl Lösung 3 zugegeben und die Probe fünfmal invertiert. Mit diesem Schritt wurden genomische DNA und Proteine aus der Probe gefällt. Anschließend wurde die Probe 15 min. bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde dann mit 96% (v/v) eiskaltem Ethanol versetzt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C für 20 min. Dann wurde erneut 15 min. bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Probe wurde anschließend mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 40 µl 0,1X TE-Puffer mit 25 µg/ml RNase gelöst. Abschließend wurde die Plasmid-DNA-Menge durch Abgleich mit dem λ-HindIII Größenstandard(5 µl) auf einem Agarosegel und durch ein Nanophotometer bestimmt.

#### **Lösung1**

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

#### **Lösung 2**

0,2 M NaOH  
1% SDS

#### **Lösung 3**

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

#### **Ethanol**

96 % bei - 20°C  
70%

#### **0,1x TE Puffer**

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

#### Plasmid Midi-Präparation aus *E.coli*

Wurden größere Mengen an DNA für Klonierung, Transfektion, Transformation oder Sequenzierung benötigt, so wurde das JetStar-MIDI Kit (Genomed, Löhne) benutzt. Dazu wurden 100 ml ÜN-Vorkultur angesetzt und nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA-Menge durch Abgleich mit dem λ-HindIII Größenstandard(5 µl) auf einem Agarosegel und durch ein Nanophotometer bestimmt.

### 4.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA-Fragmente für die Klonierung zu amplifizieren wurde eine *proofreading* Polymerase (*Pwo* DNA Polymerase, Peqlab) verwendet. Gewöhnlich bestand ein PCR-Ansatz aus folgenden Komponenten:

Tab. 20 PCR-Ansatz

Komponente	finale Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]
DNA <i>Template</i>	1-20 ng	2
5x Puffer für <i>Pwo</i>	1x (2,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	4
dNTP-Mix (10 mM)	1 mM	2
<i>Forward</i> Primer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ M	0,1
<i>Reverse</i> Primer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ M	0,1
Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 U	0,1
ddH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 20 $\mu$ l	

Für die PCR im TGradient-Cykler (Biometra) wurden 2 verschiedene Bedingungen benutzt. Eine einfache PCR lief nach folgendem Schema ab:

Tab. 21 PCR-Programm

Dauer	Temperatur	Vorgang	Anzahl der Zyklen
2 min.	95°C	Initialdenaturierung	1
1 min.	95°C	Denaturierung	
1,5 min.	50°C-65°C*	Primer <i>Annealing</i>	25-35**
2 min.***	72°C	Elongation	
7 min.	72°C	Finale Elongation	1

\*Annealingtemperatur eines Primers lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$T_m = 64,3^\circ\text{C} + 0,41 \times \text{GC}\% - 650/\text{Anzahl Basen Primer}$$

\*\* Zyklen-Anzahl 25 bei Klonierung, 35 bei Test von Konstrukt

\*\*\* Elongationszeit abhängig von Länge des Konstruktes (ca. 1 min. je 1000 bp)

Für schwierige Klonierungskonstrukte wurde eine *two step* PCR verwendet. Diese lief nach folgendem Schema:

Tab. 22 PCR-Programm *twostep* PCR

Dauer	Temperatur	Vorgang	Anzahl der Zyklen
2 min.	95°C	Initialdenaturierung	1
1 min.	95°C	Denaturierung	
1,5 min.	50°C*	Primer <i>Annealing</i>	5
2 min.	72°C	Elongation	
1 min.	95°C	Denaturierung	
1,5 min.	55-65°C**	Primer <i>Annealing</i>	20
2 min.	72°C	Elongation	
7 min.	72°C	Finale Elongation	1

\*Es wurde für diesen Schritt eine niedrigere *Annealing* Temperatur verwendet als die berechnete.

\*\* Bei diesem Schritt wurde die berechnete *Annealing* Temperatur eingestellt.

#### 4.3.5. Back to back site directed mutagenesis (SDM)

Um einen Aminosäure-Austausch in einem Protein vorzunehmen wurde eine SDM durchgeführt. Die dafür benötigten Primer wurden mit Hilfe eines Design-Programms auf der Internetseite <http://nebasechanger.neb.com/> erstellt. Anschließend wurde mit diesen Primern eine PCR angesetzt. Dabei wurde die *proofreading* Polymerase PhusionTaq verwendet. Der PCR Ansatz und das verwendete Programm sind in den Tabellen 19 und 20 zu finden.

**Tab. 23** Ansatz für SDM-PCR

Komponente	finale Konzentration	Volumen [µl]
DNA <i>Template</i>	50 ng	1
5x Puffer für PhusionTaq	1x	4
Formamid		0,5
MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)		0,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,2 mM	2
<i>Forward</i> Primer (100 µM)	0,5 µM	0,1
<i>Reverse</i> Primer (100 µM)	0,5 µM	0,1
Polymerase (5 U/µl)	0,5 U	0,1
ddH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 20 µl	

**Tab. 24** PCR-Programm für SDM

Dauer	Temperatur	Vorgang	Anzahl der Zyklen
2 min.	95°C	Initialdenaturierung	1
20 s	95°C	Denaturierung	
30 s	50°C-65°C*	Primer <i>Annealing</i>	25
4 min.	72°C	Elongation	
5 min.	72°C	Finale Elongation	1

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit T4 Polynukleotid Kinase, DpnI und T4-Ligase inkubiert. Dazu wurde zunächst folgender Ansatz zusammen pipettiert:

**Tab. 25** Ansatz für Inkubation mit T4 Polynukleotid Kinase und DpnI

Komponente	Volumen [µl]
dd H <sub>2</sub> O	12
ATP (10 mM)	2
Tango Puffer (10x)	2
T4 Polynukleotid Kinase	1
DpnI	0,5
PCR Produkt	2

Dieser Ansatz wurde dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden 0,5 µl T4 Ligase hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 22°C für 30 Minuten. Dann wurde das Produkt über chemische Transformation in DH5α – *E.coli* Zellen transformiert.

### 4.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von Plasmid-DNA, PCR- und Restriktionsprodukten erfolgte via Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurden DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der Gele betrug 0,8% (w/v) in 1 x TAE Puffer. Der selbe Puffer wurde auch für die Elektrophorese verwendet. Die entsprechende Menge Agarose und 1x TAE Puffer wurden aufgeköcht. Um die DNA unter UV-Licht zu visualisieren wurde dem Gelansatz 0,1µg/ml Ethidiumbromid beigefügt. Anschließend wurde die Lösung in Gelkammern gefüllt, mit Kämmen präpariert und ausgehärtet. Dann wurde das Gel in die Elektrophoresekammer mit 1x TAE Puffer überführt und die Kämmen entfernt. Als Größenstandards und zur DNA-Konzentrationsabschätzung wurden *HindIII* verdaute λ-DNA oder kommerziell erhältliche DNA-Marker verwendet. Die Proben wurden mit 6x Gelladepuffer (1x Endkonzentration) vermischt und auf dem Gel aufgetragen. Der 25-minütige Lauf erfolgte bei 200 V/150 cm<sup>2</sup> Gel.

#### **50x TAE Puffer**

2 M Tris Base  
5,71 % Essigsäure  
50 mM EDTA (pH= 8,0)

#### **Gelladepuffer 6x**

0,09 % Bromphenolblau (w/v)  
0,09 % Xylen cyanol FF (w/v)  
60 mM EDTA

#### **EtBr-Lösung**

10g/l Ethidiumbromid in ddH<sub>2</sub>O

### 4.3.7. Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarose Gel

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (λ= 316 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem Peqlab Gel Extraktions Kit (Peqlab®) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert.

### 4.3.8. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Um PCR-Fragmente und Vektor DNA für eine anschließende Ligierung zu schneiden wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB) und MBI Fermentas verwendet. Üblicherweise wurden für eine Klonierung 0,1-05 µg Vektor-DNA verdaut. Von den PCR-Amplifikaten wurde der gesamte vorher aufgereinigte Ansatz verwendet. Den Verdauansätzen wurden die entsprechenden Puffer (abhängig von den verwendeten Enzymen) und 2 U Restriktionsenzym je µg DNA beigefügt. Die Größe und Menge der Fragmente wurden anschließend über Agarosegele geprüft.

#### 4.3.9. Dephosphorylierung von geschnittener Vektor DNA

Zur Vermeidung von Religation wurde linearisierte Vektor-DNA dephosphoryliert. Dazu wurde die CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) von New England Biolabs verwendet. Üblicherweise wurden in einem Ansatz 1-2 µg linearisierte DNA und 1-2 U Alkaline Phosphatase und vom Hersteller bereitgestellter 1x Puffer in einem Endvolumen von 15 µl miteinander inkubiert. Die Inkubation erfolgte 30 min. bei 37°C. Anschließend wurde die Phosphatase 20 min. bei 60°C inaktiviert.

#### 4.3.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten in den linearisierten Vektor erfolgte durch Inkubation mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) in dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer. Das finale Volumen betrug 10 µl. In der Regel wurden Insert und Vektor in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und am nächsten Tag in den entsprechenden *E.coli*-Stamm transformiert.

#### 4.3.11. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde zur Überprüfung der PCR-Fragmente und Vektorkonstrukte auf Fehler (Nukleotidbasenaustausch, Deletion, falsche Orientierung im Vektor etc.) vorgenommen. Hierfür wurde die DNA bei GATC Biotech, Konstanz eingeschickt. Die benötigte DNA-Konzentration war: 100-500 ng/µl. Falls von GATC nicht bereitgestellt, mussten Fragment-spezifische Primer in der Konzentration 10 µM beigefügt werden.

### 4.4. Proteinbiochemische Methoden

#### 4.4.1. Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte in einer mit 20 ml ÜN-Kultur angeimpften Hauptkultur á 400 ml in LB oder in einer mit 40 ml ÜN-Kultur angeimpften Hauptkultur in TB á 500 ml. Den Hauptkulturen wurden noch die entsprechenden Antibiotika beigefügt. Die Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5-0,6 (für LB) bzw. 1-1,2 (für TB) bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit 0,5 mM (bei LB) bzw. 1,0 mM (bei TB) IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid) induziert. Dann erfolgte die Proteinexpression 2-4 h bei 37°C und 200 rpm. Anschließend wurden die Kulturen

auf Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 4°C und 16.000 g für 15 min. abzentrifugiert. Danach wurden die Pellets in 50 ml Reaktionsgefäße übertragen und bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

### 4.4.2. Proteinaufreinigung und Dialyse

#### Proteinaufreinigung mit Ni-TED 2000 Kit von Macherey&Nagel

Zellaufschluss:

Der Zellaufschluss erfolgte nach Resuspendierung der Zellpellets in 1x LEW-Puffer (im Kit als 8x bereit gestellt). Dazu wurden die Zellen mit Ultraschall 3 x 1 min. bei 100% und 9 Zyklen aufgeschlossen und auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 70.000 g und 4°C für 30 min. abzentrifugiert.

Proteinaufreinigung:

Die Ni-TED 2000 Säulen wurden mit 1x LEW-Puffer equilibriert. Anschließend wurde der abzentrifugierte Überstand zugegeben (max. 10 ml je Säule). Die Bindung der Proteine erfolgte nach dem Prinzip der Metallionen-Affinitätschromatografie. Dabei interagieren die His<sub>6</sub>-tags der rekombinanten Proteine mit den immobilisierten Nickel-Ionen. Nachdem das Lysat durchgelaufen war, wurde die Säule mit 6 ml 1x LEW Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proteine mit 1-4 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Dialyse:

Um das Imidazol aus dem Elutionspuffer aus der Proteinlösung zu entfernen wurde das Protein dialysiert. Dies geschah in Dialysekammern, die mit Membranen 16 kDacut-off (VISIKING® Durchmesser 16 mm, Serva) präpariert waren. Die Dialyse erfolgte ÜN bei 4°C im Kühlraum unter ständigem Rühren der Lösung. Der Puffer wurde zweimal ausgetauscht.

#### Aufreinigung rekombinanter Proteine über GE-Healthcare Nickel-Säulen

Zellaufschluss und Dialyse erfolgten nach dem selben Prinzip wie bei den Ni-TED-Säulen.

Proteinaufreinigung:

Auch hier wurde wieder die Interaktion zwischen His<sub>6</sub>-tags und immobilisierten Nickel-Ionen für die Proteinaufreinigung genutzt. Die Proteinlösung wurde über Einmalfilter von restlichen Zelltrümmern befreit. Mit Hilfe einer pneumatischen Pumpe wurden bis zu 100 ml Lysat auf eine Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 12 ml 1x LEW gewaschen. Das Protein wurde dann mit 5-10 ml Elutionspuffer eluiert.

**1x LEW Puffer**  
100 mM Tris  
100 mM NaCl

**Elutionspuffer**  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl

20 mM Imidazol  
pH=8,0

250 mM Imidazol  
pH=8,0

**Dialysepuffer**

100 mM Tris  
100 mM NaCl  
2 mM DTT  
(wahlweise 10% (v/v) Glycerin)  
pH=8,0

4.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden ihrer Größe nach elektrophoretisch nach der Laemmli (1970) Methode aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde in Elektrophorese-Kammern (Mini-Protean II, Bio-Rad) mit einem 15%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel durchgeführt. Die Proben wurden mit Laemmli-Ladepuffer vermischt und bei 95°C für 15 min. denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das SDS-Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 200 V und 60 mA.

Tab. 26 SDS-PAGE Gel Ansatz

	15% Trenngel	4% Sammelgel
<b>Acrylamidlösung</b>	5,0 ml	390 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</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>	100 µl	30 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	10 ml	3 ml

**Acrylamidlösung**

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

**Trenngelpuffer**

2 M TrisHCl pH = 8,8

**Sammelgelpuffer**

1,5 mM TrisHCl pH= 6,8

**TEMED**

unverdünntes Tetramethylethyldiamin

**APS**

10% Ammoniumperoxidisulfat (w/v)

**Elektrodenpuffer**

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

**5x Laemmli-Probenpuffer**

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

### 4.4.4. Coomassie-Färbung

Um die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar zu machen wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung eingefärbt. Dabei wurden die Gele mit Färbelösung überschichtet und 1 min. bei 360 W in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und das Gel kurz mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Dann wurde Entfärbelösung zugegeben und das Gel erneut 1 min. bei 360 W in der Mikrowelle erhitzt. Im Anschluss daran wurde ein Papiertuch beigefügt und das Gel für 30 min. geschüttelt. Die entfärbten Gele wurden dann in ddH<sub>2</sub>O gelagert.

#### Färbelösung

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

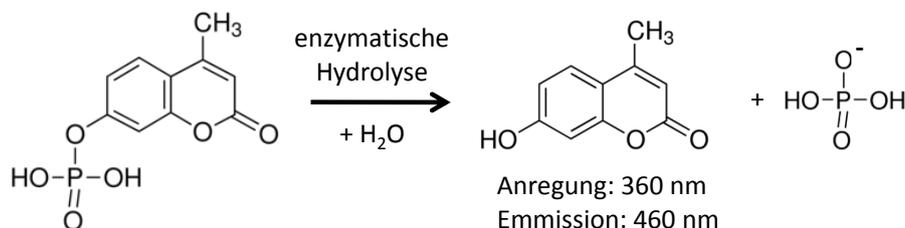
#### Entfärbelösung

10% Essigsäure (v/v)

Um die Proteinkonzentration auf dem Gel zu bestimmen wurden definierte BSA-Konzentrationen als Standard aufgetragen.

### 4.4.5. Phosphatase-Aktivitätsassay

Die Phosphatase-Aktivität der PP2Cs wurde durch die Messung von umgesetztem 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) bestimmt. Die Phosphatasen dephosphorylierten das Substrat, was bei dem Molekül zu einer Veränderung der emittierten Wellenlänge des Lichtes führte (Abb. 77). Dies konnte durch einen Mikroplattenleser (Synergy 2, Biotek) gemessen werden. Methylumbelliferyl wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und das emittierte Licht bei 460 nm gemessen. Die Signalintensität war dabei proportional zur Stoffmenge des entstandenen Fluorophors. Die Reaktion wurde je nach Beladung der Mikrotiterplatte entweder 10 (12 Ansätze) oder 20 min. (24 Ansätze) gemessen. Die Intensität wurde in RFU (*Relative Fluorescence Units*) angegeben und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der so entstandenen Geraden entsprach der Phosphatase-Aktivität und wurde in mRFU/min. angegeben.



#### Abb. 77 Enzymatische Hydrolyse von Methylumbelliferylphosphat

Die Abbildung zeigt die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von Methylumbelliferylphosphat, wobei das Fluorophor Methylumbelliferon gebildet wird. Dieses wird bei 360 nm angeregt werden und die Emission bei 460 nm gemessen.

Für den Assay wurde zunächst ein Präinkubationsansatz angesetzt. Dabei wurden die Phosphatase bzw. die Phosphatase und ihre Interaktionspartner 20 min. bei 30°C mit 0,3 mM MnCl<sub>2</sub> vorinkubiert um eine Formung des Komplexes zu gewährleisten. Etwa 10 min. vor Ende der Präinkubation wurde das 2x Substrat mit 0,3 mM MnCl<sub>2</sub> versetzt und bei 37°C inkubiert. Dann wurden Präinkubationsansatz und Substrat auf einer 96er Mikrotiterplatte zusammen pipettiert (50 µl + 50 µl) und in einem auf 37°C vorgeheizten Plattenleser gemessen.

**Stammlösungen**

30 mM MnCl<sub>2</sub> 4 x 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 (1M)  
 200 µl NaCl (5M)  
 50 µl DTT (1M)

**Präinkubationsansatz (200 µl)**

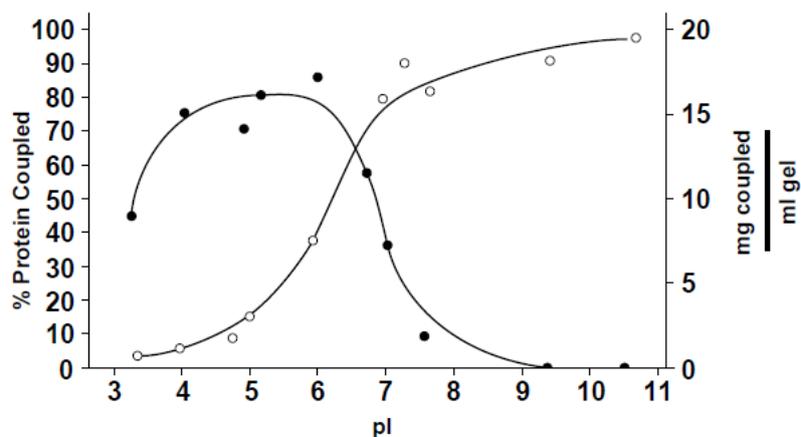
25 µl 8x Puffer  
 3 µl MnCl<sub>2</sub> (30 mM)  
 Phosphatase (1 µg)  
 RCARs  
 Ligand (z.B. ABA)  
 mit ddH<sub>2</sub>O auf 200 µl auffüllen

**2x Substrat**

100 mM TrisHCl  
 100 mM NaCl  
 0,3 mM MnCl<sub>2</sub>  
 5 mM MUP

**4.4.6. Ligand Fishing Affinitätschromatographie mit Affi 15 Gel**

Für die Affinitätschromatographie wurde Protein kovalent an das Gelmaterial Affi 15 Gel (BioRad) gebunden. Dabei reagierten die primären Aminogruppen der Aminosäuren mit dem Material, wobei ein Imid als Abgangsgruppe abgespalten wurde. Die Abb. 78 zeigt die Kopplungseffizienz der beiden Gelmaterialien in Abhängigkeit vom pI der gekoppelten Proteine. Es ist zu erkennen, dass bei einem pI von 6,6 beide Gelmatrizen als Affinitätsmatrix in Frage kommen.



**Abb. 78 Kopplungseffizienz der Affinitätsmatrizen Affi 10 Gel und Affi 15 Gel**

Die Abbildung wurde aus dem Benutzerhandbuch von BioRad für Affi 10 (weiß) und Affi 15 Gel (schwarz) übernommen. Dargestellt ist die Kopplungseffizienz (%) der Affinitätsmatrizen in Abhängigkeit vom isoelektrischen Punkt (pI) der gekoppelten Proteine.

## **Material und Methoden**

---

Das Gelmaterial (200 mg) wurde vor Beginn des Experimentes mit 4 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen um das Isopropanol in dem es gelagert wurde zu entfernen. Es wurden 200 mg Gelmaterial und 500 µg Protein für 4 h bei 4°C im Kühlraum zusammen mit dem entsprechenden Inkubationspuffer in einem Kippschüttler (HulaMixer, Invitrogen) mit den Einstellungen Orbital: OFF, Reciprocal: 70° Stufe 1 und Vibro: 5° Stufe 1 inkubiert. Anschließend wurden nicht belegte Bindestellen des Gelmaterials mit 100 µl 1M Tris HCl (pH=7,9) für 1 h blockiert. Im Anschluss daran wurde die Probe in eine Säule (3 ml Füllvolumen) überführt. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Die Probe wurde dann mit 600 µl Waschpuffer 1 gewaschen um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Der Verlust an nicht gebundenem Protein wurde über Bradford-Proteinbestimmung ermittelt (siehe 4.3.7.). Es wurden zwei Strategien bei diesem Versuch verwendet. Bei Strategie 1 wurde ein Komplex aus PP2C und RCAR mit Pyrabactin an das Gelmaterial fixiert. Bei Strategie zwei wurde nur die PP2C an das Gelmaterial fixiert. Nach dem Waschen wurde eine definierte Menge Abscisinsäure (5 nmol) auf die Säule gegeben und das Material erneut für 30 min. bei 37°C in einem Kippschüttler inkubiert. Bei Strategie 2 wurde noch zusätzlich RCAR dem Ansatz beigefügt um einen RCAR/PP2C Komplex zu formen. Anschließend wurden die Proben wieder in 3 ml Säulen überführt und 4x mit 600 µl Waschpuffer 2 gewaschen um nicht gebundene Abscisinsäure zu entfernen. Anschließend wurde die gebundene Abscisinsäure in 3 Stufen mit 500 µl 25% Methanol (v/v), 50% Methanol (v/v) und 100% Methanol von der Säule eluiert. Dann wurde das Methanol unter Druckluft abgedampft. Die Durchflüsse, Waschschritte und Eluate wurden über C18-Säulen (BakerbondSPE 100 mg) entsalzt und später in einer HPLC-Analyse untersucht (-> siehe analytische Methoden).

### **8x Puffer (modifiziert)**

1 ml 1 M HEPES pH=7,9  
200 µl NaCl<sub>2</sub> (von 5 M stock)  
50 µl DTT (1M)

### **Inkubationsansatz Strategie 1**

187,5 µl 8x Puffer  
22,5 µl 30 mM MnCl<sub>2</sub>  
500 µg Phosphatase  
500 µg RCAR  
1 ml Pyrabactin 50 µM  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1,5 ml auffüllen

### **Inkubationsansatz Strategie 2**

500 µg Phosphatase  
0,3 mM MnCl<sub>2</sub>  
4 mM DTT  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 600 µl auffüllen

### **Waschpuffer 1**

10 mM Tris HCl  
10 mM NaCl  
pH=7,9

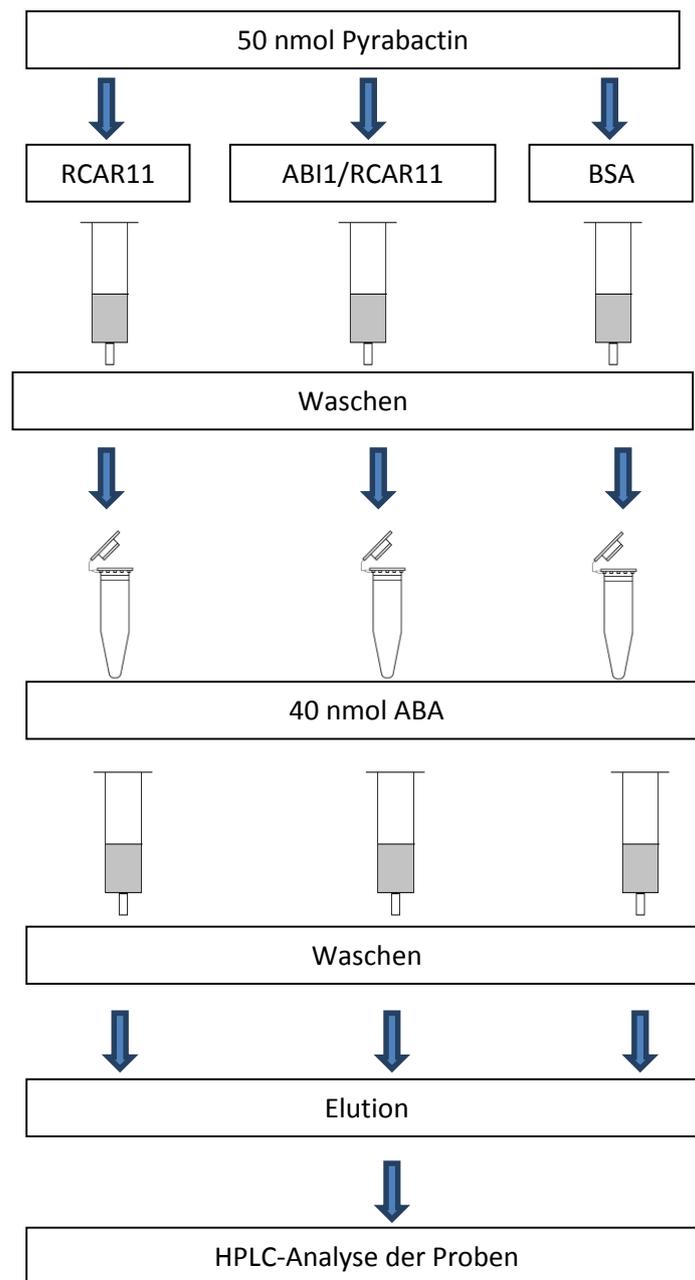
### **Waschpuffer 2**

100 mM TrisHCl  
500 mM NaCl  
pH= 7,9

### **Methanol stocks**

25% Methanol (v/v)  
50% Methanol (v/v)  
100% Methanol

*Flow-chart Schema 1*



**Abb. 79 Schema 1 Ligand-Fishing**

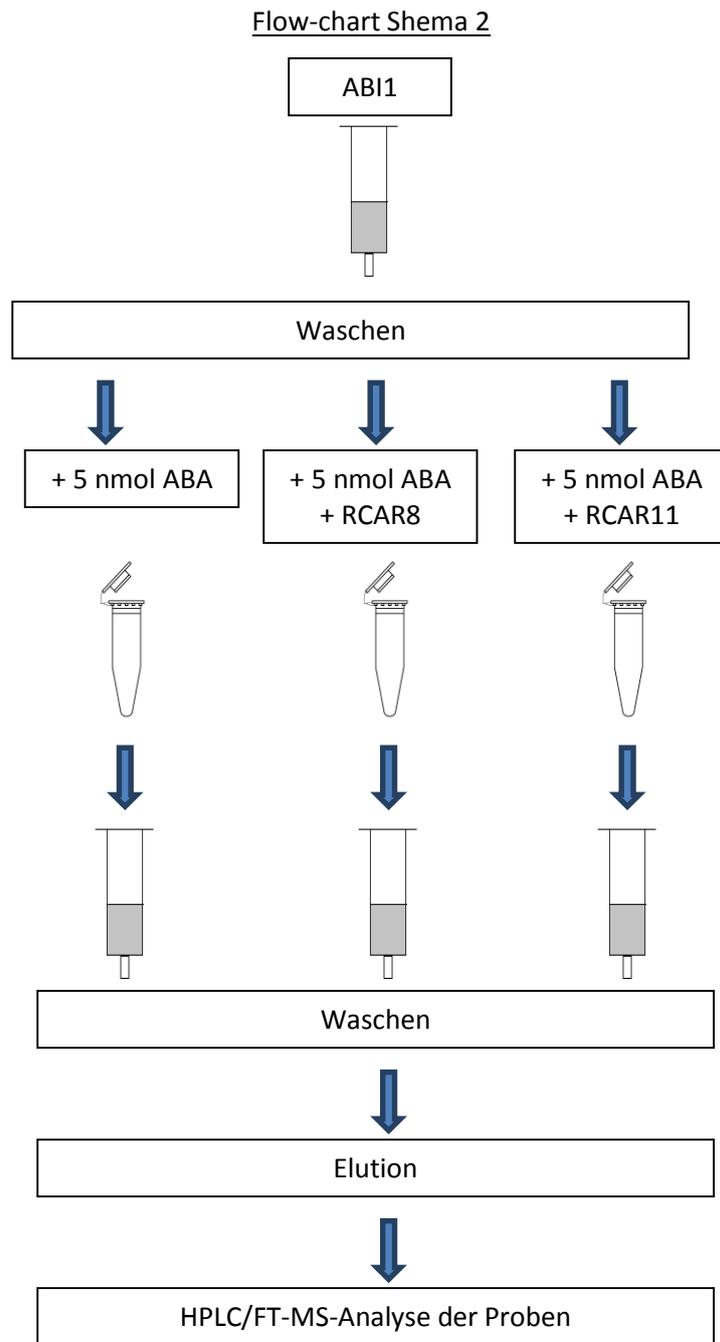


Abb. 80 Shema 2 *Ligand-Fishing*

#### 4.4.7. Bradford Proteinbestimmungsassay

Um Proteinmengen schnell und einfach zu bestimmen wurde der Bradford-assay (Bradford 1976) verwendet. Das Prinzip des Assays beruht auf der Bindung von Coomassie blue G250 Farbstoff an Arginyl- und Lysylgruppen der Proteine. Vor Beginn der Messung wurde ein BSA (*Bovine Serum Albumin*) Standard gemessen, um den linearen Bereich der Bradford-Lösung für die Proteinbestimmung festzustellen. Die Absorption der Lösung wird bei 595 nm photometrisch

bestimmt. In der Kurve konnte dann die Proteinmenge in µg gegen die Absorption in einer linearen Kurve aufgetragen werden. Die Messung des Standards erfolgte nach folgendem Ansatz:

**Tab. 27** Bradford BSA-Standard

<b>1x BSA stock 0,1 mg/ml [µl]</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O [µl]</b>	<b>Bradford-Lösung [µl]</b>	<b>Menge BSA [µg]</b>
0	800	200	0
5	795	200	0,5
10	790	200	1,0
20	780	200	2,0
30	770	200	3,0
35	765	200	3,5

Anschließend wurde die entsprechende Proteinprobe gemessen und anhand der Standardkurve die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt.

**BSA-stocks**

BSA 10x :1mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

BSA 1x: 0,1 mg/ml in Puffer der Proteinlösung

**Bradford-Lösung**

0,01% (w/v) Coomassie blue G 250

4,7% (v/v) Ethanol

8,5% (v/v) ortho-Phosphorsäure

## 4.5. Analytische Methoden

### 4.5.1. Aufreinigung von Metaboliten aus Pflanzenmaterial

Für die Erarbeitung einer Reinigungsstrategie wurde das Paper Want *et al.* (2006) als Grundlage verwendet. Dort sind verschiedene Lösungsmittel für die Aufreinigung von Metaboliten beschrieben. Für die Extraktionen in dieser Arbeit wurden Aufschlusspuffer mit verschiedenen Methanol- bzw. TCA (Trichloressigsäure) –Konzentrationen verwendet. Für die finale Extraktion wurden beide Substanzen miteinander kombiniert um eine maximale Ausbeute an Metaboliten zu gewährleisten. Methanol wurde verwendet um hydrophobe Substanzen aus dem Pflanzenmaterial zu isolieren. Das TCA wurde eingesetzt, um Proteine auszufällen. Für die Erstellung eines Reinigungsprotokolls wurden 20 g frisches Pflanzenmaterial (*Wirsing Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda* L.) in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 20 ml des jeweiligen Extraktionspuffers versehen und vermixt. Anschließend wurde die Probe für 15 min. bei RT gerührt. Dann wurde die Probe bei 30000 g, 15 min. und 4°C abzentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde dann über einen Faltenfilter aufgefangen. Im Anschluss daran wurde das Methanol durch abdampfen unter Druckluft entfernt. Dann wurde der pH der verbliebenen Lösung auf 6,5 eingestellt. Danach wurde die Lösung auf SPE (*Solid Phase Extraction*)-Säulen (Bakerbond™ spe, 1000 mg) geladen. Die Säulen wurden dann mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die an das C18-Material gebundenen hydrophoben Substanzen wurden dann mit 10 ml Methanol eluiert und erneut unter Druckluft getrocknet. Die Lagerung der abgedampften Proben erfolgte bei -80°C.

### 4.5.2. reversed phase HPLC

Für die chromatografische Auftrennung und Analyse von Proben wurde eine HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – Anlage von Dionex verwendet. Dabei wurden die Proben nach ihrer Hydrophobizität in einem steigenden Methanol-Gradienten auf einer reversed phase C18-Säule aufgetrennt. Als wässriges Laufmittel A wurde 0,25% Essigsäure (pH= 3,9) verwendet. Alle für die HPLC verwendeten Lösungen wurden unter Vakuum und ständigem Rühren in einem Excikikator entgast um Luftblasenbildung im System zu vermeiden. Die Flussrate der HPLC wurde auf 0,75 ml/min. eingestellt. Das HPLC-Programm sah wie folgt aus: 2 min. isokratisch Laufmittel A, dann 20 min. Methanol-Gradient von 0-100% Methanol, anschließend 2 min. Nachspülzeit mit 100% Methanol, dann binnen 4 min. zurück auf 0% Methanol. Es wurden 100 µl Probe injiziert. Die Messung der Absorption erfolgte mit drei Wellenlängen bei 254, 264 und 280 nm. Bei Messung von Proben in denen Abscisinsäure (ABA) enthalten war wurde vor jeder Analyse ein 40 µM ABA-Standard (siehe Schema) injiziert und bei 264 nm gemessen. Dies ermöglichte eine Quantifizierung der ABA-Menge in den Proben.

**Tab. 28** HPLC ABA-Standardreihe

Injektionsvolumen [µl]	ABA [nmol]
20	0,8
25	1
50	2
75	3
100	4
125	5
150	6

#### Laufmittel A

0,25% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O  
pH= 3,9 (NaOH)

#### ABA-Stock

40 µM ABA in Laufmittel A

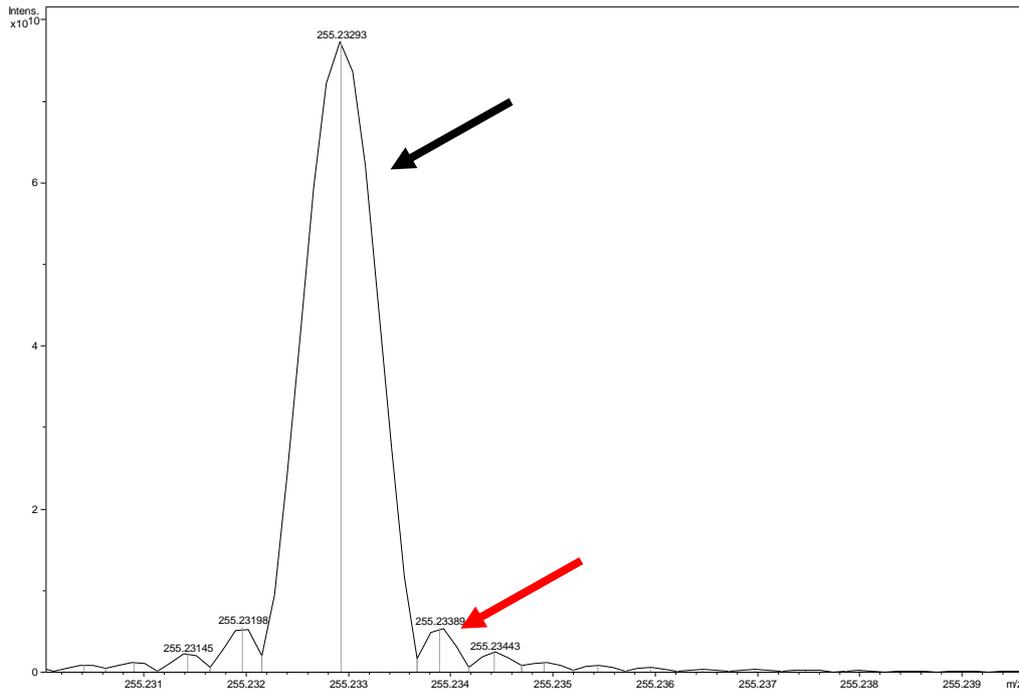
### 4.5.3. DI-ICR-FT/MS Analyse

Für die Analyse von Metaboliten aus Pflanzenzellextrakt wurde eine DI-ICR-FT/MS (*Direct Injection Ion Cyclotron Fourier-Transform Mass Spectrometry*) durchgeführt. Es wurden jedes Mal 70 µl Probe in das Massenspektrometer injiziert. Dann wurde die Probe mit einer Pumpe bei 120 µl/h weiter injiziert. Die Erfassung der Massen erfolgte in einem Massenbereich von 123-1000 m/z. Die Akkumulationszeit der Ionen betrug 0,3 s. Es wurden jeweils vier biologische und drei technische Replikate gemessen. Die daraus resultierenden Massenspektren wurden dann intern gegenaliphatische Fettsäuren mit einer Abweichung von <0,05 ppm kalibriert. Hierfür wurde die Data Analysis Software (BrukerDaltonix, Bremen) verwendet. Anschließend erfolgte der Export der Massenlisten mit Informationen zu

Molekülmasse und gemessener Signalintensität. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: *signal-to-noise-ratio* 4 und Massenpräzision von 5 Dezimalstellen.

#### 4.5.4. Auswertung der MS-Daten

Die Massenlisten aus der MS-Messung wurden mit dem Programm Matrix-Creator gepoolt. Die Datengruppen des Datensatzes wurden dann unter Verwendung des Programmes HCE verglichen. Zum Beispiel wurden die Gruppen  $\Delta$ ABI1/RCAR8-Komplex gegen  $\Delta$ ABI1-Kontrolle in einem *high-to-low* Vergleich gegenüber gestellt. Der Pearsson Koeffizient wurde auf +1 und -1 gestellt um einen möglichst konservativen Vergleich zu ermöglichen. Als Ergebnis wurden dann solche Massen ausgegeben, die in der  $\Delta$ ABI1/RCAR8 Rezeptorkomplex-Probe eine höhere Signalintensität aufwiesen als die in der  $\Delta$ ABI1 Kontrolle. Dieses Vorgehen wurde mit Datensätzen von vier Versuchen wiederholt. Anschließend wurden die so erhaltenen Listen miteinander verglichen und solche Massen ausgewählt, die in allen vier Versuchen eine höhere Signalintensität als die Kontrolle aufwiesen. Die so erhaltenen Massen wurden dahingehend überprüft, ob entsprechende  $^{13}\text{C}$ -Isotopmassen im Spektrum gefunden werden konnten. Damit wurde überprüft, ob es sich bei den erhaltenen Massen um natürliche organische Substanzen handelte. In der Natur kommen die Isotope  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  in einem Verhältnis von  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C} = 1,1\%$  pro C-Atom vor. Das heißt zu jeder natürlichen organischen Verbindung existiert ein korrespondierender Peak des  $^{13}\text{C}$ -Isotops in einem Massenabstand von 1,003355. Weiterhin wurde überprüft, ob es sich bei den gefundenen Massen um „echte“ Massenpeaks handelt. Diese Überprüfung kann im folgenden Chromatogramm (Abb. 81) nachvollzogen werden. Diese Satellitenpeaks können falsch positive Ergebnisse bei der vergleichenden Analyse liefern und müssen daher aus der Massenliste entfernt werden.



**Abb. 81 Chromatogramm mit Satellitenpeaks**

In dem Chromatogramm ist ein Peak zusammen mit sog. Satellitenpeaks abgebildet. Dabei wurde die Peakintensität gegen die Masse [m/z] aufgetragen. Der schwarze Pfeil markiert einen „echten“ Peak. Die Satellitenpeaks sind mit einem roten Pfeil markiert. Diese Peaks entstehen, durch Ungenauigkeiten in der Berechnung nach der Fourier-Transformation. Diese Peaks können mit dem Gauß-Algorithmus aus den Massenlisten entfernt werden.

In einem weiteren Schritt wurden die Massenlisten der RCAR/PP2C Rezeptorkomplexe mit Daten des Pflanzenzellextraktes verglichen und solche Massen eliminiert, die nicht dem Pflanzenzellextrakt zugeordnet werden konnten. Anschließend wurde die Summenformel der verbliebenen Massen mit Hilfe der Internetseite <http://www.chemcalc.org/> berechnet. Im Anschluss daran wurde versucht, die Massen durch Datenbankanalyse zu annotieren. Dazu wurde auf die Datenbanken <http://www.chemspider.com/> und <http://masstrix3.helmholtz-muenchen.de/masstrix3/> zugegriffen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. **Abdi H, Williams LJ.** 2010. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* **2**:433–459.
2. **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). *Science* **159**:1493.
3. **Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R.** 1997. Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *J Chem Ecol* **23**:1689–1702. doi:10.1023/B:JOEC.0000006444.79951.75.
4. **Amen RD.** 1968. A model of seed dormancy. *The Botanical Review* **34**:1–31.
5. **Annesley TM.** 2003. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* **49**:1041–1044. doi:10.1373/49.7.1041.
6. **Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Rodrigues A, Pizzio GA, Rodriguez PL.** 2012. Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiol* **158**:970–980. doi:10.1104/pp.111.188623.
7. **Atkinson NJ, Urwin PE.** 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* **63**:3523–3543. doi:10.1093/jxb/ers100.
8. **Benson CL, Kepka M, Wunschel C, Rajagopalan N, Nelson KM, Christmann A, Abrams SR, Grill E, Loewen MC.** 2015. Abscisic acid analogs as chemical probes for dissection of abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **113**:96–107. doi:10.1016/j.phytochem.2014.03.017.
9. **Blum A.** 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research* **112**:119–123.
10. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248–254.
11. **Bruzzone S, Bodrato N, Usai C, Guida L, Moreschi I, Nano R, Antonioli B, Fruscione F, Magnone M, Scarfi S, Flora A de, Zocchi E.** 2008. Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger. *J Biol Chem* **283**:32188–32197. doi:10.1074/jbc.M802603200.
12. **Bruzzone S, Moreschi I, Usai C, Guida L, Damonte G, Salis A, Scarfi S, Millo E, Flora A de, Zocchi E.** 2007. Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5759–5764. doi:10.1073/pnas.0609379104.

13. **Buhrman DL, Price PI, Rudewicz PJ.** 1996. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry. A study of ion suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **7**:1099–1105. doi:10.1016/S1044-0305(96)00072-4.
14. **Buhrman DL, Price PI, Rudewiczcor PJ.** 1996. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a study of ion suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **7**:1099–1105.
15. **Callister SJ, Barry RC, Adkins JN, Johnson ET, Qian W, Webb-Robertson BM, Smith RD, Lipton MS.** 2006. Normalization Approaches for Removing Systematic Biases Associated with Mass Spectrometry and Label-Free Proteomics. *J. Proteome Res.* **5**:277–286. doi:10.1021/pr050300l.
16. **Cao M, Liu X, Zhang Y, Xue X, Zhou XE, Melcher K, Gao P, Wang F, Zeng L, Zhao Y, Deng P, Zhong D, Zhu J, Xu HE, Xu Y.** 2013. An ABA-mimicking ligand that reduces water loss and promotes drought resistance in plants. *Cell Res* **23**:1043–1054. doi:10.1038/cr.2013.95.
17. **Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, Delucas LJ.** 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**:295–301. doi:10.1107/S09074444906052024.
18. **Cho SK, Ryu MY, Seo DH, Kang BG, Kim WT.** 2011. The Arabidopsis RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP2 plays combinatory roles with AtAIRP1 in abscisic acid-mediated drought stress responses. *Plant Physiol* **157**:2240–2257. doi:10.1104/pp.111.185595.
19. **Chong J, Poutaraud A, Huguency P.** 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* **177**:143–155. doi:10.1016/j.plantsci.2009.05.012.
20. **Christians U, Klawitter J, Hornberger A, Klawitter J.** 2011. How Unbiased is Non-Targeted Metabolomics and is Targeted Pathway Screening the Solution? *CPB* **12**:1053–1066. doi:10.2174/138920111795909078.
21. **Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A.** 2005. Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**:209–219. doi:10.1104/pp.104.053082.
22. **Ciais P, Reichstein M, Viovy N, Granier A, Ogée J, Allard V, Aubinet M, Buchmann N, Bernhofer C, Carrara A, Chevallier F, Noblet N de, Friend AD, Friedlingstein P, Grünwald T, Heinesch B, Keronen P, Knohl A, Krinner G, Loustau D, Manca G, Matteucci G, Miglietta F, Ourcival JM, Papale D, Pilegaard K, Rambal S, Seufert G, Soussana JF, Sanz MJ, Schulze ED, Vesala T, Valentini R.** 2005. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **437**:529–533. doi:10.1038/nature03972.
23. **Ciha AJ, Brenner ML, Brun WA.** 1977. Rapid separation and quantification of abscisic Acid from plant tissues using high performance liquid chromatography. *Plant Physiol* **59**:821–826.

24. **Comisarow MB, Marshall AG.** 1974. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical physics letters* **25**:282–283.
25. **Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF.** 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15243–15248. doi:10.1073/pnas.0406069101.
26. **Cordero C, Liberto E, Bicchi C, Rubiolo P, Reichenbach SE, Tian X, Tao Q.** 2010. Targeted and Non-Targeted Approaches for Complex Natural Sample Profiling by GCxGC-qMS. *Journal of Chromatographic Science* **48**:251–261. doi:10.1093/chromsci/48.4.251.
27. **Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S.** 2005. Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol* **137**:724–737. doi:10.1104/pp.104.055806.
28. **Cuatrecasas P.** 1971. Affinity chromatography. *Annu Rev Biochem* **40**:259–278. doi:10.1146/annurev.bi.40.070171.001355.
29. **Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB.** 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**:636–643.
30. **Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR.** 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**:651–679. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
31. **Dehmelt HG.** 1954. Nuclear quadrupole resonance. *American Journal of Physics* **22**:110–120.
32. **Delaunois B, Cordelier S, Conreux A, Clément C, Jeandet P.** 2009. Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnology Journal* **7**:2–12. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00377.x.
33. **Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, Latruffe N.** 2011. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1215**:48–59. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05871.x.
34. **Dempster AJ.** 1921. Positive Ray Analysis of Magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **7**:45–47.
35. **Ding J, Sorensen CM, Zhang Q, Jiang H, Jaitly N, Livesay EA, Shen Y, Smith RD, Metz TO.** 2007. Capillary LC coupled with high-mass measurement accuracy mass spectrometry for metabolic profiling. *Anal Chem* **79**:6081–6093. doi:10.1021/ac070080q.
36. **Dixon DP, Edwards R.** 2010. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J Biol Chem* **285**:36322–36329. doi:10.1074/jbc.M110.164806.
37. **Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice Md.** 1968. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**:2240–2249.

38. **Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL.** 2011. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev* **40**:387–426. doi:10.1039/b906712b.
39. **Dunn WB, Erban A, Weber RJM, Creek DJ, Brown M, Breitling R, Hankemeier T, Goodacre R, Neumann S, Kopka J.** 2013. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* **9**:44–66.
40. **Dupeux F, Antoni R, Betz K, Santiago J, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Rubio S, Park S, Cutler SR, Rodriguez PL, Márquez JA.** 2011. Modulation of abscisic acid signaling in vivo by an engineered receptor-insensitive protein phosphatase type 2C allele. *Plant Physiol* **156**:106–116. doi:10.1104/pp.110.170894.
41. **Dupeux F, Santiago J, Betz K, Twycross J, Park S, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Jensen MR, Krasnogor N, Blackledge M, Holdsworth M, Cutler SR, Rodriguez PL, Márquez JA.** 2011. A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *EMBO J* **30**:4171–4184. doi:10.1038/emboj.2011.294.
42. **Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM.** 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**:64–71.
43. **Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD.** 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**:S15-45.
44. **Flavell RA, Sabo DL, Bandle EF, Weissmann C.** 1975. Site-directed mutagenesis: effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Qbeta RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:367–371.
45. **Fuchs S, Grill E, Meskiene I, Schweighofer A.** 2013. Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J* **280**:681–693. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x.
46. **Fuchs S, Tischler SV, Wunschel C, Christmann A, Grill E.** 2014. Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:5741–5746. doi:10.1073/pnas.1322085111.
47. **Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park S, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu J.** 2009. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**:660–664. doi:10.1038/nature08599.
48. **Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2009. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**:2123–2132. doi:10.1093/pcp/pcp147.

49. **Gao G, Zhang S, Wang C, Yang X, Wang Y, Su X, Du J, Yang C.** 2011. Arabidopsis CPR5 independently regulates seed germination and postgermination arrest of development through LOX pathway and ABA signaling. *PLoS ONE* **6**:e19406. doi:10.1371/journal.pone.0019406.
50. **Garnier E, Shipley B, Roumet C, Laurent G.** 2001. A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct Ecology* **15**:688–695. doi:10.1046/j.0269-8463.2001.00563.x.
51. **Giavalisco P, Hummel J, Lisec J, Inostroza AC, Catchpole G, Willmitzer L.** 2008. High-resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole <sup>13</sup>C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas. *Anal Chem* **80**:9417–9425. doi:10.1021/ac8014627.
52. **Gläser K, Kanawati B, Kubo T, Schmitt-Kopplin P, Grill E.** 2014. Exploring the Arabidopsis sulfur metabolome. *Plant J* **77**:31–45. doi:10.1111/tj.12359.
53. **Gohlke RS.** 1959. Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Anal Chem* **31**:535–541.
54. **Gómez-Cadenas A, Pozo OJ, García-Augustín P, Sancho JV.** 2002. Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography--electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* **13**:228–234. doi:10.1002/pca.640.
55. **Gonzalez-Guzman M.** 2002. The Short-Chain Alcohol Dehydrogenase ABA2 Catalyzes the Conversion of Xanthoxin to Abscisic Aldehyde. *THE PLANT CELL ONLINE* **14**:1833–1846. doi:10.1105/tpc.002477.
56. **Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernández MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, Rodriguez PL.** 2012. Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* **24**:2483–2496. doi:10.1105/tpc.112.098574.
57. **González-Guzmán M, Rodríguez L, Lorenzo-Orts L, Pons C, Sarrión-Perdigones A, Fernández MA, Peirats-Llobet M, Forment J, Moreno-Alvero M, Cutler SR, Albert A, Granell A, Rodríguez PL.** 2014. Tomato PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *J Exp Bot* **65**:4451–4464. doi:10.1093/jxb/eru219.
58. **Guerrero F, Mullet JE.** 1986. Increased Abscisic Acid Biosynthesis during Plant Dehydration Requires Transcription. *Plant Physiol* **80**:588–591. doi:10.1104/pp.80.2.588.
59. **Haberer G, Mader MT, Kosarev P, Spannagl M, Yang L, Mayer KF.** 2006. Large-Scale cis-Element Detection by Analysis of Correlated Expression and Sequence Conservation between Arabidopsis and Brassica oleracea. *Plant Physiol* **142**:1589–1602. doi:10.1104/pp.106.085639.

60. **Hamburger M, Adler S, Baumann D, Förg A, Weinreich B.** 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia* **74**:328–338. doi:10.1016/S0367-326X(03)00051-0.
61. **Han S, Kitahata N, Sekimata K, Saito T, Kobayashi M, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshida S, Asami T.** 2004. A novel inhibitor of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in abscisic acid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol* **135**:1574–1582. doi:10.1104/pp.104.039511.
62. **Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Höhener B, Grill E.** 2002. Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J* **21**:3029–3038. doi:10.1093/emboj/cdf316.
63. **Hirayama T, Shinozaki K.** 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* **61**:1041–1052. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04124.x.
64. **Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R, Stüber D.** 1988. Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nat Biotechnol* **6**:1321–1325. doi:10.1038/nbt1188-1321.
65. **Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI.** 2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* **24**:1695–1708. doi:10.1101/gad.1953910.
66. **Iribarne JV, Thomson BA.** 1976. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* **64**:2287–2294.
67. **Jensen JS, Wertz CF, O'Neill VA.** 2010. Preformulation Stability of trans -Resveratrol and trans -Resveratrol Glucoside (Piceid). *J. Agric. Food Chem.* **58**:1685–1690. doi:10.1021/jf903009f.
68. **Jessome LL, Volmer DA.** 2006. Ion suppression: a major concern in mass spectrometry.
69. **Jiang F, Hartung W.** 2008. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot* **59**:37–43. doi:10.1093/jxb/erm127.
70. **Jinwook Seo, Shneiderman B.** 2002. Interactively exploring hierarchical clustering results [gene identification]. *Computer* **35**:80–86. doi:10.1109/MC.2002.1016905.
71. **Joudoi T, Shichiri Y, Kamizono N, Akaike T, Sawa T, Yoshitake J, Yamada N, Iwai S.** 2013. Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**:558–571. doi:10.1105/tpc.112.105049.
72. **Katajamaa M, Orešič M.** 2007. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A* **1158**:318–328. doi:10.1016/j.chroma.2007.04.021.

73. **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 Physiol* **157**:2108–2119. doi:10.1104/pp.111.182584.
74. **Kind T, Fiehn O.** 2006. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics* **7**:234. doi:10.1186/1471-2105-7-234.
75. **Kind T, Fiehn O.** 2007. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* **8**:105. doi:10.1186/1471-2105-8-105.
76. **Kline KG, Sussman MR, Jones AM.** 2010. Abscisic acid receptors. *Plant Physiol* **154**:479–482. doi:10.1104/pp.110.160846.
77. **Klingler JP, Batelli G, Zhu J.** 2010. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot* **61**:3199–3210. doi:10.1093/jxb/erq151.
78. **Krochko JE.** 1998. (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase Is a Cytochrome P450 Monooxygenase. *Plant Physiol* **118**:849–860. doi:10.1104/pp.118.3.849.
79. **Laeter JR de, Böhlke JK, Bièvre P de, Hidaka H, Peiser HS, Rosman KJR, Taylor PDP.** 2003. Atomic weights of the elements. Review 2000 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **75**. doi:10.1351/pac200375060683.
80. **Lagercrantz C, Larsson T, Karlsson H.** 1979. Binding of some fatty acids and drugs to immobilized bovine serum albumin studied by column affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* **99**:352–364. doi:10.1016/S0003-2697(79)80019-6.
81. **Lant MS, Martin LE, Oxford J.** 1985. Qualitative and quantitative analysis of ranitidine and its metabolites by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* **323**:143–152.
82. **Laskin J, Futrell JH.** 2005. Activation of large ions in FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **24**:135–167. doi:10.1002/mas.20012.
83. **Lee KH, Piao HL, Kim H, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee I, Hwang I.** 2006. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126**:1109–1120. doi:10.1016/j.cell.2006.07.034.
84. **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. doi:10.1105/tpc.9.5.759.
85. **Lewis GN.** 1916. THE ATOM AND THE MOLECULE. *J. Am. Chem. Soc.* **38**:762–785. doi:10.1021/ja02261a002.

86. **Li H, Jiang H, Bu Q, Zhao Q, Sun J, Xie Q, Li C.** 2011. The Arabidopsis RING finger E3 ligase RHA2b acts additively with RHA2a in regulating abscisic acid signaling and drought response. *Plant Physiol* **156**:550–563. doi:10.1104/pp.111.176214.
87. **Li W, Wang L, Sheng X, Yan C, Zhou R, Hang J, Yin P, Yan N.** 2013. Molecular basis for the selective and ABA-independent inhibition of PP2CA by PYL13. *Cell Res* **23**:1369–1379. doi:10.1038/cr.2013.143.
88. **Li Y, Walton DC.** 1990. Violaxanthin Is an Abscisic Acid Precursor in Water-Stressed Dark-Grown Bean Leaves. *Plant Physiol* **92**:551–559. doi:10.1104/pp.92.3.551.
89. **Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S.** 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* **41**:98–105. doi:10.1016/j.pep.2005.01.019.
90. **Ling MM, Robinson BH.** 1997. Approaches to DNA Mutagenesis. An Overview. *Analytical Biochemistry* **254**:157–178. doi:10.1006/abio.1997.2428.
91. **Liu J, Ekramoddoullah AKM.** 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**:3–13.
92. **Lüttge U, Beyschlag W, Cushman J** (ed.). 2014. *Progress in Botany*. Progress in Botany. Springer Berlin Heidelberg.
93. **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. doi:10.1126/science.1172408.
94. **Maldiney R, Leroux B, Sabbagh I, Sotta B, Sossountzov L, Miginiac E.** 1986. A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones. Auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *Journal of Immunological Methods* **90**:151–158. doi:10.1016/0022-1759(86)90070-0.
95. **Marshall AG, Hendrickson CL.** 2008. High-resolution mass spectrometers. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**:579–599.
96. **Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS.** 1998. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass spectrometry reviews* **17**:1–35.
97. **Mason AB, He Q, Halbrooks PJ, Everse SJ, Gumerov DR, Kaltashov IA, Smith VC, Hewitt J, MacGillivray RTA.** 2002. Differential Effect of a His Tag at the N- and C-Termini. *Functional Studies with Recombinant Human Serum Transferrin †*. *Biochemistry* **41**:9448–9454. doi:10.1021/bi025927l.
98. **Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T, Shinohara A, Nakata M.** 1999. Evaluation of the Antioxidant Activity of Environmental Plants. Activity of the Leaf Extracts from Seashore Plants. *J. Agric. Food Chem.* **47**:1749–1754. doi:10.1021/jf980864s.

99. **Mauch-Mani B, Mauch F.** 2005. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:409–414. doi:10.1016/j.pbi.2005.05.015.
100. **Meinhard M, Grill E.** 2001. Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *FEBS Letters* **508**:443–446. doi:10.1016/S0014-5793(01)03106-4.
101. **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. doi:10.1007/s00425-001-0675-3.
102. **Melcher K, Ng L, Zhou XE, Soon F, Xu Y, Suino-Powell KM, Park S, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong E, Volkman BF, Cutler SR, Zhu J, Xu HE.** 2009. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**:602–608. doi:10.1038/nature08613.
103. **Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY.** 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**:969–980. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054.
104. **Meyer K, Leube MP, Grill E.** 1994. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Science* **264**:1452–1455.
105. **Middleditch BS, Zlatkis A.** 1987. Artifacts in Chromatography. An Overview. *Journal of Chromatographic Science* **25**:547–551. doi:10.1093/chromsci/25.12.547.
106. **Middleditch BS.** 1989. Analytical artifacts. GC, MS, HPLC, TLC, and PC. *Journal of chromatography library*, v. 44. Elsevier, Amsterdam, New York. <http://www.sciencedirect.com/science/publication?issn=03014770&volume=44>.
107. **Milborrow BV.** 1969. Current research on abscisic acid. *Biochem J* **114**:1P-3P.
108. **Milborrow BV.** 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants. A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot* **52**:1145–1164. doi:10.1093/jexbot/52.359.1145.
109. **Milborrow BV, Noddle RC.** 1970. Conversion of 5-(1,2-epoxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl)-3-methylpenta-cis-2-trans-4-dienoic acid into abscisic acid in plants. *Biochem J* **119**:727–734.
110. **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. doi:10.1126/science.1123769.
111. **Mittelheuser CJ, van Steveninck RF.** 1969. Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. *Nature* **221**:281–282.

112. **Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang H, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira K, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M.** 2009. Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**:609–614. doi:10.1038/nature08583.
113. **Nambara E, Marion-Poll A.** 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**:165–185. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046.
114. **Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM.** 2001. erratum. Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **411**:219. doi:10.1038/35075627.
115. **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. doi:10.1126/science.1181829.
116. **Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park S, 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. *Plant J* **61**:290–299. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04054.x.
117. **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. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03107.x.
118. **Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE.** 1963. Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142**:1592–1593. doi:10.1126/science.142.3599.1592.
119. **Ohta D, Kanaya S, Suzuki H.** 2010. Application of Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to metabolic profiling and metabolite identification. *Curr Opin Biotechnol* **21**:35–44. doi:10.1016/j.copbio.2010.01.012.
120. **Okamoto M, Peterson FC, Defries A, Park S, Endo A, Nambara E, Volkman BF, Cutler SR.** 2013. Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:12132–12137. doi:10.1073/pnas.1305919110.
121. **Park S, 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 J, 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. doi:10.1126/science.1173041.
122. **Park S, Peterson FC, Mosquana A, Yao J, Volkman BF, Cutler SR.** 2015. Agrochemical control of plant water use using engineered abscisic acid receptors. *Nature* **520**:545–548. doi:10.1038/nature14123.
123. **Paterson AH, Lan T, Amasino R, Osborn TC, Quiros C.** 2001. *Genome Biol* **2**:reviews1011.1. doi:10.1186/gb-2001-2-3-reviews1011.

124. **Paul K. Crellin, Chu-Yuan Luo, Yasu S. Morita** (ed.). 2013. Metabolism of Plasma Membrane Lipids in Mycobacteria and Corynebacteria. INTECH Open Access Publisher.
125. **Peterson FC, Burgie ES, Park S, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA, Chang CA, Cutler SR, Phillips GN, Volkman BF**. 2010. Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nat Struct Mol Biol* **17**:1109–1113. doi:10.1038/nsmb.1898.
126. **Planchet E, Rannou O, Ricoult C, Boutet-Mercey S, Maia-Grondard A, Limami AM**. 2011. Nitrogen metabolism responses to water deficit act through both abscisic acid (ABA)-dependent and independent pathways in *Medicago truncatula* during post-germination. *J Exp Bot* **62**:605–615. doi:10.1093/jxb/erq294.
127. **Puma P, Buxser SE, Watson L, Kelleher DJ, Johnson GL**. 1983. Purification of the receptor for nerve growth factor from A875 melanoma cells by affinity chromatography. *J Biol Chem* **258**:3370–3375.
128. **Radauer C, Lackner P, Breiteneder H**. 2008. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol Biol* **8**:286. doi:10.1186/1471-2148-8-286.
129. **Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E**. 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* **15**:395–401. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.006.
130. **Rayleigh L**. 1882. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **14**:184–186.
131. **Rehm H, Lazdunski M**. 1988. Purification and subunit structure of a putative K<sup>+</sup>-channel protein identified by its binding properties for dendrotoxin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4919–4923.
132. **Rehm H, Letzel T**. 2010. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Experimentator, 6th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
133. **Rivier L, Milon H, Pilet P**. 1977. Gas chromatography-mass spectrometric determinations of abscisic acid levels in the cap and the apex of maize roots. *Planta*. *Planta* **134**:23–27. doi:10.1007/BF00390089.
134. **Rodriguez PL, Leube MP, Grill E**. 1998. Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol* **38**:879–883.
135. **Ross ARS, Ambrose SJ, Cutler AJ, Feurtado JA, Kermod AR, Nelson K, Zhou R, Abrams SR**. 2004. Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Analytical Biochemistry* **329**:324–333. doi:10.1016/j.ab.2004.02.026.

136. **Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim T, Santiago J, Flexas J, Schroeder JI, Rodriguez PL.** 2009. Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* **150**:1345–1355. doi:10.1104/pp.109.137174.
137. **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. *The Plant Journal* **37**:354–369. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01966.x.
138. **Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodriguez PL.** 2006. Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* **141**:1389–1399. doi:10.1104/pp.106.081018.
139. **Santiago J, Dupeux F, Betz K, Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Márquez JA, Rodriguez PL.** 2012. Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs. *Plant Sci* **182**:3–11. doi:10.1016/j.plantsci.2010.11.014.
140. **Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park S, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Márquez JA.** 2009. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**:665–668. doi:10.1038/nature08591.
141. **Santner A, Estelle M.** 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**:1071–1078. doi:10.1038/nature08122.
142. **Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ.** 2001. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**:327–330. doi:10.1038/35066500.
143. **Schulze K, Schreiber L, Szankowski I.** 2005. Inhibiting Effects of Resveratrol and Its Glucoside Piceid against *Venturia inaequalis* the Causal Agent of Apple Scab. *J. Agric. Food Chem.* **53**:356–362. doi:10.1021/jf048375h.
144. **Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA.** 2001. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* **276**:25208–25211. doi:10.1074/jbc.M102146200.
145. **Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD.** 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* **131**:1591–1601. doi:10.1104/pp.102.017921.
146. **Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I.** 2004. Plant PP2C phosphatases. Emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**:236–243. doi:10.1016/j.tplants.2004.03.007.
147. **Senior JK.** 1951. Partitions and Their Representative Graphs. *American Journal of Mathematics* **73**:663. doi:10.2307/2372318.

148. **Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiwa 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. doi:10.1073/pnas.220426197.
149. **Seutter von Loetzen C, Hoffmann T, Hartl MJ, Schweimer K, Schwab W, Rösch P, Hartl-Spiegelhauer O.** 2014. Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1. Identification of the physiological ligand. *Biochem. J.* **457**:379–390. doi:10.1042/BJ20130413.
150. **Sheen J.** 1998. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:975–980.
151. **Shinohara H, Matsubayashi Y.** 2007. Functional immobilization of plant receptor-like kinase onto microbeads towards receptor array construction and receptor-based ligand fishing. *Plant J* **52**:175–184. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03204.x.
152. **Soon F, Ng L, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MHE, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang H, Yang H, Jiang H, Li J, Yong E, Cutler S, Zhu J, Griffin PR, Melcher K, Xu HE.** 2012. Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* **335**:85–88. doi:10.1126/science.1215106.
153. **Stalikas CD.** 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* **30**:3268–3295. doi:10.1002/jssc.200700261.
154. **Suhre K, Schmitt-Kopplin P.** 2008. MassTRIX: mass translator into pathways. *Nucleic Acids Res* **36**:W481-4. doi:10.1093/nar/gkn194.
155. **Sun D, Wang H, Wu M, Zang J, Wu F, Tian C.** 2012. Crystal structures of the Arabidopsis thaliana abscisic acid receptor PYL10 and its complex with abscisic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **418**:122–127. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.145.
156. **Sun H, Wang X, Ding W, Zhu S, Zhao R, Zhang Y, Xin Q, Wang X, Zhang D.** 2011. Identification of an important site for function of the type 2C protein phosphatase ABI2 in abscisic acid signalling in Arabidopsis. *J Exp Bot* **62**:5713–5725. doi:10.1093/jxb/err274.
157. **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. *The Plant Journal* **29**:417–426.
158. **Takeuchi J, Okamoto M, Akiyama T, Muto T, Yajima S, Sue M, Seo M, Kanno Y, Kamo T, Endo A, Nambara E, Hirai N, Ohnishi T, Cutler SR, Todoroki Y.** 2014. Designed abscisic acid analogs as antagonists of PYL-PP2C receptor interactions. *Nat Chem Biol* **10**:477–482. doi:10.1038/nchembio.1524.

159. **Tang K, Zhan J, Yang H, Huang W.** 2010. Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. *Journal of Plant Physiology* **167**:95–102. doi:10.1016/j.jplph.2009.07.011.
160. **Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J.** 2007. Frontal affinity chromatography. Sugar–protein interactions. *Nat Protoc* **2**:2529–2537. doi:10.1038/nprot.2007.357.
161. **Taylor PJ.** 2005. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* **38**:328–334. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.
162. **Terpe K.** 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol* **60**:523–533. doi:10.1007/s00253-002-1158-6.
163. **Thomson JJ.** 1897. Cathode Rays. *Philosophical Magazine* **90**:25–29. doi:10.1080/14786431003659214.
164. **Thomson JJ.** 1913. Bakerian lecture: Rays of positive electricity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*:1–20.
165. **Town CD.** 2006. Comparative Genomics of Brassica oleracea and Arabidopsis thaliana Reveal Gene Loss, Fragmentation, and Dispersal after Polyploidy. *THE PLANT CELL ONLINE* **18**:1348–1359. doi:10.1105/tpc.106.041665.
166. **Tsuzuki T, Takahashi K, Inoue S, Okigaki Y, Tomiyama M, Hossain MA, Shimazaki K, Murata Y, Kinoshita T.** 2011. Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in Arabidopsis thaliana. *J Plant Res* **124**:527–538. doi:10.1007/s10265-011-0426-x.
167. **Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2010. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* **51**:1821–1839. doi:10.1093/pcp/pcq156.
168. **van Ha C, Leyva-González MA, Osakabe Y, Tran UT, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Yamaguchi S, van Dong N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Herrera-Estrella L, Tran LP.** 2014. Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:851–856. doi:10.1073/pnas.1322135111.
169. **Wilchek M, Miron T.** 1987. Limitations of N-hydroxysuccinimide esters in affinity chromatography and protein immobilization. *Biochemistry* **26**:2155–2161.
170. **Wilkinson S, Davies WJ.** 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, cell & environment* **25**:195–210.

171. **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. doi:10.1371/journal.pone.0000718.
172. **Wise BM, Gallagher NB, Butler SW, White DD, Barna GG.** 1999. A comparison of principal component analysis, multiway principal component analysis, trilinear decomposition and parallel factor analysis for fault detection in a semiconductor etch process. *J. Chemometrics* **13**:379–396. doi:10.1002/(SICI)1099-128X(199905/08)13:3/4<379:AID-CEM556>3.0.CO;2-N.
173. **Woestenenk E, Hammarström M, van den Berg S, Härd T, Berglund H.** 2004. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *Journal of Structural and Functional Genomics. J Struct Func Genom* **5**:217–229. doi:10.1023/B:jsfg.0000031965.37625.0e.
174. **Xiong L.** 2003. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiol* **133**:29–36. doi:10.1104/pp.103.025395.
175. **Yang Y, Sulpice R, Himmelbach A, Meinhard M, Christmann A, Grill E.** 2006. Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:6061–6066. doi:10.1073/pnas.0501720103.
176. **Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Di Wu, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N.** 2009. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* **16**:1230–1236. doi:10.1038/nsmb.1730.
177. **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. doi:10.1104/pp.105.070128.
178. **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. *Journal of Biological Chemistry* **285**:28953–28958. doi:10.1074/jbc.M110.160192.
179. **Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP.** 2000. RNAi. *Cell* **101**:25–33. doi:10.1016/S0092-8674(00)80620-0.
180. **Zeevaart JAD.** 1980. Changes in the Levels of Abscisic Acid and Its Metabolites in Excised Leaf Blades of *Xanthium strumarium* during and after Water Stress. *Plant Physiol* **66**:672–678. doi:10.1104/pp.66.4.672.
181. **Zeevaart JA, Creelman RA.** 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **39**:439–473.
182. **Zhao Y, Chan Z, Xing L, Liu X, Hou Y, Chinnusamy V, Wang P, Duan C, Zhu J.** 2013. The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell Res* **23**:1380–1395. doi:10.1038/cr.2013.149.

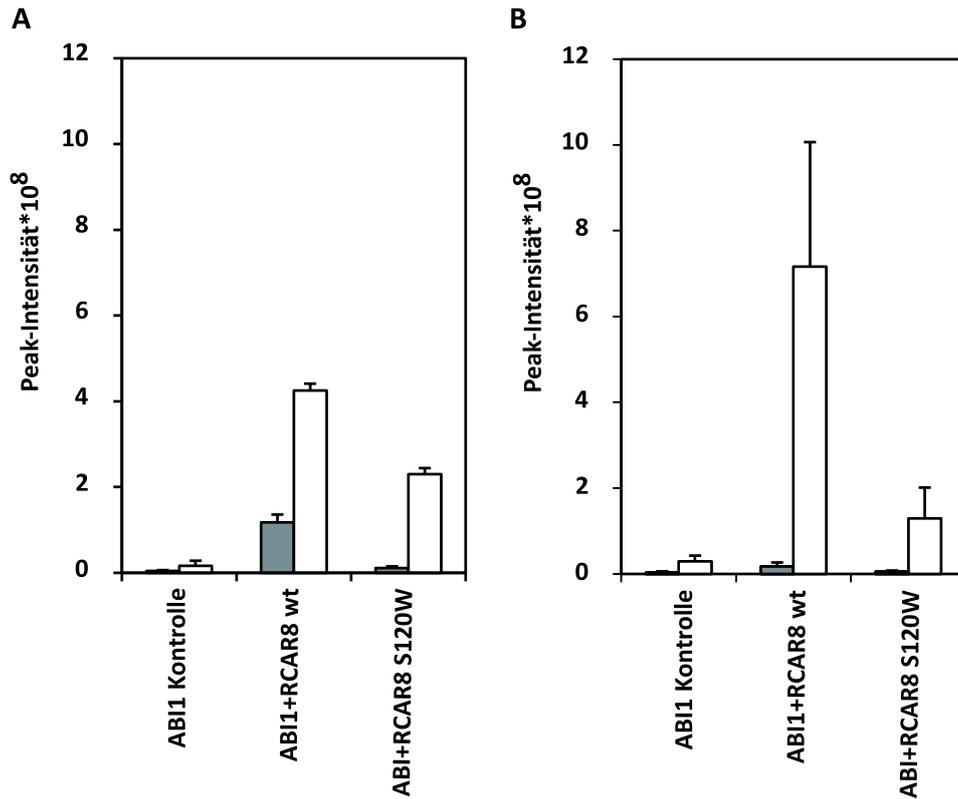
183. **Zhao Y, Chow TF, Puckrin RS, Alfred SE, Korir AK, Larive CK, Cutler SR.** 2007. Chemical genetic interrogation of natural variation uncovers a molecule that is glycoactivated. *Nat Chem Biol* **3**:716–721. doi:10.1038/nchembio.2007.32.

## 6. Anhang

### 6.1. Klonierte Konstrukte

Protein	Strain	Primer Forward/Reverse	Schnittstellen	Vektor	Template DNA	E. coli Stamm	Expression
<b>ΔABI1</b>	4480	GATC <b>CATATG</b> AGTGTGCCTTTGTATGGTTT GATC <b>CTCGAG</b> CTTGAGTTTCTCCGAGGCTTC	NdeI, XhoI	pET21a+	cDNA wt Columbia	BL21	2h, 37°C, 0,5 mM IPTG
<b>RCAR1</b>		GATG <b>CATATG</b> ATGGACGGCGTTGAAGG GATC <b>GGATCCT</b> CACTGAGTAATGTCTTGAGA	NdeI, BamHI	pET21a+	cDNA wt Columbia	BL21	20h, 18°C, 0,5 mM IPTG
<b>RCAR3</b>		GTT <b>CCATATG</b> GAAAGCTAACGGGATTGAG GAA <b>GGATCCT</b> TTAGACTCTCGATTCTGTCGT	NdeI, BamHI	pET21a+	cDNA wt Columbia	BL21	20h, 18°C 1% Laktose
<b>RCAR4</b>		GATC <b>CATATG</b> AACGGTACGAAACAAAGAA GATC <b>CTCGAG</b> TCATATCTTCTCCATAGATTTC	NdeI, XhoI	pET21a+	cDNA wt Columbia	BL21	20h, 18°C, 0,5 mM IPTG
<b>RCAR8 K87L</b>		GAAAGGTTTACGAGAACTTCATCAGAC GGATTATCGAAACGCCGC		pQE70 mit RCAR8 wt	pQE70 Vektor mit RCAR8 wt	M15	4h, 37°C, 0,5 mM IPTG
<b>RCAR8 S120A</b>		GGCGTCTCGGCCACCGAGAGG GGGAGTCCAGAGACCACC		pQE70 mit RCAR8 wt	pQE70 Vektor mit RCAR8 wt	M15	4h, 37°C, 0,5 mM IPTG
<b>RCAR8 S120W</b>		GGCGTCTCGTGGACCGAGAGGC GGGAGTCCAGAGACCACCATG		pQE70 mit RCAR8 wt	pQE70 Vektor mit RCAR8 wt	M15	4h, 37°C, 0,5 mM IPTG
<b>RCAR8 S120 F</b>		GGCGTCTCGTTCACCGAGAGG GGGAGTCCAGAGACCACC		pQE70 mit RCAR8 wt	pQE70 Vektor mit RCAR8 wt	M15	4h, 37°C, 0,5 mM IPTG

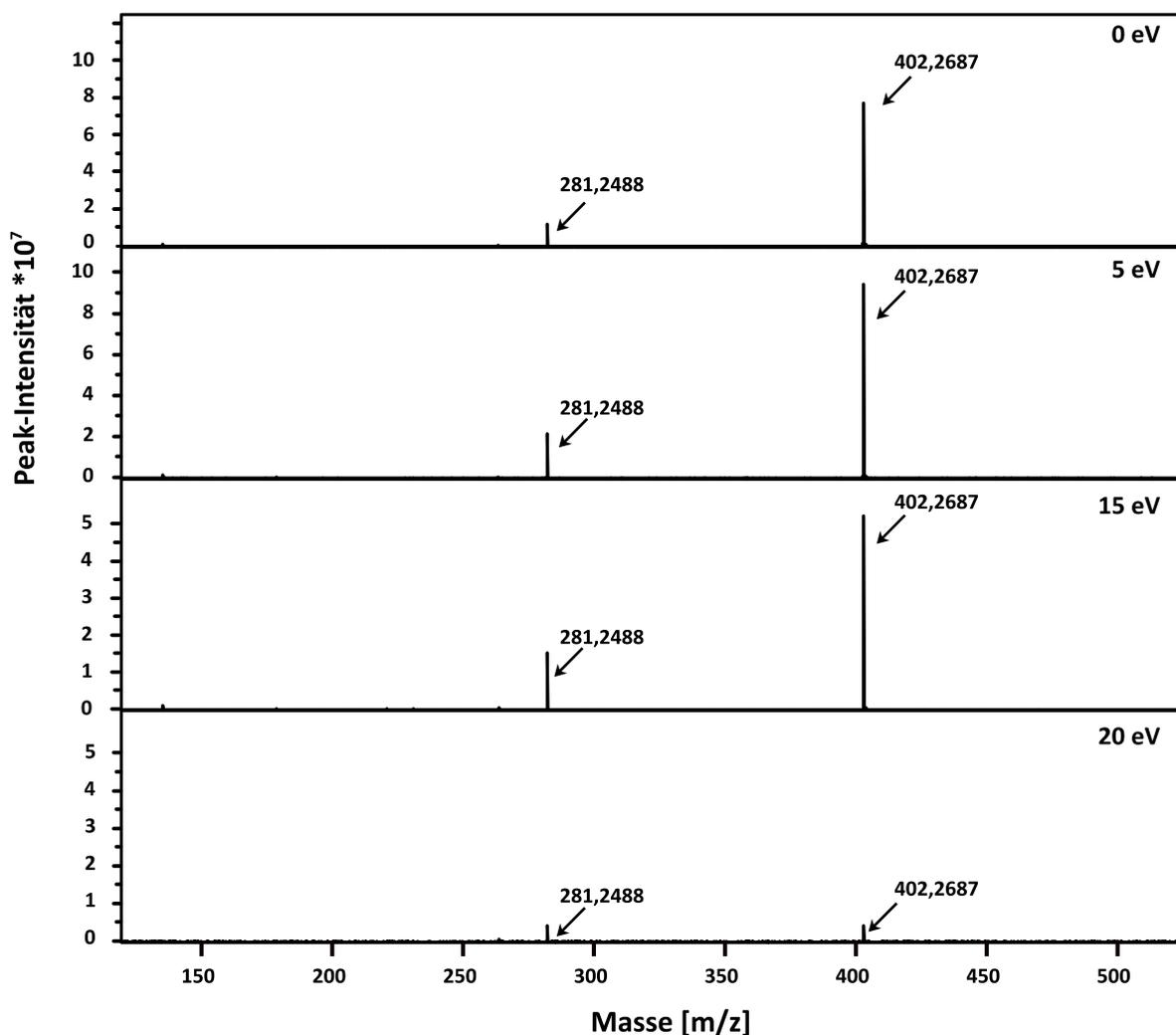
## 6.2. *E.coli* Liganden L389 und L422 in MS-Analyse der RCAR8 Mutante S120W



**Anhang 1 E.coli Liganden L389 und L422 in MS-Analyse von RCAR8 S120W**

Die Abbildung zeigt das Verhalten der E.coli Peaks L398 (grau) und L422 (weiß) bei vergleichender MS-Analyse von ABI1 Kontrolle, ABI/RCAR8 wt Rezeptorkomplex und ABI1/RCAR8 S120 W Komplex. Dargestellt sind Daten aus zwei Versuchen mit je vier technischen Replikaten pro Gruppe.

6.3. Fragmentierung von *E.coli* Ligand L403

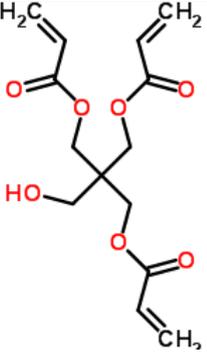
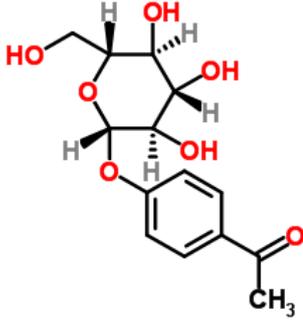
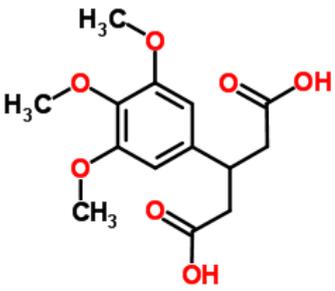
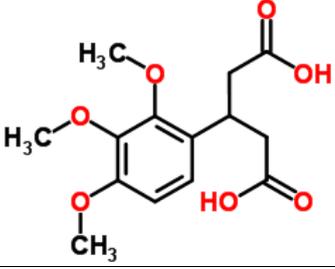
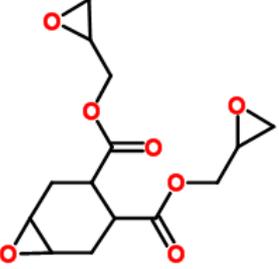


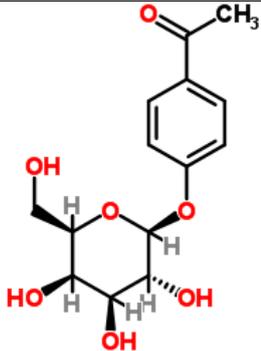
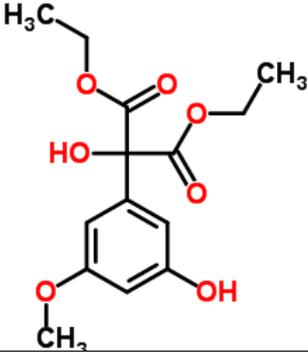
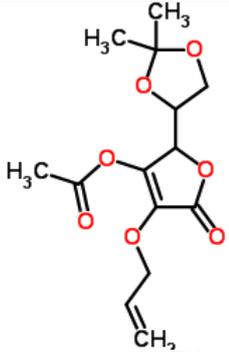
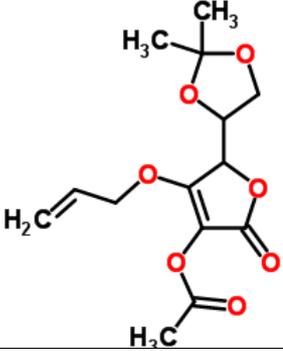
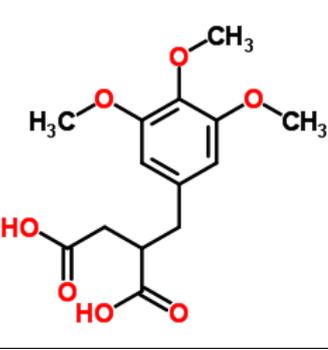
#### Anhang 2 Fragmentierung des E.coli Liganden L403

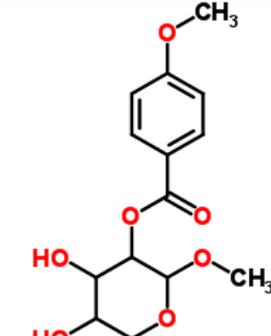
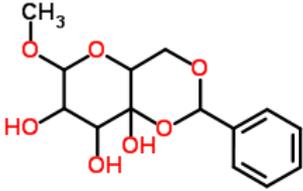
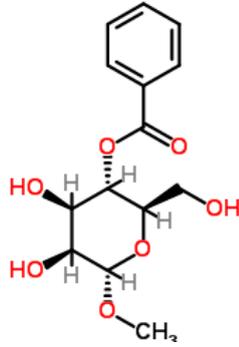
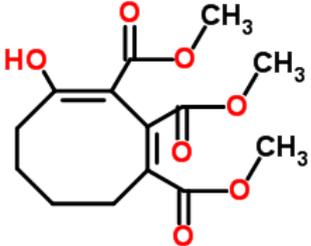
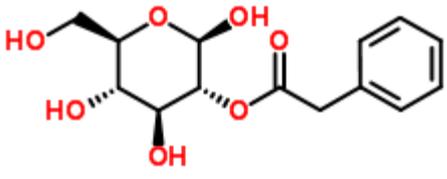
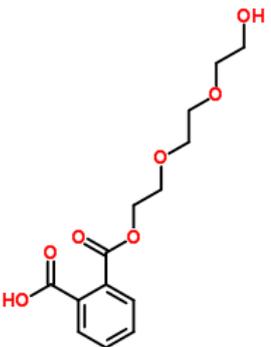
Der Ligand L403 wurde nach einer Akkumulationszeit von zehn Millisekunden mit einer steigenden kinetischen Energie von 5, 15 und 20 eV fragmentiert. Die Erfassung der Fragmentierung erfolgte mit 20 Scans im negativen Modus. Der mit 0 eV markierte Teil der Grafik zeigt die Ionen vor der Fragmentierung.

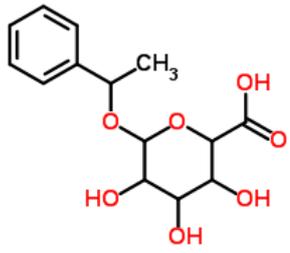
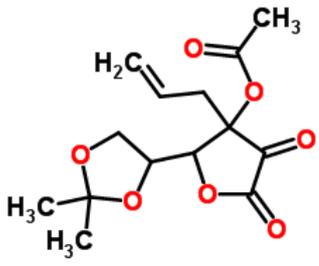
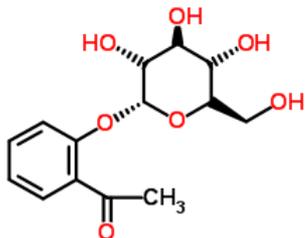
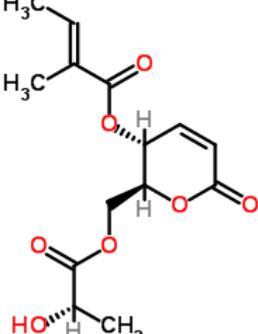
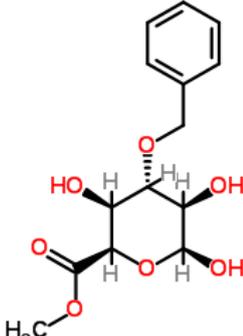
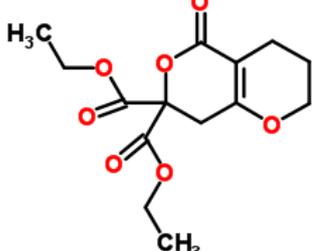
#### 6.4. Strukturvorschläge für den Liganden L298 (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>) –Quelle Chemspider

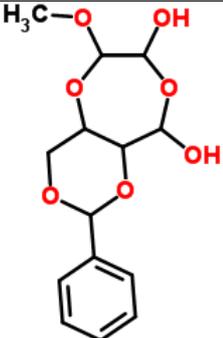
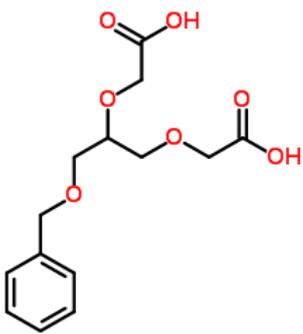
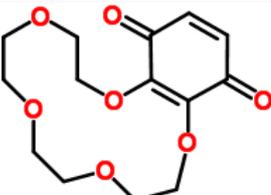
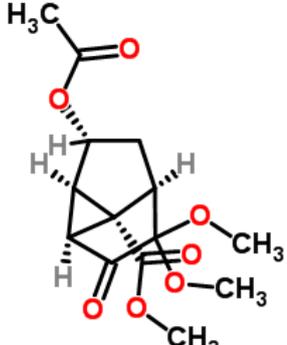
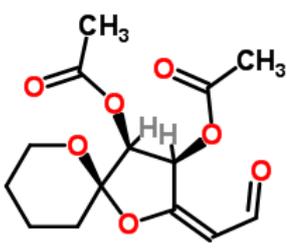
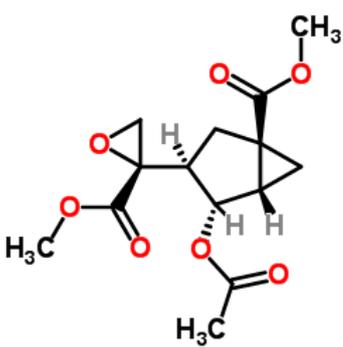
Struktur	Name
----------	------

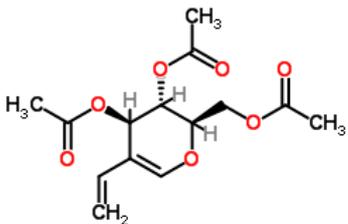
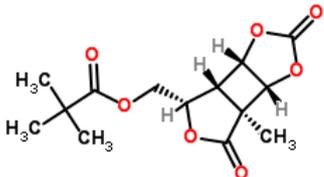
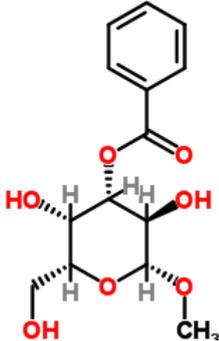
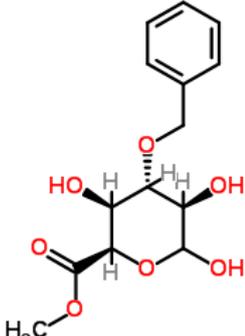
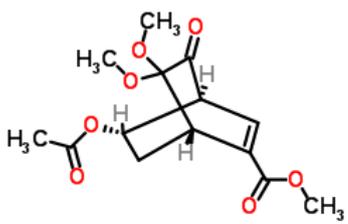
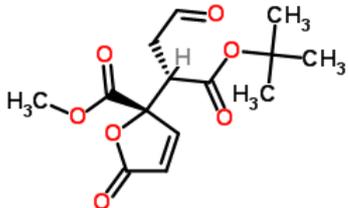
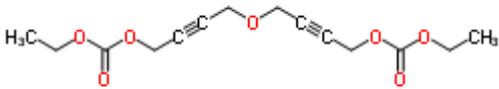
 <p>The structure shows a central carbon atom bonded to four groups: a hydroxyl group (HO-), a hydroxymethyl group (-CH<sub>2</sub>OH), and two acrylate groups (-O-C(=O)-CH=CH<sub>2</sub>). The acrylate groups are shown with their vinyl end groups (H<sub>2</sub>C= and =CH<sub>2</sub>).</p>	Pentaerythritol triacrylate
 <p>The structure shows a pyranose ring with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6. At C-4, there is a benzene ring with a methyl ketone group (-C(=O)CH<sub>3</sub>) at the para position.</p>	Ameliosid
 <p>The structure shows a benzene ring with methoxy groups (-OCH<sub>3</sub>) at positions 3, 4, and 5. At position 1, there is a pentanedioic acid chain (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH).</p>	3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)pentanedioic acid
 <p>The structure shows a benzene ring with methoxy groups (-OCH<sub>3</sub>) at positions 2, 3, and 4. At position 1, there is a pentanedioic acid chain (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH).</p>	3-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)pentanedioic acid
 <p>The structure shows a bicyclic core consisting of a six-membered ring fused to a five-membered ring, with an oxygen atom at the bridgehead. At the 3 and 4 positions of the six-membered ring, there are two ester groups (-COO-). Each ester group is linked to a 2-oxiranylmethyl group (-CH<sub>2</sub>-epoxide).</p>	Bis(2-oxiranylmethyl) 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-3,4-dicarboxylate

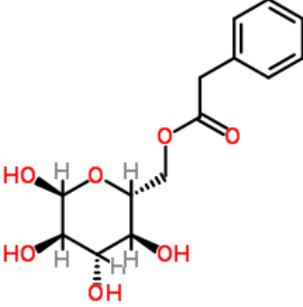
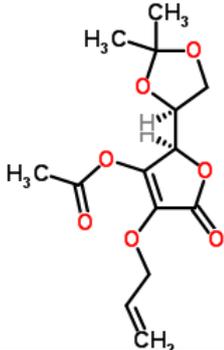
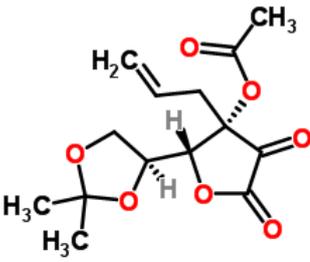
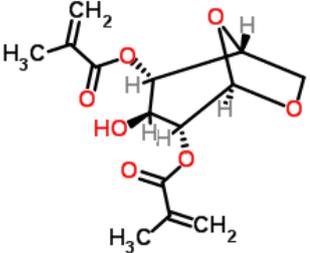
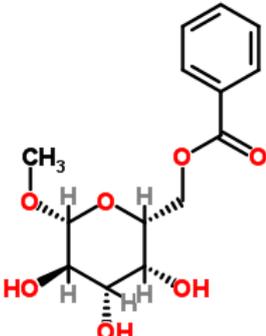
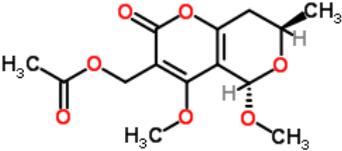
	4-Acetylphenyl $\beta$ -D-galactopyranoside
	Diethyl hydroxy(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)malonate
	4-(Allyloxy)-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-5-oxo-2,5-dihydro-3-furanyl acetate
	4-(Allyloxy)-5-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-oxo-2,5-dihydro-3-furanyl acetate
	2-(3,4,5-Trimethoxybenzyl)succinic acid

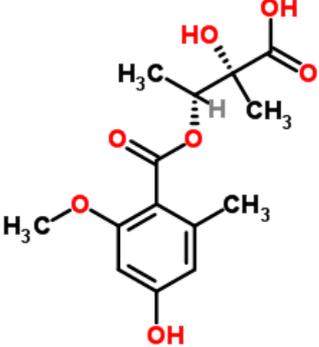
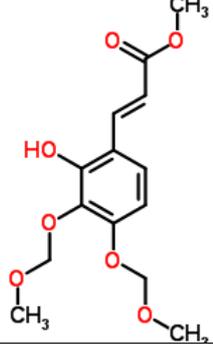
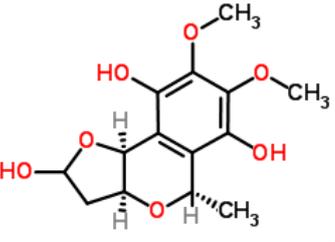
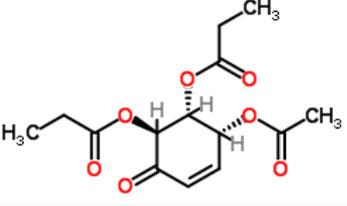
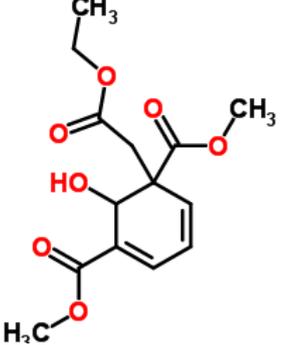
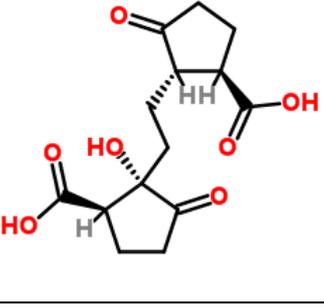
 <p>The structure shows a five-membered pyranose ring with hydroxyl groups at the 3 and 4 positions. The 2-position is linked via an oxygen atom to a carbonyl group, which is further connected to a para-methoxyphenyl ring. A methoxy group is attached to the 5-position of the ring.</p>	Methyl 2-O-(4-methoxybenzoyl)pentopyranoside
 <p>The structure is a complex bicyclic system consisting of a tetrahydropyran ring fused to a 1,3-dioxine ring. It features a phenyl group at the 2-position, a methoxy group at the 6-position, and hydroxyl groups at the 7, 8, and 8a positions.</p>	6-Methoxy-2-phenyltetrahydropyrano[3,2-d][1,3]dioxine-7,8,8a(6H)-triol
 <p>The structure shows a six-membered pyranose ring in its chair conformation. It has hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions. The 4-position is linked via an oxygen atom to a carbonyl group, which is connected to a phenyl ring. A methoxy group is attached to the 5-position.</p>	Methyl 4-O-benzoyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside
 <p>The structure is a bicyclic system with two fused eight-membered rings. It contains two double bonds in a (1Z,3Z) configuration, a hydroxyl group, and three methyl ester groups attached to the rings.</p>	Trimethyl (1Z,3Z)-4-hydroxy-1,3-cyclooctadiene-1,2,3-tricarboxylate
 <p>The structure shows a six-membered pyranose ring in its chair conformation. It has hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions. The 2-position is linked via an oxygen atom to a carbonyl group, which is connected to a phenyl ring.</p>	2-O-(Phenylacetyl)- $\beta$ -D-glucopyranose
 <p>The structure shows a benzene ring with a carboxylic acid group at the 1-position and a complex ester group at the 2-position. The ester group consists of a carbonyl group linked to a chain of three ethoxy groups, ending in a hydroxyl group.</p>	2-({2-[2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy}carbonyl)benzoic acid

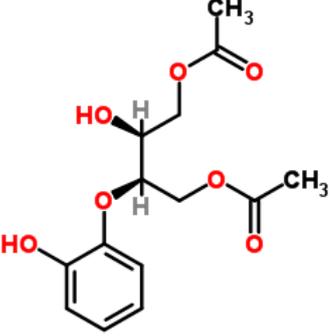
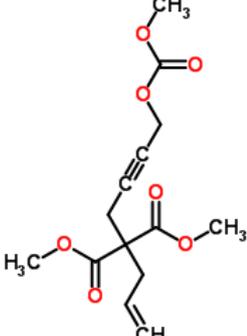
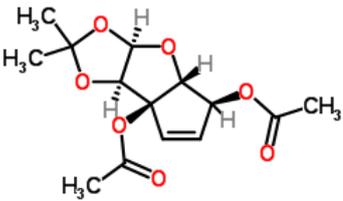
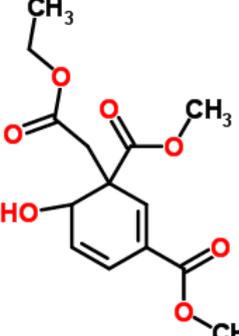
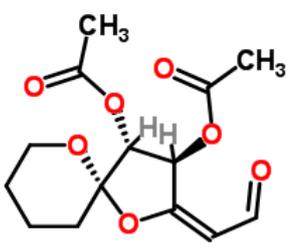
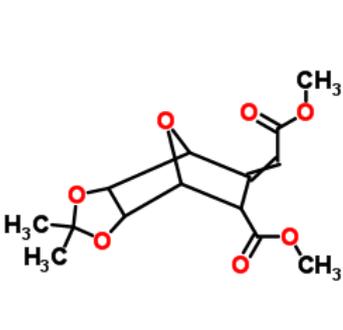
	1-Phenylethyl hexopyranosiduronic acid
	3-Allyl-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-4,5-dioxotetrahydro-3-furanyl acetate
	2-Acetylphenyl $\beta$ -L-glucopyranoside
	(2S,3R)-2-(((2S)-2-Hydroxypropanoyl)oxy)methyl)-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl (2E)-2-methyl-2-butenoate
	Methyl 3-O-benzyl- $\beta$ -L-idopyranuronate
	Diethyl 5-oxo-3,4,5,8-tetrahydro-2H,7H-pyrano[4,3-b]pyran-7,7-dicarboxylate

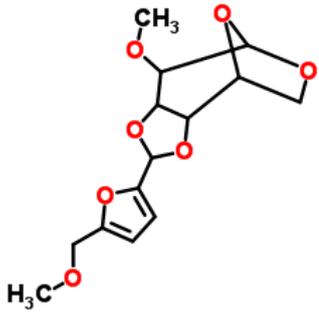
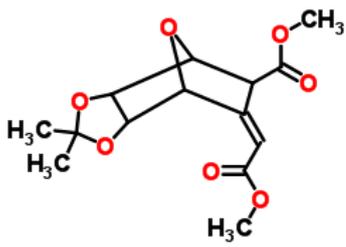
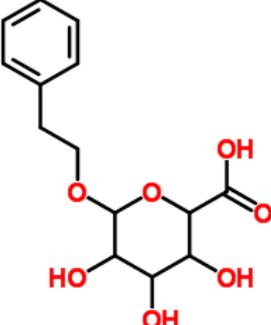
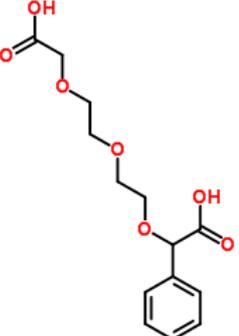
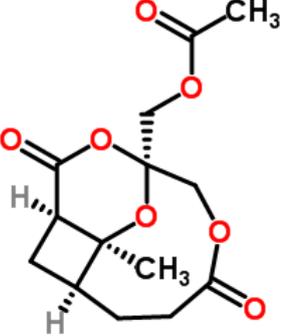
	6-Methoxy-2-phenylhexahydro[1,3]dioxino[5,4-e][1,4]dioxepine-7,9-diol
	2,2'-[3-(Benzyloxy)-1,2-propanediyl]bis(oxy)diacetic acid
	2,3,5,6,8,9,11,12-Octahydro-1,4,7,10,13-benzopentaoxacyclopentadecine-14,17-dione
	Methyl (2aS,2bR,3R,4aR,4bR)-3-acetoxy-1,1-dimethoxy-2-oxohexahydrocyclopropa[cd]pentalene-4b(1H)-carboxylate
	(2E,3R,4S,5R)-2-(2-Oxoethylidene)-1,6-dioxaspiro[4.5]decane-3,4-diyl diacetate
	Methyl (2S)-2-[(1R,3S,4S,5S)-4-acetoxy-1-(methoxycarbonyl)bicyclo[3.1.0]hex-3-yl]-2-oxiranecarboxylate

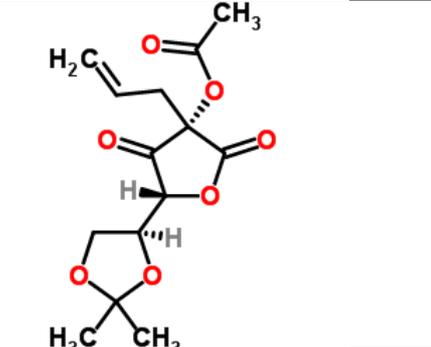
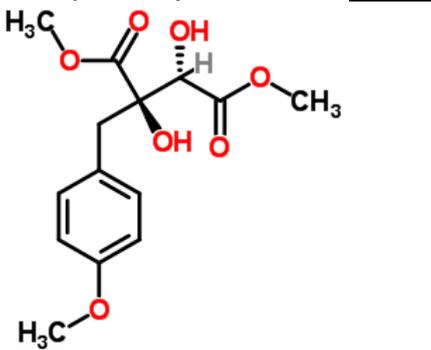
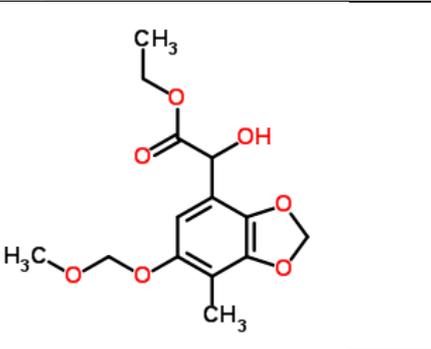
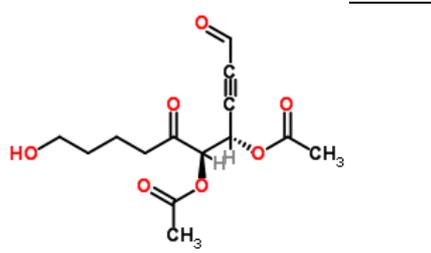
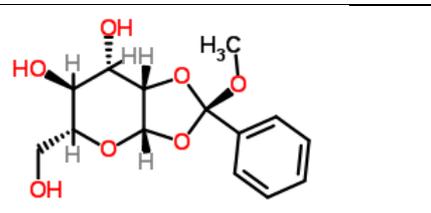
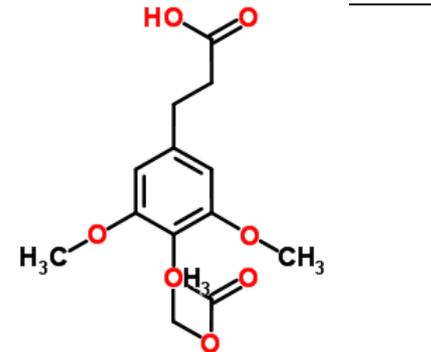
	3,4,6-Tri-O-acetyl-1,5-anhydro-2-deoxy-2-vinyl-D-arabino-hex-1-enitol
	[(3aS,3bR,4S,6aS,6bR)-6a-Methyl-2,6-dioxohexahydrofuro[3',4':3,4]cyclobuta[1,2-d][1,3]dioxol-4-yl]methyl pivalate
	Methyl 3-O-benzoyl-β-D-galactopyranoside
	Methyl 3-O-benzyl-L-idopyranuronate
	Methyl (1S,4S,8S)-8-acetoxy-6,6-dimethoxy-5-oxobicyclo[2.2.2]oct-2-ene-2-carboxylate
	Methyl (2S)-2-[(2S)-1-[(2-methyl-2-propanyl)oxy]-1,4-dioxo-2-butanyl]-5-oxo-2,5-dihydro-2-furancarboxylate
	Diethyl oxydi-2-butyne-4,1-diyl biscarbonate

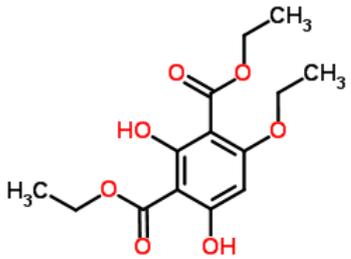
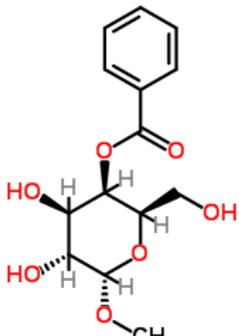
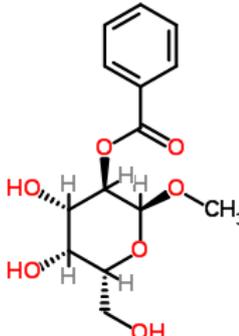
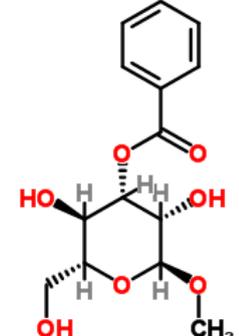
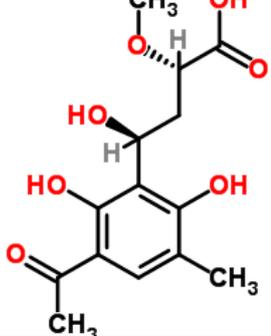
	6-O-(Phenylacetyl)- $\alpha$ -D-glucopyranose
	(2R)-4-(Allyloxy)-2-[(4S)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]-5-oxo-2,5-dihydro-3-furanyl acetate
	(2R,3S)-3-Allyl-2-[(4S)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]-4,5-dioxotetrahydro-3-furanyl acetate
	(1R,2S,3S,4R,5R)-3-Hydroxy-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-2,4-diyl bis(2-methylacrylate)
	Methyl 6-O-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
	[(5S,7R)-4,5-Dimethoxy-7-methyl-2-oxo-7,8-dihydro-2H,5H-pyrano[4,3-b]pyran-3-yl]methyl acetate

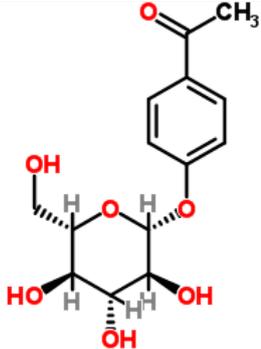
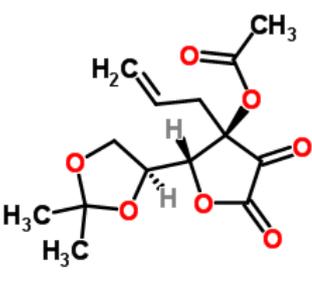
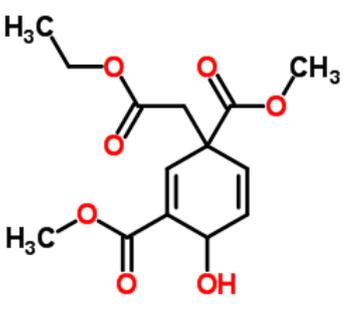
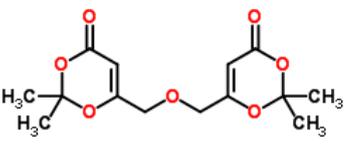
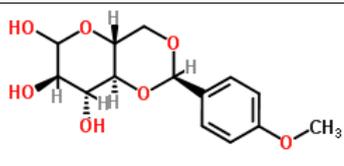
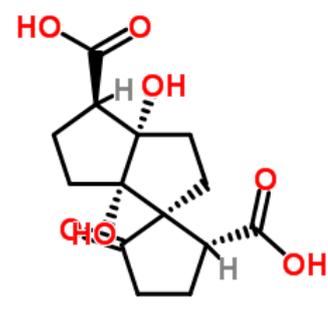
	<p>(2R,3R)-2-Hydroxy-3-[(4-hydroxy-2-methoxy-6-methylbenzoyl)oxy]-2-methylbutanoic acid</p>
	<p>Methyl (2E)-3-[2-hydroxy-3,4-bis(methoxymethoxy)phenyl]acrylate</p>
	<p>(3aS,5S,9bS)-7,8-Dimethoxy-5-methyl-3,3a,5,9b-tetrahydro-2H-furo[3,2-c]isochromene-2,6,9-triol</p>
	<p>(1S,2R,3R)-3-Acetoxy-6-oxo-4-cyclohexene-1,2-diyl dipropanoate</p>
	<p>Dimethyl 1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-2-hydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,3-dicarboxylate</p>
	<p>(1R,2S)-2-{2-[(1S,2R)-2-Carboxy-5-oxocyclopentyl]ethyl}-2-hydroxy-3-oxocyclopentanecarboxylic acid</p>

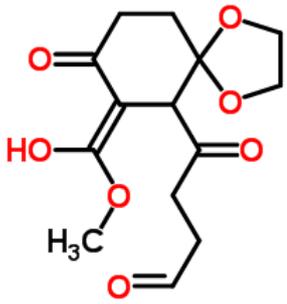
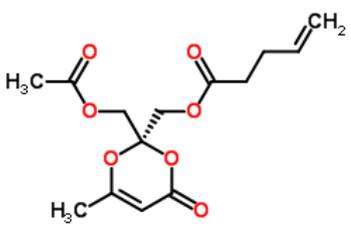
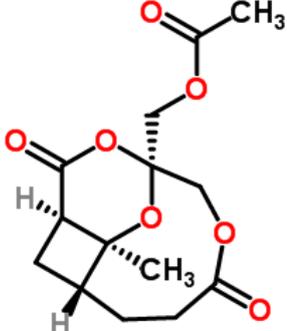
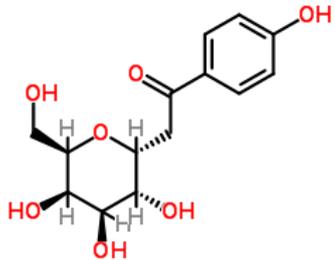
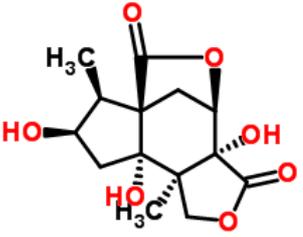
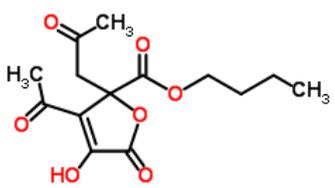
	(2R,3S)-4-Acetoxy-3-hydroxy-2-(2-hydroxyphenoxy)butyl acetate
	Dimethyl allyl{4-[(methoxycarbonyl)oxy]-2-butyn-1-yl}malonate
	(3aR,4aR,5S,7aR,7bR)-2,2-Dimethyl-3a,4a,5,7b-tetrahydro-7aH-cyclopenta[4,5]furo[2,3-d][1,3]dioxole-5,7a-diyl diacetate
	Dimethyl 3-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-4-hydroxy-1,5-cyclohexadiene-1,3-dicarboxylate
	(2E,3R,4R,5S)-2-(2-Oxoethylidene)-1,6-dioxaspiro[4.5]decane-3,4-diyl diacetate
	Methyl 9-(2-methoxy-2-oxoethylidene)-4,4-dimethyl-3,5,10-trioxatricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]decane-8-carboxylate

	7-Methoxy-4-[5-(methoxymethyl)-2-furyl]-3,5,9,11-tetraoxatricyclo[6.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]undecane
	Methyl (9Z)-9-(2-methoxy-2-oxoethylidene)-4,4-dimethyl-3,5,10-trioxatricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]decane-8-carboxylate
	2-Phenylethyl hexopyranosiduronic acid
	{2-[2-(Carboxymethoxy)ethoxy]ethoxy}(phenyl)acetic acid
	[(1S,7S,9R,13S)-13-Methyl-4,10-dioxo-3,11,12-trioxatricyclo[5.4.2.0 <sup>9,13</sup> ]tridec-1-yl]methyl acetate

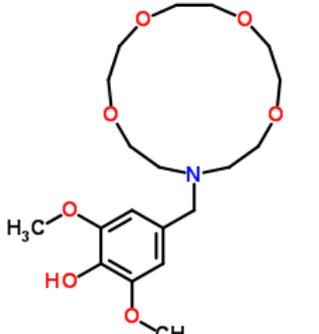
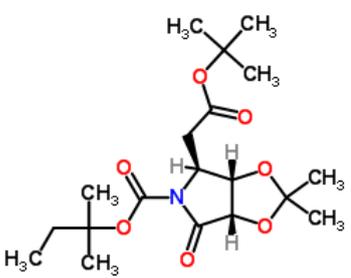
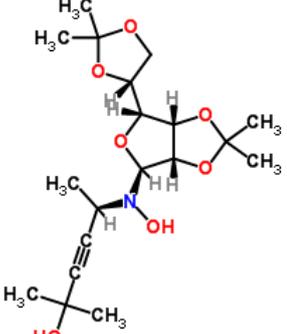
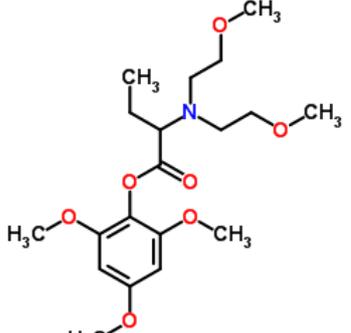
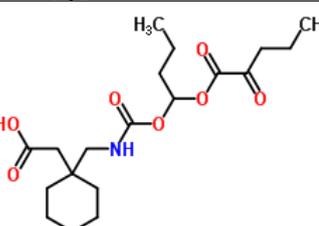
	(3S,5R)-3-Allyl-5-[(4S)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]-2,4-dioxotetrahydro-3-furanyl acetate
	Dimethyl (2R,3S)-2,3-dihydroxy-2-(4-methoxybenzyl)succinate
	Ethyl hydroxy[6-(methoxymethoxy)-7-methyl-1,3-benzodioxol-4-yl]acetate
	(4S,5R)-10-Hydroxy-1,6-dioxo-2-decyne-4,5-diyl diacetate
	1,2-O-[Methoxy(phenyl)methylene]-β-D-mannopyranose
	3-{4-[(Ethoxycarbonyloxy)-3,5-dimethoxyphenyl]}propanoic acid

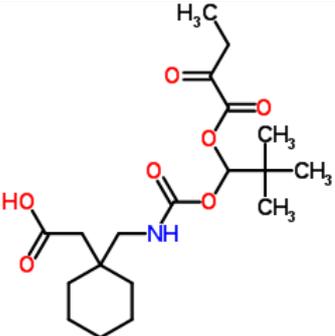
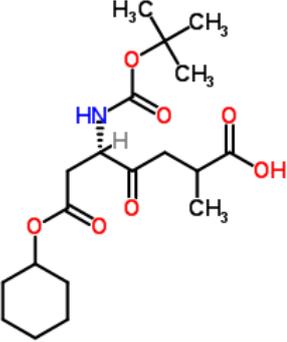
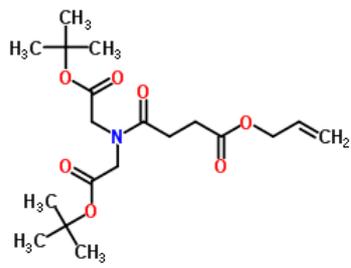
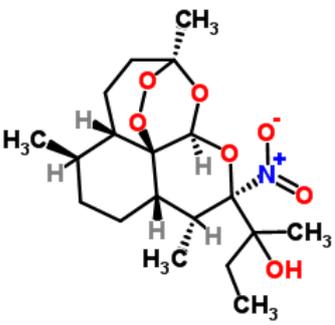
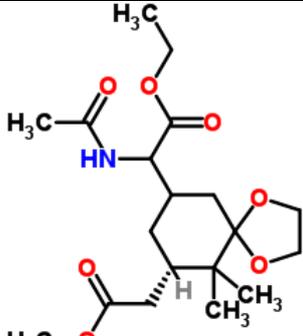
 <p>The structure shows a benzene ring with two hydroxyl groups at the 2 and 6 positions. At the 4 position, there is an ethoxy group (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). At the 1 position, there are two ethyl ester groups (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).</p>	Diethyl 4-ethoxy-2,6-dihydroxyisophthalate
 <p>The structure shows a galactopyranose ring in its chair conformation. The hydroxyl groups are at the 2, 3, and 6 positions. The 4-OH group is in the α position and is linked to a benzoyl group (-CO-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). The 1-OH group is linked to a methyl group (-CH<sub>3</sub>).</p>	Methyl 4-O-benzoyl-α-D-galactopyranoside
 <p>The structure shows a galactopyranose ring in its chair conformation. The hydroxyl groups are at the 3, 4, and 6 positions. The 2-OH group is in the α position and is linked to a benzoyl group (-CO-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). The 1-OH group is linked to a methyl group (-CH<sub>3</sub>).</p>	Methyl 2-O-benzoyl-α-D-galactopyranoside
 <p>The structure shows a mannopyranose ring in its chair conformation. The hydroxyl groups are at the 2, 4, and 6 positions. The 3-OH group is in the α position and is linked to a benzoyl group (-CO-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). The 1-OH group is linked to a methyl group (-CH<sub>3</sub>).</p>	Methyl 3-O-benzoyl-α-D-mannopyranoside
 <p>The structure shows a 2,6-dihydroxy-5-methylphenyl ring with an acetyl group (-COCH<sub>3</sub>) at the 3 position. This ring is attached to the 4 position of a butanoic acid chain. The butanoic acid chain has a hydroxyl group at the 4 position and a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 2 position. The stereochemistry is (2S,4S).</p>	(2S,4S)-4-(3-Acetyl-2,6-dihydroxy-5-methylphenyl)-4-hydroxy-2-methoxybutanoic acid

	4-Acetylphenyl $\beta$ -L-glucopyranoside
	(2R,3R)-3-Allyl-2-[(4S)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]-4,5-dioxotetrahydro-3-furanyl acetate
	Dimethyl 3-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-6-hydroxy-1,4-cyclohexadiene-1,3-dicarboxylate
	6,6'-[Oxybis(methylene)]bis(2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one)
	4,6-O-(4-Methoxybenzylidene)-D-glucopyranose
	(1R,2R,3a'S,4'R,6a'S)-3a',6a'-Dihydroxy-5-oxohexahydro-2'H-spiro[cyclopentane-1,1'-pentalene]-2,4'-dicarboxylic acid

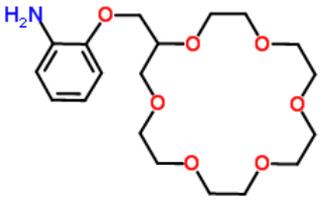
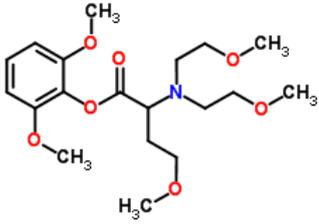
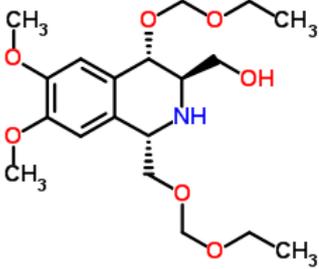
	4-((7E)-7-[Hydroxy(methoxy)methylene]-8-oxo-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-6-yl)-4-oxobutanal
	[(2S)-2-(Acetoxymethyl)-6-methyl-4-oxo-4H-1,3-dioxin-2-yl]methyl 4-pentenoate
	[(1S,7R,9R,13S)-13-Methyl-4,10-dioxo-3,11,12-trioxatricyclo[5.4.2.0 <sup>9,13</sup> ]tridec-1-yl]methyl acetate
	(1R)-1,5-Anhydro-1-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl]-D-galactitol
	(2R)-hydroxy-norneomajucin
	Butyl 3-acetyl-4-hydroxy-5-oxo-2-(2-oxopropyl)-2,5-dihydro-2-furancarboxylate

## 6.5. Strukturvorschläge für den Liganden L385 – Quelle ChempSpider

Struktur	Name
	2,6-Dimethoxy-4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-ylmethyl)phenol
	2-Methyl-2-butanyl (3aS,4S,6aS)-2,2-dimethyl-4-{2-[(2-methyl-2-propanyl)oxy]-2-oxoethyl}-6-oxotetrahydro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyrrole-5-carboxylate
	(5R)-5-[[{(3aS,4S,6R,6aS)-6-[(4R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl](hydroxy)amino]-2-methyl-3-hexyn-2-ol
	2,4,6-Trimethoxyphenyl 2-[bis(2-methoxyethyl)amino]butanoate
	(1-[[{(1-[(2-Oxopentanoyl)oxy]butoxy)carbonyl]amino]methyl]cyclohexyl)acetic acid

	<p>(1-(((2,2-Dimethyl-1-[(2-oxobutanoyl)oxy]propoxy)carbonyl)amino)methyl)cyclohexyl) acetic acid</p>
	<p>(5S)-7-(Cyclohexyloxy)-2-methyl-5-(((2-methyl-2-propanyl)oxy)carbonyl)amino)-4,7-dioxoheptanoic acid</p>
	<p>Allyl 4-(bis(2-((2-methyl-2-propanyl)oxy)-2-oxoethyl)amino)-4-oxobutanoate</p>
	<p>2-[(1S,4S,5R,8S,9R,10R,12R,13R)-1,5,9-Trimethyl-10-nitro-11,14,15,16-tetraoxatetracyclo[10.3.1.0<sup>4,13</sup>.0<sup>8,13</sup>]hexadec-10-yl]-2-butanol</p>
	<p>Ethyl acetamido[(9S)-9-(2-methoxy-2-oxoethyl)-10,10-dimethyl-1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-yl]acetate</p>

	<p>4-(2-((1R,2R,3R,5Z)-3-Hydroxy-5-(hydroxyimino)-2-((1E,3S)-3-hydroxy-1-octen-1-yl)cyclopentyl)acetoxy)butanoic acid</p>
	<p>2-Methyl-2-propanyl (3-cyclohexyl-3-oxopropanoyl)((2-methyl-2-propanyl)oxy)carbonyloxy)carbamate</p>
	<p>14-Hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradec-1-yl 4-(dimethylamino)benzoate</p>
	<p>Methyl 3-pentanyl 2-acetamido-2,4-dideoxy-3-O-(2,2-dimethylpropanoyl)-<math>\alpha</math>-L-threo-hex-4-enopyranosiduronate</p>
	<p>Ethyl (2Z)-[(2R,3S)-2-(((1S,2R,5S)-2-isopropyl-5-methylcyclohexyl)oxy)-5-oxotetrahydro-3-furanyl][methoxy(oxido)-<math>\lambda^5</math>-azanylidene]acetate</p>
	<p>3-(1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan-2-ylmethoxy)aniline</p>

 <p>The structure shows a benzene ring with an amino group (H<sub>2</sub>N) at the 1-position and a 2-(1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecan-2-ylmethoxy) group at the 2-position. The macrocyclic ring consists of 18 atoms, with 6 oxygen atoms and 12 carbon atoms.</p>	2-(1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan-2-ylmethoxy)aniline
 <p>The structure shows a benzene ring with methoxy groups (CH<sub>3</sub>) at the 2 and 6 positions. It is substituted at the 1-position with a propionic acid derivative. The nitrogen atom of the propionic acid is substituted with two 2-methoxyethyl groups. The oxygen atom of the propionic acid is substituted with a methyl group (H<sub>3</sub>C).</p>	2,6-Dimethoxyphenyl N,N-bis(2-methoxyethyl)-O-methylhomoserinate
 <p>The structure shows a tetrahydroisoquinoline ring system. The nitrogen atom (NH) is at the 3-position. The 1-position is substituted with a methyl group (CH<sub>3</sub>) and a hydroxyl group (OH). The 4-position is substituted with an ethoxymethoxy group (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>). The 6 and 7 positions are substituted with methoxy groups (CH<sub>3</sub>).</p>	{(1S,3R,4S)-4-(Ethoxymethoxy)-1-[(ethoxymethoxy)methyl]-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinyl}methanol

### Danksagung

“Was anfangs noch unmöglich schien, der Ehrgeiz kriegt es doch noch hin.“

Nie war das alte Familienmotto so aktuell, wie heute und daher freue ich mich nun, schließlich und schlussendlich die Gelegenheit zu haben mich bei allen für diese Arbeit wichtigen Personen zu bedanken.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Erwin Grill für die Vergabe dieses unerwartet vielfältigen und sehr interessanten Themas, sowie für angeregte fachliche Diskussionen bedanken.

Meinen Kollaborationspartnern von der Arbeitsgruppe der analytischen Biogeochemie vom Helmholtz Zentrum München Herrn Prof. Dr. Phillippe Schmitt-Kopplin, Herrn Dr. Basem Kanawati und Herrn Dr. Michael Witting möchte ich für die gute Zusammenarbeit, sowie für den angeregten Wissensaustausch danken. Ohne ihre Hilfe und die Möglichkeit der Nutzung modernster Massenspektrometrie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und hätte sich analytisch gesehen auf „Steinzeit-Niveau“ bewegt, dafür vielen Dank.

Natürlich sollen auch die Angehörigen meines „Botany Allstars Teams“ nicht unerwähnt bleiben. Namentlich sind das:

Christian Wunschel, der die Betreuung des Grills und der Grillkasse zur Kunst erhoben hat und immer mit seinem fachlichen biochemischen Kenntnissen zur Verfügung stand.

Michael „Michl“ Papachek, der nie um ein Weißbier und einen guten Rat verlegen ist.

Moritz Ruschhaupt, der mehr als einmal Opfer meiner Streiche wurde (die anderen haben aber auch immer mitgemacht!) und der mir die Wunder der Molekularbiologie nahe gebracht hat.

Meinen beiden Leidensgenossinnen Natalie Kowalski und Stefanie Tischer möchte ich für die Unterstützung und den fachlichen Input bei der Erstellung dieser Dissertation danken. Unser „Wettrennen“ hat mich immer motiviert am Ball zu bleiben.

Unseren allzeit bereiten TA`s Christoph „Chrisi“ Heidersberger (der Gott der Klonierung), Christian „Korni“ Kornbauer (der Protein-Wizard) und Claudia „Claudsch“ Eltschig (die Alleskönnerin) möchte ich für das Teilen ihrer praktischen Expertise danken.

An dieser Stelle möchte ich mich natürlich auch bei meinen beiden Korrektoren und lieben Freunden Johannes „Jojo“ Cramer und Anna Schmidt für die umfangreiche Korrektur dieser Arbeit bedanken. Ihr beide habt dieser Dissertation zu einer neuen Qualität verholfen, dafür kann ich euch nicht genug danken (jaja, die Kommas und Getrenntschreibung). Ich möchte natürlich auch Frau Dr. Fahrah Assad für die Korrektur der englischen Zusammenfassung danken (jetzt klingt das bedeutend professioneller).

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie und meiner lieben Freundin Julia Wilde bedanken, die mir immer wieder auf die Füße getreten haben (im positiven Sinne), um mich zu motivieren und mir durch die Höhen und Tiefen der Doktorarbeit zu helfen.

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen

---

**Name:** Katharina Hill  
**Geburtsdatum:** 27.08.1985  
**Familienstand:** ledig  
**Nationalität:** deutsch  
**Adresse:** Eichert 7c, 85777 Fahrenzhausen  
**E-mail:** katharina.hill1985@googlemail.com

### Studium

---

07/15-03/16            Niederschrift der Promotion

11/10-07/16            Promotionsstudium,  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Botanik,  
Technische Universität München

10/05-11/10            Studium der Pflanzenbiotechnologie,  
Abschluss als Master of Science  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

### Schulbildung

---

08/92-05/05            Grundschule Johann-Heinrich von Thünen Rubkow,  
Lilienthal-Gymnasium Anklam