

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

**Biochemische Charakterisierung des
Rezeptorkomplexes für Abscisinsäure**

Christian Willi Wunschel

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Wolfgang Liebl

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Erwin Grill
2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 23.05.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.07.2017 angenommen.

für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1. Phytohormone	5
1.1.1. ABA-Biosynthese	7
1.1.2. ABA-Katabolismus	9
1.2. Kernkomponenten der ABA-Signaltransduktion	11
1.2.1. ABA-Rezeptoren	11
1.2.2. Proteinphosphatasen 2C der Gruppe A	13
1.2.3. Proteinkinasen	15
1.3. ABA-Signaltransduktion	16
1.3.1. ABA-Erkennung und Koordination	16
1.3.2. Ausbildung des heterotrimeren Komplexes	19
1.3.3. ABA-Signaltransduktion	22
1.4. Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung	24
1.4.1. Die Peptidyl-Prolylbindung	24
1.4.2. Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	25
1.5. Zielsetzung der Arbeit	27
2. Ergebnisse	28
2.1. Expression, Reinigung, Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung von RCARs und PP2Cs	28
2.2. Biochemische Analyse der ABA-Rezeptor Familie	33

2.2.1.	Regulation der Proteinphosphatasen 2C durch RCARs	34
2.2.2.	ABA-induzierte-Regulation der PP2Cs durch RCARs.....	38
2.3.	Die regulatorische Funktion von RCAR7	47
2.4.	ABA-Derivate und ABA-ähnliche Substanzen	53
2.4.1.	Stereoselektivität der ABA-Rezeptoren.....	53
2.4.2.	Analyse der ABA-Derivate	59
2.4.3.	PP2Cs und RCARs in Lebermoos <i>Marchantia polymorpha</i>	72
2.4.3.1.	Vergleichende Analyse der RCARs und PP2Cs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Marchantia polymorpha</i>	73
2.4.3.2.	Analyse zu LA verwandter natürlicher Substanzen.....	78
2.5.	Prolylisomeraseaktivität der RCAR-Proteine	84
3.	Diskussion	90
3.1.	Ligandenselektivität der regulatorischen Proteine	91
3.1.1.	Stereoselektivität der RCARs.....	91
3.1.2.	Synthetische ABA-Analoga	95
3.1.3.	LA als alternativer Ligand zu ABA.....	102
3.2.	RCAR7; ein Spezialfall im RCAR-PP2C-Netzwerk.....	109
3.3.	Funktionelle Differenzierung der RCAR-PP2C Komplexe	114
3.4.	Prolylisomerisierung als regulatorischer Schalter	125
4.	Material und Methoden	132
4.1.	Materialien	132
4.1.1.	Chemikalien	132
4.1.2.	Geräte	132
4.1.3.	Software	133
4.1.4.	Verwendete Bakterienstämme und ihre Kultivierung.....	134
4.1.5.	Plasmide und Vektoren	135
4.2.	Molekularbiologische Methoden	136
4.2.1.	Herstellung kompetenter Zellen	136

4.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen	136
4.2.1.2. Herstellung elektrokompeter Zellen	136
4.2.2. Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	137
4.2.2.1. Transformation chemisch kompetenter Zellen	137
4.2.2.2. Transformation elektrokompeter Zellen.....	137
4.2.3. Plasmid-Präparation.....	138
4.2.3.1. Plasmid Mini Präparation	138
4.2.3.2. Plasmid Midi Präparation	138
4.3. Proteinbiochemische Methoden	138
4.3.1. Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	138
4.3.2. Zellaufschluss	140
4.3.3. Proteinaufreinigung	141
4.3.3.1. Reinigung via Nickel-TED Säulen	141
4.3.3.2. Reinigung via HisTrap FF crude Säulen	142
4.3.4. Dialyse	143
4.3.5. Protein-Konzentrierung	144
4.3.6. TCA-Präzipitation von Proteinlösungen.....	144
4.3.7. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	144
4.3.8. Coomasie-Färbung.....	146
4.3.9. Proteinphosphatase-Aktivitätstest	147
4.3.10. Isomerisierung des Peptids Abz-SGLPA-pNa.....	148
5. Anhang.....	150
6. Literaturverzeichnis	153
Publikationen	166
Lebenslauf.....	167
Danksagung	168

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Pflanzenhormone	6
Abbildung 1-2: Biosynthese von ABA.....	8
Abbildung 1-3: Katabolismus von ABA.....	10
Abbildung 1-4: ABA Rezeptorproteine.....	12
Abbildung 1-5: Proteinphosphatasen Typ 2C	14
Abbildung 1-6: ABA-Bindung an RCAR.....	17
Abbildung 1-7: ABA Koordination	18
Abbildung 1-8: PP2C Interaktionen	20
Abbildung 1-9: ABA-Signaltransduktion für Ionenkanäle und Nukleus	23
Abbildung 1-10: <i>cis-trans</i> -Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung.....	24
Abbildung 1-11: Vertreter der drei verschiedenen Unterklassen der Peptidyl- <i>cis/trans</i> - Isomerasen.....	26
Abbildung 2-1: Rekombinant in <i>E.Coli</i> exprimierte und über einen Hexahistidintag gereinigte Proteine	29
Abbildung 2-2: Aktivitätsanalyse der Proteinphosphatasen HAB1, ABI1, ABI2 und PP2CA, sowie Inhibition von ABI2 mit RCAR8 und RCAR14.....	32
Abbildung 2-3: RCAR-abhängige Regulation der Proteinphosphataseaktivität in Abwesenheit von ABA	36
Abbildung 2-4: RCAR-abhängige Regulation der Proteinphosphatasen ABI2 und PP2CA.....	37
Abbildung 2-5: ABA abhängige Regulation von ABI2.....	39
Abbildung 2-6: ABA abhängige Regulation von PP2CA.....	42
Abbildung 2-7: ABA-abhängige Regulation von ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA.	45
Abbildung 2-8: Sequenzvergleich aller 14 RCARs aus <i>A. thaliana</i>	48
Abbildung 2-9: Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität durch RCAR7.....	49
Abbildung 2-10: Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität durch RCAR7 Varianten	50
Abbildung 2-11: Strukturvergleich zwischen den Rezeptorkomplexen HAB1-RCAR11 und ABI1-RCAR12	51
Abbildung 2-12: Regulation von HAB1 WT und Varianten	52
Abbildung 2-13: Strukturen von ABA und R-ABA	54

Abbildung 2-14: ABA und R-ABA vermittelte Regulation von ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 mit RCAR1	55
Abbildung 2-15: R-ABA vermittelte Regulation von ABI2 in Kombination mit 14 verschiedenen RCARs	56
Abbildung 2-16: ABA und R-ABA vermittelte Regulation von ABI2 in Kombination mit RCAR8	58
Abbildung 2-17: Strukturen der zu ABA bzw. R-ABA analogen Substanzen	61
Abbildung 2-18: Ligandenabhängige Regulation von ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1	63
Abbildung 2-19: ABA und S-Analoga vermittelte Regulation	64
Abbildung 2-20: Ligandenabhängige Regulation von ABI2	67
Abbildung 2-21: ABA und PBI 352 vermittelte Regulation von ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA in Kombination mit RCAR1 und RCAR8	71
Abbildung 2-22: Strukturvergleich von ABA und LA	73
Abbildung 2-23: Interspeziesanalyse der <i>M. polymorpha</i> und <i>A. thaliana</i> PP2Cs bzw. RCARs mit ABA.....	75
Abbildung 2-24: Interspeziesanalyse der <i>M. polymorpha</i> und <i>A. thaliana</i> PP2Cs bzw. RCARs mit LA	77
Abbildung 2-25: Strukturen zu LA verwandter Substanzen	79
Abbildung 2-26: Durch methylierte LA vermittelte Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität.....	80
Abbildung 2-27: Durch LAL04, LAL07, LAL12, LAL15 und LAL17 vermittelte Inhibierung der ABI2-Aktivität	81
Abbildung 2-28: Durch LAL04, LAL07, LAL12, LAL15 und LAL17 vermittelte Inhibierung der MpABI1-Aktivität	82
Abbildung 2-29: <i>Gate Loop</i> der RCAR-Proteine	84
Abbildung 2-30: <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von Abz-SGLPA-pNa.....	85
Abbildung 2-31: <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von Abz-SGLPA-pNa in Gegenwart von RCAR8	87
Abbildung 2-32: <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von Abz-SGLPA-pNa in Gegenwart von RCAR 1, 8 und 11 mit und ohne ABA.....	89
Abbildung 3-1: R-ABA vermittelte Inhibition verschiedener PP2Cs und Strukturvergleich zwischen RCAR13 im Komplex mit ABA und R-ABA	93

Abbildung 3-2: Mögliche Koordination des Liganden PBI 413 in der Bindungstasche; <i>in vitro</i> Studien zu PBI 413 und seinen Derivaten.....	97
Abbildung 3-3: <i>In vivo</i> Studien und mögliche Koordination der Strukturen der ABA-analogen Substanzen innerhalb der Bindungstasche.....	99
Abbildung 3-4: Strukturvergleich zwischen ABA und LA; mögliche LA-Koordination innerhalb der Bindetasche von AtRCAR14 und MpRCAR2.....	105
Abbildung 3-5: Strukturen von LA und verwandten natürlichen Substanzen	107
Abbildung 3-6: Vergleich der ABA-Bindungstasche von RCAR14 und 7.....	111
Abbildung 3-7: Unterschiede zwischen HAB1 und ABI1; <i>in vivo</i> und Y2H-Studien der HAB1-Varianten.....	113
Abbildung 3-8: RCAR-abhängige Regulation der PP2Cs; inhibitorische Interaktion zwischen PP2C und RCAR	117
Abbildung 3-9: ABA-abhängige Regulation der Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA	120
Abbildung 3-10: Schematische Darstellung einer möglichen ABA-Signaltransduktion	124
Abbildung 3-11: Vergleich zwischen RCAR-Protein und den Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen.....	127
Abbildung 3-12: Vergleich der aktiven Zentren von humanen Cyclophilin und humanen FKBP12, sowie Vergleich mit RCAR11	129
Abbildung 5-1: Sequenzvergleich der 14 RCARs aus <i>A. thaliana</i> und der drei RCARs aus <i>M. polymorpha</i>	150
Abbildung 5-2: Sequenzvergleich der 9 PP2Cs aus <i>A. thaliana</i> und MpABI1 aus <i>M. polymorpha</i>	152

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Aus <i>E. coli</i> rekombinant gereinigte Proteine, Herkunftsorganismus und die erhaltene Proteinmenge je 500 ml LB-Medium.....	30
Tabelle 2-2: Halbmaximale durch ABA-induzierte Inhibierung [nM] von ABI2 mit allen 14 RCARs aus Abbildung 2-5.....	40
Tabelle 2-3: Halbmaximale durch ABA-induzierte Inhibierung [nM] von PP2CA mit allen 14 RCARs aus Abbildung 2-6.	43
Tabelle 2-4: IC ₅₀ -Werte der S-Liganden in nM.....	66
Tabelle 2-5: IC ₅₀ -Werte der Liganden ABA und PBI352 in Kombination mit den Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA und den RCARs 1 und 8.....	72
Tabelle 2-6: IC ₅₀ -Werte der ABA und LA vermittelten Regulation.....	78
Tabelle 2-7: IC ₅₀ -Werte der LAL vermittelten Regulation.....	83
Tabelle 4-1: Verwendete Geräte.....	132
Tabelle 4-2: Verwendete Bakterienstämme.....	134
Tabelle 4-3: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentration im Nährmedium ..	135
Tabelle 4-4: Zur Proteinexpression verwendete Konstrukte und Expressionsbedingungen.....	139

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ABA	Abscisinsäure
ABA3/AAO3	Abscisinsäurealdehyd Oxidase 3
ABI4	Neoxanthinsynthase
Abz	Aminobenzoyl
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABF	ABRE Binding Factor
ABI	Abscisinsäure-Insensitiv
ABRE	ABA-Response Element
AHG	ABA-Hypersensitive Germination
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bet v 1	Major birch pollen allergen of <i>Betula verrucosa</i> 1
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	Basic Leucin Zipper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Crk	CT10 Regulator of Kinase
cV	Säulenvolumen
Cyp	Cyclophilin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Cam	Chloramphenicol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
EtOH	Ethanol

ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKBP	FK506-Bindungsproteine
g	Erdbeschleunigung ($1 \text{ g} = 9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GdmCl	Guanidiniumchlorid
h	Stunde
HAB	Hypersensitive to ABA
HAI	Highly ABA-Induced
IC ₅₀	halbmaximale (50%) inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
k_{app}	apparente Rate der Signaländerung
K _D	Dissoziationskonstante
LA	Lunularsäure
LAL	Lunularic acid like
LB	Luria-Bertani-Bakteriennährlösung
M	mol/l
min	Minute
<i>M. polymorpha</i> / Mp	<i>Marchantia polymorpha</i>
mQ	milliQ-Wasser
MUP	Methylumbelliferylphosphat
NCED	9-cis-Epoxy-carotinoid-Dehydrogenase
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
OST1	Open Stomata 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBI	Plant Biotechnology Institute
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pNa	p-Nitroanilin
PP2C	Protein Phosphatase Type 2C
PPlase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
PYL	PYR1-like
PYR	Pyrabactin Resistant
RCAR	Regulatory Component of ABA Receptor
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	src-homology domains
SLAC1	Slow Anion Channel 1
SnRK2	Sucrose non-fermenting Related Kinase 2
TB	Terrific Broth (Medium)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N ,N' ,N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VDE	Violaxanthin De-Epoxigenase
WT	Wildtyp
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid-System
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) ist ein zentraler Regulator bei der Anpassung an abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Kälte und Salinität. Außerdem stellt es einen Antagonisten zu den wachstumsfördernden Pflanzenhormonen dar. Die ABA-Wahrnehmung besteht dabei aus zwei Schlüsselementen; den *Regulatory Component of ABA Receptors* (RCARs) bzw. die *Pyrabactin resistant/PYR1-like proteins* und einer Reihe von Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2Cs). Insgesamt wurden im Genom von *Arabidopsis thaliana* 14 unterschiedliche RCARs identifiziert, die auf Basis ihrer Sequenzhomologien in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Ihnen gegenüber stehen neun PP2Cs, die über die Inhibierung der *Sucrose non-fermenting-Related Protein Kinase 2* (SnRK2s) als negative Regulatoren physiologische Prozesse wie Wurzelwachstum, Keimung oder die Schließung der Spaltöffnungen kontrollieren. Die RCAR-Proteine verfügen über eine hydrophobe Bindetasche, welche mit dem Liganden ABA interagiert. Durch die Bindung des Phytohormons wird eine Konformationsänderung induziert, die in einer Inhibierung der Aktivität der mit den RCARs in Komplex befindlichen PP2Cs resultiert. Durch die Inaktivierung der enzymatischen Aktivität der PP2Cs werden die SnRK2s aktiviert, die als positive Regulatoren des ABA Signalweges fungieren.

In dieser Arbeit wurden erstmals alle 14 RCARs aus *Arabidopsis thaliana* in Kombination mit den Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA getestet. Es konnte festgestellt werden, dass *in vitro* eine Regulation der Proteinphosphatasen durch einige der RCARs bereits in Abwesenheit des Liganden stattfand, welche nicht nur vom eingesetzten regulatorischen Protein, sondern ebenfalls von der beteiligten Proteinphosphatase abhängig war. Des Weiteren ergab sich, dass, im direkten Vergleich der drei RCAR-Untergruppen, die dritte Untergruppe der RCARs nur eine schwache inhibitorische Wirkung besaß und PP2CA von allen PP2Cs resistenter gegen die Regulation der RCARs in Abwesenheit des Liganden war. RCAR4 kristallisierte sich als das Protein mit der stärksten ABA-unabhängigen Regulation heraus. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass, mit Ausnahme der HAB1-RCAR7-Kombination, alle 14 RCARs in der Lage waren die vier Proteinphosphatasen mit unterschiedlicher Effizienz *in vitro* ABA-abhängig zu inhibieren. Hierbei waren von den 56 untersuchten Kombinationen 5% bereits in der Lage bei einer sehr niedrigen

und physiologisch relevanten ABA-Konzentration (30 nM) die Aktivität der PP2Cs stark zu reduzieren. Die Kombination mit der PP2C war dabei entscheidend für die Effektivität des regulatorischen Proteins. Eine Reihe von identifizierten PP2C-RCAR-Komplexen, deren Aktivität erst bei sehr hohen ABA-Konzentrationen reguliert wurde, könnte von biologischer Bedeutung sein um bei erhöhten ABA-Konzentrationen eine basale PP2C-Aktivität in den Pflanzen aufrechtzuerhalten.

Um eine genauere Vorstellung zur Spezifität und Flexibilität der molekularen Interaktionen der ABA-Bindung zu erhalten, wurden ABA-analoge Substanzen und ihre Stereoisomere getestet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die RCAR-Proteine über eine hohe Stereoselektivität verfügten und R-ABA eine um mindestens Faktor 100 geringere Aktivität als ABA besaß. Die chemischen Modifikationen der ABA-Analogen zeigten, dass die Bindungstasche über eine hohe Flexibilität verfügt und Liganden über ein Netzwerk spezifischer Wechselwirkungen polarer Aminosäurereste gebunden werden.

Des Weiteren wurde Lunularsäure (LA), ein Wachstumsregulator mit zu ABA ähnlichen Eigenschaften, aus *Marchantia polymorpha* untersucht. Die verwandte Struktur und ähnliche biologische Aktivität gegenüber ABA führte zu der Vermutung, dass dieses Molekül an ABA-Rezeptoren binden könnte. PP2Cs und RCARs beider Spezies wurden analysiert und es konnte in allen Fällen eine ABA-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte MpRCAR2 eine spezifische Regulation, die selektiv für LA und einige seiner Derivate war. Damit konnte zum ersten Mal ein bestimmtes regulatorisches Protein individuell aktiviert und der Nachweis einer ABA ähnlichen Wirksamkeit der LA erbracht werden.

Summary

The phytohormone abscisic acid (ABA) is a central regulator of plant adaptive responses to abiotic stress factors such as drought, cold and salinity. It also acts as an antagonist to growth-promoting hormones. The core components of ABA perception are the Regulatory Component of ABA Receptors (RCARs) also called Pyrabactin resistant/PYR1-like proteins and type 2C protein phosphatases (PP2Cs). The *Arabidopsis thaliana* genome encodes 14 different RCARs, which can be divided into three different subfamilies according to their sequence homology. Opposing, nine PP2Cs function as negative regulators of physiological processes such as root growth, seed germination and stomatal closure. PP2Cs act by inhibiting the Sucrose non-fermenting-Related Protein Kinases 2 (SnRK2s). RCARs contain a hydrophobic binding pocket at the interface with the ABA ligand. The binding of the phytohormone induces a conformational change, resulting in inhibition of the RCAR-bound PP2Cs. This inactivation of the PP2Cs results in an activation of the SnRK2s as positive regulators of the ABA signaling pathway.

This study is the first to analyse all 14 RCARs of *Arabidopsis thaliana* in combination with the four PP2Cs ABI1, ABI2, HAB1 and PP2CA. In the absence of the ABA ligand, the RCARs were shown to regulate the PP2Cs. This regulation depends on the composition of the RCAR-PP2C-complex. Furthermore, while members of the first two subfamilies of the RCARs showed an effective inhibition of the PP2Cs, the third subclass of the RCARs had only a weak inhibitory effect and PP2CA was more resistant towards the ABA-independent regulation of the RCARs. RCAR4 was emphasized as the protein with the most efficient ABA-independent regulation. Further all 14 RCARs inhibited the PP2C activity ABA-dependent *in vitro* with varying efficiency, except the HAB1-RCAR7 combination. Five percent of the 56 analyzed combinations inhibited the PP2C activity at very low and physiologically relevant ABA-concentration (30 nM). Thus, the combination with the PP2C was critical for the efficiency of the regulatory component. A series of PP2C-RCAR complexes were identified that required very high ABA-concentrations for their regulation. These complexes could be biologically important for keeping a basal phosphatase activity in plants in the presence of high ABA-concentrations.

ABA analog substances and their stereoisomers were used to probe the specificity and flexibility of the molecular interactions during ABA-binding. It was determined that RCAR proteins possess a high stereoselectivity. Indeed, R-ABA was at least 100-fold less effective than ABA. The chemical modifications of the ABA analogs confirmed that the binding pocket of the RCARs is highly flexible and that ligands are bound by a network of specific polar interactions.

In addition, the growth regulator lunularic acid (LA) from *Marchantia polymorpha* with similar properties as ABA was analyzed. Its related structure and similar biological activity compared to ABA suggested that LA could bind to ABA-receptors. PP2Cs and RCARs of *Arabidopsis* and *Marchantia* were analyzed and these exhibited an ABA-dependent regulation in all cases; additionally, MpRCAR2 showed a specific regulation selective for LA and some of its derivatives. Thus, for the first time an ABA-like activity of LA and an individual activation of one regulatory component were confirmed.

1. Einleitung

1.1. Phytohormone

Als sessile Organismen müssen Pflanzen in der Lage sein sich den herrschenden Umweltbedingungen anzupassen. Zu diesem Zweck besitzen sie eine Reihe von Botenstoffen (Phytohormonen), die an der Regulation von Stoffwechsel, Wachstum und Morphogenese beteiligt und bereits in niedrigen Konzentrationen wirksam sind. Die Familie der Phytohormone kann in zwei Klassen unterteilt werden (Iten et al. 1999). Hierbei unterscheidet man die wachstumsfördernden Pflanzenhormone (Auxine, Cytokinine, Gibberelline und Brassinosteroide) und die wachstumshemmenden Hormone (Ethylen, Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure und Salicylsäure) (Abbildung 1-1). Bei all diesen Phytohormonen handelt es sich um niedermolekulare Komponenten aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanzen.

Bei den wachstumsfördernden Phytohormonen ist Auxin verantwortlich für die Förderung des zellulären Streckungswachstums und hat eine wichtige Rolle in der Apikaldominanz, der Zellteilung und -differenzierung, sowie der Seneszenz inne (Simon and Petrusek 2011). Cytokinine besitzen eine stimulierende Wirkung auf die Zellteilung, hemmen die Seneszenz und fördern die Bildung von Adventivknospen (Werner et al. 2001; Gan and Amasino 1995). Gibberelline sind neben dem Streckungswachstum auch für Blütenbildung und Keimung von entscheidender Bedeutung (Hedden and Sponsel 2015; Hooley 1994). Die Brassinosteroide fördern additiv zu Auxin das Streckungswachstum der Pflanzen und stehen in Verbindung mit biotischen und abiotischen Stressreaktionen (Bajguz and Hayat 2009; Zhou et al. 2015).

Zu den wachstumshemmenden Pflanzenhormonen gehört das für Fruchtreifung und Beschleunigung der Seneszenz verantwortliche Ethylen (Negi et al. 2008b; Wang et al. 2002), sowie Jasmonsäure und Salicylsäure, welche der Pathogenabwehr, sowie der Wundreaktion bzw. Thermogenese dienen (Campos et al. 2014; Delker et al. 2006; Delaney et al. 1994).

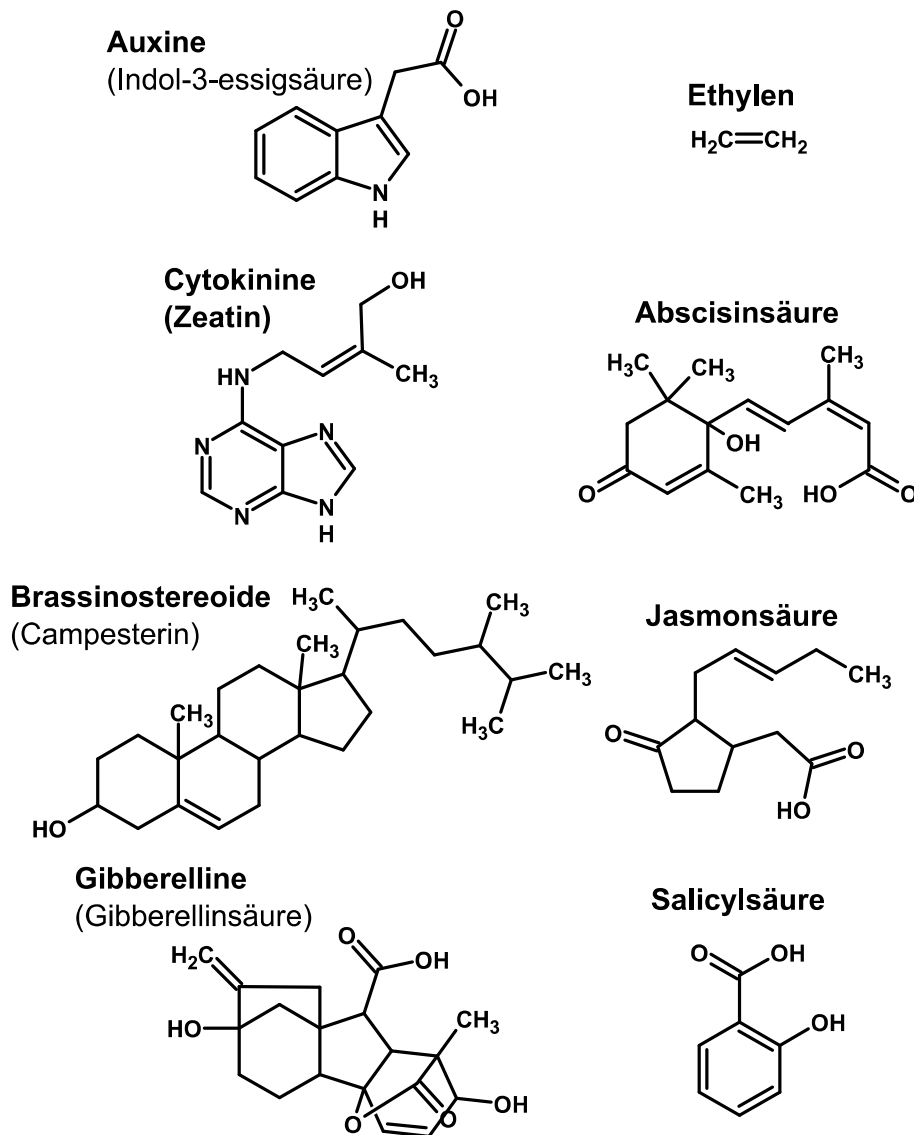


Abbildung 1-1: Pflanzenhormone

Links sind die wachstumsfördernden, rechts die wachstumshemmenden Phytohormone dargestellt, jeweils mit dem bzw. einem der wichtigsten Vertreter der Gruppe (Iten et al. 1999).

Als Antagonist zu den wachstumsfördernden Pflanzenhormonen ist ABA ein natürlicher Wachstumsinhibitor. Seine diversen Funktionen lassen sich in zwei Kategorien zusammenfassen; zum einen beeinflusst es Entwicklungsprozesse, wie die Keimung der Samen, die Elongation der Wurzeln und die Auslösung bzw. Aufrechterhaltung der Dormanz (Bewley 1997; Himmelbach et al. 1998), zum anderen steuert es Anpassungen an abiotische und biotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Kälte, Pathogenbefall, Salinität und zu hohe Lichtintensität (Adie et al. 2007; Christmann et al. 2006; Galvez-Valdivieso et al. 2009; Melotto et al. 2006; Tossi et al. 2009; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006). Die Funktionen kann

ABA unter anderem dadurch erfüllen, dass es essentiell für die Regulation der Schließzellen ist (Kim et al. 2010), bei der Keimung als Antagonist von Gibberillin fungiert (Huttly and Baulcombe 1989) oder die Akkumulation osmoprotektiver Aminosäuren fördert (Verslues and Bray 2006). Die antagonistische Wirkung vieler, in den Entwicklungsphasen der Pflanze gleichzeitig vorkommender, Phytohormone legt nahe, dass durch die Synthese bzw. den Abbau dieser ein flexibles Gleichgewicht besteht, welches die biologischen Prozesse der Pflanzen steuert (Han et al. 2009; Mur et al. 2006; Anderson et al. 2004).

1.1.1. ABA-Biosynthese

ABA wurde 1963 in abgeworfenen Baumwollblättern entdeckt und als den Fruchtfall fördernde Substanz beschrieben (Ohkuma et al. 1963). Ursprünglich wurde es als Faktor Abscisin II bezeichnet bzw. als der die Dormanz auslösende Faktor Dormin. Nachdem festgestellt wurde, dass es sich bei beiden Substanzen um denselben Faktor handelte, setzte sich der Name Abscisin durch (Addicott et al. 1968). Bei diesem Phytohormon handelt es sich um ein monozyklisches Sesquiterpen mit dem systematischen Namen 3-Methyl-5-(1'-hydroxy-4'-oxo-2',6',6'-trimethyl-2'-cyclohexen-1'-yl)-cis-2,4-pentadiensäure, das mittlerweile in einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen, unter anderem auch in menschlichen Granulozyten (Bruzzone et al. 2012), nachgewiesen werden konnte (Nambara and Marion-Poll 2005).

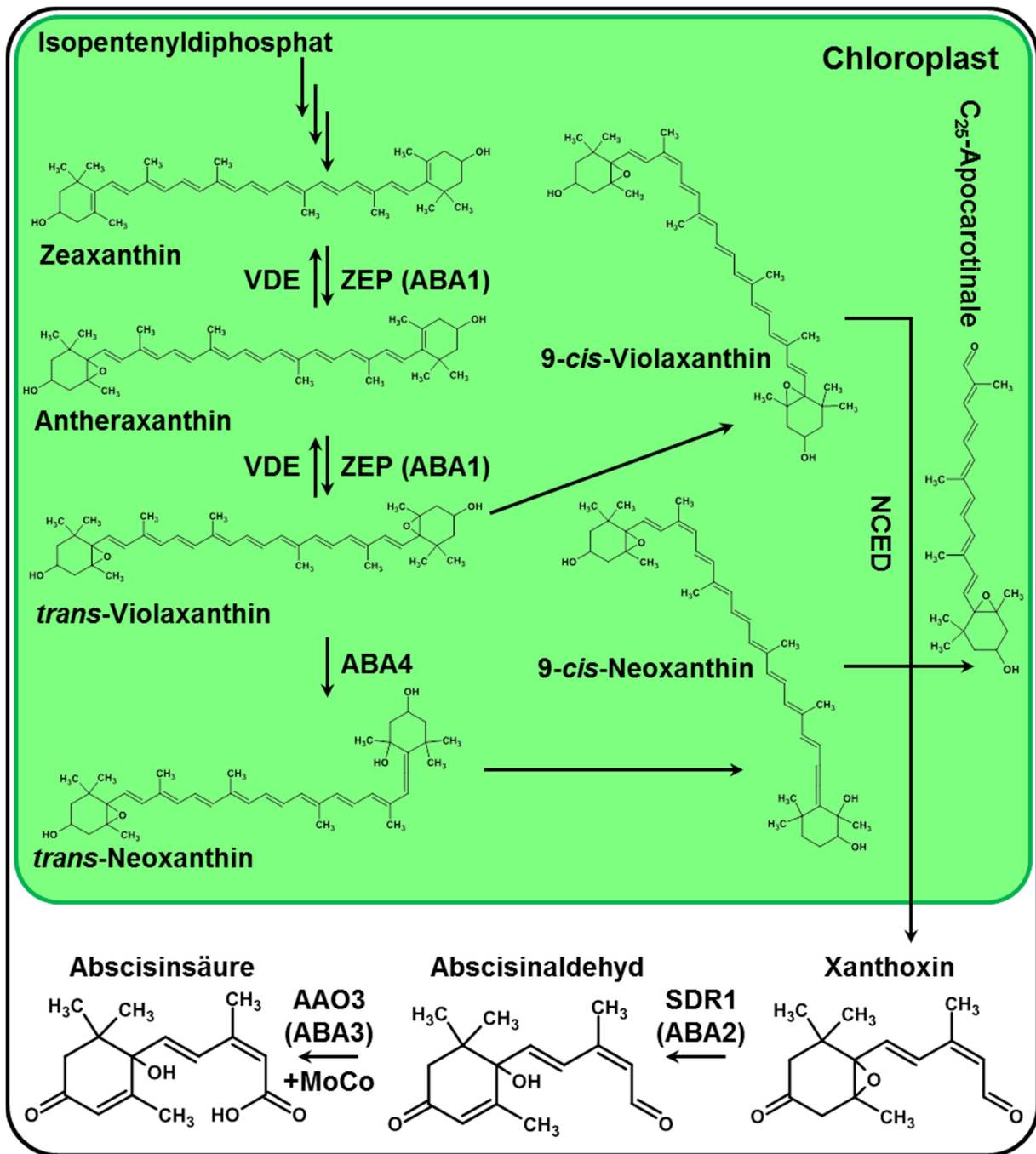


Abbildung 1-2: Biosynthese von ABA

Aus über den Methylerythritol-4-Phosphatweg gebildetem IPP wird Zeaxanthin produziert, welches in Chloroplasten mittels ZEP zu *trans*-Violaxanthin bzw. *trans*-Neoxanthin reagiert und anschließend über NCED zu Xanthoxin gespalten wird. Xanthoxin wird abschließend in das Cytosol transportiert und dort über SDR1 und AAO3 zu ABA umgewandelt. Die Abbildung wurde erstellt nach Schwartz et al. 2003; Schroeder and Nambara 2006; North et al. 2007 und Arc et al. 2013.

Die Biosynthese des Hormons findet in Schließzellen, Zellen des Leitgewebes und in Plastiden statt (Nambara and Marion-Poll 2005). Das Ausgangsprodukt ist Isopentenylpyrophosphat (IPP), das über den Methylerythritol-4-Phosphatweg (MEP-

Weg) in den Chloroplasten gebildet wird (Kasahara et al. 2004). Ausgehend von dem Xanthophyll Zeaxanthin wird über Antheraxanthin *trans*-Violaxanthin gebildet (Bouvier et al. 1996; Marin et al. 1996). Katalysiert wird dieser Prozess durch die Zeaxanthin Epoxidase (Szep et al.), deren Antagonist die Violaxanthin De-Epoxigenase (VDE), die zur Akkumulierung größerer Mengen an Zeaxanthin als UV-Schutz dient, ist (Niyogi et al. 1998). Im Anschluss daran wird *trans*-Violaxanthin entweder über eine Neoxanthinsynthase (ABI4) zu *trans*-Neoxanthin oder isomerisiert zu 9-*cis*-Violoxanthin. Das gebildete *trans*-Neoxanthin isomerisiert ebenfalls zu 9-*cis*-Neoxanthin und wird, wie auch 9-*cis*-Violoxanthin über 9-*cis*-Epoxy-carotinoid-Dehydrogenasen (NCEDs), letztendlich zu Xanthoxin (Schwartz et al. 2003). Xanthoxin kann abschließend ins Cytosol transportiert werden und reagiert dort zu ABA. Hierbei überführt zunächst ABA2 Xanthoxin durch Auflösen der Ethergruppe in ein Abscisinaldehyd, welches anschließend mittels der Abscisinsäurealdehyd Oxidase 3 (ABA3/AAO3) zur Carbonsäure oxidiert wird (Schwartz et al. 1997) (Abbildung 1-2).

1.1.2. ABA-Katabolismus

Der Katabolismus von ABA beginnt mit der Oxidation eines von drei C-Atomen (C'7, C'8 oder C'9), was zur Ausbildung von drei verschiedenen oxidativen Abbauwegen führt (Kushiro et al. 2004; Zhou et al. 2004). Der größte Teil des vorkommenden ABAs wird über die Oxidation von C'8 und das Zwischenprodukt Phaseinsäure zu Dihydrophaseinsäure abgebaut (Nambara and Marion-Poll 2005), wobei diese Abbauprodukte noch über eine biologische Aktivität verfügen, die aber im Vergleich zu ABA deutlich verringert ist (Jadhav et al. 2008; Kepka et al. 2011). Diese Hydroxylierung wird von der P450 Monooxygenase katalysiert (Krochko et al. 1998).

Alternativ kann ABA auch durch die Bildung eines Glukoseesters inaktiviert werden und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. in der Vakuole akkumulieren (Priest et al. 2006; Xu et al. 2002). Diese Reaktion wird durch die ABA-Glycosyltransferase katalysiert. Die Veresterung des Hormons ist reversibel und kann durch spezifische β -Glucosidasen rückgängig gemacht werden. Dies ermöglicht Pflanzen die Bereitstellung eines Vorrats an inaktiver ABA, der als schnelle Reaktion auf biotische

oder abiotische Stressfaktoren reaktiviert wird (Arc et al. 2013; Lee et al. 2006; Xu et al. 2012) (Abbildung 1-3).

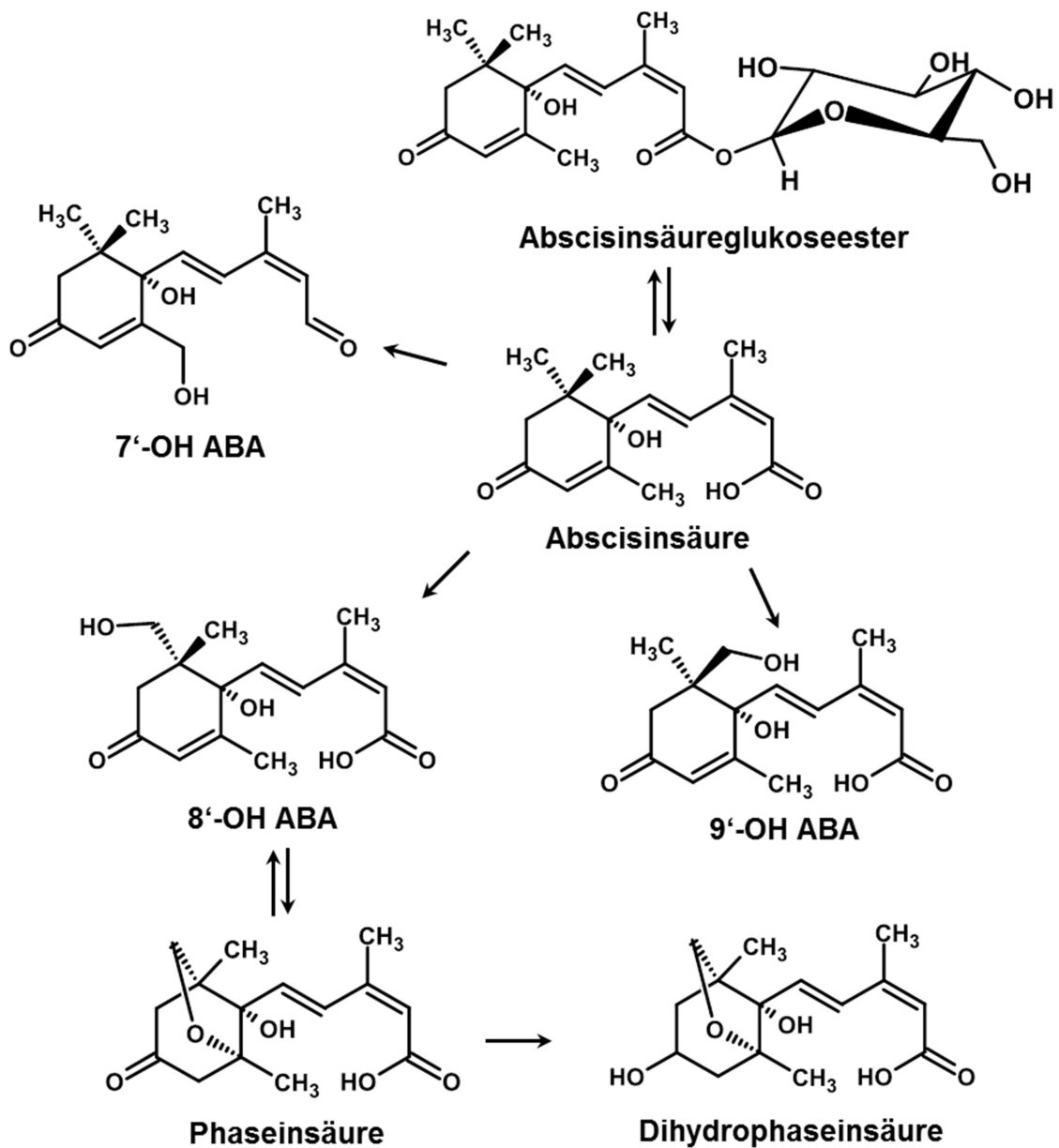


Abbildung 1-3: Katabolismus von ABA

Über eine Hydroxylierung am C'7, C'8 oder C'9 Atom kann ABA abgebaut werden. Hauptabbauweg ist die Oxidation des C'8-Atoms und die Bildung von Phaseinsäure bzw. Dihydrophaseinsäure. Des Weiteren kann ABA in einen inaktiven Glukoseester überführt und mittels spezifischer β -Glucosidasen wieder aktiviert werden. Die Abbildung wurde nach Kepka et al. 2011 erstellt.

1.2. Kernkomponenten der ABA-Signaltransduktion

Die ABA Signaltransduktion kann in drei verschiedene Ebenen aufgeteilt werden. Die erste bildet hierbei der Metabolismus und der Transport von ABA, die zweite wird durch die Wahrnehmung von ABA und die Signaltransduktion dargestellt, die letzte ist die Stressantwort und deren Modulation (Hauser et al. 2011). Die ABA-Wahrnehmung besteht dabei aus drei verschiedenen Schlüsselementen; den ABA Rezeptoren (RCARs/PYR1, PYLs) (Ma et al. 2009; Park et al. 2009), einer Reihe von Proteinphosphatasen des Typs 2C PP2Cs (Schweighofer et al. 2004) und einer Gruppe von Proteinkinasen, den *SNF1-Related Protein Kinase 2* (SnRK2) (Mustilli et al. 2002; Umezawa et al. 2009; Yoshida et al. 2006a).

1.2.1. ABA-Rezeptoren

Die ABA-Rezeptoren wurden unabhängig voneinander durch zwei verschiedene Forschungsgruppen entdeckt. Die Suche nach einer *Arabidopsis*- Variante, welche insensitive zu einem synthetischen Analogon von ABA war, führte zur Identifikation des Rezeptorproteins *Pyrabactin resistance 1* (PYR1) und einer Reihe homologer Proteine (PYLs) (Park et al. 2009). Auf der anderen Seite wurde mittels einer *Yeast-Two-Hybrid* Analyse die regulatorische Komponente des ABA-Rezeptors 1 (RCAR1) als ein mit *Abscisic Acid Insensitive 1* (ABI1) und *Abscisic Acid Insensitive 2* (ABI2) interagierendes Protein entdeckt (Ma et al. 2009; Park et al. 2009), welches sich als identisch zu PYL9 erwies. Insgesamt wurden im Genom von *Arabidopsis* 14 unterschiedliche RCARs gefunden, die auf Basis ihrer Sequenzhomologien in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt werden konnten (Abbildung 1-4A) (Raghavendra et al. 2010). Die Untergruppe I besteht aus vier (RCAR1-4/PYL7-10), die Untergruppe II aus sechs (RCAR5-10/PYL4-6 und PYL11-13) und die Untergruppe III ebenfalls aus vier Proteinen (RCAR11-14/PYL1-3 und PYR1) (Ma et al. 2009; Park et al. 2009).

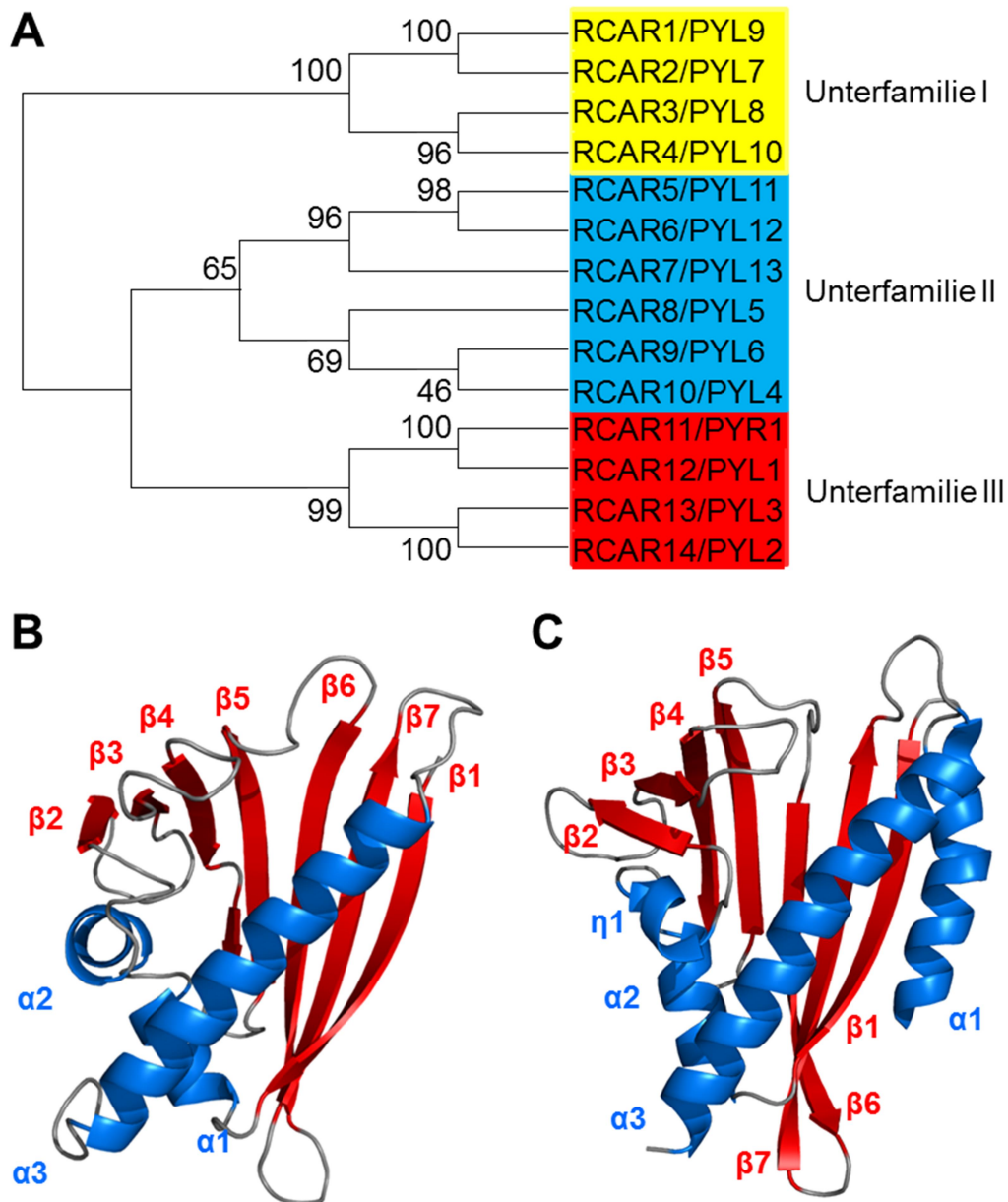


Abbildung 1-4: ABA Rezeptorproteine

(A) Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der RCAR-Familie und der auf Sequenzhomologien basierenden Untergruppen I (gelb), II (blau) und III (rot). Die Darstellung erfolgte mit dem Programm MEGA 6. Die phylogenetische Analyse basiert auf dem *Neighbor-Joining* Algorithmus. Die verwendete Distanzmethode war *Bootstrapping* und beinhaltete 1000 Teildatensätze. Die angegebenen Werte spiegeln den Anteil der Einzelbäume zweier RCARs in Prozent wider in denen die betreffende Verzweigung enthalten war. Dreidimensionale Struktur von Bet v 1 (B) (Gajhede et al. 1996) und RCAR1 (C) (Nakagawa et al. 2014). In blau sind die α -Helices, in rot die β -Faltblattstrukturen und in grau die *random coil*-Bereiche der Proteine markiert. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 1BV1 und 3W9R.

Die RCAR-Proteine sind Mitglieder der Bet v 1 Superfamilie. Diese Proteingruppe zeichnet sich durch eine siebensträngige antiparallele β -Faltblattstruktur (β 1- β 7),

welche um eine zentrale C-terminale α -Helix angeordnet ist, aus (Abbildung 1-4B, C). Zwei aufeinanderfolgende kürzere α -Helices trennen hierbei die β 1-Faltblattstruktur von den restlichen Faltblattstrukturen (β 2- β 7). Der hydrophobe Kern der Struktur wird vom C-terminalen Ende der α 3-Helix, sowie den Helices α 1 und α 2 gebildet. Die Helices sind amphiphile Strukturen, deren hydrophobe Elemente im Kernbereich des Proteins lokalisiert sind. Des Weiteren sind die hydrophoben Aminosäuren der Faltblattstrukturen β 1, β 5, β 6 und β 7 an der Bildung der hydrophoben Bindetasche beteiligt (Gajhede et al. 1996). Diese spezifische dreidimensionale Struktur führt zur Ausbildung einer Ligandenhöhle in der kleine hydrophobe Moleküle wie Hormone oder Lipide gebunden werden können und ist in allen Proteinen dieser Klasse konserviert (Iyer et al. 2001; Radauer et al. 2008).

1.2.2. Proteinphosphatasen 2C der Gruppe A

Die PP2Cs der Pflanzen sind ein zentraler Bestandteil der Stressantwort dieser Organismen (Moorhead et al. 2007). Proteinphosphatasen sind sehr verschieden und können auf Basis der katalytischen Aktivität in drei Gruppen unterteilt werden (Moorhead et al. 2007). Die Serin/Threonin-spezifischen, die metallabhängigen und die Aspartat-abhängigen Proteinphosphatasen (Kerk et al. 2008). Die Enzyme werden weiterhin in eine Reihe von Untergruppen auf Basis der Abhängigkeit von verschiedenen Metallkofaktoren, sowie der Sensitivität gegenüber unterschiedlichen Inhibitoren unterteilt. Während der Evolution von Prokaryoten zu mehrzelligen eukaryotischen Organismen haben die PP2Cs sich zu einer Proteinklasse entwickelt, die eine große Anzahl an Unterklassen enthält. Die Klasse der metallabhängigen PP2Cs, welche durch die magnesium- und manganabhängigen Proteinphosphatasen gebildet wird, umfasst in höheren Pflanzen wie Arabidopsis und Reis 80 bis 90 Mitglieder, welche zu zehn oder mehr Untergruppen gehören (Singh et al. 2010; Xue et al. 2008; Fuchs et al. 2013). Die Gruppe A der PP2Cs repräsentiert eine dieser Untergruppen aus Arabidopsis und besteht aus neun Enzymen (Abbildung 1-5A).

Als erste der PP2Cs wurde ABI1 durch die Erzeugung einer Substitutionsvariante identifiziert. Hierbei wurde ein ABA-insensitiver Phänotyp, (ABA insensitive 1, ABI1) durch den Austausch einer Aminosäure im Interaktionsbereich der Proteinphosphatasen generiert (Leung et al. 1994; Meyer et al. 1994). ABI1 und sein

Homologe ABI2 sind PP2Cs, welche den gesamten Bereich der ABA-Antwort regulieren, darin eingeschlossen Transpiration, vegetatives Wachstum und die Samenkeimung (Koornneef et al. 1984). Die Beeinflussung des Interaktionsbereiches der Enzyme und die daraus resultierende verminderte Affinität zu den Substratproteinen war ursächlich für die Bildung des ABA-Phänotyps (Ma et al. 2009).

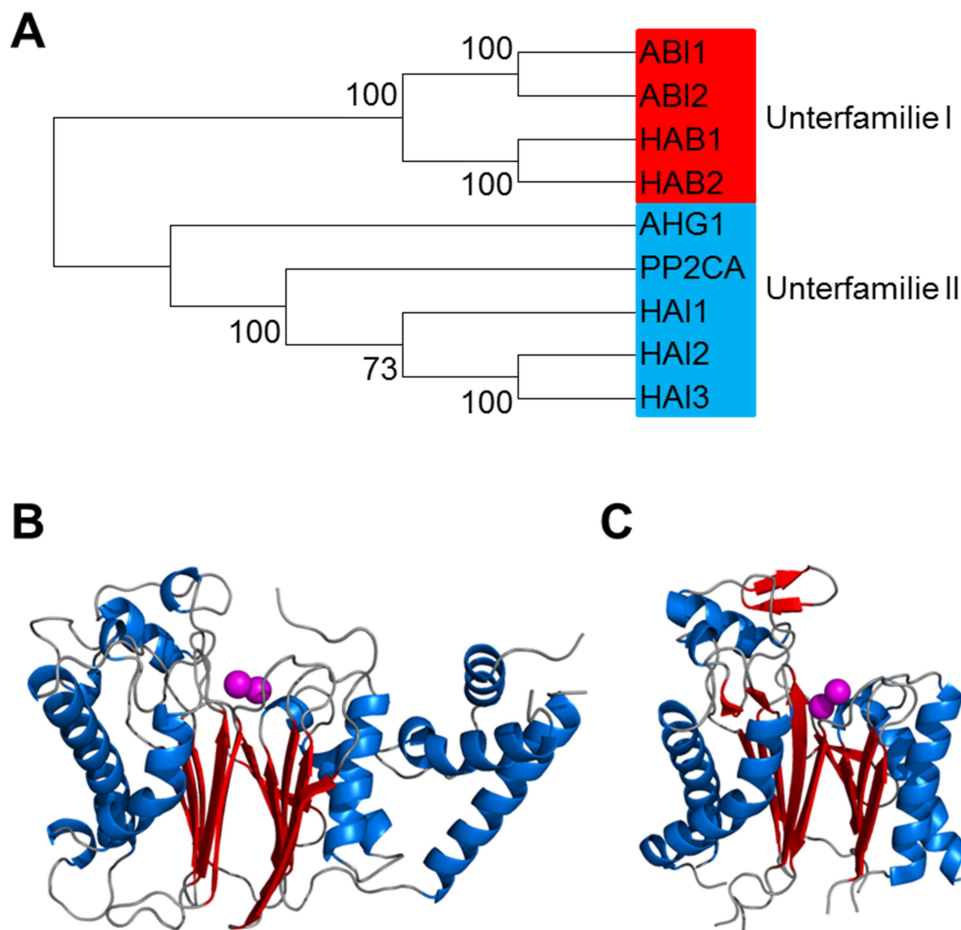


Abbildung 1-5: Proteinphosphatasen Typ 2C

(A) Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der PP2C-Familie und der auf Sequenzhomologien basierenden Untergruppen I (rot) und II (blau). Die Darstellung erfolgte mit dem Programm MEGA 6. Die phylogenetische Analyse basiert auf dem *Neighbor-Joining* Algorithmus. Die verwendete Distanzmethode war *Bootstrapping* und beinhaltete 1000 Teildatensätze. Die angegebenen Werte spiegeln den Anteil der Einzelbäume zweier PP2Cs in Prozent wider in denen die betreffende Verzweigung enthalten war. Dargestellt sind die dreidimensionalen Strukturen der humanen Serin/Threonin Proteinphosphatase 1A (B) (Das et al. 1996) und ABI1 (C) (Melcher et al. 2010). In blau sind die α -Helices, in rot die β -Faltblattstrukturen und in grau die *random coil*-Bereiche der Proteine markiert. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 1A6Q und 3NMN.

Die zentrale Rolle dieser beiden Proteine wurde über die Phänotypen der Mutanten *abi1* und *abi2* früh bestätigt (Koornneef et al. 1984). Mittlerweile wurden alle Mitglieder der PP2Cs als Elemente der ABA-Signaltransduktion charakterisiert. Sie kontrollieren über negative Regulation ABA-vermittelte Prozesse; hierbei in erster Linie das Wurzelwachstum, die Keimung oder die Schließung der Spaltöffnungen (Cherel et al. 2002; Merlot et al. 2001; Saez et al. 2004; Umezawa et al. 2009). Zusätzlich zu diesen beiden Proteinen besteht die Untergruppe noch aus PP2CA / AHG3 (*ABA Hypersensitive Germination 3*) (Yoshida et al. 2006b), HAB1 (*Homology to ABI1 1*) (Rodriguez et al. 1998), HAB2 (*Homology to ABI1 2*) (Saez et al. 2004), HAI1 (*Highly ABA-Induced PP2C 1*), HAI2 (*Highly ABA-Induced PP2C 2*) und HAI3 (*Highly ABA-Induced PP2C 3*) (Fujita et al. 2009) sowie AHG1 (*ABA Hypersensitive Germination 1*) (Nishimura et al. 2007). Der strukturell konservierte katalytische Bereich einer PP2C ist in all diesen Proteinen und auch in anderen Organismen (z. B. humane Serin/Threonin Proteinphosphatase 1A) zu finden. Er besteht aus einer zentralen Struktur von zwei mal fünf antiparallelen β -Faltblattstrukturen, wobei jede dieser Strukturen durch zwei α -Helices flankiert wird (Das et al. 1996) (Abbildung 1-5B und C). Durch diese Anordnung wird eine Spalte zwischen den β -Faltblattstrukturen erzeugt. Die Koordination der Metallionen innerhalb dieser Spalte durch benachbarte Aminosäuren erlaubt die Aktivierung eines Wassermoleküls, welches die Phosphatgruppe des Substrats nukleophil angreifen und abspalten kann (Das et al. 1996). Über die Generierung verschiedener Varianten, in welchen jeweils eines der Mitglieder der PP2C Unterklasse fehlte, konnte die Redundanz dieser Enzyme nachgewiesen werden. Das Fehlen einzelner Mitglieder der PP2Cs führte zu keinen Veränderungen in Funktion und Phänotyp (Yoshida et al. 2006b). Erst durch das Ausschalten mehrerer PP2Cs war die Erzeugung eines ABA übersensitiven Phänotyps möglich (Rubio et al. 2009; Saez et al. 2006).

1.2.3. Proteinkinasen

Proteinkinasen, die eine bekannte Funktion in der ABA Signaltransduktion haben, gehören zu den SNF-1 (*sucrose non fermenting 1*) ähnlichen Proteinkinasen. (Harmon et al. 2000; Kudla et al. 2010; Umezawa et al. 2010). Es handelt sich bei ihnen um positive Regulatoren der ABA-Signaltransduktionskaskade (Fujita et al. 2009). Die Unterfamilie 2 dieser Enzyme besteht aus 10 Mitgliedern, die in drei

verschiedene Untergruppen unterteilt werden kann (Kobayashi et al. 2004). Diese SnRK2 liegen in Landpflanzen konserviert vor und ihre Rolle in der ABA Signaltransduktion und in der Antwort auf osmotischen Stress konnte für Mitglieder von Mais, Reis, Erbsen und Gerste gezeigt werden (Huai et al. 2008; Kobayashi et al. 2004; Li et al. 2000; Shen et al. 2001). In Arabidopsis sind die SnRK2 in Kombination mit ABA am besten untersucht (Fujita et al. 2009). Mit Ausnahme von SnRK2.9, können alle SnRK2s durch osmotischen und salzbedingten Stress aktiviert werden (Boudsocq et al. 2004). Allerdings unterliegen nur die SnRK2.2/3/6(OST1)/7/8 einer ABA-abhängigen Regulation (Boudsocq et al. 2004; Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2002). Hierbei sind SnRK2.2/3/6 diejenigen Proteinkinasen, welche am stärksten durch die Gegenwart von ABA aktiviert werden (Fujita et al. 2009). Woraus hervorgeht, dass bei den SnRK2s oder ihren Substraten die ABA-abhängigen und -unabhängigen Signalwege aufeinandertreffen.

1.3. ABA-Signaltransduktion

1.3.1. ABA-Erkennung und Koordination

Die Besonderheit der RCAR-Proteine ist ihre hydrophobe Bindungstasche, die durch die dreidimensionale Struktur der Proteine entsteht. Diese Tasche, welche hauptsächlich aus der C-terminalen Helix und der siebensträngigen β -Faltblattstruktur besteht, hat eine Größe von 543 \AA^3 in der offenen und 480 \AA^3 in der geschlossenen Konformation (Abbildung 1-6A) (Santiago et al. 2009a; Melcher et al. 2009). Die Bindungstasche wird von 23 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren gebildet, welche hochkonserviert innerhalb der RCAR-Familie vorliegen.

Die ABA-Erkennung und -Bindung basiert auf einem *gate-latch*-Mechanismus der, durch die Aufklärung der Proteinstrukturen, von fünf Forschungsgruppen beschrieben wurde (Yin et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Nishimura et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Melcher et al. 2009). Analysen der ABA-gebundenen und -freien Kristallstruktur zeigen, dass der Eingangsbereich der Bindungstasche von zwei ungefalteten Regionen umgeben ist, die sich auf der einen Seite zwischen den Faltblattstrukturen β_3 und β_4 (Aminosäuren SGLPA; *gate*) und auf der anderen Seite

zwischen $\beta 5$ und $\beta 6$ (Aminosäuren: HRL; *latch*) befinden (Abbildung 1-6B). Die Bindung des Phytohormons induziert eine Konformationsänderung des Proteins; hierbei ändert sich die Position des *latch loops* kaum, wohingegen beim *gate loop* eine größere Konformationsänderung zwischen 3 bis 9 Å zu erkennen ist, die in einem Verschluss der Bindungstasche resultiert (Abbildung 1-6C und D) (Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Shibata et al. 2010; Melcher et al. 2009).

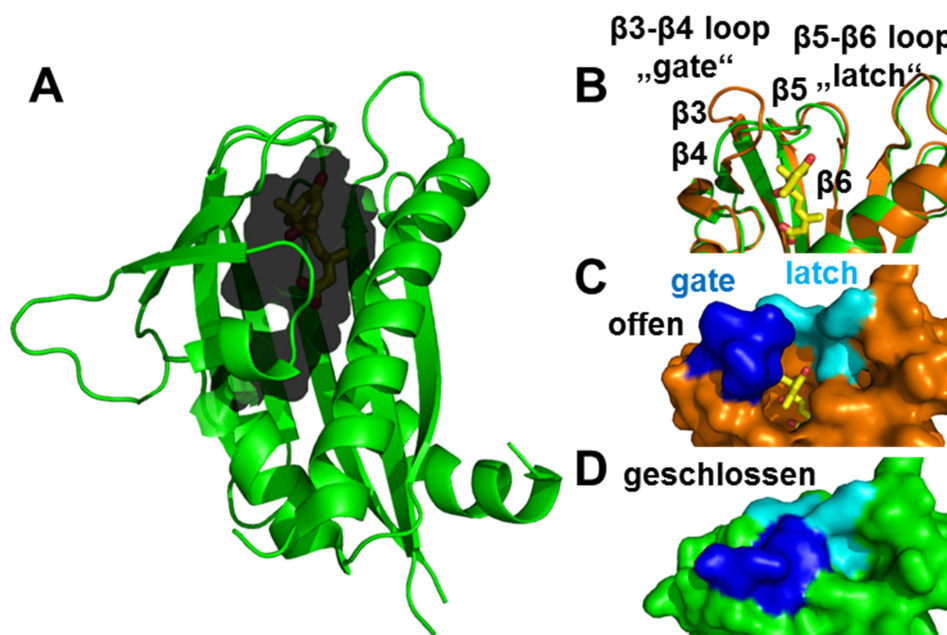


Abbildung 1-6: ABA-Bindung an RCAR

(A) Die konservierte Bindetasche im hydrophoben Kern der RCAR-Proteine ist als schwarze Oberflächendarstellung im Inneren des Proteins gezeigt (Miyazono et al. 2009). (B) Darstellung der *gate* und *latch loop* Region in offener (orange) und geschlossener (grün) Konformation des Proteins. Vergleichende Oberflächendarstellung des RCAR-Proteins im offenen (C) und geschlossenen (D) Zustand. Zur Verdeutlichung der Konformationsänderung bei ABA-Bindung wurden der *gate loop* dunkel- und der *latch loop* hellblau eingefärbt (Melcher et al. 2009). Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 3KAZ und 3KB0.

Das durch die RCARs gebundene ABA wird innerhalb der Bindetasche durch eine Reihe von Interaktionen stabilisiert (Yin et al. 2009; Santiago et al. 2009a; Nishimura et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Melcher et al. 2009). Durch die Größe der Ligandenhöhle ist ABA vom externen Medium nahezu vollständig isoliert. Die Wände dieser Bindungstasche sind perfekt auf den chemischen Charakter des Phytohormons abgestimmt. Sowohl die apolaren Bereiche des Moleküls also auch

die geladenen Gruppen werden durch Interaktionen stabilisiert. Viele der Wechselwirkungen mit den Seitenketten funktionieren über H-Brückenbindungen mit Wassermolekülen.

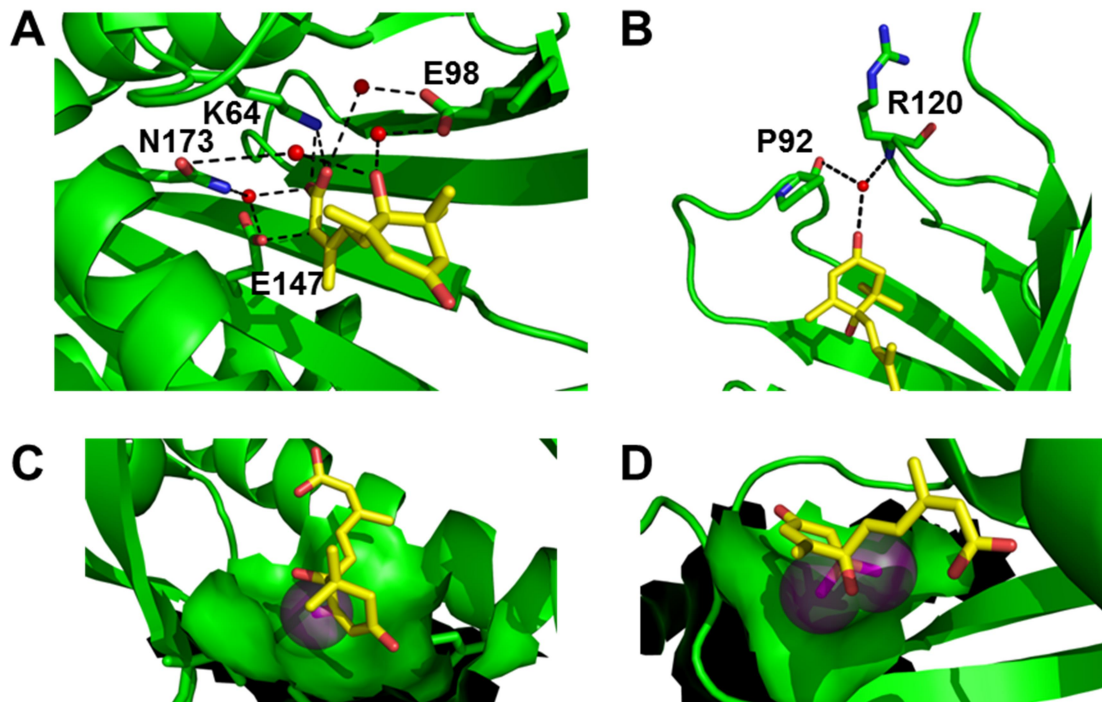


Abbildung 1-7: ABA Koordination

Interaktionen polarer Aminosäuren von RCAR12 mit der Carboxy- bzw. Hydroxygruppe (A) oder der Ketogruppe (B) von ABA. Die Methyl- (C) und die Dimethylgruppe (D) von ABA wurden jeweils violett markiert und ihre Größe mittels einer transparenten Kugel verdeutlicht. Die hydrophoben Taschen sind in grüner Oberflächendarstellung dargestellt. ABA wurde jeweils als gelbes Strichmodell gezeichnet. Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die roten Kugeln repräsentieren das Sauerstoffatom der Wassermoleküle. (Melcher et al. 2009). Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDB: 3KB0.

ABA ist zentral in der Bindungstasche der RCARs lokalisiert. Jede der polaren Gruppen des Liganden ist direkt oder indirekt über Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die Carboxygruppe wird über die Seitenkette von K64 koordiniert (Abbildung 1-7A) und ist weiterhin über ein komplexes Geflecht von wasservermittelten Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren E98, N173 und E147 verbunden (Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2009a). Die Hydroxylgruppe am chiralen Kohlenstoff ist ebenfalls über stabilisierende Wechselwirkungen mit den Aminosäuren E98 und N173 verknüpft (Abbildung 1-7A). Die Ketogruppe von ABA wird über P92 aus dem *gate loop* und über R120 aus dem *latch loop* koordiniert.

Diese beiden Aminosäuren bilden über ein Wassermolekül eine ionische Interaktion mit ABA aus (Abbildung 1-7B) (Nakagawa et al. 2014; Yin et al. 2009). Neben den ionischen Wechselwirkungen sind auch die hydrophoben Interaktionen entscheidend für die Bindung von ABA. Durch die Aminosäuren F66, V87, L91, P92, F165 und V169 wird eine hydrophobe Bindungstasche für die Methylgruppe der ABA bereitgestellt (Abbildung 1-7C) (Santiago et al. 2009a). Eine größere hydrophobe Bindestelle für die Dimethylgruppe wird in erster Linie durch die Aminosäuren A93, S96 und V114 gebildet (Abbildung 1-7D). Die an der Koordination von ABA und an der Bildung der Bindungstasche beteiligten Aminosäuren sind innerhalb der gesamten RCAR-Familie hochkonserviert (Santiago et al. 2009a). Die Bindung von ABA und die darauf folgende Schließung der Ligandenhöhle resultieren in einer Änderung der Konformation der RCAR-Proteine und der Ausbildung einer neuen Interaktionsfläche (Melcher et al. 2009; Santiago et al. 2009a).

1.3.2. Ausbildung des heterotrimeren Komplexes

Die Ausbildung des Komplexes zwischen einem ABA-gebundenen RCAR-Protein und der Proteinphosphatase besteht aus einem komplexen Netzwerk von Van-der-Waals-Kontakten und direkten oder indirekten Wasserstoffbrückenbindungen (Yin et al. 2009). Den wichtigsten Bereich dieser Interaktionen stellt das katalytische Zentrum der Proteinphosphatase dar (Abbildung 1-8A). Aus Vergleichen der Struktur und der Sequenz der PP2C Familie geht hervor, dass dieses auch in anderen Organismen hochkonserviert ist (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Yin et al. 2009). Seine Position befindet sich zwischen den zentralen β -Faltblattstrukturen der beiden fünfsträngigen antiparallelen Faltblattstrukturen (Abbildung 1-5) und besteht aus acht konservierten Aminosäuren, welche die Metallkofaktoren des Proteins koordinieren (Dupeux et al. 2011a; Melcher et al. 2009). In ABI1 sind diese Aminosäuren Arg138, Glu142, Asp143, Asp177, Gly178, His179, Asp347 und Asp413 (Abbildung 1-8A) (Miyazono et al. 2009).

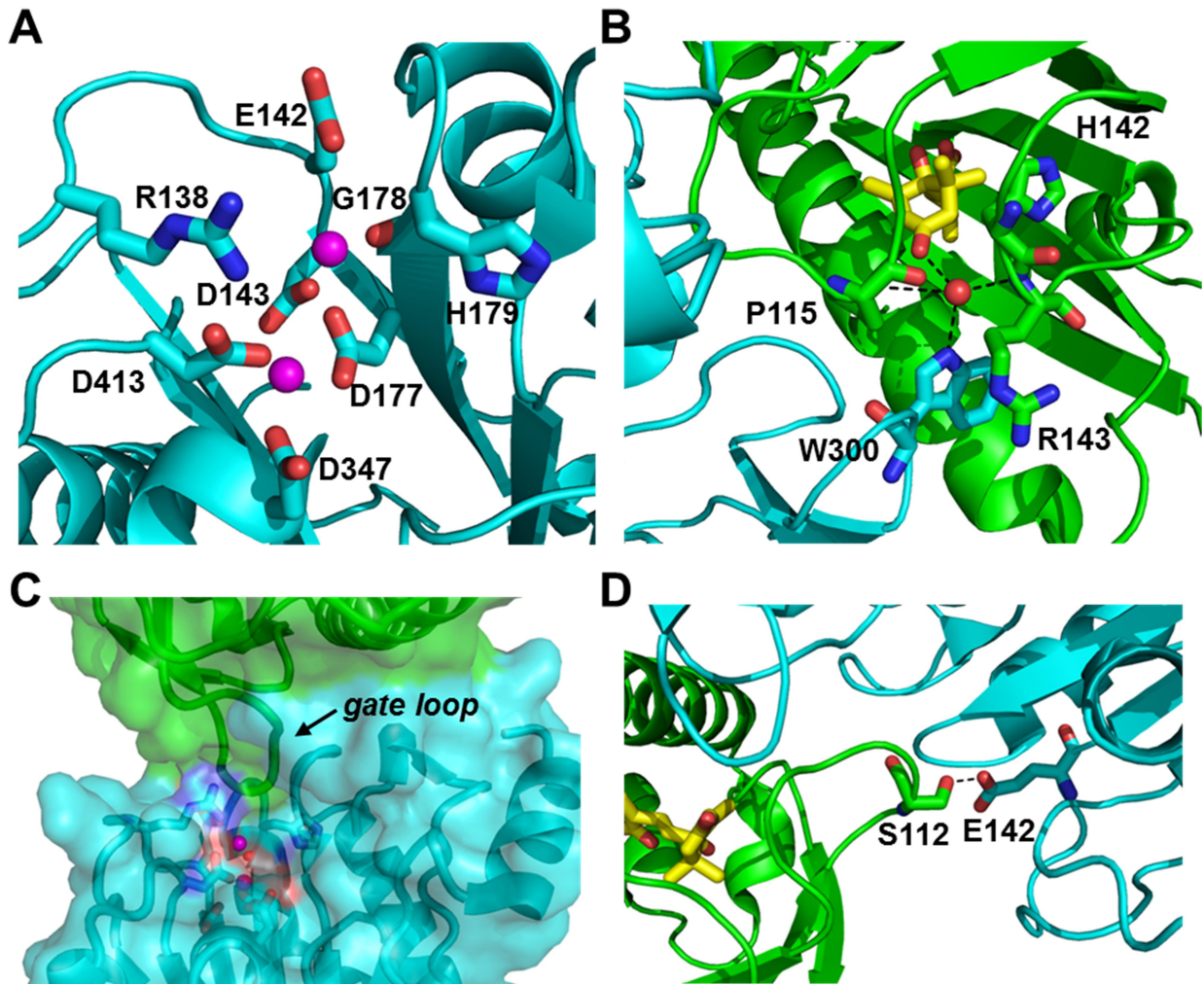


Abbildung 1-8: PP2C Interaktionen

(A) Aktives Zentrum der PP2C ABI1 (cyan). Die den katalytischen Bereich bildenden und für die Koordination der Metallkofaktoren (Kugeln, magenta) entscheidenden Aminosäuren sind als Strichmodell hervorgehoben (Miyazono et al. 2009). (B) Gezeigt ist das Netzwerk der wasservermittelten (rote Kugel) Interaktionen (schwarze Linien) der Ketogruppe von ABA (gelb) mit den Aminosäuren des *gate* und *latch loops* des RCAR-Proteins (grün) und des Tryptophans der PP2C (cyan) (Melcher et al. 2009). (C) Oberflächendarstellung der Interaktionsseiten von ABI1 und RCAR12. Das aktive Zentrum der PP2C ist als Strichmodell dargestellt. (D) Direkte Wasserstoffbrückenbindung (schwarze Linien) zwischen einem Serin des RCARs und einem Glutamin der PP2C, die Aminosäuren sind jeweils als Strichmodell hervorgehoben (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009). Bei allen Abbildungen wurden Stickstoffatome blau und die Sauerstoffatome rot markiert. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDB: 3JRQ.

Die auffälligste Interaktion zwischen der PP2C und dem RCAR-Protein wird durch die Seitenkette eines Tryptophans gebildet, das sich in einer Loopregion der Proteinphosphatase befindet. Es ragt aus der Oberfläche des Proteins heraus und ist mit Ausnahme von AHG1 bei allen Proteinen der PP2C-Familie in Arabidopsis

konserviert (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009; Yin et al. 2009). Dieses Tryptophan bindet zwischen dem *gate* und *latch loop* der RCAR-Proteine und interagiert über eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung indirekt mit der Ketogruppe von ABA (Melcher et al. 2009). Zusätzlich interagiert es mit einer Aminosäure des *gate*- (Pro115) und einer Aminosäure des *latch loops* (Arg143) (Dupeux et al. 2011a). In Abbildung 1-6D ist gezeigt, dass die Bindungstasche durch die Bindung von ABA vollständig geschlossen vorliegt. Für die Bindung an die PP2C kommt es daher zu einer Konformationsänderung, die es dem Tryptophan erlaubt zwischen den Loops zu binden (Melcher et al. 2009). Demnach ist es die einzige PP2C-Aminosäure, die direkten Kontakt mit dem Phytohormon in der Bindetasche hat (Abbildung 1-8B) (Miyazono et al. 2009). Mutationen in diesem Tryptophan resultieren in einer ABA-insensitiven PP2C Regulation und in einer Abnahme der Affinität des ABA-Moleküls zum PP2C-RCAR-Rezeptorkomplex (Dupeux et al. 2011a).

Die RCAR-Proteine interagieren mit den PP2Cs in einem Bereich, der sich um deren aktives Zentrum herum anordnet. Dieser ist überwiegend hydrophob und wird von einigen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Abbildung 1-8C). Hierbei positioniert sich der β 3- β 4 *loop* (*gate*) nahe des katalytischen Zentrums der Proteinphosphatasen bei den Aminosäuren D177 und G178 (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009). Die Bedeutung dieser beiden Aminosäuren für die Aktivität der Proteinphosphatasen ist bereits gut untersucht und ihre Abwesenheit führt zu einer Insensitivität gegenüber ABA (Bertauche et al. 1996). Die Interaktionsfläche zwischen der PP2C und dem RCAR beträgt im Falle von ABI1 und RCAR12 7,4% (883 Å²) bzw. 8,9% (851 Å²) des jeweiligen Proteins in Bezug auf seine Gesamtoberfläche (Miyazono et al. 2009). Hierbei bildet das Serin des *gate loops* in RCAR eine besonders wichtige Wechselwirkung über eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Glutamin im katalytischen Zentrum der Proteinphosphatase aus (Abbildung 1-8D) (Dupeux et al. 2011a; Miyazono et al. 2009; Yin et al. 2009). Als Teil des aktiven Zentrums des Proteins ist diese Aminosäure von entscheidender Bedeutung für die Aktivität der Proteinphosphatase. Es hat sich gezeigt, dass ihre Abwesenheit bzw. die des Serins im regulatorischen Protein dazu führt, dass die Aktivität der PP2Cs nicht mehr inhibiert werden kann (Miyazono et al. 2009). Die aufgeführten Interaktionen zwischen den PP2Cs und

RCARs zeigen, dass das aktive Zentrum der Proteinphosphatasen durch die RCAR Proteine beeinflusst und dies die Grundlage ihrer regulatorischen Wirkung ist (Dupeux et al. 2011a; Miyazono et al. 2009).

1.3.3. ABA-Signaltransduktion

Die Aufgabe der aktiven PP2Cs ist die Inhibierung von Proteinkinasen wie den SnRK2s, die als positive Regulatoren des ABA Signalweges fungieren (Kulik et al. 2011; Mustilli et al. 2002; Rubio et al. 2009; Vlad et al. 2009; Xie et al. 2012). Durch die Bindung eines RCARs und eines ABA-Moleküls an eine PP2C bildet sich ein heterotrimerer Komplex aus, der das zentrale Element der ABA Signaltransduktionskaskade darstellt. Hierbei bindet das RCAR-Protein an derselben Interaktionsfläche der PP2C an, welche zuvor von der Proteinkinase besetzt wurde (Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2012; Soon et al. 2012). RCARs dienen demnach für die PP2Cs als ein Pseudosubstrat, die anstelle der Proteinkinasen gebunden werden (Klingler et al. 2010). Durch die Inaktivierung der enzymatischen Aktivität der PP2Cs werden die SnRK2s aktiviert (Yin et al. 2009; Miyazono et al. 2009). Ziel dieser Proteinkinasen ist eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, welche an der ABA-vermittelten Genregulation beteiligt sind (z.B. ABI5). Eine der Klassen von Transkriptionsfaktoren, welche von den Proteinkinasen aktiviert werden, gehören zu den *basic region/leucine zipper* (bZIP) und werden als *ABA-responsive element binding proteins* (ABFs) bezeichnet (Choi et al. 2000; Finkelstein and Lynch 2000; Lopez-Molina and Chua 2000; Uno et al. 2000). Das Zusammenwirken mehrerer verschiedener Klassen an Transkriptionsfaktoren dient zur Verstärkung und besseren Kontrolle der Genexpression. Im Falle von ABI5 wird dieses noch durch ABI3, welches zu den B3-Transkriptionsregulatoren gehört, verstärkt (Monke et al. 2004; Nakashima et al. 2006). ABI4, ein AP2 Transkriptionsfaktor, bindet an das *coupling element* (CE) zur besseren Regulation der ABA-abhängigen Genexpression (Finkelstein et al. 1998; Reeves et al. 2011; Soderman et al. 2000; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006) (Abbildung 1-9).

Des Weiteren wird der Anionenkanal SLAC1 durch OST1 aktiviert (Geiger et al. 2009; Lee et al. 2009), wohingegen der Kationenkanal KAT1 durch dieselbe Proteinkinase inaktiviert wird (Sato et al. 2009). Beide Ionenkanäle werden wechselseitig über die ABA-Signaltransduktionskaskade und eine calciumabhängige

Regulation kontrolliert (Siegel et al. 2009). Die durch den Anionenausstrom aus SLAC1 vermittelte Depolarisierung führt anschließend zur Schließung der Spaltöffnungen (Negi et al. 2008a; Vahisalu et al. 2008) (Abbildung 1-9).

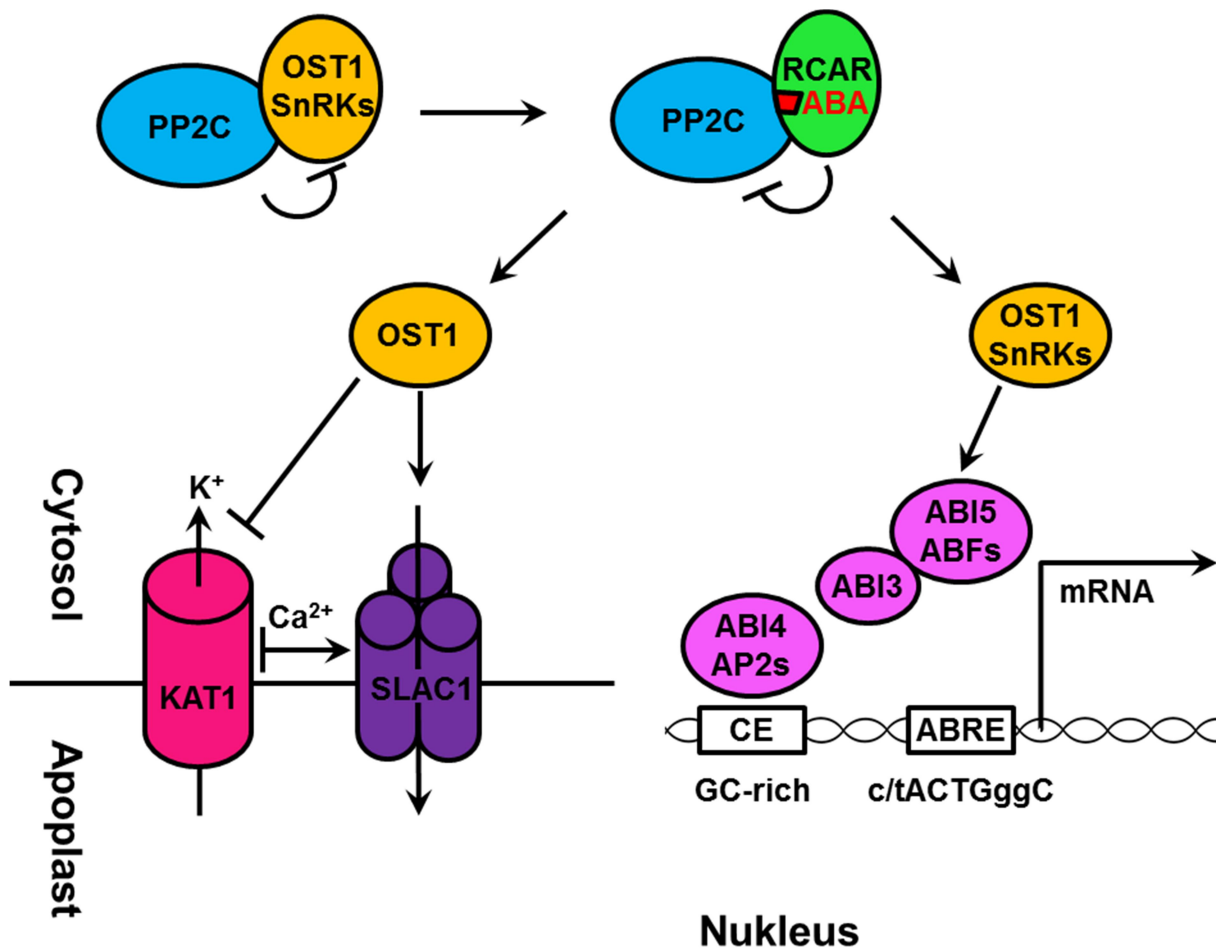


Abbildung 1-9: ABA-Signaltransduktion für Ionenkanäle und Nukleus

Der heterotrimerische Komplex wird aus einem RCAR (grün), einem ABA (rot) und einer PP2C (blau) gebildet. Durch die Bindung des regulatorischen Proteins werden die Proteinkinasen (orange) nicht mehr inhibiert und sind in der Lage zentrale Komponenten des ABA-Signalweges zu phosphorylieren. In Stomata sind die Ziele dieser Proteinkinasen Ionenkanäle, welche entweder inhibiert (KAT1; pink) oder aktiviert (SLAC1, violett) werden. Im Zellkern werden Transkriptionsfaktoren (magenta) von den SnRK2s aktiviert. ABI5 und ABFs werden phosphoryliert und binden als Dimere an ABREs. ABI3 interagiert mit ABI5 um seine Aktivität zu steigern, während ABI4 für eine verbesserte Regulation der ABA-abhängigen Genexpression an *coupling elements* (CE) bindet. Die Abbildung wurde nach (Raghavendra et al. 2010) erstellt.

1.4. Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung

1.4.1. Die Peptidyl-Prolylbindung

Peptidbindungen an welchen die Aminosäure Prolin beteiligt ist besitzen partiellen Doppelbindungscharakter und zeigen daher eine planare Anordnung. Die flankierenden C_{α} -Atome sind entweder *trans* oder *cis* zueinander angeordnet. Bei allen anderen Peptidbindungen ist die sterische Hinderung der beiden C_{α} -Atome in der *cis*-Konformation energetisch derart ungünstig, dass nur etwa 0,1-1% der Bindungen im *cis*-Zustand vorliegen (Scherer et al. 1998). In nativen Proteinen ist eine Nichtprolyl-*cis*-Peptidbindung daher sehr unwahrscheinlich (Jabs et al. 1999).

Bei Peptidyl-Prolylbindungen hingegen ist das *trans*-Isomer gegenüber dem *cis*-Isomer energetisch nur leicht favorisiert, da durch den Pyrrolidinring der Aminosäure Prolin das C_{α} -Atom der vorhergehenden Aminosäure immer *cis*-ständig zu einem der C-Atome (C_{α} oder C_{δ} -Atom) des Prolins steht (Abbildung 1-10) (Balbach und Schmid 2000). Dieser Energieunterschied führt dazu, dass in einem nativen Protein etwa 7% der Prolinbindungen in einer *cis*-Konformation vorliegen. Durch den partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung ist die Aktivierungsenergie für eine Isomerisierung mit ca. 80 kJ/mol sehr hoch. Folglich handelt es sich bei Prolinisomerisierungen um langsame Faltungsvorgänge im Bereich von 10 bis 100 s pro *cis/trans*-Isomerisierung bei 25 °C (Schmid 2001).

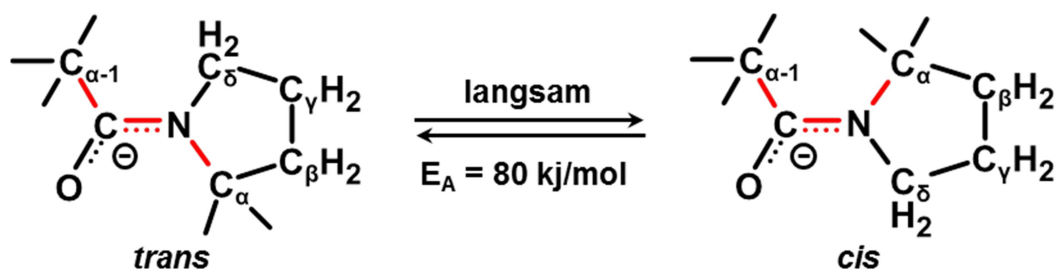


Abbildung 1-10: *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung.

Das Gleichgewicht liegt zu 70-90% auf der Seite der *trans*-Konformation (Balbach und Schmid 2000).

Da das native Protein in den meisten Fällen nur eines der beiden Isomere der Prolinbindung akzeptiert ist die Konformation im vollständig gefalteten Enzym meist

festgelegt. Hierbei weisen nur etwa 5-7% aller Peptidyl-Prolylbindungen eine *cis*-Konformation auf (Stewart et al. 1990). Bei einigen Proteinen konnte allerdings auch ein Gleichgewicht zwischen den Isomeren beobachtet werden. Beispiele hierfür bilden die Staphylokokkennuklease (Evans et al. 1987), Calbindin (Chazin et al. 1989) und das humane Interleukin-3 (Feng et al. 1997).

1.4.2. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Bei Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, welche sowohl in Eukaryoten, als auch in Prokaryoten vorkommen. Grundlage ihrer Entdeckung war die Entwicklung eines proteasegekoppelten Isomerasetests durch Fischer und Mitarbeiter (Fischer et al. 1984a). Bei diesem Experiment wird ein chromogenes Tetrapeptid nur dann durch Chymotrypsin gespalten, wenn seine Prolinbindung in der *trans*-Konformation vorliegt. Dieses System erlaubte die Identifizierung von Cyclophilin, als die erste Prolylisomerase (Fischer et al. 1984b; Fischer et al. 1989). Durch Lang wurde 1987 gezeigt, dass die katalytische Funktion dieser Proteine darin besteht die Isomerisierung der Peptidbindung zwischen Prolin und der Aminosäure vor Prolin von *trans* zu *cis* zu beschleunigen (Lang et al. 1987).

Die Hemmung der Aktivität der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen ist ein essentieller Bestandteil der Immunsuppression. Es konnte gezeigt werden, dass Immunsuppressiva an Prolylisomerasen binden und deren Aktivität hemmen (Schreiber and Fersht 1993). Auf Basis dieser Bindung werden die Isomerasen in drei Untergruppen eingeteilt: Cyclophiline (binden Cyclosporin A), die Parvulin-ähnlichen Proteine (binden keine Immunsuppressiva), und die FK506 bindenden Proteine (FKBP) (Abbildung 1-11).

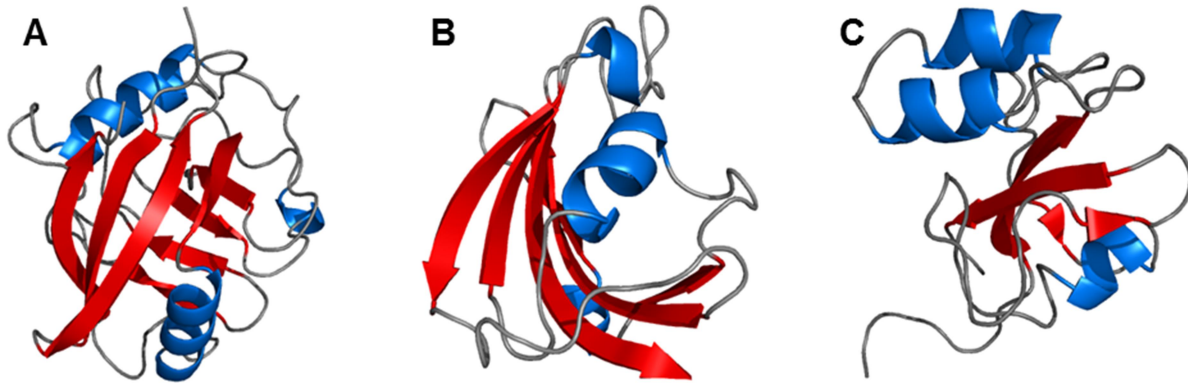


Abbildung 1-11: Vertreter der drei verschiedenen Unterklassen der Peptidyl-*cis/trans*-Isomerasen.

Dargestellt sind humanes Cyclophilin 18 (A) (Ottiger et al. 1997), humanes Parvulin 14 (B) (Terada et al. 2001) und humanes FKBP12 (C) (Szep et al. 2009). In blau sind die α -Helices, in rot die β -Faltblattstrukturen und in grau die *random coil*-Bereiche der Proteine markiert. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 1OCA, 1FJD und 2PPN.

Die Unterteilung der Prolylisomerasen in drei verschiedene Unterklassen erfolgt vor allem auf Basis der strukturellen Unterschiede der Proteine. Bei den Cyclophilinen bildet eine achtsträngige β -Faltblattstruktur eine hydrophobe Tasche, welche der Bindung des Inhibitors Cyclosporin A dient (Ke et al. 1991; Mikol et al. 1993). Wohingegen die Parvulin-ähnlichen Proteine eine Peptidyl-Prolylisomerase-Domäne besitzen, die aus einer β -Faltblattstruktur besteht, deren Stränge von vier α -Helices umgeben sind (Shaw 2002). Bei den FKBP-Proteinen handelt es sich um kleine Eindomänenproteine bzw. um eine Domäne eines Proteins, welche aus einer fünfsträngigen β -Faltblattstruktur und einer kurzen α -Helix besteht. Auffällig ist bei diesen Enzymen vor allem die hohe Substratspezifität gegenüber der Aminosäure vor dem Prolin. Hierbei ist die enzymatische Aktivität bei hydrophoben Aminosäuren um bis zu 1000-fach stärker, als bei polaren (Harrison and Stein 1990). Das aktive Zentrum dieser Proteine wird von einer Reihe konservierter aliphatischer und aromatischer Aminosäuren gebildet, welche ein hydrophobes Milieu erschaffen, das bei der Bindung des Substrates zu einer Destabilisierung der Peptidbindung führt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Phytohormon ABA ist ein zentraler Regulator für die Anpassung an biotische oder abiotische Stressfaktoren (Arc et al. 2013; Lee et al. 2006; Xu et al. 2012; Christmann et al. 2006) und seine Bindung an den ABA Rezeptor und die daraus resultierende Inhibition der PP2Cs der zentrale Mechanismus der ABA-induzierten Signalkaskade (Hauser et al. 2011; Miyazono et al. 2009; Raghavendra et al. 2010). Diese Kernkomponenten des ABA-Signalweges sind seit ihrer Entdeckung Gegenstand intensiver Forschungen (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Angesichts der 14 in *Arabidopsis* vorkommenden RCARs und der neun PP2Cs, die diesen gegenüber stehen, ist die Bildung des RCAR-PP2C-Komplexes ein kompliziertes Interaktionsnetzwerk, dessen Charakterisierung in den letzten Jahren begonnen wurde. Im Rahmen dieser Arbeit gilt es zunächst die Vielzahl an kombinatorischen Möglichkeiten zwischen RCARs und PP2Cs *in vitro* zu analysieren um Spezifitäten innerhalb dieser Kombinationen zu untersuchen bzw. nachzuweisen ob alle dieser möglichen RCAR-PP2C Kombinationen eine regulatorische Funktion zeigen. Hierzu sollen alle 14 RCARs aus *Arabidopsis thaliana* analysiert werden.

Des Weiteren ist die Rolle der Bindung des Phytohormons ABA als ein entscheidender Faktor für die Interaktionen des heterotrimeren Komplexes von besonderem Interesse. Bereits bei der Identifikation der RCARs zeigte die Verwendung eines synthetischen Wachstumsinhibitors als alternativer Ligand, dass die Bindungstasche eine gewisse Flexibilität bezüglich der an der Koordination von ABA und an der Bildung der Bindungstasche beteiligten Aminosäuren besitzt (Park et al. 2009). In dieser Arbeit sollen ABA-Analoga und chemisch verwandte Verbindungen verwendet werden um die Eigenschaften und Spezifitäten aller 14 regulatorischen Proteine zu analysieren. Abschließend soll der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei den RCARs um Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen handelt, da die Konformationsänderung von einem *cis*- zu einem *trans*-Prolin, einen zentralen und inhibitorisch entscheidenden Schritt der ABA-Bindung darstellt.

2. Ergebnisse

2.1. Expression, Reinigung, Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung von RCARs und PP2Cs

Die Proteinphosphatasen PP2CA, ABI1, ABI2 und HAB1 sowie die RCARs 1-14 aus *Arabidopsis thaliana* und die Proteine ABI1, RCAR1 und RCAR2 aus *Marchantia polymorpha* wurden heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Die Expression aller Proteine wurde unter Verwendung verschiedener Vektoren, *E. coli* Stämme, Temperaturen und Expressionszeiten optimiert. Des Weiteren wurden verschiedene Induktionsmittel, sowie Konzentrationen derselben getestet. In Tabelle 4-4 sind die Bedingungen aufgeführt bei welchen eine ausreichende Menge an funktionellem Protein erhalten werden konnte.

Alle Proteine aus *Arabidopsis thaliana* besaßen einen N-terminalen Hexa-Histidintag, wohingegen diejenigen aus *Marchantia polymorpha* sowohl über einen N-, als auch einen C-terminalen His-Tag verfügten. Nach Aufschluss der Zellen und Abtrennung der Zellreste wurden die RCARs und Proteinphosphatasen über eine Ni-Affinitätschromatographie von den *E. coli* Proteinen abgetrennt. Die Reinigung variierte hierbei qualitativ je nach Beschaffenheit und Menge des exprimierten Proteins und des verwendeten *E. coli* Stammes. In Abbildung 2-1 und Tabelle 2-1 wurden SDS-PAGEs bzw. eine Übersicht über die gereinigten Proteine dargestellt. Die SDS-PAGEs zeigten, dass bei vielen Reinigungen neben dem gewünschten Protein (mit Pfeilen markiert) noch weitere Banden zu erkennen waren, die das Vorhandensein von Fremdproteinen anzeigten. Diese Kontaminationen bestanden vermutlich aus *E. coli* Proteinen, welche ebenfalls an die Ni-Säule binden konnten oder solchen, die in der Lage waren mit den gebundenen Proteinen zu assoziieren. Die gereinigten Proteine wurden für eine Aktivitätsanalyse verwendet, die spezifisch für die Aktivität der Proteinphosphatasen und ihre Regulation durch die RCAR-Proteine war. Eine Konzentrationsbestimmung der gewünschten Proteine über den Absorptionskoeffizienten oder die Bradfordmethode war aufgrund der Präsenz von Fremdproteinen, welche über ihre eigene Absorption das Ergebnis einer solchen Konzentrationsbestimmung verfälschen würden, nicht möglich. Stattdessen wurde

die Konzentration der Proteine über die Größe und Intensität der Banden bestimmt (4.3.8). Zu diesem Zweck wurden, wie in Abbildung 2-1D zu sehen, definierte Mengen einer BSA-Stammlösung als Standard eingesetzt um über den Vergleich der Bandenintensitäten eine Aussage über die Konzentration treffen zu können.

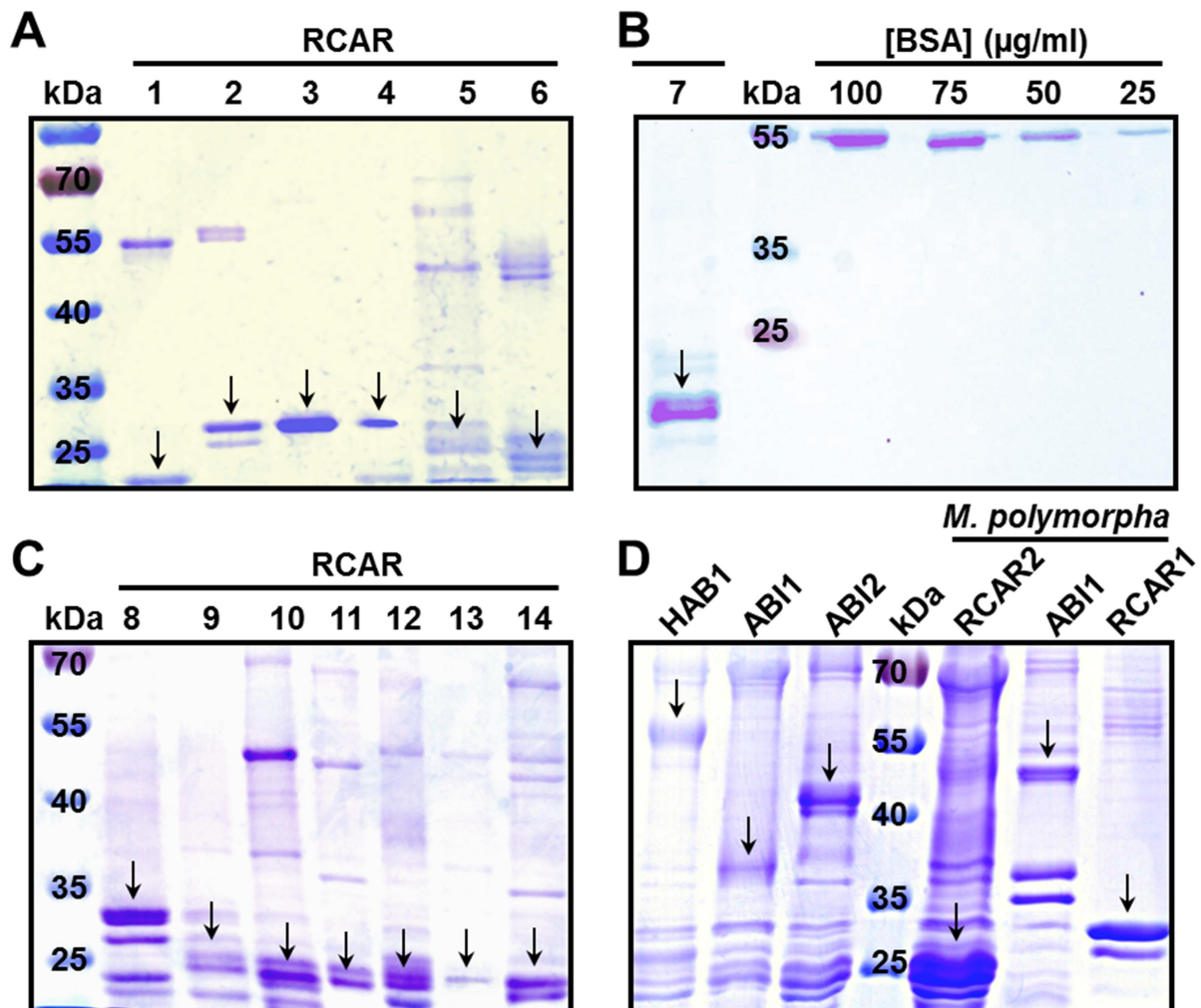


Abbildung 2-1: Rekombinant in *E.Coli* exprimierte und über einen Hexahistidintag gereinigte Proteine

Die regulatorischen Proteine RCAR1, 2, 3, 4, 5, 6 (A), 7 (B), 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 (C) sowie die Proteinphosphatasen HAB1, ABI1, ABI2 (D) aus *Arabidopsis* und die RCARs 1 und 2, sowie die Proteinphosphatase ABI1 (D) aus *M. polymorpha* wurden über einen Hexahistidintag gereinigt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Verdünnungen einer BSA-Stammlösung (100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml) bestimmt (D).

Durch die Bestimmung der Konzentration und der erhaltenen Menge an Eluat konnte für jede durchgeführte Reinigung die Proteinmenge ermittelt werden. Die daraus

resultierenden durchschnittlichen Mengen wurden auf eine Aufreinigung aus 500 ml LB-Medium normiert und sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Aus *E. coli* rekombinant gereinigte Proteine, Herkunftsorganismus und die erhaltene Proteinmenge je 500 ml LB-Medium

Protein	Organismus	Proteinmenge je 500 ml LB	Protein	Organismus	Proteinmenge je 500 ml LB
PP2CA	<i>A. thaliana</i>	1,2 mg	RCAR8	<i>A. thaliana</i>	1 mg
ABI1	<i>A. thaliana</i>	150 µg	RCAR9	<i>A. thaliana</i>	3 mg
ABI2	<i>A. thaliana</i>	0,3 mg	RCAR10	<i>A. thaliana</i>	0,3 mg
HAB1	<i>A. thaliana</i>	0,25 mg	RCAR11	<i>A. thaliana</i>	4 mg
RCAR1	<i>A. thaliana</i>	50 µg	RCAR12	<i>A. thaliana</i>	4 mg
RCAR2	<i>A. thaliana</i>	80 µg	RCAR13	<i>A. thaliana</i>	4 mg
RCAR3	<i>A. thaliana</i>	25 µg	RCAR14	<i>A. thaliana</i>	4 mg
RCAR4	<i>A. thaliana</i>	200 µg	ABI1	<i>M. polymorpha</i>	0,3 mg
RCAR5	<i>A. thaliana</i>	25 µg	RCAR1	<i>M. polymorpha</i>	0,5 mg
RCAR6	<i>A. thaliana</i>	25 µg	RCAR2	<i>M. polymorpha</i>	0,6 mg
RCAR7	<i>A. thaliana</i>	25 µg			

Alle Experimente dieser Arbeit wurden mit Proteinen nach diesem Reinigungsschritt durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Proteinphosphatasen mit der Zeit in *in vitro* Experimenten deutlich an Aktivität verloren. Über einen Zeitraum von acht Stunden konnte die Ausgangsaktivität einer Proteinphosphatase um bis zu 40% sinken. Das Einführen weiterer Reinigungsschritte hätte potentiell zur Abnahme in der enzymatischen Aktivität einiger Proteinphosphatasen geführt. Für die Durchführung des Aktivitätsassays spielte die Anwesenheit der Fremdproteine keine Rolle, da dieser auf dem Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) basierte, welches eine Fluoreszenzänderung bei 460 nm nach Anregung bei einer Wellenlänge von 360 nm zeigte. Dies konnte gezeigt werden, indem eine *E. coli* Kultur gereinigt wurde, welche kein Plasmid trug und daher nur die kontaminierenden Proteine enthielt. Hierbei wurde das Experiment analog zu 4.3.9 durchgeführt, allerdings wurde statt mQ H₂O die gereinigte *E. coli* Probe verwendet. Die zusätzliche Anwesenheit dieser Probe zeigte keine Veränderung der ABA-abhängigen Messungen oder hatte Einfluss auf die Aktivität der PP2Cs (Abbildung 2-2C).

Es musste allerdings berücksichtigt werden, dass die Bestimmung der Konzentration über den Vergleich der Größe und Intensität per se nicht exakt war und Abweichungen bis zu Faktor zwei zu erwarten waren. Hierbei konnte der Aktivitätsassay nicht nur als ein zusätzliches Mittel zur quantitativen Bestätigung dienen, sondern ebenfalls die Qualität der gereinigten Proteine beurteilen. Auf Basis der in der SDS-PAGE ermittelten Konzentration der Proteine wurden Aktivitätsmessungen der Proteinphosphatasen durchgeführt (Abbildung 2-2A). Durch den Vergleich verschiedener Reinigungen und Konzentrationsbestimmungen ergab sich, dass die Proteinphosphatasen in der Aktivitätsanalyse eine spezifische Aktivität von HAB1 161 nkatal/mg, ABI1 103 nkatal/mg, ABI2 136 nkatal/mg und PP2CA 223 nkatal/mg gegenüber MUP aufwiesen. Die spezifischen Aktivitäten aller weiteren Reinigungen der PP2Cs sollten entsprechend im Bereich dieser ermittelten enzymatischen Aktivitäten liegen. Somit konnte festgestellt werden, ob es sich bei dem Protein um ein aktiv gereinigtes Enzym handelte. Weichen die Konzentrationsbestimmung über das Gel und die aus der Aktivität geschlussfolgerte Konzentration dagegen stark voneinander ab, so musste davon ausgegangen werden, dass die Proteinphosphatasen teilweise inaktiv gereinigt wurden und demzufolge nicht für weitere Analysen geeignet waren. Diese Fälle traten insbesondere dann ein, wenn die Konzentration der in Lösung befindlichen Proteine zu hoch war und es zur Aggregatbildung kam. Des Weiteren geht aus Abbildung 2-2A hervor, dass bei allen gemessenen Proteinphosphatasen die Aktivität proportional zur Konzentration zunimmt; bis zu einer Phosphatasekonzentration von 50 nM. Bei höheren Konzentrationen war vor allem bei PP2CA zu beobachten, dass eine proportionale Zunahme nicht mehr gegeben war. Dies war nicht weiter überraschend, da die Reaktion einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt und sich asymptotisch ihrem Sättigungswert annähert. Da für die Auswertung der Aktivitätsanalysen die apparenten Raten des linearen Abschnittes der Enzymkinetik genutzt wurden, wurden alle folgenden Aktivitätsanalysen bei einer PP2C-Konzentration von 50 nM durchgeführt.

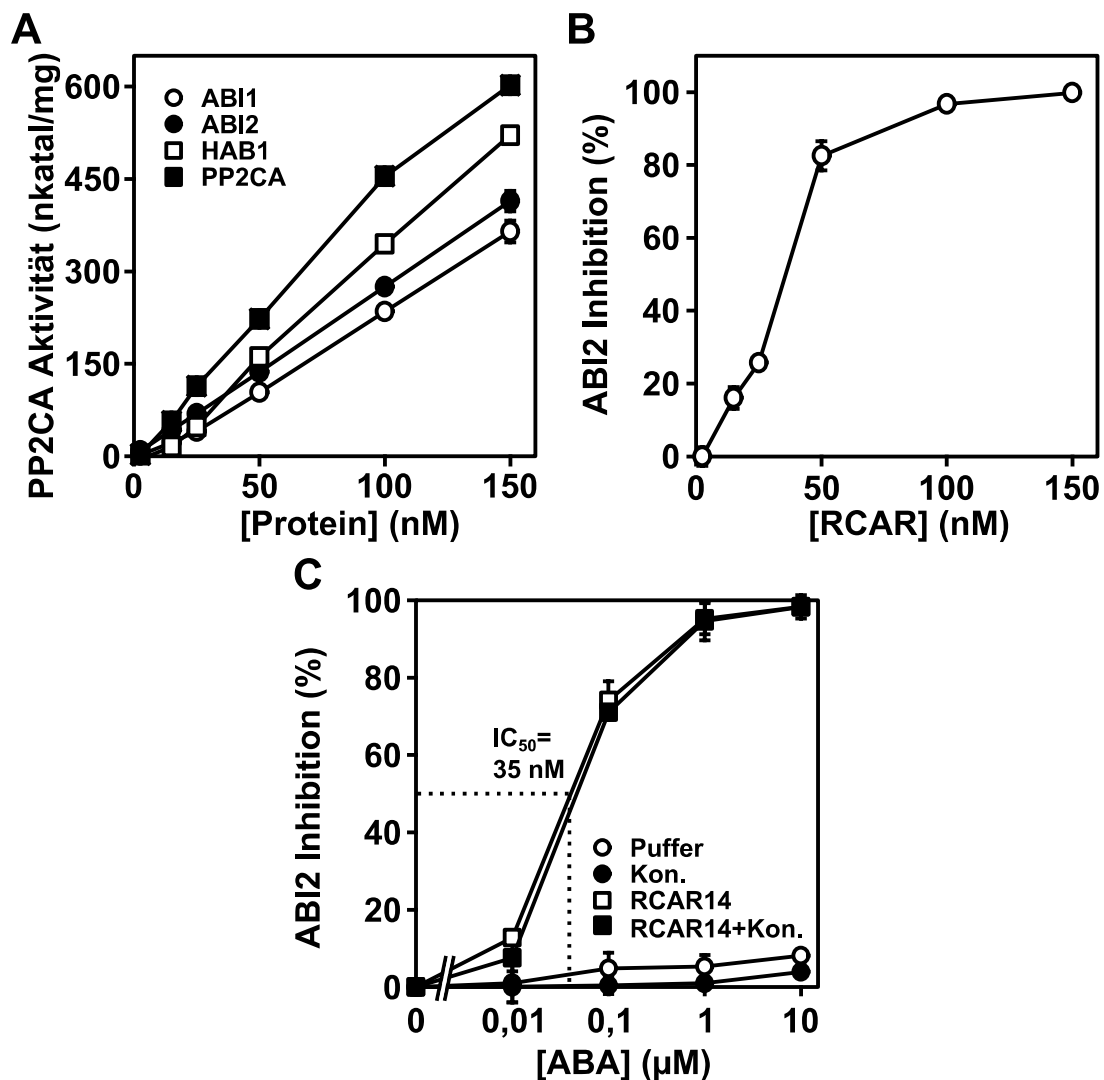


Abbildung 2-2: Aktivitätsanalyse der Proteinphosphatasen HAB1, ABI1, ABI2 und PP2CA, sowie Inhibition von ABI2 mit RCAR8 und RCAR14

(A) Aktivität verschiedener Konzentrationen von ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA mit dem Substrat MUP. (B) Die Proteinphosphatase ABI2 (50 nM) wurde in Gegenwart von 1 mM ABA mit verschiedenen Konzentrationen an RCAR8 inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. (C) Die Proteinphosphatase ABI2 (50 nM) wurde mit Puffer, gereinigten E. coli Proteinen, RCAR14, sowie einer Mischung aus RCAR14 und gereinigten E. coli Proteinen in Abhängigkeit von ABA gemessen. Die RCAR14 Konzentration betrug 100 nM. Die Werte wurden auf die Aktivität der Proteinphosphatase ABI2 mit RCAR14 bei 0 mM ABA (0%) und 1 mM ABA (100%) normiert. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

In einem ähnlichen Verfahren wurde die aus dem SDS-Gel abgeschätzte Konzentration der RCAR-Proteine überprüft (Abbildung 2-2B). In Gegenwart einer hohen ABA Konzentration (1 mM), wurde das zu untersuchende RCAR-Protein in verschiedenen Konzentrationen mit einer der Proteinphosphatasen inkubiert. Die Konzentration der Proteinphosphatase wurde im vorigen Verfahren bestimmt und mit

50 nM eingesetzt. Angesichts der hohen Konzentration an ABA war davon auszugehen, dass bei jeder Bindung eines RCARs an eine PP2C diese ABA-abhängig inhibiert und der trimere Komplex stabilisiert wurde. Theoretisch sollte daher bei einem 1:1 Verhältnis zwischen PP2C zu RCAR eine weitgehend vollständige Inhibierung der Enzymaktivität eintreten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass ein leichter Überschuss von RCAR vorhanden sein muss, um eine vollständige Inhibition zu erzielen. Daher wurden auch in den meisten der folgenden Experimente die RCAR Proteine stets im zweifachen Überschuss im Verhältnis zur PP2C verwendet. Aus Abbildung 2-2 geht hervor, dass bei dieser Konzentration an regulatorischen Protein die Proteinphosphataseaktivität nahezu vollständig inhibiert war.

2.2. Biochemische Analyse der ABA-Rezeptor Familie

RCARs und PP2Cs repräsentieren eine Proteinfamilie bestehend aus 14 bzw. 9 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana* (Ma et al. 2009; Nishimura et al. 2010; Park et al. 2009). Die RCAR Proteine lassen sich aufgrund ihrer Homologie in drei Unterfamilien unterteilen (Ma et al. 2009). Sie verfügen über eine hydrophobe Bindetasche, welche mit dem Liganden ABA interagiert (Nakagawa et al. 2014). Durch die Bindung des Phytohormons wird eine Konformationsänderung des Proteins induziert, welche in einer beinahe vollständig geschlossenen Hülle des RCARs um den Liganden resultiert (Nishimura et al. 2009). Die einzige nicht RCAR-Aminosäure, die direkt mit dem Liganden interagiert, ist ein Tryptophan, welches zu der mit dem RCAR-Protein interagierenden Proteinphosphatase gehört (Miyazono et al. 2009).

Es existieren zwei Modelle, welche die Bildung des heterotrimeren Komplexes erläutern. Die erste Hypothese geht von einer Heterodimerisierung der PP2C und der regulatorischen Komponente sowie einer anschließenden Bindung des Liganden aus (Ma et al. 2009). Im zweiten Fall bindet zunächst das Phytohormon an ein aus RCARs bestehendes Homodimer; dies führt zu einer Monomerisierung des Komplexes. Anschließend wird die Aktivität der Proteinphosphatase durch die Bindung des Koenzyms inhibiert. Die Bindetasche aller 14 RCARs liegt, mit nur vereinzelt Ausnahmen, konserviert vor. Im Folgenden wurden mittels *in vitro* Analysen die Unterschiede zwischen den einzelnen PP2C-RCAR Kombinationen aufgezeigt und analysiert.

2.2.1. Regulation der Proteinphosphatasen 2C durch RCARs

Die in *E. coli* rekombinant exprimierten und gereinigten PP2C Proteine wurden mittels des Substrates MUP auf ihre Aktivität getestet. Die Proteinphosphatasen dephosphorylierten hierbei das im Überschuss zugesetzte Substrat. Diese Reaktion konnte fluorimetrisch verfolgt werden. Die Zugabe eines zweifachen Überschusses von RCAR-Proteinen zu PP2Cs resultierte in Abwesenheit des ABA-Liganden in einer Veränderung der Proteinphosphataseaktivität. Obwohl die RCARs sowohl im Bereich ihrer Bindungstasche, als auch im Bereich der Interaktionsoberfläche mit den Proteinphosphatasen konserviert vorliegen (Hauser et al. 2011), zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen PP2C-RCAR Kombinationen.

Aus Abbildung 2-3 geht hervor, dass nur wenige Kombinationen aus RCARs und Proteinphosphatasen eine unveränderte Aktivität im Vergleich zur Proteinphosphatase ohne RCAR (100%) aufwiesen. Des Weiteren war ersichtlich, dass alle Enzyme von einigen der regulatorischen Proteine gegensätzlich beeinflusst wurden. Die Unterfamilie III hatte den geringsten Einfluss auf die Aktivität der Proteinphosphatasen. Hierbei zeigte keine der Kombinationen mit den verschiedenen PP2Cs eine Inhibierung die stärker war als 20%; mit Ausnahme der Kombination ABI1-RCAR11, die eine inhibitorische Wirkung von 14% aufwies, zeigten RCAR11, 12 und 14 keine negative Regulation der enzymatischen Aktivität. Die stärkste inhibierende Wirkung dieser Untergruppe besaß RCAR13 mit den PP2Cs ABI1 (16%) und HAB1 (19%). Allerdings konnte beobachtet werden, dass RCAR14 bei allen PP2Cs zu einer positiven Regulation der Aktivität führte. Die zweite Unterfamilie der RCARs zeigte eine differenziertere Regulation, welche vor allem abhängig von den eingesetzten Proteinphosphatasen war. Während die PP2CA positiv (RCAR5 und 7) oder gar nicht (RCAR6, 8, 9 und 10) reguliert wurde, zeigte ABI2 bei allen RCARs der Unterfamilie II eine durchgehend negative Regulation von minimal 36% mit RCAR5 bis hin zu maximal 59% mit RCAR9. Die einzige Ausnahme bildete RCAR10, welches keine der eingesetzten PP2Cs inhibierte, aber in der Lage war ABI2 und HAB1 positiv zu regulieren. Im Gegensatz zu ABI2, konnte für ABI1 und HAB1 jeweils eine Kombination mit einer sehr starken (ABI1-RCAR9 92% Inhibierung und HAB1-RCAR8 66% Inhibierung) inhibitorischen Wirkung ermittelt werden. Des Weiteren zeigten diese beiden PP2Cs nur eine

weitere Kombination mit einer mittelmäßigen (ABI1-RCAR7 34% Inhibierung und HAB1-RCAR9 37% Inhibierung) inhibitorischen Wirkung, während sie durch die übrigen RCARs nicht negativ in ihrer Aktivität beeinflusst wurden und RCAR5, ähnlich wie bei PP2CA, auch bei ABI1 die enzymatische Aktivität erhöhte.

Hierbei wurde gezeigt, dass die eingesetzte Proteinphosphatase die Fähigkeit des RCARs zur Regulation wesentlich beeinflusste. Im Falle von RCAR5 entschied die verwendete Proteinphosphatase, ob es sich bei dem Protein um einen positiven Regulator handelte, welcher die Aktivität der Proteinphosphatase PP2CA verdoppelte bzw. bei ABI1 um 58% steigerte oder um einen negativen Regulator der die Aktivität von ABI2 auf 64% reduzierte.

Die erste Unterfamilie der RCARs besaß kein Mitglied, welches in der Lage war HAB1, ABI2 oder PP2CA positiv zu regulieren, lediglich in Kombination mit ABI1 zeigte sich bei den RCARs1-3 eine Steigerung der Aktivität um etwa 20%. Im Gegensatz dazu lag in Gegenwart von ABI2 eine ausschließlich negative Regulation vor. Auch bei PP2CA waren sowohl RCAR1 als auch RCAR4 negative Regulatoren, wohingegen RCAR2 und 3 die PP2CA nicht signifikant beeinflussten.

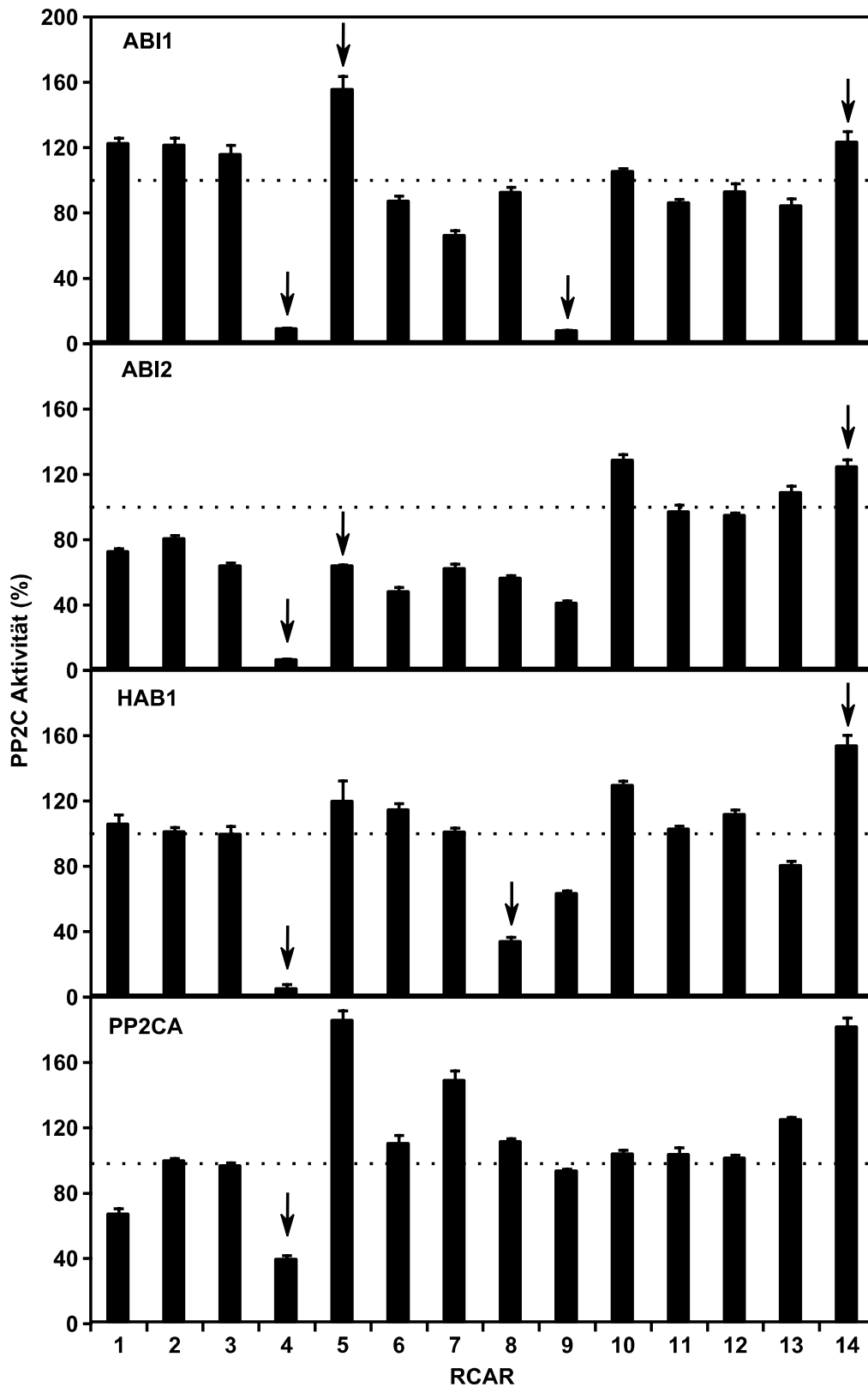


Abbildung 2-3: RCAR-abhängige Regulation der Proteinphosphataseaktivität in Abwesenheit von ABA

Die Fluoreszenz des Substrats MUP wurde bei jeder Messung für 20 min bei 30 °C verfolgt. Jede Messung erfolgte bei einer PP2C-Konzentration von 50 nM und einer RCAR-Konzentration von 100 nM. Alle Werte wurden auf die Aktivität der Proteinphosphatasen (100%) normiert. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

Diese Messdaten zeigten ein ambivalentes Ergebnis. In Bezug auf RCAR4, welches mit Abstand die stärkste Regulation aller Proteinphosphatasen aufwies, konnte festgestellt werden, dass eine ABA-unabhängige Regulation vorhanden war. Allerdings zeigten auch mehrere PP2C-RCAR Kombinationen, vor allem die der dritten Untergruppe, keine Veränderung der Proteinphosphataseaktivität durch Zugabe der regulatorischen Komponente. Insgesamt ergab sich, dass einige RCARs in der Lage waren ABA-unabhängig Proteinphosphatasen zu regulieren, diese Regulation konnte allerdings sowohl positiv als auch negativ sein. Die verwendete Proteinphosphatase spielte hierbei eine große Rolle und konnte, wie im Fall von RCAR5 und 7 unter Umständen sogar eine eindeutig antagonistische Regulation aufweisen. Alle bisherigen Messungen erfolgten bei einem zweifachen Überschuss des regulatorischen Proteins. Im Folgenden sollten die Auswirkungen von größeren Mengen der RCARs auf die enzymatische Aktivität analysiert werden. Hierzu wurden ABI2 und PP2CA gegen jeweils einen Vertreter der Unterfamilie der RCARs titriert.

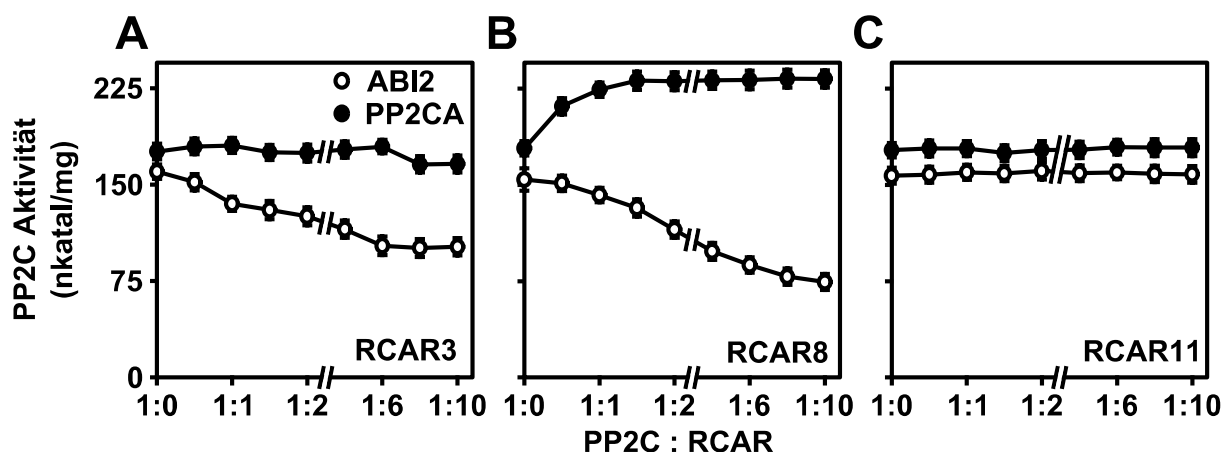


Abbildung 2-4: RCAR-abhängige Regulation der Proteinphosphatasen ABI2 und PP2CA

Die Proteinphosphatasen ABI2 und PP2CA (50 nM) wurden in Abwesenheit von ABA mit verschiedenen Konzentrationen an RCAR3 (A), RCAR8 (B) und RCAR11 (C) inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

Die in Abbildung 2-4 ermittelten Daten bestätigten die vorherigen Messungen. Hierbei war RCAR3, als Vertreter der ersten Unterfamilie der regulatorischen Proteine in der Lage die Aktivität von ABI2 zu reduzieren, wohingegen sich kein Unterschied in Kombination mit PP2CA zeigte. RCAR8 konnte ebenfalls ABI2 inhibieren und im direkten Vergleich erwies sich die Inhibierung durch RCAR8 als stärker im Vergleich zu RCAR3. Wie bereits in Abbildung 2-3 zu beobachten war

zeigte RCAR8 eine positive Regulation der PP2CA. In Kombination mit RCAR11, als Vertreter der dritten Unterfamilie, konnte bei keiner der beiden Proteinphosphatasen eine positive oder negative Regulation beobachtet werden.

Des Weiteren zeigten die Messungen, dass höhere Konzentrationen an RCARs einem Sättigungswert entgegenstreben und die negative Regulation von ABI2 bei einem sechsfachen Überschuss des Proteins ihr Maximum erreichte. Im Gegensatz hierzu wies RCAR8 in Kombination mit ABI2 noch bis zu einem zehnfachen Überschuss an regulatorischen Protein eine Reduktion der enzymatischen Aktivität auf; wohingegen die positive Regulation der PP2CA bereits bei einem 1,5-fachen Überschuss an RCAR8 ihr Maximum erreichte. Es konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl die positive als auch die negative Regulation der Aktivität der PP2Cs auf eine direkte Interaktion mit dem zugesetzten RCARs zurückzuführen waren. Gemäß dem in der Einleitung vorgestellten Modell deutete die maximale bzw. minimale Aktivität von ABI2 und PP2CA in Abbildung 2-4 darauf hin, dass jede der Proteinphosphatasen zu diesem Zeitpunkt mit einem der zugesetzten regulatorischen Proteine im Komplex vorlag.

2.2.2. ABA-induzierte-Regulation der PP2Cs durch RCARs

Aus den ABA-unabhängigen Messungen aus 2.2.1 ging hervor, dass RCARs, trotz ihrer Homologie, sehr unterschiedliche Regulationen und Spezifitäten gegenüber den Proteinphosphatasen zeigten. Im Folgenden wurde die ABA-Abhängigkeit dieser Regulation getestet. Die Daten wurden hierfür jeweils von 0-100% normiert. Die Normierung bezog sich auf die Aktivität der Proteinphosphatase, welche nach Zugabe eines zweifachen Überschusses des RCAR Proteins ermittelt wurde (Abbildung 2-5). Eine Messung in Gegenwart von 1 mM ABA stellte jeweils die maximal durch ABA induzierte Regulation der jeweiligen Proteinphosphatase dar und wurde als 100% Inhibition angesehen. Im Folgenden wurden zunächst alle 14 RCARs mit der Proteinphosphatase ABI2 gemessen.

Aus Abbildung 2-5 ging hervor, dass alle 14 RCARs in der Lage waren ABI2 zu regulieren. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Effizienz der Regulation der Proteinphosphatase. Die Mehrheit der RCARs erreichte im gleichen Konzentrationsbereich von ca. 20-60 nM ABA eine halbmaximale Inhibierung der

Aktivität, allerdings konnten bei einigen wenigen RCARs auch Abweichungen von dieser Regel festgestellt werden. Die IC_{50} -Werte der einzelnen Messungen wurden in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

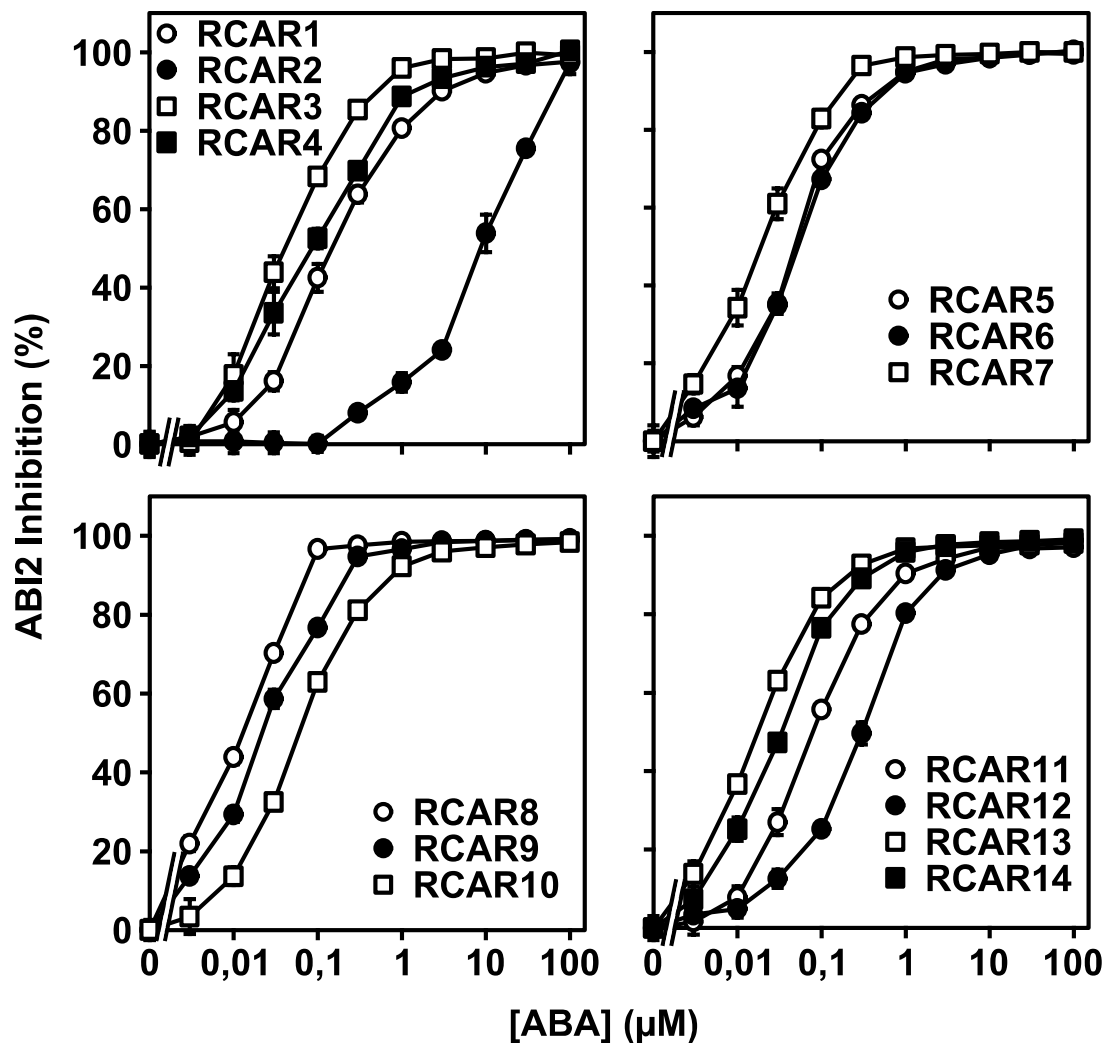


Abbildung 2-5: ABA abhängige Regulation von ABI2

Die Messungen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA für 20 min bei 30 °C verfolgt. Jede Messung erfolgte bei einer ABI2-Konzentration von 50 nM und einer RCAR-Konzentration von 100 nM. Alle Werte wurden auf die Aktivität der Proteinphosphatase ABI2 mit dem entsprechenden RCAR bei 1 mM ABA (100%) normiert. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

Durchgehend war für die meisten RCARs ein IC_{50} -Wert im zweistelligen nanomolaren Bereich zu erkennen. Vor allem in der Unterfamilie II war dies bei allen Mitgliedern der Fall. Die beste inhibitorische Wirkung dieser Untergruppe und insgesamt aller RCARs zeigte RCAR8 mit einem IC_{50} -Wert von 17 nM; die schlechteste RCAR10 mit einem vierfach höheren Wert. Vergleicht man dies mit der

Unterfamilie III, wies RCAR12, welches erst bei einer Konzentration von 274 nM eine halbmaximale Inhibierung erreichte, die größte Differenz auf. Im Gegensatz hierzu waren die anderen Mitglieder der Untergruppe im gleichen inhibitorischen Konzentrationsbereich angesiedelt, wie die der Unterfamilie II. Die schlechteste Kombination der ABI2-RCARs stellte RCAR2 dar. Eine halbmaximale Inhibition für dieses Protein wurde erst bei einer Konzentration von 6,35 μ M erreicht. Selbst RCAR1, welches im Durchschnitt eine schlechtere regulatorische Fähigkeit zeigte als die meisten übrigen RCARs, ist 40-mal effektiver als RCAR2.

Bei den durchgeführten Analysen ergab sich eine Auffälligkeit. Alle Messungen wurden bei einer Konzentration von 50 nM ABI2 und 100 nM RCAR durchgeführt. Die Abschätzung der Konzentrationen erfolgte über SDS-PAGE und durch eine Titration wurde das Verhältnis und die enzymatische Aktivität der einzelnen Komponenten bestätigt (vgl. 2.1). Die theoretisch bestmögliche Konzentration des Liganden, in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1, um die enzymatische Aktivität um 50% zu inhibieren sollte folglich 25 nM betragen. Die Messungen von IC_{50} -Werten die um bzw. unter dieser Konzentration lagen waren daher eine Überraschung.

Tabelle 2-2: Halbmaximale durch ABA-induzierte Inhibierung [nM] von ABI2 mit allen 14 RCARs aus Abbildung 2-5.

RCAR	IC_{50} [nM]	\pm SD [nM]	RCAR	IC_{50} [nM]	\pm SD [nM]
1	143	8	8	17	1
2	6350	532	9	23	2
3	44	3	10	59	2
4	78	9	11	79	3
5	47	3	12	274	16
6	53	3	13	18	4
7	39	1	14	31	1

Abbildung 2-5 zeigte, dass die RCARs eine ABA-Konzentrationsabhängigkeit ihrer regulatorischen Effizienz besitzen. Es konnte beobachtet werden, dass annähernd alle RCARs in einem niedrigen Konzentrationsbereich eine effiziente Inhibierung der ABI2-Aktivität ermöglichten. Des Weiteren wurden ebenfalls drei Kombinationen identifiziert, welche höhere ABA-Konzentrationen benötigten.

Somit kann festgehalten werden, dass für die Proteinphosphatase ABI2 nicht eine bestimmte, regulatorisch effizienteste Kombination zur Regulation ihrer Aktivität existiert. Vielmehr ist das Gegenteil der Fall, wobei die Mehrzahl aller RCARs in der Lage war die Proteinphosphatase effektiv zu regulieren, wohingegen bei einigen wenigen Ausnahmen diese Fähigkeit fehlte und erst deutlich höhere Konzentrationen des Phytohormons einen entsprechenden Effekt erzielen konnten. Hierbei war zu beachten, dass diese diskriminierten RCARs verschiedenen Unterfamilien angehörten. Da die Unterfamilie auf Basis der Primärstruktur der Proteine festgesetzt worden war, war anzunehmen, dass keine großen Unterschiede in der dreidimensionalen Struktur zu den verschiedenen Ergebnissen führten, sondern vielmehr, einzelne ungleiche Aminosäuren zwischen den Proteinen einen großen Einfluss darauf besaßen, ob und wie effizient die Proteinphosphatasen durch die regulatorischen Proteine inhibiert werden konnten. Hierbei war allerdings Voraussetzung, dass alle gemessenen Proteine vollständig funktional gereinigt wurden, wobei vor allem die starke Abweichung des IC_{50} -Wertes von RCAR2 auf ein mögliches Problem hinwies.

Bereits aus der direkten Regulation der PP2Cs durch die RCARs in Abwesenheit des Liganden ging hervor, dass die beiden Untergruppen der PP2Cs sich stark bezüglich der inhibierenden Wirkung der regulatorischen Proteine unterscheiden (vgl. 2.2.1). PP2CA zeigte sich dabei deutlich insensitiver gegenüber dem inhibierenden Einfluss der RCARs als ABI2. Im Folgenden wurde daher die ABA-Abhängigkeit der Regulation aller 14 RCARs in Kombination mit PP2CA getestet (Abbildung 2-6). Hierbei bestätigte sich der Eindruck aus 2.2.1, da PP2CA sich insgesamt als resistenter gegenüber des inhibitorischen Effektes der RCARs zeigte und die IC_{50} -Werte durchschnittlich erst bei höheren Konzentrationen an ABA erreicht wurden (vgl. Tabelle 2-3). Nur vier der RCARs erzielten eine halbmaximale Inhibierung der Aktivität in einem Konzentrationsbereich von 20-60 nM ABA.

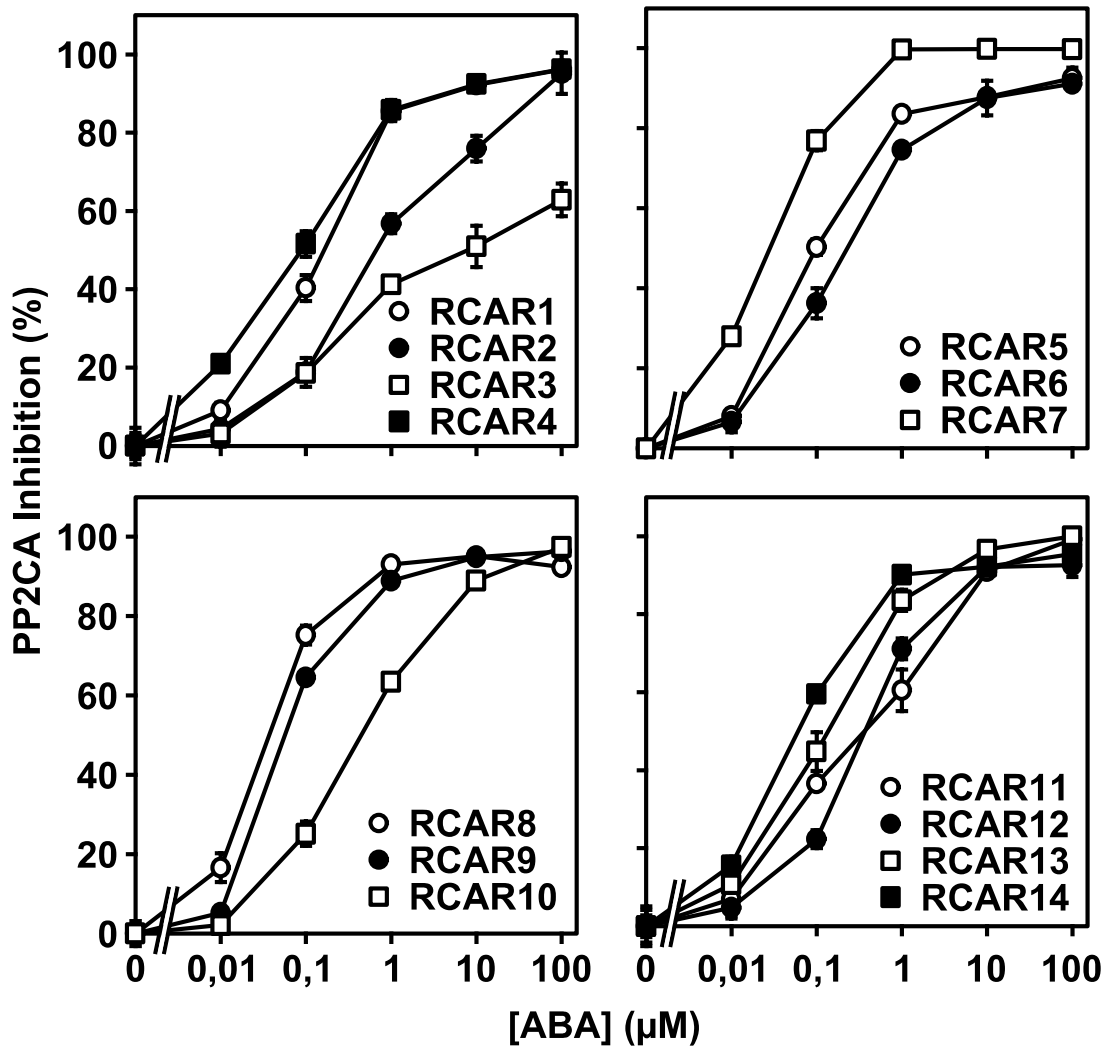


Abbildung 2-6: ABA abhängige Regulation von PP2CA

Die Messungen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA für 20 min bei 30 °C verfolgt. Jede Messung erfolgte bei einer PP2CA-Konzentration von 50 nM und einer RCAR-Konzentration von 100 nM. Alle Werte wurden auf die Aktivität der Proteinphosphatase PP2CA mit dem entsprechenden RCAR bei 1 mM ABA (100%) normiert. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

Insgesamt konnte die Regulation der PP2CA durch die RCARs in drei Konzentrationsbereiche von ABA unterteilt werden. Hierbei waren RCAR7, 8, 9 und 14 in der Lage PP2CA in einem Bereich von 20-60 nM ABA halbmaximal zu inhibieren, während RCAR1, 4, 6 und 13 eine gleichwertige Regulation erst in einem ABA-Konzentrationsbereich von 100-180 nM erzielten. Eine durchschnittlich dreifach höhere Konzentration zu diesem mittleren Bereich benötigten die RCARs2, 10, 11 und 12. Die schlechteste Kombination der PP2CA-RCARs zeigte RCAR3. Die halbmaximale Inhibition für dieses Protein wurde erst bei einer ABA-Konzentration von 7,97 μ M erreicht und war damit vergleichbar mit dem ABI2-RCAR2 Komplex aus

Abbildung 2-5. Auch wenn drei der vier RCAR-Proteine, welche die PP2CA am effizientesten inhibierten, aus Unterfamilie zwei stammten, konnte bei dieser Proteinphosphatase keine klare Unterteilung in ähnliche inhibitorische Konzentrationsbereiche in Bezug auf die Untergruppen der regulatorischen Proteine festgestellt werden. Vielmehr schien jede Gruppe Proteine zu besitzen, die die enzymatische Aktivität in verschiedenen Konzentrationsbereichen an ABA inhibieren konnten.

Tabelle 2-3: Halbmaximale durch ABA-induzierte Inhibierung [nM] von PP2CA mit allen 14 RCARs aus Abbildung 2-6.

RCAR	IC ₅₀ [nM]	±SD [nM]	RCAR	IC ₅₀ [nM]	±SD [nM]
1	150	8	8	35	2
2	560	26	9	55	13
3	7970	394	10	429	26
4	135	7	11	379	11
5	98	7	12	358	18
6	173	9	13	146	6
7	28	1	14	49	1

Nach den aus den bisherigen Messungen ersichtlichen Unterschieden in der Regulation zwischen den Proteinphosphatasen PP2CA und ABI2 stellte sich die Frage ob dieses Muster für alle Enzyme Gültigkeit besaß oder auf die beiden Untergruppen der PP2Cs beschränkt war. Im Folgenden wurden PP2CA, HAB1, ABI1 und ABI2 rekombinant gereinigt und analysiert, ob auch hierbei eine Spezifität der Proteinphosphatase gegenüber einzelnen RCARs bzw. RCAR-Gruppen zu beobachten war. Ausgehend von den bisherigen Messungen konnte ermittelt werden, dass eine effiziente Regulation einer Proteinphosphatase etwa im Bereich von 30 nM liegen sollte. Sämtliche Messungen der PP2Cs wurden deshalb in diesem Konzentrationsbereich durchgeführt.

Von den getesteten Enzymen in Abbildung 2-7, besaß ABI1 die größte Sequenzhomologie zu ABI2 (vgl. 1.2.1). Daher wurden bei beiden PP2Cs ähnliche Ergebnisse erwartet. Im Bezug darauf, dass RCAR8 das stärkste regulierende Protein darstellte und die meisten der Proteine in einem Konzentrationsbereich von 30 nM ABA eine bereits sehr effiziente Regulation aufwiesen, wurden diese

Erwartungen erfüllt. Zusätzlich zeigte ABI1-RCAR2 keinerlei Regulation bei 30 nM ABA. Auffallend war hier allerdings die gleichzeitige Diskriminierung des Proteins RCAR7, welches nur eine leichte Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität erzielte. Die aus ABI2 bekannten schwach regulatorischen RCARs1 und 12 wurden bei den durchgeführten Messungen mit ABI1 dagegen nicht diskriminiert; so besaß RCAR12 in etwa die gleiche regulatorische Effizienz wie der Rest der Unterfamilie III, wohingegen RCAR1 sogar nach RCAR8 und 3 einen der stärksten Regulatoren von ABI1 darstellte.

HAB1, welches eine hohe Sequenzhomologie zu ABI1 besitzt, zeigte ebenfalls ein ähnliches Verhalten wie die vorherigen Proteinphosphatasen und eine effiziente Regulation in einem ABA-Konzentrationsbereich von 30 nM durch die meisten der RCAR-Proteine. Wie allerdings schon bei dem Vergleich von ABI2 zu ABI1 waren einige deutliche Unterschiede der regulatorischen Fähigkeiten der RCARs zu erkennen. So wurde RCAR8, das mit ABI1 und ABI2 eine vollständige Inhibition erreichte, in Kombination mit HAB1 durch RCAR13 als effizientestes inhibierendes RCAR abgelöst. Besonders auffällig war hierbei, dass RCAR1 durch ABI2 noch diskriminiert wurde. Des Weiteren wurden RCAR3 sowie RCAR7 in Kombination mit HAB1 präferentiell diskriminiert.

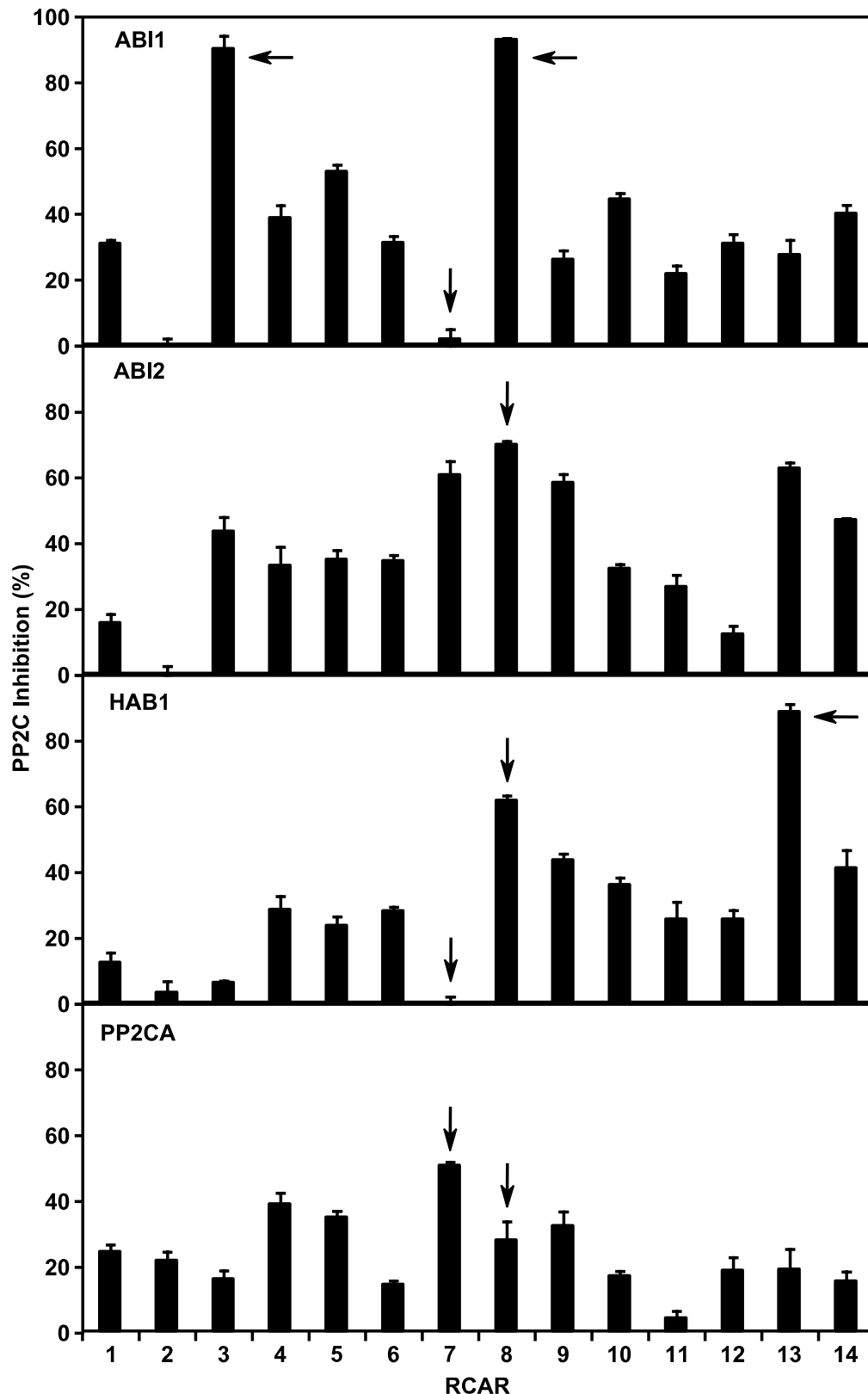


Abbildung 2-7: ABA-abhängige Regulation von ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA.

Die Messungen wurden mit 30 nM ABA für 20 min bei 30 °C verfolgt. Jede Messung erfolgte bei einer Proteinphosphatase-Konzentration von 50 nM und einer RCAR-Konzentration von 100nM. Alle Werte wurden auf die Aktivität der entsprechenden Proteinphosphatase mit dem entsprechenden RCAR bei 1mM ABA (100%) normiert. Die Analysen wurden in drei Replikaten durchgeführt (\pm SD).

Die Daten aus Abbildung 2-7 bestätigten die bisherigen Analysen, dass PP2CA, als Vertreter der anderen Untergruppe der PP2Cs, sich von den übrigen PP2Cs unterscheidet. Während bei allen anderen untersuchten Proteinphosphatasen bestimmte Kombinationen mit RCARs bei der eingesetzten Menge an ABA zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Aktivität führten, konnte dies bei PP2CA nicht immer beobachtet werden. Zwar unterschieden sich auch hier die RCARs in ihrer regulatorischen Effizienz deutlich voneinander, doch erreichte keines der Proteine bei der zugesetzten ABA-Konzentration von 30 nM eine inhibitorische Effizienz von über 60%. RCAR7, ein bisher durchschnittliches oder im Fall von ABI1 und HAB1 nur leicht oder inaktives, regulatorisches Protein inhibierte die Aktivität der Proteinphosphatase am stärksten. Im Gegensatz zu den anderen PP2Cs scheint die PP2CA von den meisten RCARs insgesamt schwerer reguliert werden zu können.

Die bisher ermittelten Daten zeichnen ein eindeutiges Bild des regulatorischen Netzwerkes der Proteinphosphatasen und RCARs in *Arabidopsis thaliana*. Es schien nicht der Fall zu sein, dass es bestimmte Kombinationen aus diesen beiden Proteinfamilien gibt, welche eine hochaffine Reaktion auf das Phytohormon zeigen, eher ist die Mehrzahl der getesteten RCAR-PP2C Proteine in der Lage, bereits bei niedrigeren Konzentrationen miteinander zu reagieren. Nur eine kleine Auswahl von kombinatorischen Möglichkeiten dieser Proteine tolerierte die Anwesenheit des Phytohormons in hohen Konzentrationen ohne eine Inhibierung der Aktivität zu induzieren.

2.3. Die regulatorische Funktion von RCAR7

Bisher durchgeführte Interaktionsstudien zwischen den 9 PP2Cs und den 14 RCARs aus *Arabidopsis thaliana* haben eine sehr große Anzahl an möglichen Rezeptor-Korezeptor-Kombinationen ergeben, obwohl noch keine genauere Aussage über die Spezifität dieser Interaktionen gegeben werden konnte (Antoni et al. 2013; Antoni et al. 2012; Bhaskara et al. 2012; Park et al. 2009; Santiago et al. 2009b). Mittels Substitutionsvarianten einzelner RCARs wurden kritische Aminosäuren identifiziert, welche die Interaktion zwischen Proteinphosphatase und RCAR maßgeblich beeinflussen (Mosquna et al. 2011; Dupeux et al. 2011a; Melcher et al. 2010; Ma et al. 2009). Über biochemische Analysen wurde bereits festgestellt, dass sowohl das RCAR Protein als auch die Proteinphosphatase einen großen Einfluss auf die Interaktion der Proteine haben (Hao et al. 2011; Ma et al. 2009; Santiago et al. 2009b; Szostkiewicz et al. 2010). Bei allen untersuchten RCAR Proteinen wurde ausschließlich für RCAR7 festgestellt, dass drei kritische Aminosäuren nicht konserviert vorlagen. Diese drei von der konservierten Sequenz abweichenden Aminosäuren sind Glutamin 38, Leucin 67 und Phenylalanin 71 (Abbildung 2-8) und führten nach Li et al. 2013 und Zhao et al. 2013 zu einer ABA-unabhängigen Regulation des Proteins, sowie der Schlussfolgerung, dass ABA nicht in der Lage ist mit RCAR7 zu interagieren.

	40	50	60	70	
RCAR 7	FDKPKQAYQR	FVK SCTMRS	GGGGGGKGG	EGKGSVRDVT	LVSGFPADF
RCAR 1	FDQPQKYK	PFVSRCTV	IGD - P - - - -	- EIGSLREVN	VKSGLPATT
RCAR 2	FDQPQKYK	PFISRCTV	NGD - P - - - -	- EIGCLREVN	VKSGLPATT
RCAR 3	FDQPQKYK	PFISR CVVK	GN - M - - - -	- EIGTVREVD	VKSGLPATR
RCAR 4	FDEPQKYK	PFISRCVV	QGKKL - - - -	- EVG SVREVD	LKSGLPATK
RCAR 5	FDNPQAYK	QFVKTCNL	SSGDG - - - -	- GEGSVREVT	VVSGLP AEF
RCAR 6	FDNPKTFK	KHFVKTC	KLRS GDG - - - -	- GEGSVREVT	VVSDLPASF
RCAR 8	FDNPKVYK	NFIRQCRI	VQGDGL - - - -	- HVGDLREVM	VVSGLP AVS
RCAR 9	FEHPQAYK	KHFVKSCH	VVIGDGR - - - -	- EVG SVREVR	VVSGLPAAF
RCAR 10	FDNPQAYK	HFLKSCSV	IGDGD - - - -	- NVGSLRQVH	VVSGLP AAS
RCAR 11	FDKPKQTYK	HFIKSCS	VEQNF - - - -	- EMRVGCTRD	VIVISGLPANT
RCAR 12	FDRPQIYK	HFIKSCN	VSEDF - - - -	- EMRVGCTRD	VNVISGLPANT
RCAR 13	FANPNKYK	HFIKSC	IRVNGN - GIKE	IKVGTIREVS	VVSGLPAST
RCAR 14	FDNPERYK	HFKRCRL	ISGD - - - -	- GDVGSVREVT	VIVISGLPAST

Abbildung 2-8: Sequenzvergleich aller 14 RCARs aus *A. thaliana*

Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen den 14 RCARs aus *A. thaliana*. Die Zahlen spiegeln die Position der Aminosäuren in RCAR7 wieder. Die in RCAR7 unterschiedlichen Aminosäuren sind gelb hervorgehoben.

Die bereits in 2.2.2 festgestellte ABA-abhängige Regulation der Proteinphosphatasen ABI2 durch RCAR7 konnte in Abbildung 2-9A bestätigt werden. Hierbei zeigte sich eine ABA Abhängigkeit der ABI2-Phosphatase Regulation in der die eingesetzte RCAR7 Konzentration Einfluss auf die IC_{50} -Werte hatte. Diese Beeinflussung war darauf zurückzuführen, dass bei äquimolaren Lösungen es innerhalb der Inkubationszeit nicht möglich war eine vollständige Sättigung der PP2Cs mit RCAR7 zu erreichen. Dieser Versuch zeigte, warum für alle durchgeführten Messungen stets ein zweifacher Überschuss der RCAR Proteine verwendet wurde. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ABA-abhängige Regulation durch RCAR7 nicht auf die Proteinphosphatase ABI2 beschränkt war, sondern PP2CA und ABI1 ebenfalls von dem RCAR-Protein reguliert wurden (Abbildung 2-9B). Wobei sich hier der in 2.2.2 gezeigte Trend bestätigte, dass RCAR7 besonders PP2CA effektiv inhibiert, wohingegen ABI1 und ABI2 eine deutlich schwächere Regulation aufwiesen. Auffällig ist hingegen, dass auch bei sehr hohen Konzentrationen an ABA ($>0,1\text{mM}$) keinerlei Inhibition bei HAB1 zu erkennen war.

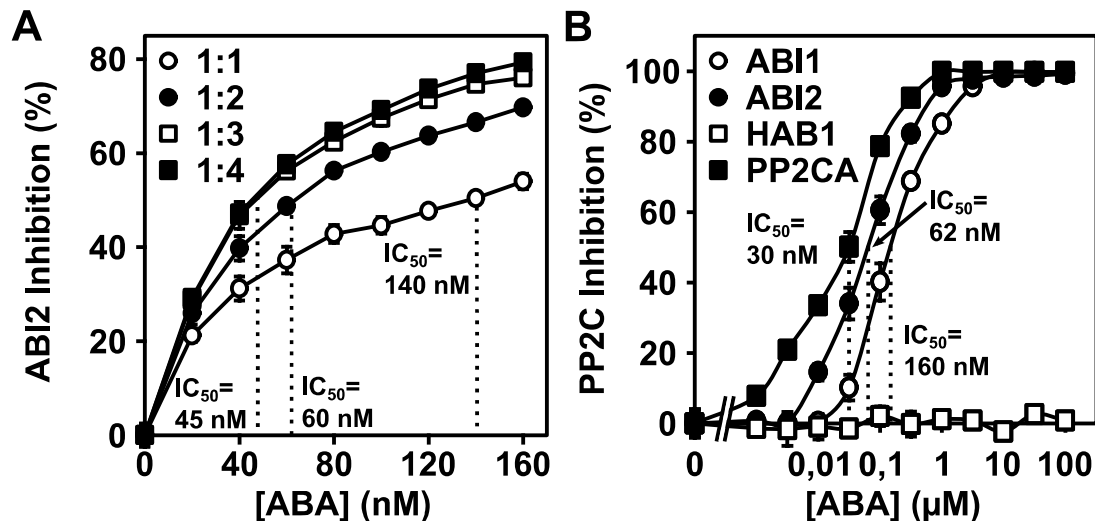


Abbildung 2-9: Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität durch RCAR7

(A) RCAR7 vermittelte Inhibierung der ABI2-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der ABA-Konzentration. ABI2 (50 nM) wurde in Gegenwart der ein- (weiße Kreise), zwei- (schwarze Kreise), drei- (weiße Quadrate) und vierfachen (schwarze Quadrate) Menge an RCAR7 bei verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Für jedes Verhältnis wurde der IC_{50} -Wert angegeben. (B) ABI1 (weiße Kreise), ABI2 (schwarze Kreise), PP2CA (schwarze Quadrate) und HAB1 (weiße Quadrate) wurden jeweils im Verhältnis 50 nM zu 100 nM mit RCAR7 bei verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert, bei anschließender Bestimmung der Aktivität. Für ABI1-RCAR7 und PP2CA-RCAR7 wurde der IC_{50} -Wert angegeben. HAB1 konnte nicht reguliert werden. Alle Messungen wurden in drei unabhängigen Replikaten wiederholt.

Zur Analyse der Abweichungen der Konsensussequenz des Proteins RCAR7 wurden Substitutionsvarianten des Proteins erstellt in welchen jeweils eine der drei Aminosäuren ausgetauscht wurde. Anschließend wurden diese mit ABI2 analysiert (Abbildung 2-10A). Es zeigte sich, dass die Substitution der einzelnen Aminosäuren in Kombination mit ABI2 keinerlei Auswirkungen auf die Regulation der Proteinphosphatase besaß. Des Weiteren wurde eine Variante vermessen, in welcher alle drei Aminosäuren wieder der Konsensussequenz angepasst wurden, auch hier konnte keine Veränderung in der regulatorischen Fähigkeit des Proteins festgestellt werden.

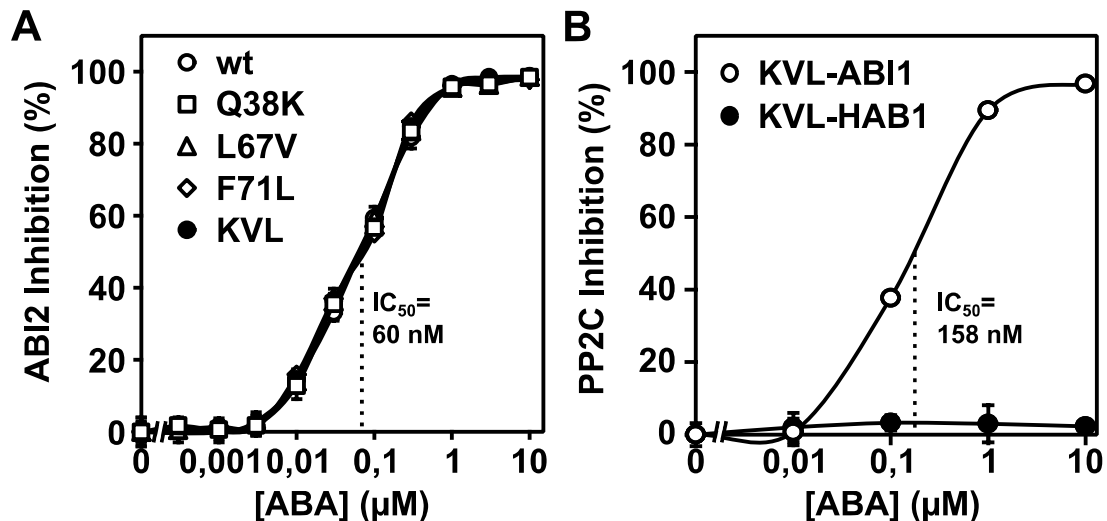


Abbildung 2-10: Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität durch RCAR7 Varianten

(A) Regulation der ABI2-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der ABA-Konzentration mittels RCAR7 Wildtyp und RCAR7 Substitutionsvarianten. ABI2 (50 nM) wurde mit der doppelten Menge an wildtypischen RCAR7 (weiße Kreise), RCAR7 Q38K (weiße Quadrate), RCAR7 L67V (weiße Dreiecke), RCAR7 F71L (weiße Rauten) und RCAR7 Q38K L68V F71L (schwarze Kreise) bei verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. (B) ABI1 (weiße Kreise) und HAB1 (schwarze Kreise) wurden jeweils im Verhältnis 50 nM zu 100 nM mit RCAR7 Q38K L68V F71L bei verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert, bei anschließender Bestimmung der Aktivität. HAB1 konnte nicht reguliert werden.

Die Regulation von HAB1 und ABI1 mit der dreifachen Substitutionsvariante von RCAR7 wurde in Abbildung 2-10B analysiert, wobei auch hier kein Unterschied im Vergleich zu wt RCAR7 Abbildung 2-9B auftrat. Es bleibt festzuhalten, dass die drei identifizierten Aminosäuren in RCAR7 keinerlei Einfluss auf seine regulatorische Fähigkeit oder, im Falle von HAB1, das Ausbleiben derselben haben. Dennoch stellt sich die Frage, warum HAB1, trotz seiner Homologie mit dem getesteten und durch RCAR7 regulierbaren Proteinphosphatasen eine derartige regulatorische Ausnahmestellung besitzt.

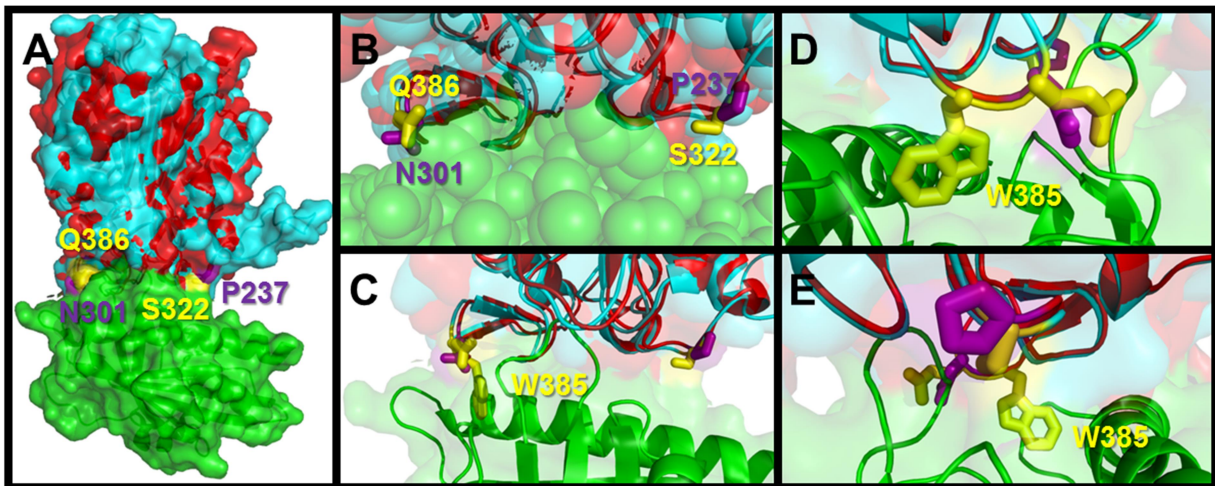


Abbildung 2-11: Strukturvergleich zwischen den Rezeptorkomplexen HAB1-RCAR11 und ABI1-RCAR12

(A) HAB1 (cyan) und ABI1 (rot) im Komplex mit RCAR11 (grün) und RCAR 12 (grün) (Dupeux et al. 2011a; Yin et al. 2009). An der Peripherie der Interaktionsfläche zwischen den Proteinphosphatasen und den RCARs wurden jeweils zwei in ihren Eigenschaften unterschiedliche Aminosäuren identifiziert. Die HAB1 Aminosäuren (S322 und Q386) sind gelb, wohingegen die korrespondierenden ABI1 Aminosäuren (P237 und N301) violett markiert sind. (B) Vergrößerte Aufnahme der strukturell identischen Interaktionsfläche zwischen HAB1 und ABI1 dargestellt durch die überlappenden Aminosäureseitenketten (cyan und rote Kugeln) und das Rückgrat der PP2Cs (cyan und rote Linien). Die unterschiedlichen Aminosäuren der Proteinphosphatasen sind dargestellt wie in (A). (C) Darstellung ähnlich zu (B). Die Sekundärstrukturen des RCARs sind in grün dargestellt. Ein für die Interaktion mit dem Liganden (nicht gezeigt) wichtiges Tryptophan ist in gelb dargestellt. (D+E) Nahansicht und gespiegelte Ansicht des in (C) gezeigten Tryptophans von HAB1 und der wichtigen Aminosäuren Q386/N301 und S322/P237 im Vordergrund. Die Abbildung wurde Fuchs et al. 2014 entnommen. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 3KB3 und 3UJL.

In Abbildung 2-11 wurde mittels *in silico* Analysen vorhandener Kristallstrukturen (Dupeux et al. 2011a; Yin et al. 2009) die Interaktionsfläche zwischen Proteinphosphatasen und RCARs analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass die Proteine in diesen Bereichen eine strukturelle Konservierung besitzen und keine erkennbaren Unterschiede zwischen den in Abbildung 2-10B getesteten Proteinphosphatasen existieren. Erst in der Peripherie der Interaktionsflächen konnten Varianzen zwischen HAB1 und ABI1 ermittelt werden. Die HAB1 Aminosäuren (S322 und Q386) und die korrespondierenden ABI1 Aminosäuren (P237 und N301); von besonderer Bedeutung hierbei wurde die Aminosäure Q386 von HAB1 angesehen, da sie sich in unmittelbarer Nähe der für die Interaktion

zwischen RCAR und Proteinphosphatase entscheidenden Aminosäure Tryptophan befindet (Abbildung 2-11C). Die Bedeutung dieser Aminosäure wurde bereits eingehend untersucht und die unmittelbare Nähe von Q386 kann Einfluss auf die Konformation der direkten Umgebung haben und stellte somit einen wichtigen Ansatzpunkt für weiterführende Analysen dar.

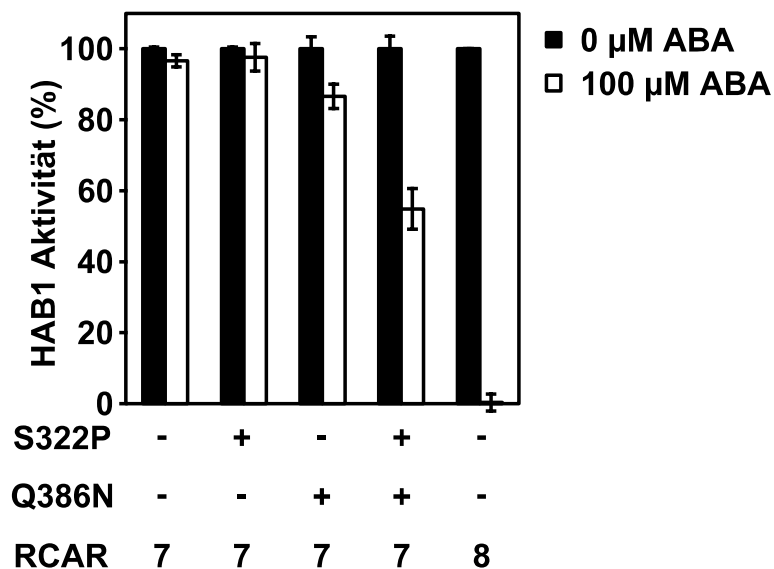


Abbildung 2-12: Regulation von HAB1 WT und Varianten

Regulation Phosphataseaktivität ohne und bei 0,1 mM ABA mittels RCAR7 und RCAR8. Gemessen wurden HAB1 WT, HAB1S322P und HAB1Q386N bei einer Konzentration von 50 nM mit der doppelten Menge des jeweiligen RCARs.

Wie aus Abbildung 2-12 hervorgeht konnte durch die gezielte Substitution der Aminosäuren in der Proteinphosphatase HAB1 eine Regulation erzielt werden. Hierbei ist auffällig, dass die Substitution lediglich einer der *in silico* prognostizierten Aminosäuren keinen (S322P) oder lediglich einen geringen (Q386N) Effekt hatte; erst durch die Erstellung der Doppelmutante HAB1 S322P Q386N wurde eine Regulation erreicht. Die Aktivität der Proteinphosphatase wurde durch RCAR7 um 50% reduziert; allerdings bei einer Konzentration des Phytohormons von 0,1 mM. Wie an dem Vergleichstest mittels RCAR8 gezeigt wurde, reicht eine gleichartige Konzentration des Hormons aus um eine vollständige Inhibition der beteiligten Proteinphosphatase zu erzielen. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz der Homologie der Interaktionsflächen eine hohe Komplexität in der dreidimensionalen Struktur der Proteine vorhanden ist, welche die Regulation maßgeblich beeinflusst. Selbst die an der Peripherie dieser Interaktionsfläche gelegenen Aminosäuren, sind in der Lage

die Regulation der Enzyme zu beeinflussen. Die durch die Substitution erreichte geringfügige Regulation zeigte sich lediglich bei sehr hohen Konzentrationen an ABA und ist folglich ein Indikator dafür, dass nicht nur eine bzw. zwei Aminosäuren, sondern ein hochkomplexes System von Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur der Interaktionsfläche und ihrer Umgebung maßgeblichen Einfluss auf die regulatorische Effizienz des Komplexes besitzt.

2.4. ABA-Derivate und ABA-ähnliche Substanzen

Durch die in 2.2 durchgeführten Messungen konnte ein erster Einblick in die Komplexität des regulatorischen Netzwerkes bestehend aus Proteinphosphatasen und regulatorischen Proteinen gewonnen werden. Neben der Ausbildung des Rezeptor-Korezeptor-Komplexes stellt allerdings auch das Phytohormon ABA einen entscheidenden Faktor in den Interaktionen des trimeren Komplexes dar. Bereits bei der Identifikation der RCARs, welche unabhängig voneinander mittels Pyrabactin, einem synthetischen Wachstumsinhibitor (Park et al. 2009), und als PP2C Interaktionspartner (Ma et al. 2009) identifiziert wurden, wurde deutlich, dass die Wechselwirkungen zwischen den Liganden und dem Protein flexibel sind. Obwohl chemisch distinkt, sind beide Moleküle in der Lage als Ligand von RCARs zu fungieren (Peterson et al. 2010). Wie in 2.2 belegt, wurde bei allen 14 RCARs eine regulatorische Funktion nachgewiesen, welche allerdings von der jeweils verwendeten Proteinphosphatase beeinflusst wurde.

2.4.1. Stereoselektivität der ABA-Rezeptoren

Wie bereits in der Einleitung dargelegt ist ABA für eine große Anzahl biologischer Prozesse wie Wurzelwachstum, Stomata-Regulierung, Keimung, Dormanz und als Reaktion auf abiotische Stressfaktoren wie Kälte oder Trockenheit von entscheidender Bedeutung (Cutler et al. 2010; Gonzalez-Guzman et al. 2012; Raghavendra et al. 2010). Bei dem Hormon handelt es sich um ein monozyklisches Sesquiterpen mit einem asymmetrischen Zentrum an der C1' Position (Abbildung 2-13). Seit der Entdeckung der Bedeutung des natürlich vorkommenden Liganden ist auch die biologische und biochemische Aktivität seines synthetischen Stereoisomers

R-ABA Gegenstand intensiver Untersuchungen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei Keimung und Pflanzenwachstum R-ABA eine vergleichbare Funktion in der ABA-Signaltransduktion zu erfüllen scheint wie ABA und es in der Lage ist die Biosynthese von ABA zu induzieren (Lin et al. 2005; Nambara et al. 2002). Ein Vorteil des synthetischen Stereoisomers gegenüber des natürlichen ABA wäre, dass dieser Ligand langsamer metabolisiert wird als sein Pendant (Balsevich et al. 1994), somit könnte die gleiche Konzentration des Hormons bei gleicher Wirksamkeit eine länger anhaltende Signaltransduktion vermitteln.

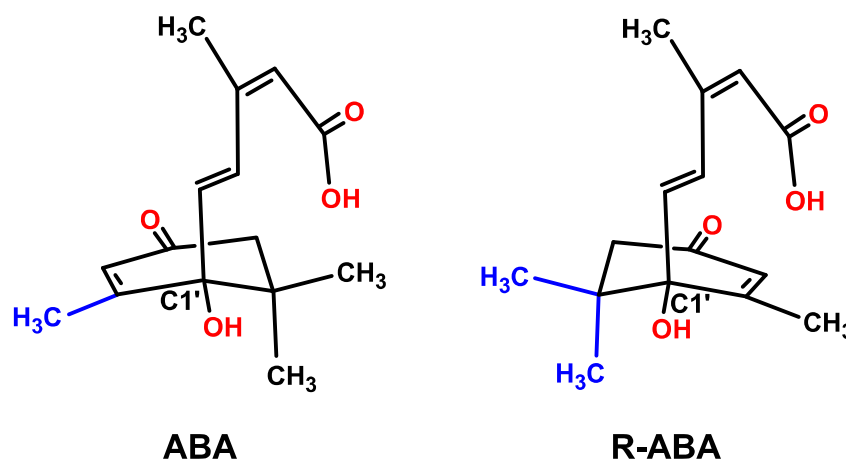


Abbildung 2-13: Strukturen von ABA und R-ABA

Strukturen von ABA und seinem Stereoisomer R-ABA. Das chirale Zentrum der Isomere ist mit C1' markiert. Die polaren Gruppen der Moleküle wurden in rot dargestellt. Die Methylgruppe von ABA bzw. die Dimethylgruppe von R-ABA wurden blau hervorgehoben. Die Abbildung wurde nach Benson et al. 2014 erstellt.

Die vergleichbare biologische Aktivität der beiden Stereoisomere ABAs trotz deren struktureller Unterschiede, deutete darauf hin, dass die Bindungstasche der RCAR-Proteine anpassungsfähig genug ist um ebenfalls die veränderte Struktur des Hormons zu binden und die daraus resultierende regulatorische Antwort zu entwickeln. Im Folgenden wurde die regulatorische Funktion der Stereoisomere *in vitro* über die Aktivität der Proteinphosphatasen untersucht. Es wurden hierbei die PP2Cs ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA in Kombination mit RCAR1 getestet. Von RCAR1 ist bekannt, dass es eine regulatorische Funktion in Kombination mit den PP2Cs und R-ABA erzielen kann (28% ABI1- und 27% ABI2- Inhibition bei 10 μ M R-ABA) (Szostkiewicz et al. 2010). Alle Messungen wurden bei einer konstanten Ligandenkonzentration von 10 μ M durchgeführt (Abbildung 2-14).

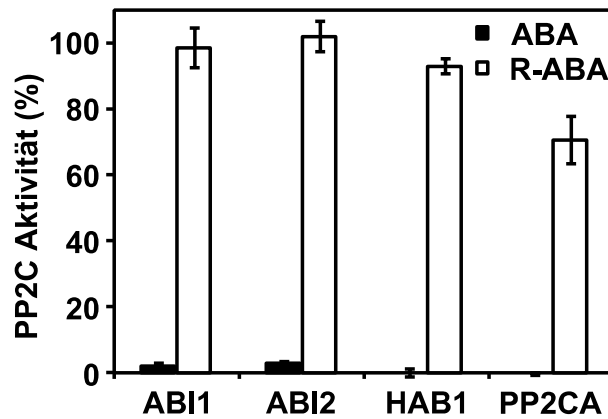


Abbildung 2-14: ABA und R-ABA vermittelte Regulation von ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1 mit RCAR1

Die Messungen wurden mit 10 μ M ABA (schwarze Balken) bzw. R-ABA (weiße Balken) durchgeführt. Jede Messung erfolgte bei einer Proteinphosphatasekonzentration von 50 nM und einer RCAR1-Konzentration von 100 nM. Alle Werte wurden auf die Aktivität der entsprechenden PP2C mit RCAR1 bei 0 mM (100%) und 1 mM ABA (0%) normiert. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

Die in Abbildung 2-14 dargestellten Messungen zeigten, dass bei keiner der Kombinationen zwischen RCAR1 und einer PP2C mit ABA und R-ABA eine vergleichbare inhibitorische Reaktion zwischen den Stereoisomeren erzielt werden konnte. Im Gegenteil ist es der Fall, dass die R-Form des Liganden in allen Fällen deutlich weniger wirksam war. In Kombination mit ABI1 und ABI2 konnte keine Regulation induziert werden und ebenfalls bei HAB1 wurde nur eine minimale regulatorische Wirkung nachgewiesen. Ausschließlich PP2CA zeigte eine deutlichere Inhibierung der Aktivität auf 75%. Allerdings war diese im Vergleich zum natürlich vorkommenden Liganden, der bei der eingesetzten ABA Menge eine vollständige Inhibierung erzielte, nur gering.

Bei den in 2.2.2 analysierten Messungen der vier PP2Cs mit RCAR1 und ABA wurde die PP2CA als diejenige Proteinphosphatase ermittelt, welche in Gegenwart des Liganden am schlechtesten durch RCAR1 reguliert werden konnte; in Kombination mit R-ABA erwies sie sich jedoch als die am besten zu regulierende PP2C. Ursächlich könnte hierfür beispielsweise der Einfluss des Liganden auf die Bindungstasche sein. Wie bereits in 2.2 dargelegt ist die Bindungstasche über alle RCARs hinweg konserviert, doch wurde auch gezeigt, dass die RCARs unterschiedliche Affinitäten gegenüber ABA besitzen. Es war daher zu erwarten, dass dies ebenfalls für den R-Liganden gilt. In Abbildung 2-15 wurden alle 14 RCARs in Kombination mit ABI2 analysiert.

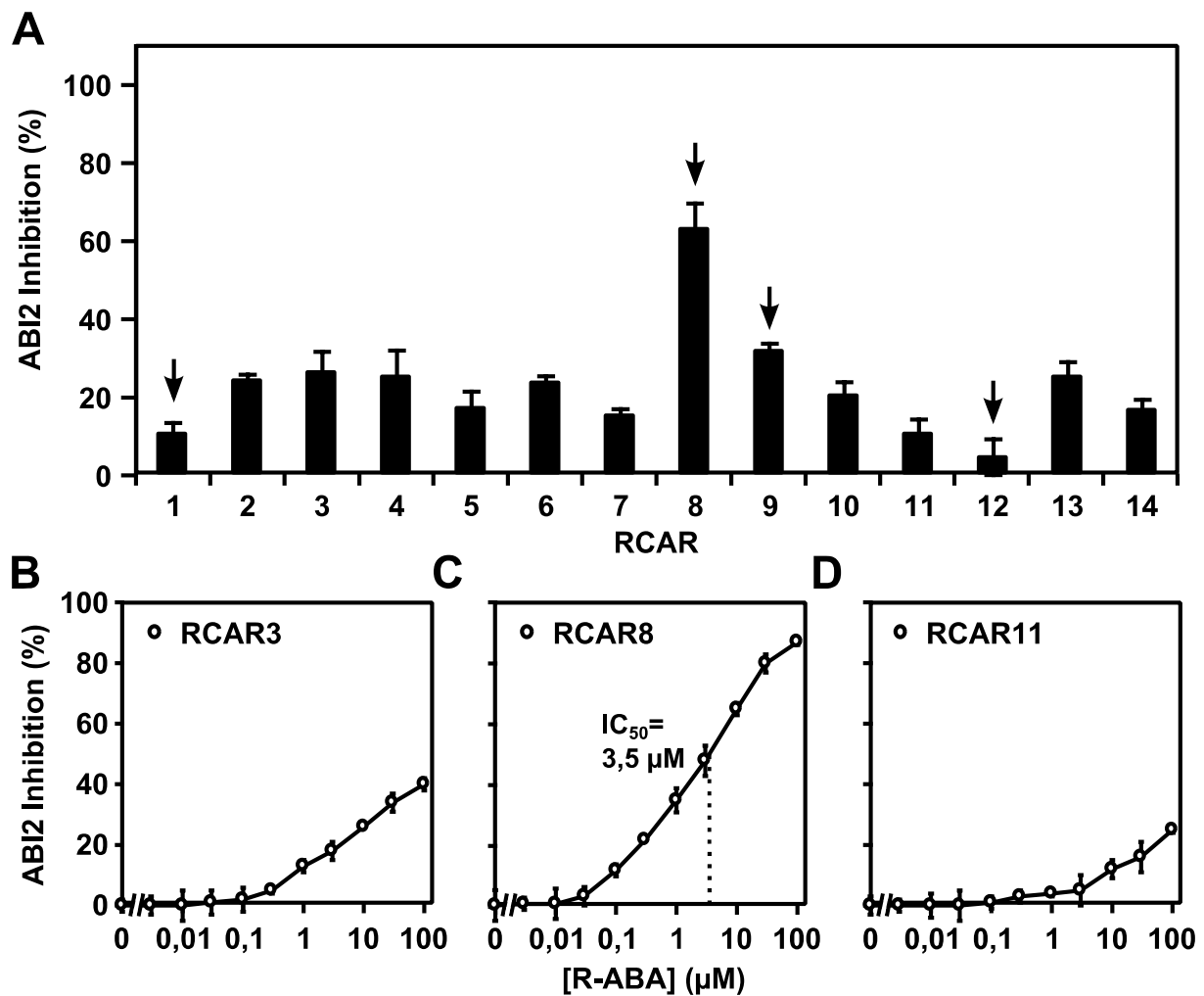


Abbildung 2-15: R-ABA vermittelte Regulation von ABI2 in Kombination mit 14 verschiedenen RCARs

(A) Jede Messung erfolgte bei einer ABI2 Konzentration von 50 nM und der doppelten Menge an RCAR. Die Messungen wurden mit 10 μM R-ABA durchgeführt. Alle Werte wurden auf die Aktivität von ABI2 mit dem entsprechenden RCAR bei 0 mM (100%) und 1 mM ABA (0%) normiert. Die Regulation der ABI2-Phosphataseaktivität wurde in Abhängigkeit der R-ABA-Konzentration verfolgt. RCAR3 (B), RCAR8 (C) und RCAR11 (D) wurden bei verschiedenen ABA-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt ($\pm\text{SD}$).

Die Analyse wurde mit allen 14 RCARs bei einer Ligandenkonzentration von 10 μM durchgeführt (Abbildung 2-15A). Die RCAR übergreifende Analyse mit ABI2 zeigte, dass keine der gemessenen Kombinationen in der Lage war eine vollständige Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität zu erzielen. Die stärkste durch ABA-vermittelte Inhibierung konnte hierbei durch RCAR8 erreicht werden, das in der Lage war die Aktivität von ABI2 um 63% zu inhibieren. Zusätzlich war dieses

regulatorische Protein damit das einzige, welches in der Lage war die Aktivität der PP2C auf unter 50% zu reduzieren. Das zweiteffektivste inhibitorische Protein war RCAR9 mit einer Reduktion der ABI2-Aktivität auf 35%. Keines der übrigen RCARs konnte in Gegenwart von 10 μM R-ABA die PP2Cs um mehr als 25% inhibieren. RCAR12 kristallisierte sich hierbei mit einer inhibitorischen Regulation von nur 5% als das schwächste der Proteine heraus.

Aus jeder der drei Unterfamilien der RCARs wurde ein Vertreter in Abbildung 2-15 in Abhängigkeit von der R-ABA-Konzentration analysiert. Wie bereits aus Abbildung 2-15A zu vermuten war, wurde ausschließlich durch RCAR8 die Konzentration der PP2C auf unter 50% inhibiert und nur für diese Konzentration konnte ein IC_{50} -Wert von 3,5 μM bestimmt werden. RCAR3 und RCAR11 als Vertreter der anderen beiden Untergruppen der regulatorischen Proteine zeigten zwar in beiden Fällen eine eindeutige Ligandenabhängigkeit ihrer Regulation, jedoch erzielte RCAR3 auch bei der gemessenen maximalen Konzentration an R-ABA nur eine inhibitorische Wirkung von 40% und RCAR11 von 25%.

Die starke Diskriminierung der R-Form überraschte insofern, da zumindest bei einigen Kombinationen eine vergleichbare Effektivität der Regulation erwartet wurde (vgl. Nambara et al. 2002). Eine gerade in diesem Fall mögliche und kritische Ursache für die Abweichung von den Erwartungen könnte vor allem die schwierige Reinigung der Stereoisomere sein. Da aufgrund der gemessenen Daten davon ausgegangen werden musste, dass ABA deutlich effektiver ist als sein Pendant, würden Kontaminationen des R-ABAs mit ABA zu einer starken Beeinflussung der Messung führen. Im Folgenden wurden daher verschiedene Quellen von R-ABA im Vergleich zu ABA analysiert, um zu überprüfen wie groß dieser Einfluss möglicherweise war. Hierbei wurde ABI2 mit RCAR8 verwendet, da diese Kombination in den vorangegangenen Messungen bereits gezeigt hatte besonders sensitiv auf die jeweiligen Liganden zu reagieren.

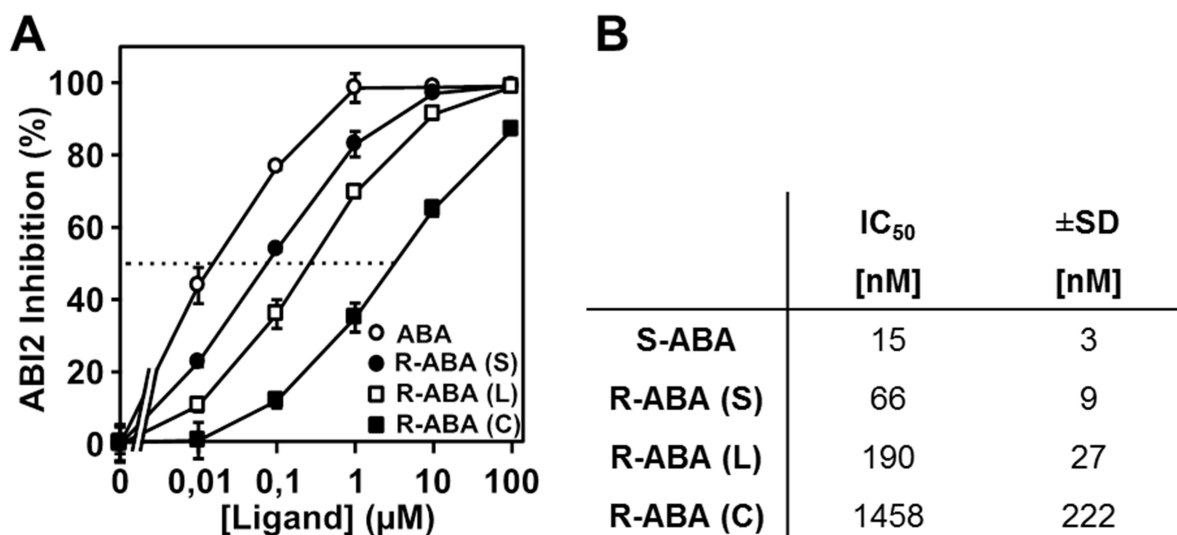


Abbildung 2-16: ABA und R-ABA vermittelte Regulation von ABI2 in Kombination mit RCAR8

(A) Regulation der ABI2-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der ABA bzw. R-ABA-Konzentration mittels RCAR8. ABI2 (50 nM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR8 bei verschiedenen Konzentrationen der Liganden ABA (weiße Kreise), R-ABA (S) (schwarze Kreise) (Quelle: Sigma-Aldrich), R-ABA (L) (weiße Quadrate) (Quelle: Loewen-Labratory) und R-ABA (C) (schwarze Quadrate) (Quelle: A. Christmann) inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. (B) Auflistung der aus den Messungen (A) erhaltenen IC₅₀-Werte (±SD).

Abbildung 2-16 zeigte, dass jedes der verwendeten R-ABAs eine deutlich schwächere Wirkung besaß als das natürliche Pendant. Überraschend war allerdings, dass die unterschiedlichen Quellen einen großen Einfluss auf die regulatorische Wirkung besaßen. Das von Sigma-Aldrich bezogene R-ABA hatte eine um Faktor vier niedrigere Wirkung im Vergleich zu ABA, wohingegen das von Loewen-Labratory bezogene R-ABA einen 13-fach niedrigeren IC₅₀-Wert aufwies als das natürliche Pendant. Mit einer Inhibierung der ABI2-Aktivität auf 50% bei einer R-ABA Konzentration von 1458 nM besaß das von A. Christmann gereinigte R-ABA den höchsten IC₅₀-Wert und einen um etwa Faktor 100 höheren als ABA.

Diese Messungen zeigten, wie entscheidend die Quelle für R-ABA war. Die Unterschiede zwischen den R-ABAs waren möglicherweise auf die Qualität der von den Bezugsquellen durchgeführten Reinigung der Stereoisomere zurückzuführen und die unterschiedlichen IC₅₀-Werte aus Abbildung 2-16B ein Indikator für die Reinheit des R-ABAs. Demnach beeinflusste die Reinigung der Stereoisomere durch

die Bezugsquelle alle mit R-ABA durchgeführten Messungen. Bei den in Abbildung 2-14 und Abbildung 2-15 durchgeführten Messungen wurde das von A. Christmann gereinigte R-ABA verwendet. Dieses R-ABA, mit einer 100-fach schlechteren Wirkung als natürliches ABA, war ein Hinweis darauf wie groß der Einfluss durch ABA-Kontaminationen in R-ABA sein konnte.

2.4.2. Analyse der ABA-Derivate

Wie bereits in 2.2 erwähnt besteht das regulatorische Netzwerk um das Phytohormon ABA aus 14 verschiedenen RCARs und 9 verschiedenen Proteinphosphatasen, deren Mitglieder sich durch eine genetische und funktionale Redundanz auszeichnen (Park et al. 2009). Diese funktionale Redundanz erschwert eine individuelle Charakterisierung der einzelnen RCARs. Aktuell haben nur einige wenige Studien einen Zusammenhang zwischen einzelnen RCAR Proteinen und einem spezifischen physiologischen Effekt herstellen können. Beispielsweise wurde für RCAR1 gezeigt, dass es in der Lage ist die Phosphorylierung des Anionenkanals SLAH3 zu regulieren (Geiger et al. 2011). Des Weiteren konnte durch die Überexpression von RCAR10 eine Regulation des Jasmonsäuresignalweges (Lackman et al. 2011) und durch die Überexpression von RCAR8 und 10 eine erhöhte Trockenresistenz erreicht werden (Pizzio et al. 2013; Santiago et al. 2009b).

Die Regulation des ABA induzierten Signalweges erscheint vor allem dadurch sehr komplex, dass sieben der verschiedenen Proteinphosphatasen mit unabhängigen und sich überlagernden Funktionen an der ABA-Antwort beteiligt sind (Antoni et al. 2012; Nishimura et al. 2007; Robert et al. 2006; Saez et al. 2006; Kuhn et al. 2006; Yoshida et al. 2006b; Merlot et al. 2001). Die Proteinphosphatasen werden, wie die RCARs, zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien innerhalb der Pflanze exprimiert (Nishimura et al. 2010; Szostkiewicz et al. 2010). Hierbei wird bei einigen RCARs davon ausgegangen, dass sie mit derselben Interaktionsfläche, welche für die Interaktion mit den PP2Cs verantwortlich ist, auch Homodimere bilden (Dupeux et al. 2011a; Hao et al. 2011).

Strukturelle Analysen des RCAR-Rezeptors zeigten eine flexible Bindungstasche, welche unterschiedliche Konformationen im offenen bzw. geschlossenen Zustand des Proteins aufwies (Melcher et al. 2009; Melcher et al. 2010; Miyazono et al. 2009; Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2009b; Soon et al. 2012; Yin et al. 2009).

Studien unter der Verwendung kleiner molekularer Liganden haben einige Erkenntnisse über die strukturellen Anforderungen erbracht, welche nötig sind um an den ABA Rezeptor zu binden. Durch die Analyse großer Gruppen an Chemikalien konnten verschiedene synthetische Sulfonamide und von ABA unterschiedliche Moleküle identifiziert werden (Cao et al. 2013; Okamoto et al. 2013). Hierbei wurde festgestellt, dass die identifizierte Komponente Pyrabactin in der Lage ist zwei RCARs zu aktivieren, wohingegen, das ebenfalls gefundene, Quinabactin in der Lage ist drei weitere RCARs zusätzlich zu den beiden Pyrabactin-regulierten zu aktivieren.

Einen alternativen Ansatz zur Analyse der Eigenschaften der Bindungstasche, stellte die synthetische Herstellung chemisch modifizierter Liganden dar. Ausgehend von ABA wurde eine Reihe Analoga produziert (Benson et al. 2014; Kepka et al. 2011), welche Modifikationen an spezifischen Gruppen des ABA-Moleküls aufwiesen. Durch diese Modifikationen sollte ein Einblick in die strukturellen Eigenschaften verschiedener RCAR-Proteine erhalten werden. Die auf ABA basierenden modifizierten Moleküle und ihre jeweiligen Stereoisomere sind in Abbildung 2-17 dargestellt.

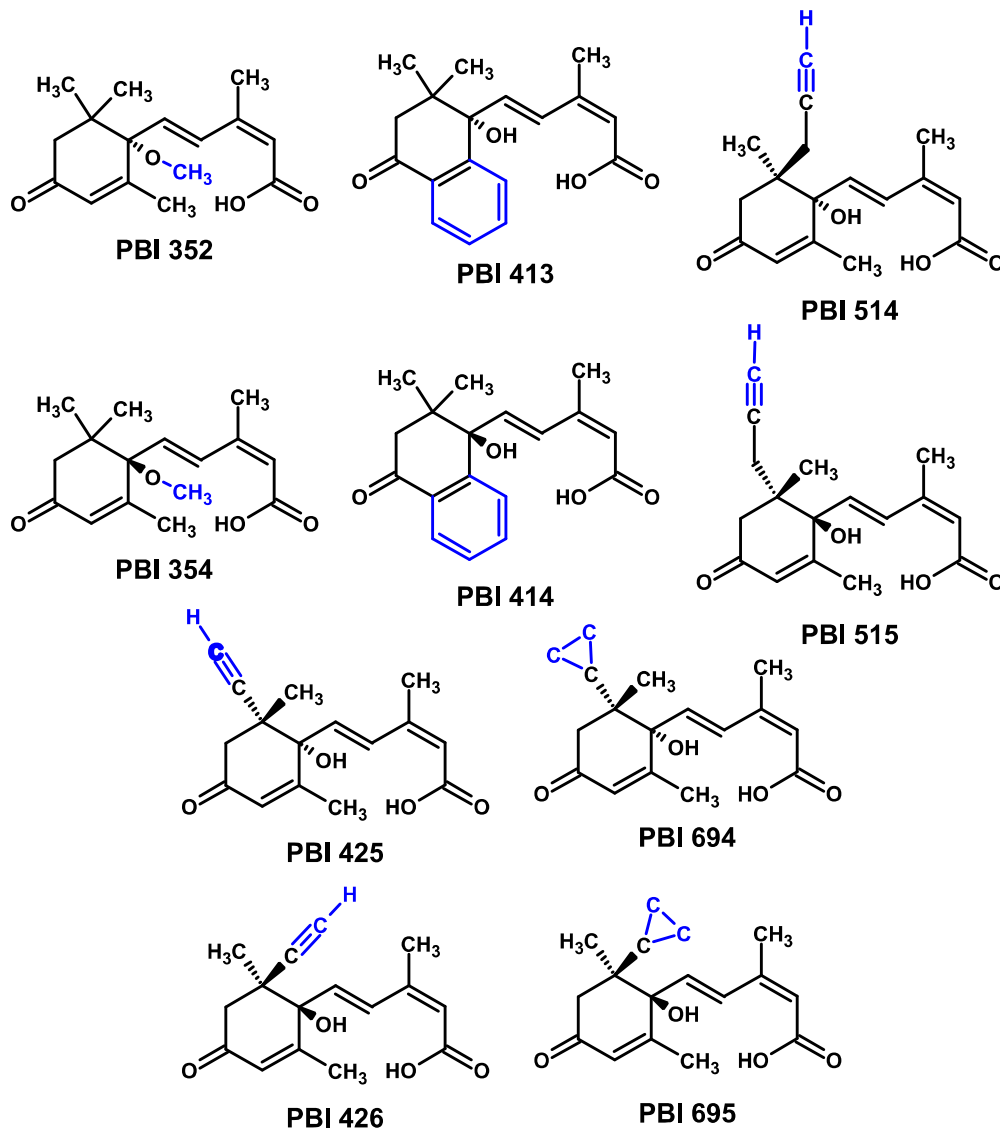


Abbildung 2-17: Strukturen der zu ABA bzw. R-ABA analogen Substanzen

Dargestellt sind die Strukturen der analogen Substanzen PBI 352, 354, 413, 414, 514, 515, 425, 426, 694 und 695. Die im Vergleich zu ABA bzw. R-ABA modifizierten Bereiche sind in blau hervorgehoben.

Die Substanz PBI 352 stellte eine Modifikation der Hydroxylgruppe des Ringes von ABA dar. Hierbei wurde die Gruppe durch einen Ether ersetzt. Vorige spezifische Wechselwirkungen mit der Alkoholgruppe des ABA, würden durch diese Modifikation erschwert werden.

Bei der Substanz PBI 413 wurde die Vinylmethylgruppe von ABA durch einen aromatischen Ring ersetzt. Durch diese Modifikation wurde dem Molekül eine steife, planare Struktur hinzugefügt, die RCAR-Proteine müssen daher nun ein deutlich größeres Molekül aufnehmen. So konnte festgestellt werden, ob trotz der konservierten Aminosäuren, welche die Bindungstaschen der ABA-Rezeptoren

bilden, Unterschiede in der Größe bzw. Flexibilität derselben bestehen. Des Weiteren wurde durch die Modifikation in PBI 413 das C7' des ABA-Moleküls, welches über Hydroxylierung ein Ansatzpunkt für den Katabolismus von ABA darstellt (siehe Einleitung), mit einem chemisch inerten Benzolring geschützt.

Bei PBI 425 bzw. 514 wurde eine bestehende Methylgruppe, durch eine Propinyl- bzw. Ethinylgruppe ersetzt. Da keine funktionelle Gruppe hinzugefügt oder entfernt wurde, war nicht zu erwarten, dass sich diese Modifikation wesentlich auf die chemischen Eigenschaften des Liganden auswirkt. Allerdings wurde hierdurch ein größerer Rest am planaren Ring in der Nähe des Interaktionsbereiches zwischen PP2C und RCAR eingeführt. Bei PBI 694 wurde durch die Modifikation mittels einer Cyclopropylgruppe das Molekül um eine wesentlich größere Gruppe erweitert. Allen dreien dieser Modifikationen ist gemeinsam, dass sie entweder am C9'- oder am C8'-Atom von ABA durchgeführt wurden und daher ebenfalls auf den Katabolismus von ABA Einfluss nehmen könnten (siehe 1.1.1).

Die Flexibilität und Spezifität der Bindetasche zu analysieren stellte einen wichtigen Aspekt zum Verständnis der Wirkungsweise des heterotrimeren Komplexes dar. Trotz der Homologie in der Sequenz der Bindetasche wurde bereits aus den Analysen in 2.2 und 2.3 ersichtlich, dass geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz großen Einfluss auf die Interaktionen der Proteine hatten. Im Folgenden sollte gezeigt werden, welchen Einfluss die Struktur des Phytohormons auf die Proteinumgebung besitzt. Hierbei wurde vor allem auf die Aspekte der Größe des Moleküls und dem Vorhandensein spezifischer Ladungen eingegangen, welche von entscheidender Bedeutung für ionische Wechselwirkungen sind. Ziel war es hierbei Unterschiede zu ermitteln, welche dazu führen spezifische RCARs oder sogar eine spezifische Kombination aus einem RCAR und einer PP2C gezielt zu regulieren. Zur Analyse der Flexibilität der Bindetasche wurden 4 PP2Cs und alle 14 RCARs *in vitro* analysiert. Es wurden die aufgeführten Analogas aus Abbildung 2-17 verwendet. Da es sich, wie bereits eingangs erwähnt, bei ABA um ein Molekül mit einem chiralen Zentrum handelt, war zu beachten, dass alle verwendeten Analogas als Stereoisomere vorlagen. Die Unterscheidung nach der Selektivität der Stereoisomere war somit ein wesentlicher Bestandteil der Analyse. Die erste Messung wurde mittels RCAR1 und den vier PP2Cs ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA durchgeführt und in Abbildung 2-18 dargestellt.

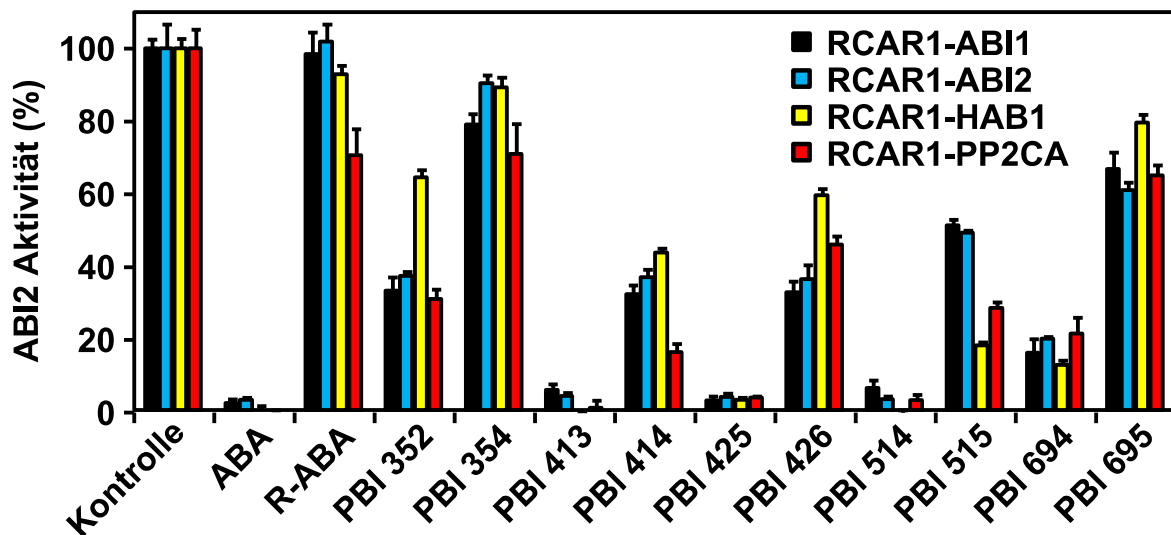


Abbildung 2-18: Ligandenabhängige Regulation von ABI1, ABI2, PP2CA und HAB1

Die Messungen wurden mit 10 μM Ligand für 20 min bei 30 °C durchgeführt. Jede Messung erfolgte bei einer Proteinphosphatasekonzentration von 50 nM und einer RCAR1-Konzentration von 100 nM. Alle Werte wurden auf die Aktivität der entsprechenden PP2C mit dem entsprechenden RCAR bei 0 mM (100%) und 1 mM ABA (0%) normiert. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen bestätigt ($\pm\text{SD}$).

Die bereits in 2.4.1 aufgezeigte Stereoselektivität, des RCAR1 für ABA und R-ABA wurde durch die gemessenen Proteinphosphataseregulationen in Abbildung 2-18 bestätigt. Im direkten Vergleich zueinander zeigte keine der gemessenen R-Formen der Analoga oder des natürlich vorkommenden ABAs eine stärkere Inhibierung der Aktivität als das jeweilige S-Pendant. PBI 352 zeigte eine deutlich geringere hemmende Wirkung als ABA, die im Vergleich zu seinem R-Pendant PBI 354 nur um Faktor 2 stärker war. Dies galt für die Kombination mit allen Proteinphosphatasen, mit Ausnahme von HAB1. Diese PP2C schien in Bezug auf PBI 352 eine höhere Toleranz zu besitzen. Die durchschnittliche Reduktion der Aktivität auf ca. 40%, welche bei allen anderen Proteinphosphatasen zu beobachten war, war mit einem Wert von etwa 70% hier deutlich geringer. HAB1 zeigte ebenfalls in Bezug auf die Analoga PBI 426 und PBI 515 eine spezielle Rolle. Im Falle von PBI 426 war es noch diejenige Proteinphosphatase, welche wie schon bei PBI 352 am schlechtesten inhibiert werden konnte; hier wurde eine Reduktion auf nur 60% Aktivität (HAB1) im Verhältnis zu einer Reduktion auf 40% Aktivität bei ABI1 und ABI2 beobachtet. In der Kombination mit PBI 515 zeigte sich der gegenteilige Effekt, des vorher beobachteten. ABI1 und ABI2 sind mit einer Aktivität von 50% deutlich toleranter gegenüber der hemmenden Wirkung des Moleküls als die HAB1-RCAR1

Kombination, welche eine Restaktivität von 20% aufwies. HAB1 besitzt, wie schon in 2.2 geschildert, eine hohe Sequenzhomologie mit ABI1 und ABI2, wohingegen PP2CA deutlichere Unterschiede zu den anderen drei getesteten Enzymen aufweist. Dennoch zeigten die Daten aus Abbildung 2-18, dass HAB1 sich in Kombination mit den Varianten von ABA als ein Sonderfall erwies. Entweder reagierte es wie im Falle von PBI 352 und PBI 426 insensitiver als andere oder im Fall von PBI 515 sensitiver. Die Proteinphosphatase HAB1 war bereits in Kombination mit RCAR7 in 2.3 ein Sonderfall. Es wurde bereits gezeigt, dass hier wenige Aminosäuren dieses Protein zu einer Ausnahme machen.

Insgesamt stimmten alle Messungen in einer Diskriminierung der R-Variante der Analoga überein. In allen Fällen ist die S-Variante um mindestens den Faktor 2 effektiver. Letztendlich, darf auch hierbei nicht vernachlässigt werden, dass eine Trennung der Stereoisomere immer ein kritischer Schritt ist und man niemals von einer vollständigen Reinheit der beiden Fraktionen ausgehen sollte (vgl. 2.4.1). Es bleibt festzuhalten, dass die beste regulatorische Wirkung in Kombination mit RCAR1 und den vorliegenden Proteinen bei den S-Varianten erzielt wurde. Daher wurden diese auch gesondert in Abbildung 2-19 analysiert.

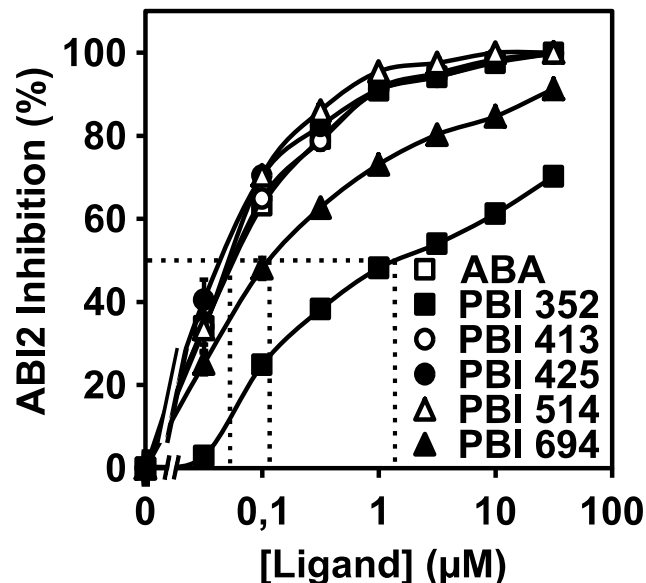


Abbildung 2-19: ABA und S-Analoga vermittelte Regulation

Regulation der ABI2-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der ABA-Konzentration mittels RCAR1. ABI2 (50 nM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR1 bei verschiedenen Konzentrationen der Liganden ABA (weiße Quadrate), PBI 352 (schwarze Quadrate), PBI 413 (weiße Kreise), PBI 425 (schwarze Kreise), PBI 514 (weiße Dreiecke) und PBI 694 (schwarze Dreiecke) inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen bestätigt (\pm SD).

Die Messdaten aus Abbildung 2-19 zeigten, dass die ABA-Analoga PBI 413, PBI 425 und PBI 514 sich sehr ähnlich zu ABA verhielten. Die in Tabelle 2-4 aufgeführten IC_{50} -Werte sind nahezu identisch. Dies bewies, im Falle von PBI 413, dass durch das Ersetzen der Vinylmethylgruppe von ABA durch einen aromatischen Ring, das Molekül zwar eine zusätzliche planare Struktur erhalten hat, aber, auch wenn das Molekül hierdurch stark an Flexibilität verloren und an Größe zugenommen hat, dies nicht zu einer Änderung in der regulatorischen Wirkung führte.

Bei den Analogas PBI 425 bzw. PBI 514 wurde jeweils eine bestehende Methylgruppe durch eine Ethinyl- bzw. eine Propinylgruppe ersetzt. Aus den Kristallstrukturen in der Einleitung geht hervor, dass die Positionen der Modifikationen jeweils direkt im Randbereich der Bindetasche stattgefunden haben. Hierdurch wurde ein größerer Rest am planaren Ring in der Nähe des Interaktionsbereiches zwischen PP2C und RCAR eingeführt. Die RCAR-Proteine müssen daher nun ein deutlich größeres Molekül aufnehmen. So konnte festgestellt werden, ob trotz der konservierten Aminosäuren, welche die Bindungstaschen bilden, Unterschiede in der Größe bzw. Flexibilität der Bindetasche bestehen. Tatsächlich zeigten die in Abbildung 2-19 durchgeführten Messungen keine Veränderung im Vergleich zu ABA. Daher war anzunehmen, dass RCAR1 auch bei einer Vergrößerung des Ringes eine korrekte Positionierung der Liganden ermöglichte, welche die Regulation induzierte, und/oder die Bindungstasche von ihrer dreidimensionalen Struktur her, die Umlagerung des Moleküls begünstigte bzw. kompensierte.

Die Modifikation von PBI 425 umfasste lediglich den Ersatz einer bestehenden Methylgruppe, durch eine Ethinylgruppe. Es wurden keine funktionellen Gruppen hinzugefügt oder entfernt und es konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Größe des Moleküls seine Eigenschaften nur unwesentlich beeinflusste. Im Gegensatz hierzu wurde durch die Modifikation des Moleküls zu PBI 694 eine Reduktion der Inhibitionsrate um den Faktor zwei erzielt (Tabelle 2-4). Anstatt der Ethinylgruppe von PBI 425 wurde bei diesem Analogon dieselbe Seitenkette mittels eines Cyclopropyls modifiziert. Eine Gruppe deren Gesamtgröße, die der vorigen Modifikationen übertraf.

Neben den bisher analysierten Modifikationen, welche mehrheitlich eine Vergrößerung des Ausgangsmoleküls darstellten, wurde beim Analoga PBI 352 eine polare Seitengruppe mit einem Methylrest versehen. Folglich wurden ionische Wechselwirkungen mit der Seitengruppe dieses Moleküls erschwert bzw. verhindert. Ausgehend von den vorhandenen kristallisierten Proteinstrukturen, war hierbei die Interaktion mit einem konservierten Glutamat eine entscheidende Funktion dieser polaren Seitengruppe (siehe Einleitung). Die Verdreifachung des IC_{50} -Wertes (Tabelle 2-4) belegte, dass durch diese Modifikation das Hormon in einer Weise verändert wurde die möglicherweise entscheidende Wechselwirkungen negativ beeinflusste.

Tabelle 2-4: IC_{50} -Werte der S-Liganden in nM

Ligand	IC_{50} [nM]	$\pm SD$ [nM]
ABA	58	1
PBI 352	1416	42
PBI 413	56	3
PBI 425	44	2
PBI 514	51	2
PBI 694	116	5

Auch wenn die vorangegangenen Daten aus Abbildung 2-20 ein klares Bild und einen eindeutigen Trend zeigten, wurden alle bisher durchgeführten Messungen mit RCAR1 durchgeführt. Trotz einer hohen Konservierung der RCAR Proteine in *Arabidopsis thaliana* bewiesen die Ergebnisse aus 2.2, dass auch kleine Unterschiede in den Aminosäuresequenzen bzw. in der 3D Struktur des Proteins einen großen Einfluss auf die Aktivität der Proteine haben können. Es war zu erwarten, dass auch die RCARs unterschiedlich auf die zu ABA analogen Substanzen reagierten. Daher wurden in Abbildung 2-20 alle RCARs bei einer konstanten Konzentration von 100 nM mit ABI2 getestet. Im Vergleich zu der Konzentration von 10 μM in Abbildung 2-18 wurde diesmal eine Ligandenkonzentration von 100 nM gewählt, da aus Abbildung 2-19 hervorging, dass diese Konzentration zwischen den IC_{50} -Werten, der gemessenen Analoga lag. Da alle durchgeführten Messungen einen sigmoidalen Verlauf zeigten ist die Sensitivität

einer Punktmessung bei nur einer einzelnen Konzentration im Bereich des IC_{50} -Wertes am höchsten.

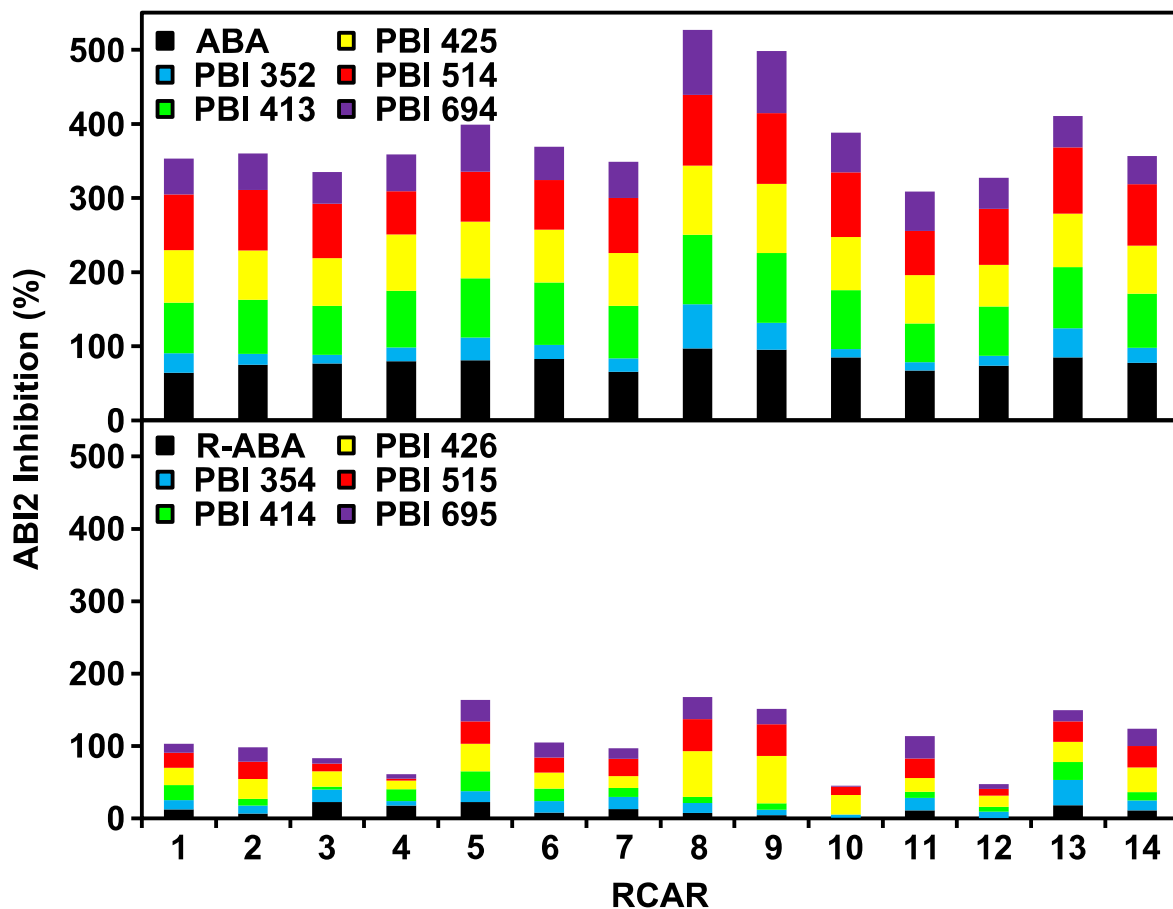


Abbildung 2-20: Ligandenabhängige Regulation von ABI2

Jede Messung erfolgte bei einer ABI2 Konzentration von 50 nM und der doppelten Menge an RCAR. Die Messungen wurden mit 100 nM Ligand für 20 min bei 30 °C verfolgt. Alle Werte wurden auf die Aktivität der ABI2-Phosphatase mit dem entsprechenden RCAR bei 0 mM (100%) und 1 mM ABA (0%) normiert. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

Die Messdaten aus Abbildung 2-20 bestätigten die bereits erhaltenen Daten aus Abbildung 2-18. Bei keiner der gemessenen Kombinationen zeigte die Verwendung der R-Variante einen stärkeren inhibitorischen Effekt im Vergleich zur S-Form. Im Gegenteil zeichnete sich der durchgehende Trend ab, dass die R-Form bei allen Liganden einen deutlich schwächeren Effekt in Kombination mit den RCARs ausübte. Im besten Fall war der Unterschied zwischen der Effektivität zweier Stereoisomere bei einem Wert von etwa 10% zu erkennen; beispielsweise bei RCAR14 in Kombination mit PBI 352 (S) und PBI 354 (R), sowie PBI 694 (S) und PBI 695 (R). Es muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den vorliegenden Daten allerdings um

Punktmessungen bei einer bestimmten Analogkonzentration handelte. Die ausgewerteten Messdaten in Abbildung 2-19 deuten den erwarteten sigmoidalen Verlauf der Messungen an. Aufgrund des Verlaufs dieser Messkurven entstand ein deutlich stärkerer Unterschied wenn die Konzentration des Phytohormons sich im Bereich des Wendepunktes der Kurve befand. Die einzelnen Messpunkte, welche sich im oberen Bereich der Aktivitätsmessungen befanden mussten daher unter Berücksichtigung dieses Umstandes analysiert werden. Die erhaltenen Daten durften nicht isoliert interpretiert werden, vielmehr konnte mittels der Daten eine Aussage über die Reaktivität der Gesamtheit der RCAR-Familie getroffen werden. Allerdings war der Trend der Diskriminierung der R-Variante bei allen durchgeführten Messungen im Vergleich zur jeweiligen S-Form deutlich zu erkennen.

Bei allen Enantiomerenpaaren fiel, wie schon in Abbildung 2-18, besonders die erhöhte Stereoselektivität von ABA im Vergleich zu den übrigen Stereoisomeren auf. Eine proteinbasierende Begründung für diesen Unterschied kann nicht angeführt werden. Es ist unwahrscheinlich, dass das natürliche Stereoisomer, welches eine gleichwertige oder stärkere inhibitorische Wirkung besaß, durch die RCAR-Proteine diskriminiert werden sollte, wohingegen modifizierte Varianten dieses Moleküls effektiver anbinden. Die wahrscheinliche Ursache für diesen Effekt ist die bereits in 2.4.1 behandelte sehr gute Trennung der Isomere untereinander und eine daraus resultierende Kontamination des inaktiven oder weniger aktiven R-ABAs durch weniger als 1% ABA. Geht man davon aus, dass diese Trennung bei den übrigen Ligandenpaarungen nicht mit dergleichen Effizienz erfolgte, können die beobachteten Effekte durch eine höhere S-Kontamination entstanden sein. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes kann auch ein größerer inhibitorischer Effekt, wie der des R-Analoga PBI 426 erklärt werden. Es zeigte eine deutlich stärkere Inhibition der Proteinphosphataseaktivität als die übrigen R-Varianten, vor allem in Kombination mit RCAR8 und 9. Die chemische Modifikation deutet dagegen an, dass keine zusätzliche funktionelle Gruppe eingeführt wurde, welche eine fördernde Wechselwirkung mit der Bindungstasche entstehen lassen könnte. Grundlegend wurde das Analoga durch die Modifikation lediglich vergrößert. Das erwartete Ergebnis war hierbei entweder eine allgemeine Verschlechterung der Bindung des Liganden und der daraus resultierenden schlechteren Inhibition der Gesamtaktivität der PP2Cs oder eine Selektierung der RCAR-Familie in eine Untergruppe mit einer flexibleren Bindungstasche, welche auch die Bindung größerer

Moleküle gestattet, und in eine Gruppe RCARs, die über eine starrere Bindungstasche verfügen und entsprechende Liganden diskriminieren. Die einfachere Erklärung für den beobachteten Effekt bei PBI 426 war daher, dass, unter allen gemessenen enantiomeren Analogas, hier die höchste S-Kontamination aller R-Varianten vorlag. Für das Ziel, ein ABA-Analoga zu erhalten, das in der Lage ist spezifische RCARs zu aktivieren, während andere diskriminiert werden, sollte sich, wie schon in Abbildung 2-19 auf die S-Varianten dieser Moleküle beschränkt werden.

Durch die Messung von RCAR1 in Kombination mit ABI2 wurde in Tabelle 2-4 eine Reihenfolge der IC_{50} -Werte festgelegt, welche die Analoga PBI 413, PBI 425 und PBI 514 als gleichwertige Liganden zu ABA definiert, wohingegen PBI 694 einen etwa um den Faktor zwei und PBI 352 einen etwa um den Faktor 30 schwächeren inhibitorischen Effekt erzielt. Da in Abbildung 2-20 ausschließlich Messungen bei einer Ligandenkonzentration von 100 nM durchgeführt wurden, konnten für die gesamte RCAR Familie keine derart exakten Angaben ermittelt werden, sondern eine allgemeinere Übersicht. Aus dieser Übersicht konnten allerdings die bereits ermittelten Daten bestätigt und auf die gesamte RCAR-Familie übertragen werden. PBI 413, PBI 425 und PBI 514 zeigten in allen Messungen einen identischen Wert oder eine nur leichte Abweichung zum ABA. Die größten Abweichungen einzelner RCARs mit einem bestimmten Analogon liegen, zum Beispiel bei PBI 413, bei einer enzymatischen Aktivität von maximal 16%. Vergleich man die Aktivität von ABI2 mit den Mitgliedern einer Unterfamilie der RCARs mit den übrigen RCARs, so fiel zunächst auf, dass es keinen durchgehenden Trend gibt, welcher lediglich für eine der Subfamilien gilt. Die Unterteilung in Unterfamilien, welche auf der Gesamtsequenz beruhen, ist daher irreführend für diese Messdaten; vielmehr muss jedes einzelne RCAR isoliert im Vergleich zu den übrigen RCARs betrachtet werden. Hiervon ausgehend fiel auf, dass von den 14 gemessenen RCARs 12 eine Art Durchschnittswert bildeten und in Kombination mit ABI2 und allen Analoga durchgehend eine konstante, wenn auch leicht variierende, Aktivität besaßen. Auf zwei der analysierten RCARs (RCAR8 und RCAR9) trifft dieser Trend jedoch nicht zu. Beide zeigten durchgehend niedrigere Aktivität mit allen gemessenen Liganden. Angesichts der Tatsache, dass diese beiden RCARs bereits in 2.2 zu denen zählten, welche einen niedrigen IC_{50} -Wert im Bereich von (10-20 nM) besaßen ist dieser

Unterschied zunächst verständlich und nur die Fortsetzung des Trends des natürlichen Liganden ABA in Kombination mit den Analoga.

Festzuhalten war, dass die Analoga PBI 413, PBI 425 und PBI 514 wie auch ABA sehr effektive Inhibitoren darstellten, welche in Kombination mit ABI2 zu einer Restaktivität der Proteinphosphatase in einem Bereich von meist zwischen 20% und 30% und in Ausnahmen bis zu 45% führten. Im Gegensatz dazu zeigten die Analoga PBI 352 und PBI 694 einen größeren Bereich an Restaktivität in Kombination mit verschiedenen Rezeptoren von 15-90%; vor allem RCAR8 und 9 sind hierbei sehr reaktiv in Kombination mit PBI 694. Entscheidend war, dass RCAR8 eine zusätzliche deutlich höhere Aktivität mit PBI 352 aufwies. Der Trend von RCAR8 und 9 ABI2 besser zu inhibieren, zeigte sich sogar in den R-Analoga wie PBI 426 und PBI 515. Damit stellte sich schlussendlich die Frage, ob die erhöhte Aktivität dieser beiden RCARs im generellen und RCAR8 im speziellen nicht auch dadurch bedingt sein konnte, dass die Bindungstasche des Liganden, bei diesen beiden Proteinen, welche auch von der Sequenz her, die höchste Homologie zueinander besaßen, flexibler ist, als beim Rest der RCAR Familie und diese Flexibilität der Bindungstasche der Grund für die Effektivität der beiden Proteine darstellte. Da es sich, wie angemerkt, bei den Messungen lediglich um Punktmessungen handelte, war zunächst eine genauere Analyse erforderlich, daher wurden RCAR1 und RCAR8 in Kombination mit vier Proteinphosphatasen und den Liganden ABA und PBI 352 analysiert (Abbildung 2-21).

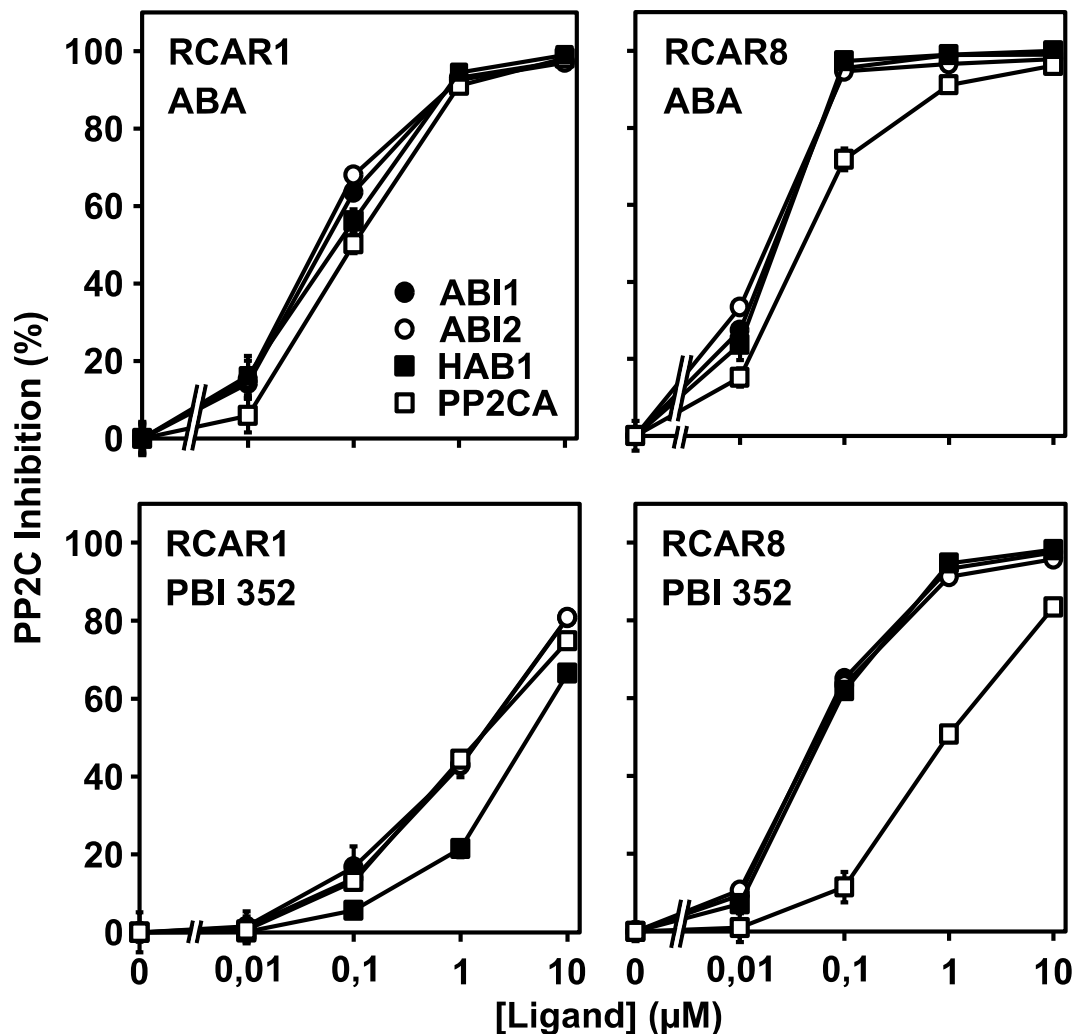


Abbildung 2-21: ABA und PBI 352 vermittelte Regulation von ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA in Kombination mit RCAR1 und RCAR8

Regulation der Phosphataseaktivität von ABI1 (schwarze Kreise), ABI2 (weiße Kreise), HAB1 (schwarze Quadrate) und PP2CA (weiße Quadrate) in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration von ABA und PBI352 mittels RCAR1 und RCAR8. Die Proteinphosphatasen (50 nM) wurden mit der doppelten Menge an RCAR1 bzw. RCAR8 bei verschiedenen Konzentrationen der Liganden ABA bzw. PBI 352 gemessen. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen bestätigt (\pm SD).

Es ergab sich, dass der RCAR1-ABA Komplex einen leicht erhöhten inhibitorischen Effekt von HAB1 ($IC_{50}=0,10 \mu\text{M}$) gegenüber ABI1 ($IC_{50}=0,07 \mu\text{M}$), ABI2 ($IC_{50}=0,06 \mu\text{M}$) oder PP2CA ($IC_{50}=0,08 \mu\text{M}$) besaß. Ferner hat der RCAR8-ABA Komplex die schlechteste regulatorische Wirkung in Kombination mit PP2CA ($IC_{50}=0,05 \mu\text{M}$), im Vergleich zu etwa $0,02 \mu\text{M}$ bei den übrigen Proteinphosphatasen. Dieser Verlauf wurde bestätigt durch das vergleichende Experiment mit PBI 352. Hierbei wurde ein IC_{50} -Wert von $3,5 \mu\text{M}$ für RCAR1-PBI 352-HAB1 gemessen im Vergleich zu etwa $1,2 \mu\text{M}$ für die anderen drei PP2Cs. Für die Kombination RCAR8-

PBI 352-PP2CA wurde hingegen ein IC_{50} -Wert von 1,0 μ M in Relation zu einem Wert von ca. 0,7 μ M für alle übrigen Proteinphosphatasen bestimmt (Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5: IC_{50} -Werte der Liganden ABA und PBI352 in Kombination mit den Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA und den RCARs 1 und 8

		ABI1 [μ M]		ABI2 [μ M]		HAB1 [μ M]		PP2CA [μ M]	
RCAR1	ABA	0,07	$\pm 0,01$	0,06	$\pm 0,01$	0,1	$\pm 0,03$	0,08	$\pm 0,02$
	PBI 352	1,21	$\pm 0,43$	1,23	$\pm 0,32$	3,5	$\pm 0,5$	1,22	$\pm 0,33$
RCAR8	ABA	0,02	$\pm 0,01$	0,02	$\pm 0,01$	0,02	$\pm 0,01$	0,05	$\pm 0,01$
	PBI 352	0,73	$\pm 0,12$	0,71	$\pm 0,09$	1,03	$\pm 0,12$	0,72	$\pm 0,11$

Aus diesen Daten war ersichtlich, dass zum einen, dass RCAR8, wie bereits beschrieben, einen effektiveren Regulator darstellte als RCAR1. Ob diese Fähigkeit durch eine erhöhte Flexibilität der Bindungstasche entstand konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Allerdings war hierbei wiederum eine Auffälligkeit zu erkennen, welche schon unter 2.2 aufgetreten war. Bestimmte Kombinationen aus RCARs und PP2Cs schienen diskriminiert zu werden. Diese Kombinationen waren offenbar wesentlich schlechter darin den Liganden zu binden als die übrigen. Der Einsatz des Liganden PBI 352, welcher allgemein eine schlechtere Affinität zeigte als ABA verstärkte diesen Effekt noch.

2.4.3. PP2Cs und RCARs in Lebermoos *Marchantia polymorpha*

In dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* wurden sowohl eine Proteinphosphatase als auch regulatorische Proteine identifiziert (Bhalerao R.P. unveröffentlicht) (Ghosh et al. 2015; Kageyama et al. 2015; Tougane et al. 2010). Eine Analyse der Sequenzen der Proteine aus beiden Organismen zeigte, dass die, die Bindetasche bildenden Aminosäuren der regulatorischen Proteine nicht nur in *Arabidopsis thaliana* konserviert waren, sondern ebenfalls die Sequenzen der drei *Marchantia polymorpha* RCARs, dieselben Aminosäuren besaßen (Abbildung 5-1). Nur geringe Unterschiede in der Sequenz zeigten, dass MpRCAR2 und 3 eine etwas andere Bindetasche besitzen könnten als die übrigen RCARs. Im Gegensatz hierzu ist MpRCAR1 in den entscheidenden Aminosäuren mit den *Arabidopsis* RCARs

identisch. Ein ähnlicher Trend war bei den PP2Cs zu erkennen. Zwar war die PP2C MpABI1 mit 62,5kDa um nahezu ein Drittel größer als die meisten seiner Arabidopsis Pendanten, dennoch sind die Bereiche, in denen sich das aktive Zentrum und die Interaktionsfläche der Proteine mit den RCARs befindet, homolog zwischen *A. thaliana* und *M. polymorpha* Proteinphosphatasen (Abbildung 5-2).

M. polymorpha verfügt neben ABA über das Phytohormon Lunularsäure (LA). Dieses wirkt als Wachstumsinhibitor in Moosen und weist damit sowohl eine ähnliche biologische Aktivität als auch strukturelle Gemeinsamkeiten mit ABA auf (Abbildung 2-22) (Yoshikawa et al. 2002). Aufgrund dieser Eigenschaften bestand die Möglichkeit, dass beide Moleküle in der Lage sind mit den gleichen Rezeptoren zu interagieren. Im Folgenden sollte nun in *in vitro* Experimenten zum einen analysiert werden ob die RCARs und PP2Cs aus *A. thaliana* und *M. polymorpha* in der Lage sind speziesübergreifend zusammenzuwirken und zum anderen ob es sich bei LA um einen Liganden der RCARs handeln könnte.

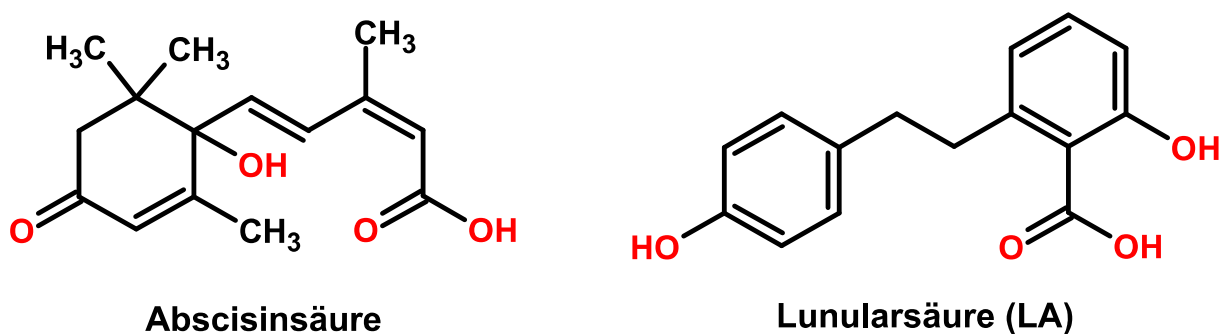


Abbildung 2-22: Strukturvergleich von ABA und LA

Die polaren Gruppen der beiden Moleküle wurden rot markiert.

2.4.3.1. Vergleichende Analyse der RCARs und PP2Cs aus *Arabidopsis thaliana* und *Marchantia polymorpha*

Aufgrund der in 2.4.3 gezeigten Homologie der RCAR-Proteine aus *M. polymorpha* im Vergleich zu den entsprechenden Pendanten in *A. thaliana*, vor allem in Bezug auf die Bindungsstelle der Liganden, konnte angenommen werden, dass die MpRCARs ebenfalls in der Lage sind mit ABA zu interagieren. In Abbildung 2-23A wurde daher diese Proteinphosphatase mit MpRCAR1 und 2 bei verschiedenen ABA-Konzentrationen getestet. MpRCAR3 konnte nicht in aktiver Form *in vitro* isoliert

werden. Zusätzlich wurde als *A. thaliana* Kontrolle RCAR8 ebenfalls analysiert, da dieses Protein in 2.2 und 2.4.1 gezeigt hatte, dass es sowohl in der Lage ist alle getesteten Proteinphosphatasen zu regulieren, als auch eine breite Substratspezifität besaß. Das Ergebnis der ersten Analyse zeigte, dass ABI2 von allen eingesetzten RCARs effektiv inhibiert werden konnte. In Gegenwart von RCAR8 wurde hierbei ein IC_{50} -Wert von 15 nM ermittelt, welcher die vorherigen Ergebnisse bestätigte. MpRCAR1 und 2 zeigten mit IC_{50} -Werten von 50 nM bzw. 43 nM eine zweifach schlechtere regulatorische Funktion als RCAR8, allerdings lagen diese im selben Bereich wie die meisten regulatorischen Proteine aus Arabidopsis (2.2.2). Folglich konnte zum einen festgehalten werden, dass die beiden RCAR-Proteine aus *Marchantia polymorpha* in der Lage waren ABA zu binden und zum anderen, dass sie in der Lage sind die Arabidopsis Proteinphosphatase ABI2 in Gegenwart von ABA effektiv zu regulieren. Die ermittelten IC_{50} -Werte wurden in Tabelle 2-6 zusammengefasst.

Das Experiment wurde anschließend unter denselben Bedingungen mit der Proteinphosphatase ABI1 aus *Marchantia* wiederholt (Abbildung 2-23B). Es zeigte sich, dass ebenfalls MpABI1 von allen getesteten RCARs reguliert werden konnte. Hierbei war auffallend, dass RCAR8 mit einem IC_{50} -Wert von 30 nM und MpRCAR1 mit einem IC_{50} -Wert von 39 nM diese Proteinphosphatase mit beinahe identischer Effizienz inhibieren konnten. Dies zeigte zum einen, dass das regulatorische Protein RCAR8 auch spezieübergreifend sehr effizient wirkte und zum anderen, dass die verwendete Proteinphosphatase ebenfalls einen großen Einfluss auf die regulatorische Fähigkeit der RCAR-Proteine besaß. Im Falle von ABI2 war der Unterschied zwischen den IC_{50} -Werten der beiden RCARs Faktor zwei, wohingegen sie im Fall von MpABI1 identische Werte besaßen. Eine ebenfalls gute Regulation zeigte MpRCAR2 mit einem IC_{50} -Wert von 82 nM. Auch wenn dieser Wert um Faktor zwei schlechter ist als der, der vergleichenden Proteine RCAR8 und MpRCAR1, lag er dennoch in einem Konzentrationsbereich, welcher aus den vorherigen Ergebnissen für RCARs üblich war.

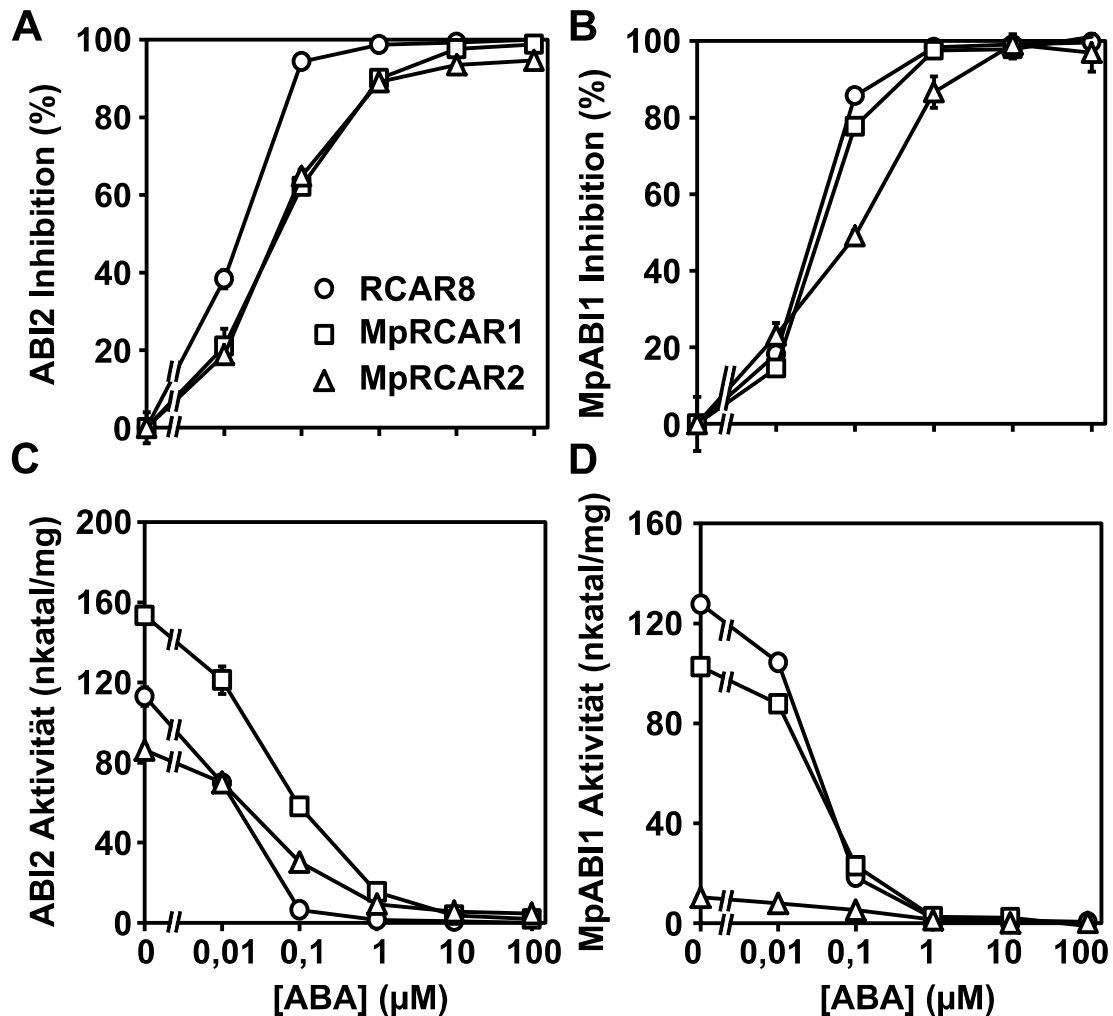


Abbildung 2-23: Interspeziesanalyse der *M. polymorpha* und *A. thaliana* PP2Cs bzw. RCARs mit ABA

Regulation der ABI2 bzw. MpABI1-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der ABA-Konzentration mittels RCAR8 (weiße Kreise), MpRCAR1 (weiße Quadrate) und MpRCAR2 (weiße Dreiecke). Die Proteinphosphatase (50 nM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR bei verschiedenen Konzentrationen von ABA inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. In (A) und (B) wurden die Messungen auf die Inhibition der durch ABA vermittelten regulierbaren Aktivität normiert. In (C) und (D) hingegen ist die Aktivität der Enzyme in Gegenwart der entsprechenden RCARs und in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration in nkatal/mg dargestellt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

In Abbildung 2-23C und D wurden die Messungen ebenfalls als katalytische Aktivität pro Milligramm Protein dargestellt. Aus diesen Daten ging ein Effekt hervor, der bereits unter 2.2.1 beschrieben wurde. Die RCAR Proteine von *A. thaliana* und ebenfalls jene aus *M. polymorpha* sind in der Lage auch in Abwesenheit von ABA die Aktivität einer Proteinphosphatase zu regulieren. Die Art und Weise wie stark diese Regulation war bzw. ob es sich dabei um eine negative Regulation handelte, welche

die Aktivität des Enzyms reduzierte, oder eine positive Regulation, welche die Aktivität des Enzyms steigerte, war dabei von der verwendeten Proteinphosphatase und dem entsprechenden RCAR abhängig. Die Proteine RCAR8 und MpRCAR1 bildeten ein anschauliches Beispiel dieses Effektes. In Kombination mit ABI2 stellte RCAR8 ohne ABA im Vergleich zu MpRCAR1 den stärkeren negativen Regulator der Proteinphosphatase dar. Im Gegensatz hierzu wurde im direkten Vergleich in Abwesenheit von ABA das Enzym MpABI1 stärker durch MpRCAR1 reguliert, als durch RCAR8. Den auffälligsten Unterschied in der ABA-unabhängigen Regulation zwischen ABI2 und MpABI1 zeigte jedoch MpRCAR2. Dieses RCAR war in der Lage die Aktivität von ABI2 auf 84 nkatal/mg zu regulieren und war damit deutlich aktiver als MpRCAR1. Erst durch die Kombination mit MpABI1 konnte gezeigt werden, wie effizient MpRCAR2 in der Lage ist die PP2C-Aktivität ohne einen Liganden zu regulieren. Hierbei wurde die Gesamtaktivität des Enzyms in Abwesenheit von ABA auf 9 nkatal/mg reduziert.

Gleichzeitig ergab sich aus der Effizienz der ABA-unabhängigen Regulation aber auch ein Problem. Die Durchführung aller Experimente hatte gezeigt, dass, sobald eine Proteinphosphatase eine Anfangsaktivität von unter 30 nkatal/mg besaß, die Auswertung der Messung wesentlich erschwert wurde. Der Grund hierfür ist, dass die Messschwankungen einen größeren Einfluss auf den eigentlichen sigmoidalen Verlauf der Messkurve hatten und diesen zunehmend linearisieren. Sollte die Aktivität eines Enzyms unter diese Marke fallen, muss dies bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Dies betraf in diesem speziellen Fall die ABA-abhängige Regulation von MpABI1 durch MpRCAR2. Auch wenn die exakten Werte dieser Kombination nicht anderweitig bestätigt werden konnten, so wurde zumindest der Trend der Regulation durch die ABA-abhängige Regulation von ABI2 mit MpRCAR2 verifiziert.

Aus Abbildung 2-23 konnte ermittelt werden, dass sowohl die PP2C, als auch die RCAR-Proteine aus *M. polymorpha* aktiv waren und speziesübergreifend wirkten. Es stellte sich die Frage, ob dies ebenfalls für LA galt. In Abbildung 2-24 wurde diese konzentrationsabhängig gegen dieselben Kombinationen aus PP2Cs und RCARs getestet wie ABA.

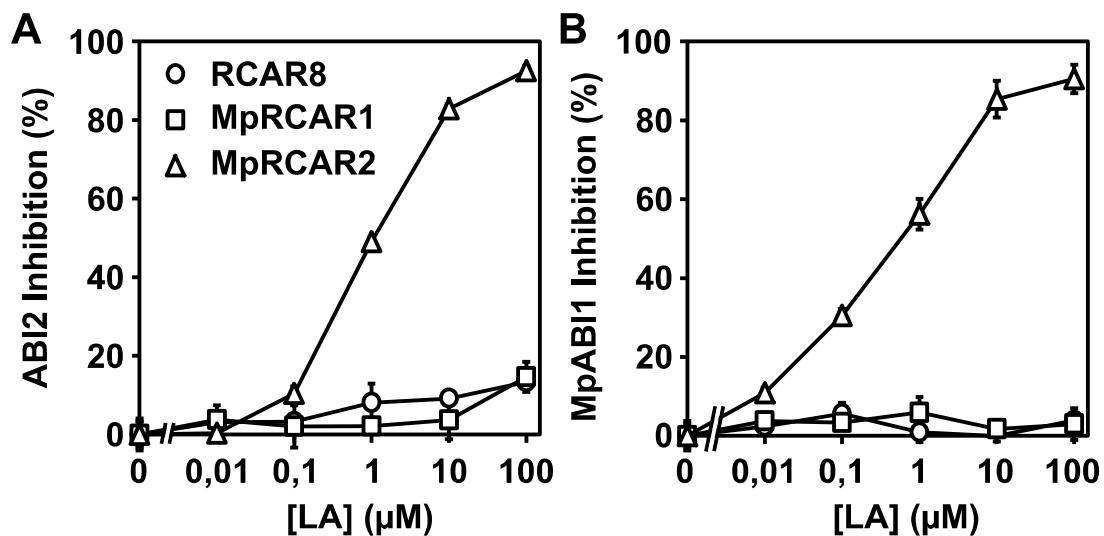


Abbildung 2-24: Interespeziesanalyse der *M. polymorpha* und *A. thaliana* PP2Cs bzw. RCARs mit LA

Regulation der ABI2 (A) bzw. MpABI1-Phosphataseaktivität (B) in Abhängigkeit der LA-Konzentration mittels RCAR8 (weiße Kreise), MpRCAR1 (weiße Quadrate) und MpRCAR2 (weiße Dreiecke). Die Proteinphosphatase (50 nM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR bei verschiedenen Konzentrationen von ABA inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen bestätigt (\pm SD).

Die ermittelten Daten zeigten ein eindeutiges Ergebnis. Weder in Kombination mit RCAR8 noch mit MpRCAR1 konnten ABI2 und MpABI1 inhibiert werden. Bis zu einer Konzentration von 0,1 mM hatte das Hormon keinen Einfluss auf die Aktivität der Proteinkomplexe. Im Gegensatz hierzu vermittelte MpRCAR2 mit LA, sowohl im Fall von ABI2 als auch im Fall von MpABI1 eine Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität. Die gemessenen IC_{50} -Werte lagen hierbei bei 0,88 μ M LA für ABI2 und 0,285 μ M für MpABI1. Vorweg sollte hierbei berücksichtigt werden, dass, wie bereits oben beschrieben, die Auswertung der Kombination MpABI1 und MpRCAR2 aufgrund der effizienten Inhibierung der Aktivität des Enzyms in Abwesenheit des Liganden, schwierig war und daher der Unterschied der beiden IC_{50} -Werte um den Faktor zwei für sich alleine nicht belastbar war. Allerdings wurde die Existenz dieser regulatorischen Funktion durch die vergleichende Messung mit ABI2 bestätigt. Somit konnte festgehalten werden, dass LA in der Lage war, wie ABA, die Regulation der Proteinphosphatasen zu vermitteln. Allerdings schien der Ligand nur für spezifische RCARs bzw. nur für MpRCAR2 zu wirken.

Tabelle 2-6: IC₅₀-Werte der ABA und LA vermittelten Regulation

Aufgeführt sind die IC₅₀-Werte der Liganden ABA und LA in Kombination mit den Proteinphosphatasen ABI2 und MpABI1 und den regulatorischen Proteinen RCAR8, MpRCAR1 und MpRCAR2.

PP2C	RCAR	Ligand	IC ₅₀ [μM]	±SD [μM]
ABI2	RCAR 8	ABA	0,015	0,003
	MpRCAR1	ABA	0,050	0,007
	MpRCAR2	ABA	0,043	0,003
	RCAR 8	LA	n.b.	n.b.
	MpRCAR1	LA	n.b.	n.b.
	MpRCAR2	LA	0,880	0,052
MpABI1	RCAR8	ABA	0,030	0,007
	MpRCAR1	ABA	0,039	0,007
	MpRCAR2	ABA	0,082	0,024
	RCAR 8	LA	n.b.	n.b.
	MpRCAR1	LA	n.b.	n.b.
	MpRCAR2	LA	0,285	0,060

2.4.3.2. Analyse zu LA verwandter natürlicher Substanzen

Das regulatorische Protein MpRCAR2 hatte seine Fähigkeit zur Regulation der PP2Cs insbesondere in Kombination mit ABI2 gezeigt. Des Weiteren konnte ABA bei MpRCAR2 eine regulatorische Wirkung induzieren. Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Interaktionen die Regulation von LA ausschließlich mit MpRCAR2 ermöglichten bzw. die der anderen RCARs verhinderten. Zu diesem Zweck wurde mittels *in silico* Analysen eine Reihe von in Pflanzen vorkommenden Molekülen identifiziert, welche chemische oder/und strukturelle Ähnlichkeiten mit LA besaßen (*lunularic acid like*, LAL), allerdings auch über wesentliche unterschiedliche Merkmale verfügten (Abbildung 2-25).

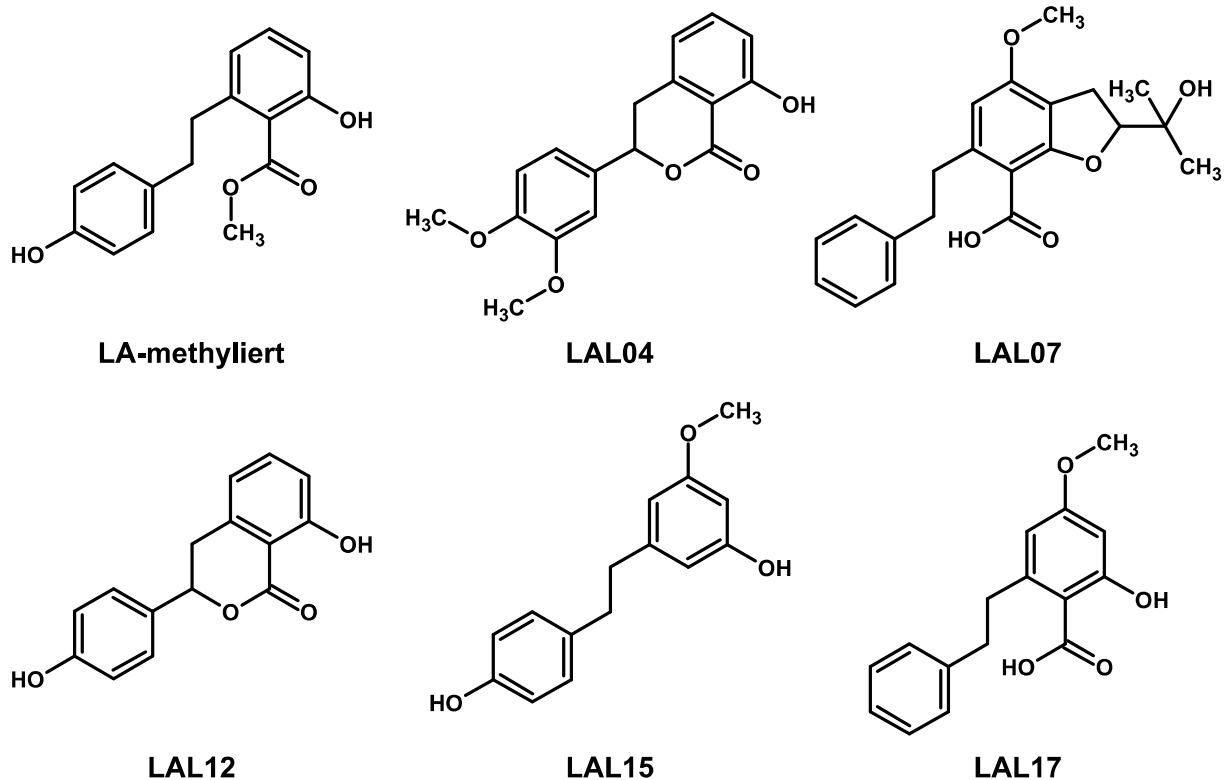


Abbildung 2-25: Strukturen zu LA verwandter Substanzen

Dargestellt wurden die Strukturen des Methylesters von LA, sowie fünf weitere zu LA ähnliche Substanzen.

Wie in Miyazono et al. 2009 dargelegt, sind einige der wichtigsten Wechselwirkungen der RCAR-Bindungstasche mit dem Phytohormon ABA, diejenigen mit der Carbonsäuregruppe des Moleküls. Ausgehend von der axialen molekularen Anordnung der ABA im Vergleich zu LA kann davon ausgegangen werden, dass im Falle einer durch LA induzierten Regulation die Carbonsäuregruppe des Moleküls eine essentielle Rolle spielte. Um diese These zu überprüfen wurde die entsprechende Gruppe methyliert (Abbildung 2-25) und anschließend die Proteinphosphataseaktivität analysiert (Abbildung 2-26).

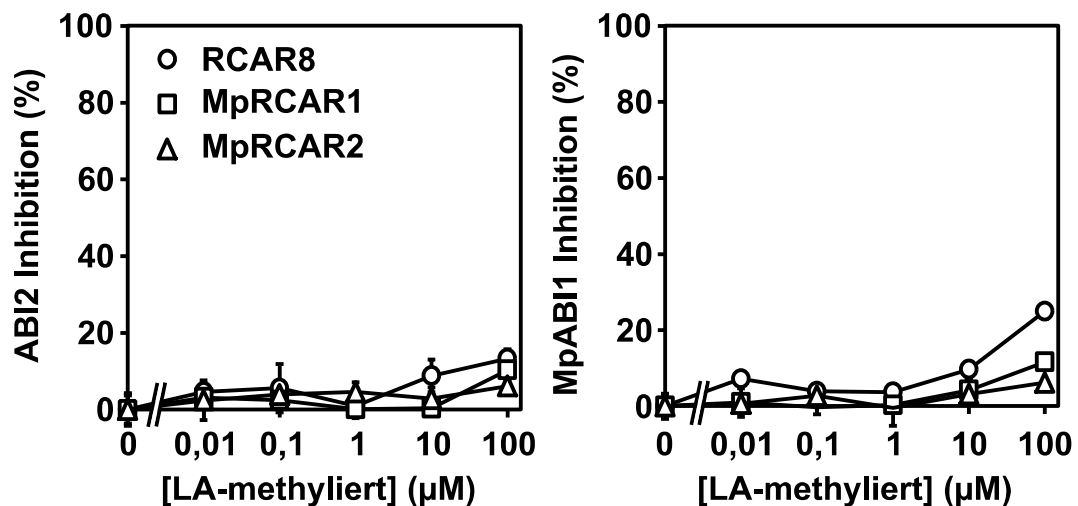


Abbildung 2-26: Durch methylierte LA vermittelte Inhibition der Proteinphosphataseaktivität

Regulation der ABI2-Phosphataseaktivität und MpABI1-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration mittels RCAR8, MpRCAR1 und MpRCAR2. Die Proteinphosphatase (50 nM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR8 (weiße Kreise), MpRCAR1 (weiße Quadrate) und MpRCAR2 (weiße Dreiecke) bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen bestätigt (\pm SD).

Entsprechend den Erwartungen wurde in Anwesenheit von RCAR8 bzw. MpRCAR1 mit keiner der gemessenen Proteinphosphatasen eine signifikante Änderung der Regulation erreicht. Allerdings konnte durch Methylierung der Carbonsäuregruppe ebenfalls die durch LA induzierte Regulation der Proteinphosphatasen durch MpRCAR2 aufgehoben werden. Dies zeigte, wie wichtig diese Gruppe für eine regulatorische Interaktion des Moleküls mit dem Protein ist.

Die auf Basis der strukturellen Verwandtschaft zu LA ähnlichen Moleküle wurden nach demselben Schema analysiert. Zum einen sollte herausgefunden werden, ob die spezifische Wechselwirkung mit MpRCAR2 bestehen blieb oder durch bestimmte Gruppen aufgelöst wurde, zum anderen ob einige der neuen Liganden ein breiteres Wirkungsspektrum besaßen als lediglich MpRCAR2. Alle durchgeführten Messungen in Kombination mit ABI2 wurden in Abbildung 2-27 dargestellt.

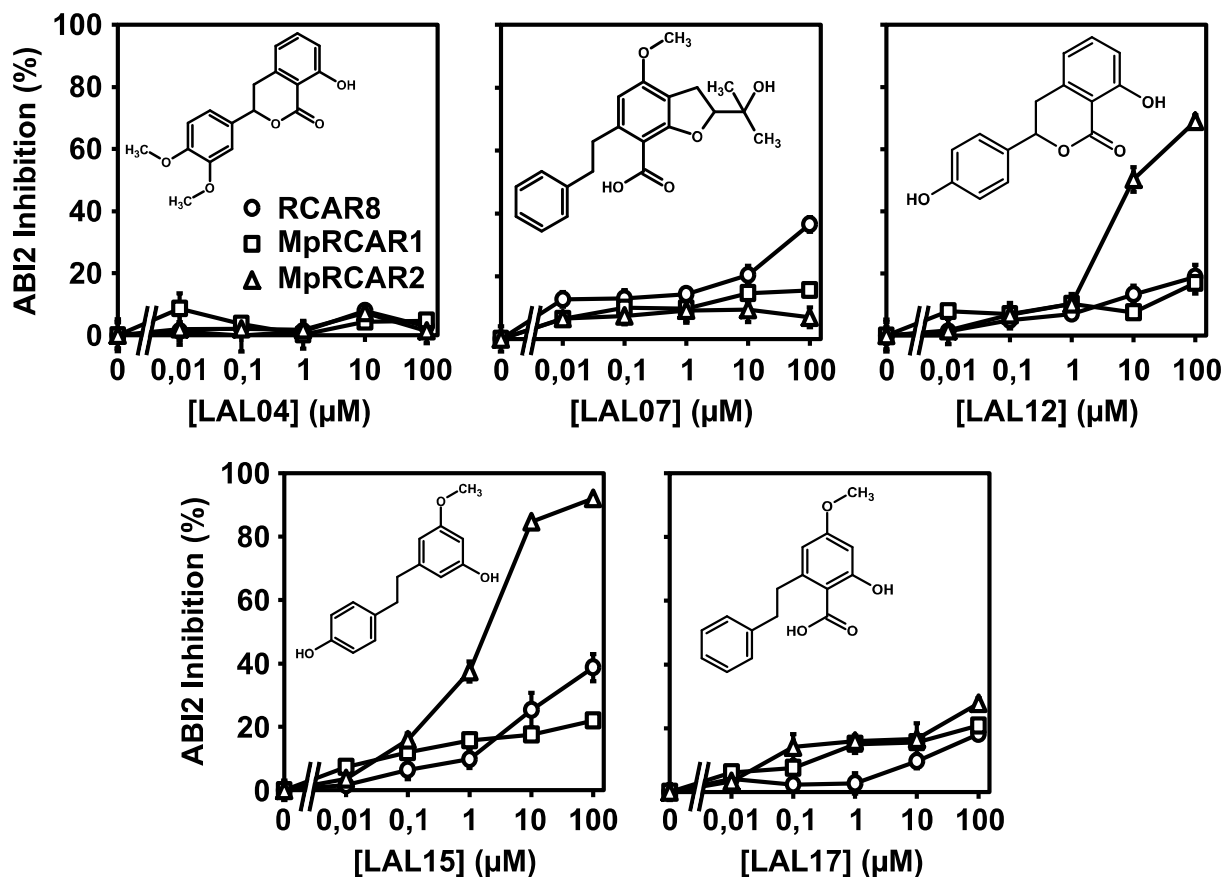


Abbildung 2-27: Durch LAL04, LAL07, LAL12, LAL15 und LAL17 vermittelte Inhibition der ABI2-Aktivität

Regulation der ABI2-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration mittels RCAR8, MpRCAR1 und MpRCAR2. Die Proteinphosphatase (50nM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR8 (weiße Kreise), MpRCAR1 (weiße Quadrate) und MpRCAR2 (weiße Dreiecke) bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen durchgeführt (\pm SD).

Aus den Messdaten geht hervor, dass durch die drei Liganden LAL04, LAL07 und LAL17 keine wesentliche Regulation in Kombination mit ABI2 und einem der RCARs induziert werden konnte. Gleiches konnte für alle drei Liganden auch in Kombination mit MpABI1 beobachtet werden (Abbildung 2-28). Zwar konnte im Falle von LAL07 ein Anstieg der regulatorischen Aktivität bei sehr hohen Konzentrationen des Liganden beobachtet werden, jedoch war dies vermutlich eher den Eigenschaften des Moleküls geschuldet, welche die Proteinphosphataseaktivität direkt beeinflussen. LAL07 war von den gemessenen Analoga die Substanz, welche strukturell am weitesten von ABA und LA entfernt war. Die Messungen mit diesem Liganden sollten hauptsächlich als Negativkontrolle für die übrigen Substanzen dienen. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der Aktivität im Vergleich zu den anderen beiden

inaktiven Liganden LAL04 und LAL17 wäre hierbei beispielsweise eine Blockade des aktiven Zentrums der PP2C oder eine Art „partieller Denaturierung“ der Sekundärstrukturen des Proteins.

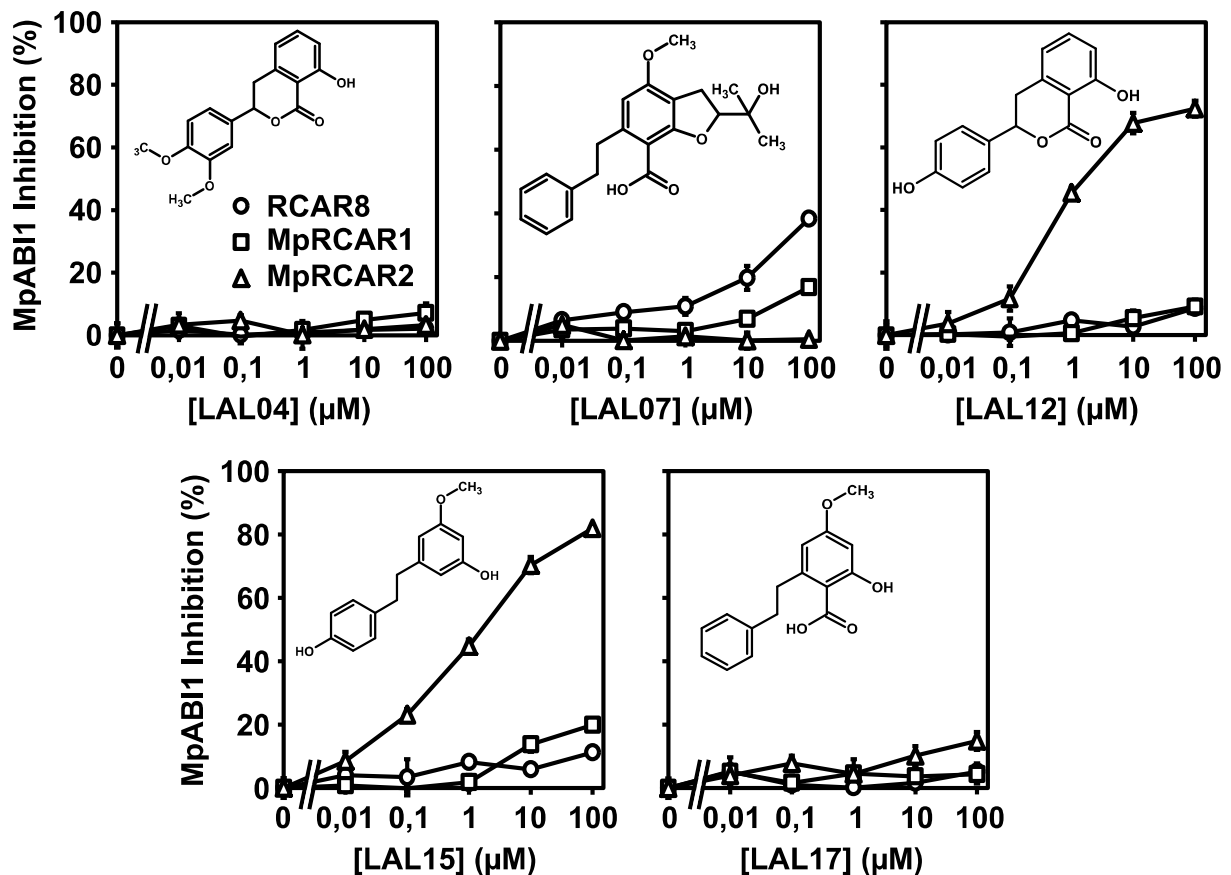


Abbildung 2-28: Durch LAL04, LAL07, LAL12, LAL15 und LAL17 vermittelte Inhibition der MpABI1-Aktivität

Regulation MpABI1-Phosphataseaktivität in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration mittels RCAR8, MpRCAR1 und MpRCAR2. Die Proteinphosphatase (50nM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR8 (weiße Kreise), MpRCAR1 (weiße Quadrate) und MpRCAR2 (weiße Dreiecke) bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen inkubiert und anschließend die Aktivität der Proteinphosphatase bestimmt. Die Analysen wurden in drei Wiederholungen bestätigt (±SD).

Der Ligand LAL17 besaß im Vergleich zu LA eine sehr homologe Struktur und ebenfalls die durch die Methylierung von LA bereits als entscheidend definierte Carbonsäuregruppe. Dennoch konnte in keiner Kombination eine Regulation der Proteinphosphataseaktivität induziert werden. Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Liganden war LAL12 in der Lage eine Inhibition der Phosphataseaktivität mit einem IC_{50} -Wert von 11 µM für ABI2 und einem IC_{50} -Wert

von 1,3 μM für MpABI1 in Kombination mit MpRCAR2 zu erreichen (vgl. Tabelle 2-7). Auffällig war hierbei vor allem die ähnliche Struktur von LAL12 mit dem inaktiven LAL04. Im direkten Vergleich besitzt LAL04 eine zusätzliche $-\text{OCH}_3$ Gruppe und die Alkoholgruppe des Benzolringes wurde methyliert. Es stellte sich die Frage ob hierbei nicht nur die Größe des Moleküls, sondern ebenfalls die Methylierung einen wichtigen Einfluss auf die Aktivität des Liganden besaß. Eine tiefere Einsicht in diese Vorgänge gewährte LAL15. Dieser Ligand war ebenfalls ausschließlich regulatorisch aktiv mit MpRCAR2, wobei die IC_{50} -Werte in Kombination mit ABI2 bei 0,9 μM und mit MpABI1 bei 1,4 μM lagen. Dieser Ligand besaß an beiden planaren Ringen eine alkoholische Gruppe und ist durch die Verbindung über eine Zweierkohlenstoffkette der beiden aromatischen Ringe flexibel in der Gesamtstruktur. Des Weiteren besaß er eine zusätzliche Alkoholgruppe, welche allerdings methyliert vorlag. Ausgehend von der Gesamtstruktur des Moleküls besaß dieses eine große Ähnlichkeit zu LA bzw. zu seiner methylierten Version. Angesichts der vorherigen Ergebnisse war die Erwartung, dass aufgrund der Methylierung ebenfalls dieses Molekül nicht in der Lage sein sollte eine Regulation zu induzieren. Dennoch zeigte sich, dass es eine nur um den Faktor zwei schlechtere regulatorische Wirkung besaß als LA.

Tabelle 2-7: IC_{50} -Werte der LAL vermittelten Regulation

Aufgeführt sind die IC_{50} -Werte der Liganden LAL12 und LAL15 Kombination mit den Proteinphosphatasen ABI2 und MpABI1 und den regulatorischen Proteinen MpRCAR2.

PP2C	Ligand	IC_{50} (μM)	$\pm\text{SD}$ (μM)
ABI2	LAL12	1,312	0,159
	LAL15	4,803	0,512
MpABI1	LAL12	0,503	0,111
	LAL15	0,566	0,048

2.5. Prolylisomeraseaktivität der RCAR-Proteine

Die Konformationsänderung von einem *cis*- zu einem *trans*-Prolin ist ein wesentlicher Bestandteil der ABA-Bindung. Hierbei wird, wie in 1.3 erläutert, durch die Relokalisation von *gate* und *latch loop* eine Konformationsänderung induziert welche neue intermolekulare Interaktionen zulässt, die die Bindungstasche und die Koordination des ABA-Moleküls ermöglichen (Nishimura et al. 2009; Yin et al. 2009).

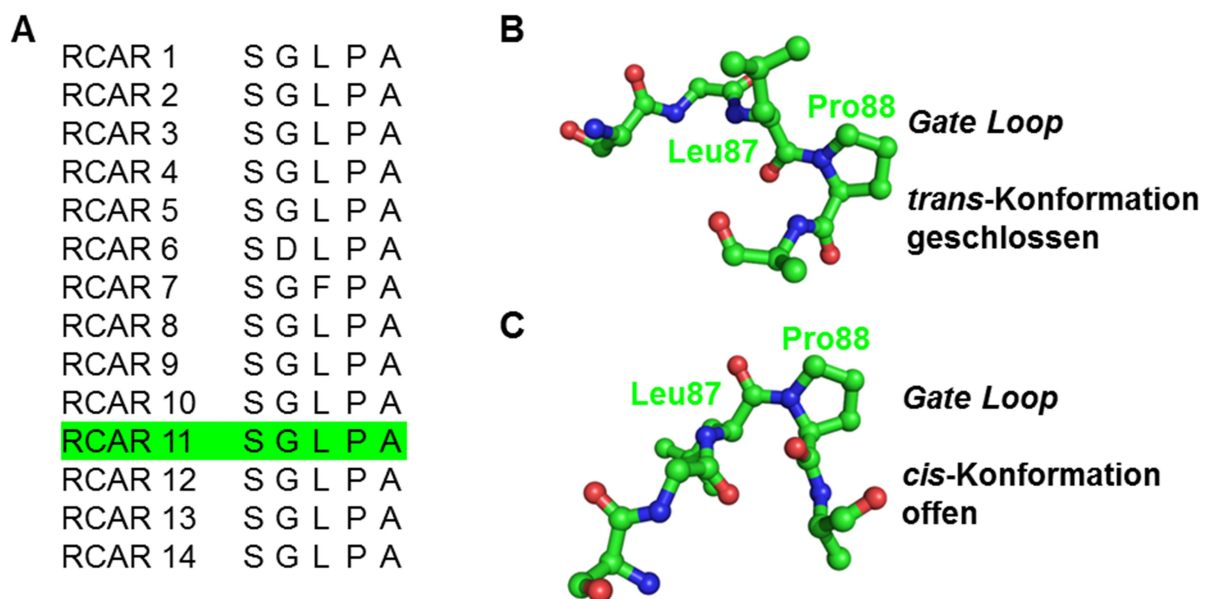


Abbildung 2-29: Gate Loop der RCAR-Proteine

(A) Vergleich der Aminosäuren, welche in allen 14 RCARs aus *Arabidopsis thaliana* die *Gate Loop* Region bilden. In grün ist die Sequenz von RCAR11 markiert, welche ebenfalls als 3D-Struktur dargestellt ist. In (B) und (C) sind die Aminosäuren des *Gate Loop* Bereichs als Linien und Kugeln dargestellt, wobei Sauerstoff rot, Stickstoff blau und Kohlenstoff grün gekennzeichnet sind. Markiert sind die Aminosäuren Leu87 und Pro88, durch dessen Isomerisierung von der *cis*- (C) zur *trans*-Konformation (B) die Bindungstasche der RCARs geschlossen wird (Nishimura et al. 2009).

Die Konformationsänderung findet in einem konservierten Bereich der RCAR-Familie statt. Vor allem die Aminosäure vor Prolin ist in allen RCARs hochkonserviert, mit Ausnahme von RCAR7. Allerdings konnte bereits in 2.3 gezeigt werden, dass dieser Unterschied keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins besitzt. Da das Schließen der Bindungstasche ein entscheidender Schritt in der Ausbildung des Rezeptorkomplexes ist und dieser Vorgang eine Isomerisierung der Leucin-Prolin Bindung erfordert, stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um einen katalysierten

Schritt handelt. Die Hypothese, dass die RCARs als Dimere vorliegen und die Bindung von ABA erst die Monomerisierung dieser erlaubt, ist ein weiteres Indiz dafür, dass der Schritt der Isomerisierung der Bindung ein regulatorisch entscheidender „Schalter“ für die Aktivität der RCARs sein könnte.

Zur Untersuchung ob die RCAR-Proteine über eine Prolylisomeraseaktivität verfügen, wurde ein der Konsensus-Sequenz entsprechendes Peptid (Aminobenzoyl-Ser-Gly-Leu-Pro-Ala-p-Nitroanilin) als Substrat benutzt. Da Peptide gegenüber den natürlichen Substratproteinen generell kleiner sind, kann durch deren Verwendung eine spezifische Analyse eines evtl. vorhandenen katalytischen Zentrums des Enzyms ermöglicht werden. Die Analyse wurde mittels eines proteasefreien Prolylisomerasetests durchgeführt. Hierbei kann die Zunahme der Fluoreszenz von Aminobenzoyl gemessen werden, welche ansonsten durch p-Nitroanilin in LiCl/TFE, bei *cis*-Konformation des Peptids, gequencht ist (Zoldak et al. 2009). Durch 100-fache Verdünnung wurde die *cis/trans*-Isomerisierung des Peptids initiiert und der zeitliche Verlauf der Zunahme der Fluoreszenz verfolgt. Die erhaltenen Messdaten (Abbildung 2-30A) wurden mittels einer monoexponentiellen Funktion analysiert und die erhaltenen apparenten Raten aufgetragen (Abbildung 2-30B).

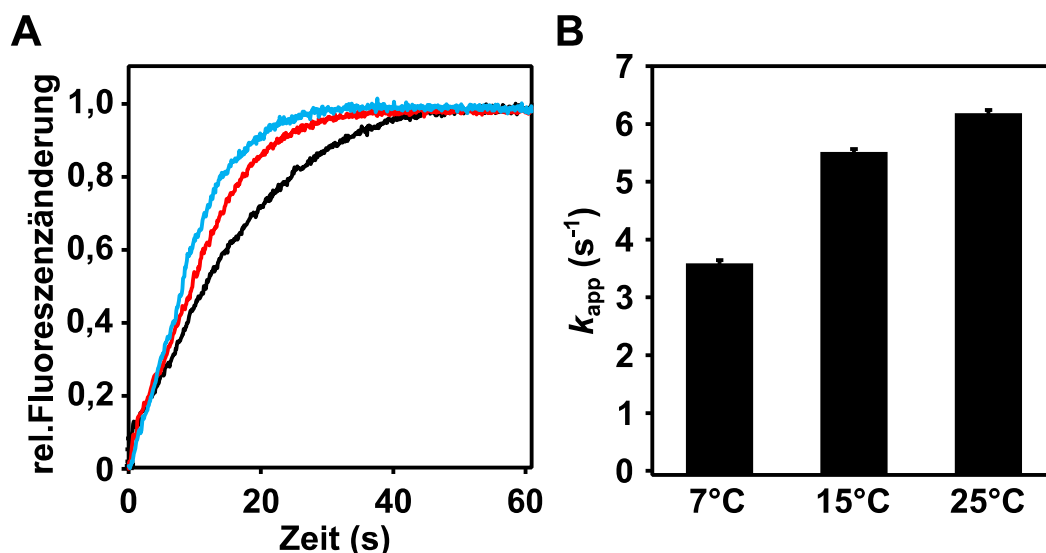


Abbildung 2-30: *cis/trans*-Isomerisierung von Abz-SGLPA-pNa

(A) Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung der *cis/trans*-Isomerisierung von 2,5 μ M des Quintapeptids Abz-SGLPA-pNa bei 7 °C (schwarz), 15 °C (rot) und 25 °C (blau) nach manueller Mischung. (B) Auftragung der Raten (k_{app}) der unkatalysierten Reaktion bei 7 °C, 15 °C und 25 °C.

Zu Beginn wurde die unkatalysierte *cis/trans*-Isomerisierung des Peptids verfolgt. Neben den in der Literatur verwendeten Standardbedingungen von 15 °C (Schmidpeter et al. 2011) wurde die unkatalysierte Isomerisierung des Peptids ebenfalls bei 7 °C und 25 °C gemessen. Zum einen geht aus den Messdaten (Abbildung 2-30) hervor, dass die Konformationsänderung des Peptids eine temperaturabhängige Reaktion darstellt, zum anderen, dass es sich hierbei um eine zeitabhängige Reaktion handelt, die ohne Katalyse temperaturabhängig in einem Zeitraum von 20-60s nahezu vollständig abläuft. Die unkatalysierte Reaktion des Peptids ist hierbei im Vergleich zu den in der Literatur verwendeten Peptiden um etwa den Faktor fünf schneller (vgl. Zoldak et al. 2009). Da alle Versuche mit manueller Mischung durchgeführt wurden, wurde im Folgenden nur noch bei 15 °C und 7 °C gemessen. Da eine Änderung der gemessenen Raten bei diesen Temperaturen leichter zu ermitteln wäre. Zunächst wurde die Reaktion in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von RCAR8 analysiert (Abbildung 2-31).

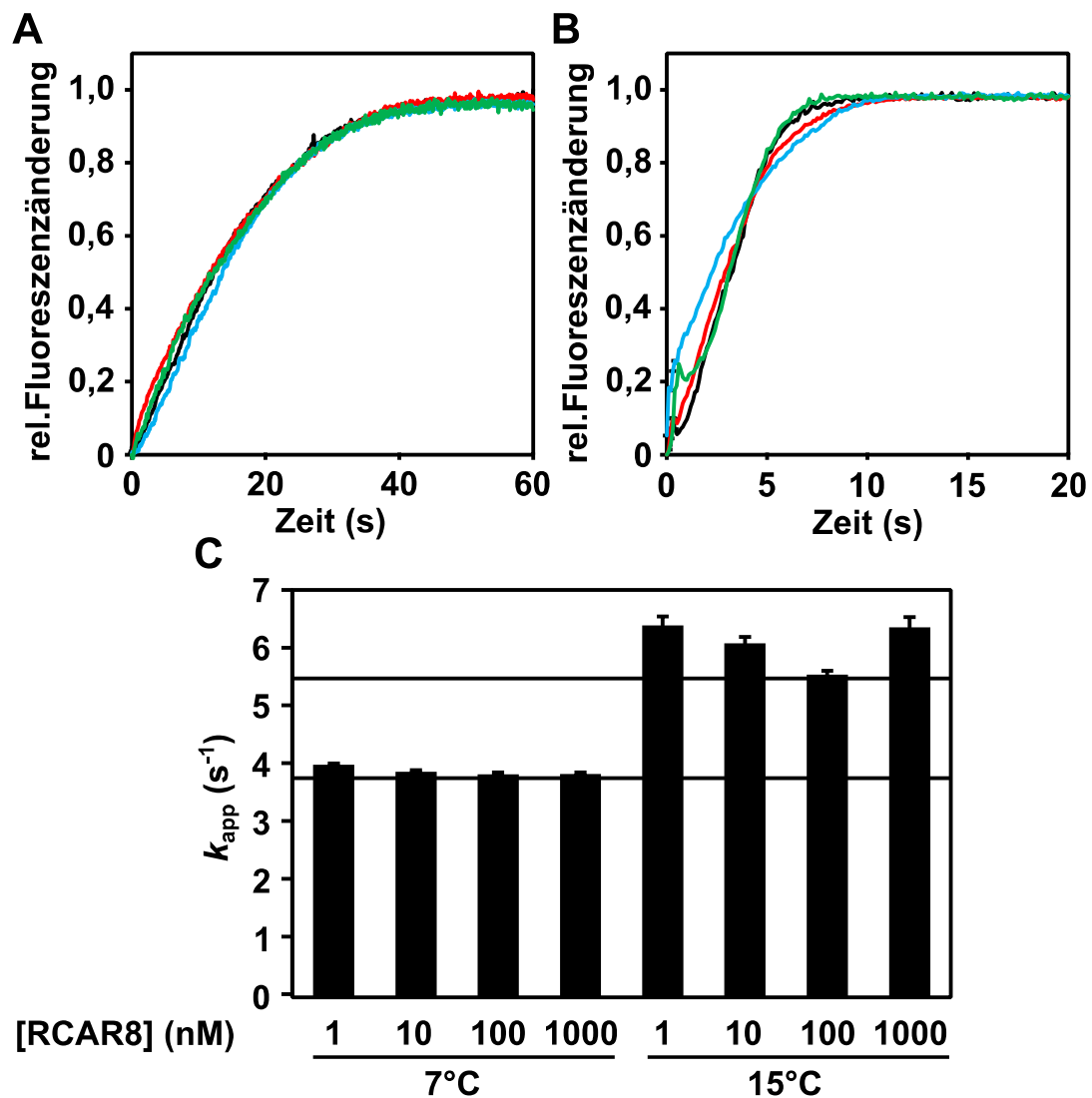


Abbildung 2-31: *cis/trans*-Isomerisierung von Abz-SGLPA-pNa in Gegenwart von RCAR8

Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung der *cis/trans*-Isomerisierung von 2,5 μM des Quintapeptids Abz-SGLPA-pNa in Gegenwart von 1 nM (schwarz), 10 nM (rot), 100 nM (blau) und 1000 nM (grün) RCAR8 nach manueller Mischung bei 7 °C (A) und 15 °C (B). (C) Auftragung der Raten (k_{app}) der Isomerisierungsreaktionen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an RCAR8 bei 7 °C und 15 °C. Die Linien zeigen die apparenten Raten (k_{app}) der unkatalysierten Reaktion bei 7 °C (3,63 s^{-1}) bzw. 15 °C (5,53 s^{-1}).

Die Messung bei 7 °C zeigte keine Veränderung in der Isomerisierungsrate des Peptides in Abhängigkeit der Konzentration des eingesetzten RCAR8 Proteins (Abbildung 2-30). Vielmehr entsprechen die gemessenen Raten denen der unkatalysierten Reaktion aus Abbildung 2-30. Im Vergleich hierzu zeigten die bei 15 °C gemessenen Raten leichte Varianzen im Vergleich zu Abbildung 2-30, allerdings sind diese Änderungen unabhängig von der Konzentration an eingesetzten RCAR8 und die apparenten Isomerisierungsraten waren durchgehend im Vergleich

zum vorherigen Experiment leicht erhöht. Bei keiner der beiden gemessenen Temperaturen konnte RCAR8 die Isomerisierung des Peptides beschleunigen. Allerdings wurde mit RCAR8 auch nur eine der drei Unterfamilien der RCARs untersucht. Im Folgenden sollen mit RCAR1 und RCAR11 auch jeweils ein Vertreter der beiden anderen Unterfamilien analysiert werden (Abbildung 2-32).

Im Vergleich zu RCAR8 nimmt die Rate der Isomerisierung des Peptides bei RCAR1 und RCAR11 geringfügig ab. Allerdings geht bereits aus Abbildung 2-31 hervor, dass leichte Messschwankungen gegeben sind. Wie bereits RCAR8 waren auch RCAR1 und 11 nicht in der Lage die Isomerisierungsrate des Peptides zu beschleunigen (Abbildung 2-32 A, C und D). Die Zugabe einer mit 500 μM sehr hohen Konzentration an ABA und die daraus resultierende Bindung des Liganden an das regulatorische Protein hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die apparenten Raten der Isomerisierung (Abbildung 2-32). Obwohl die Konformationsänderung ein wesentlicher Bestandteil der ABA-Bindung ist, kann nach den durchgeführten Messungen festgehalten werden, dass weder RCAR1, 8 noch 11 in der Lage waren eine Prolylisomerisierung von einem *cis*- zu einem *trans*-Prolin zu katalysieren.

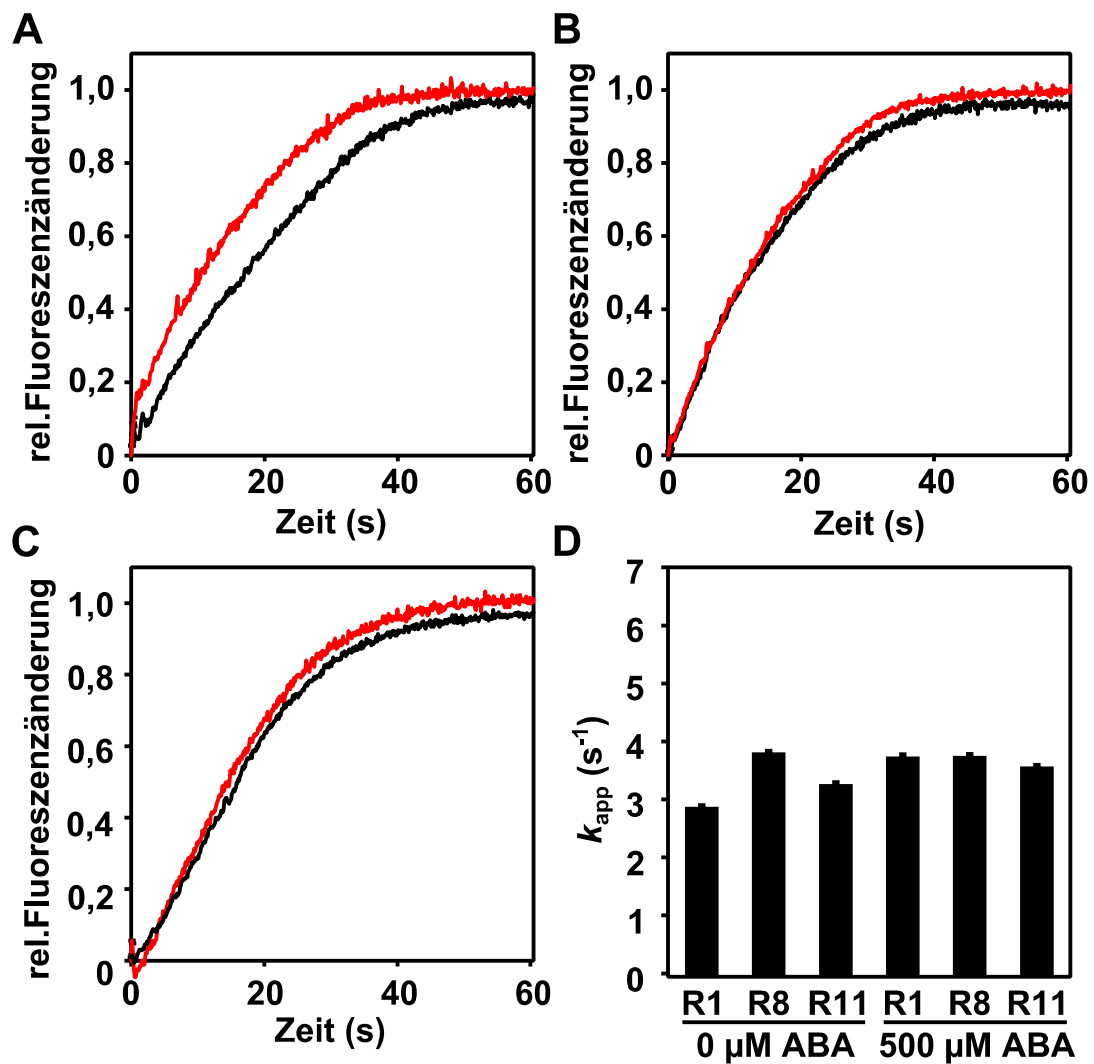


Abbildung 2-32: *cis/trans*-Isomerisierung von Abz-SGLPA-pNa in Gegenwart von RCAR 1, 8 und 11 mit und ohne ABA

Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung der *cis/trans*-Isomerisierung von 2,5 μM des Quintapeptids Abz-SGLPA-pNa in Gegenwart von 1 μM RCAR1 (A), RCAR8 (B) und RCAR11 (C) nach manueller Mischung bei 7 °C bei 0 μM (schwarz) und 500 μM ABA (rot). (D) Auftragung der Raten (k_{app}) der Isomerisierungsreaktionen in Gegenwart von RCAR1, 8 und 11 mit und ohne ABA.

3. Diskussion

Das Phytohormon ABA ist ein zentraler Regulator für die Anpassung an biotische oder abiotische Stressfaktoren (Arc et al. 2013; Lee et al. 2006; Xu et al. 2012; Christmann et al. 2006). Die Kernkomponenten des ABA-Signalweges bilden die ABA-Rezeptoren (Ma et al. 2009; Park et al. 2009), die Gruppe A Proteinphosphatasen des Typs 2C (Schweighofer et al. 2004; Fuchs et al. 2013) und eine Reihe von Proteinkinasen (Mustilli et al. 2002; Umezawa et al. 2009; Yoshida et al. 2006a). Die Bindung des Phytohormons in der hydrophoben Ligandentasche der RCARs und die daraus resultierende Inhibition der PP2Cs bzw. die Aufhebung der PP2C-vermittelten Inhibierung der Proteinkinasen ist der zentrale Mechanismus der ABA-Signalkaskade und als solcher, seit seiner Entdeckung, Gegenstand intensiver Forschungen. Die Rolle der Bindung des Phytohormons ABA stellt einen entscheidenden Faktor in den Interaktionen des heterotrimeren Komplexes dar. Bereits bei der Identifikation der RCARs wurde ein synthetischer Wachstumsinhibitor verwendet (Park et al. 2009). Obwohl chemisch distinkt, sind beide Moleküle in der Lage als Ligand der RCARs zu fungieren (Peterson et al. 2010). Dies bewies eine gewisse Flexibilität bezüglich der an der Koordination von ABA und an der Bildung der Bindungstasche beteiligten Aminosäuren, die innerhalb der gesamten RCAR-Familie hochkonserviert vorliegen (Santiago et al. 2009a).

In dieser Arbeit wurden das ABA-Enantiomer, ABA-Analoga chemische Verbindungen, LA und zu LA-verwandte natürliche Substanzen getestet um die Eigenschaften und Spezifitäten der Bindungstasche aller 14 RCARs zu analysieren. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit RCAR7 und den Besonderheiten dieses Proteins, durch die seine Funktion als ABA-Rezeptor in Frage gestellt wurde (Fujii et al. 2009; Li et al. 2013; Zhao et al. 2013).

Die erfolgreiche Reinigung aller RCAR-Proteine aus *Arabidopsis* ermöglichte weiterhin erstmalig eine umfassend vergleichende *in vitro* Analyse bezüglich der Regulation der enzymatischen Aktivität von vier der neun PP2Cs durch die RCARs und die inhibitorische Wirkung von ABA auf diese; im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen die auf eine kleinere Anzahl an RCARs begrenzt waren (Ma et al. 2009; Okamoto et al. 2013; Szostkiewicz et al. 2010).

Diese übergreifende Analyse lieferte neue Einblicke in das komplexe Netzwerk der ABA-Signaltransduktion. Zugleich eröffnete die Analyse einen Erklärungsansatz für ihre unerwartete funktionelle Redundanz. Im letzten Abschnitt wurde untersucht, ob die Prolylisomerisierung des *gate loops*, als inhibitorisch entscheidender Schritt, selbst einer regulatorischen Kontrolle durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase unterlag.

3.1. Ligandenselektivität der regulatorischen Proteine

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wird eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie beispielsweise Wurzelwachstum, Keimung, Dormanz und die Reaktion auf abiotische Stressfaktoren, im Lebenszyklus einer Pflanze durch ABA reguliert (Cutler et al. 2010; Gonzalez-Guzman et al. 2012; Raghavendra et al. 2010). Es ist daher wenig überraschend, dass seit der Entdeckung des Pflanzenhormons auch die biologische Aktivität des nicht natürlichen R-ABAs gegenüber seinem natürlichen Pendant untersucht wurde (Lin et al. 2005; Zaharia et al. 2005). In den meisten der durchgeführten Analysen, wurde R-ABA als ein im Verhältnis zu ABA schwächer wirkender Ligand deklariert und nur manchmal, wie zum Beispiel beim Wurzelwachstum von Getreidepflanzen, zeigte sich eine mit natürlicher ABA vergleichbare Aktivität (Lin et al. 2005; Nambara et al. 2002; Walker-Simmons et al. 1992). Es wurde gezeigt, dass R-ABA in der Lage ist die meisten mit ABA assoziierten Gene zu regulieren (Huang et al. 2007). Folglich sollte R-ABA, wie ABA, in der Lage sein die ABA-Biosynthese zu induzieren und die ABA-Signaltransduktion zu aktivieren (Lin et al. 2005). Ein Vorteil der Wirkung von R-ABA gegenüber der natürlichen ABA könnte sein, dass dieser Ligand langsamer metabolisiert wird als sein Pendant (Balsevich et al. 1994), dementsprechend würde die gleiche Konzentration des Hormons eine länger anhaltende Aktivierung der Signaltransduktion vermitteln.

3.1.1. Stereoselektivität der RCARs

In der vorliegenden Studie wurde R-ABA als alternativer Ligand mit 14 RCARs getestet. Bei allen regulatorischen Proteinen konnte eine inhibitorische Wirkung des

R-ABAs mit ABI2 beobachtet werden. Allerdings legte eine um etwa Faktor 100 schlechtere Wirkung des Liganden im Vergleich zu ABA in diesen Analysen den Schluss nahe, dass die RCARs eine Stereoselektivität besitzen und die R-Form diskriminiert wird.

Die enzymatische Aktivität von ABI2 lag in Kombination mit 13 der 14 RCARs in Gegenwart von 10 μM R-ABA noch bei über 70%, ausschließlich mit RCAR8 konnte sie auf 36% reduziert werden. Bei vergleichbaren Konzentrationen an ABA konnte nur mit RCAR2 noch eine ABI2-Aktivität von 44% festgestellt werden, alle übrigen RCARs inhibierten die enzymatische Aktivität der PP2C vollständig (vgl. Abbildung 2-5). Eine ähnliche Beobachtung wurde sowohl bei Ma et al. 2009 als auch bei Szostkiewicz et al. 2010 beobachtet. In beiden Fällen lag die Inhibition der Aktivität von ABI1 und ABI2 mit RCAR1 in Gegenwart von 10 μM R-ABA bei unter 30% (Abbildung 3-1A). Ein Vergleich dieser Analysen mit der vorliegenden Studie ergab eine etwa doppelt bzw. dreimal so effektive Regulation. Jedoch geht aus 2.4.1 hervor, dass von allen RCARs, die in Kombination mit ABI2 getestet wurden, RCAR1 eines der insensitivesten Proteine für R-ABA darzustellen scheint. RCAR3 hingegen war um den Faktor drei sensitiver für die R-ABA vermittelte Regulation und bestätigte damit die bei Szostkiewicz et al. 2010 durchgeführten Analysen (Abbildung 3-1A). Ein Faktor der hierbei berücksichtigt werden musste, war der Einfluss der PP2C auf die Wirkung der regulatorischen Proteine (vgl. 2.4.1). Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinphosphatasen ABI1, ABI2 und HAB1 in Kombination mit RCAR1 eine vergleichbare Regulation in Gegenwart von R-ABA besaßen, was auch in der Literatur gezeigt wurde (Ma et al. 2009; Okamoto et al. 2013; Szostkiewicz et al. 2010). Ausschließlich die Aktivität von PP2CA wurde um 30% reduziert und wies darauf hin, dass die verwendete PP2C, die Analysen beeinflusst.

Während RCAR1, eines der für R-ABA am insensitivesten regulatorischen Proteine darstellte, kristallisierte sich in dieser Studie RCAR8 als das sensitivste heraus und das einzige, das die Bestimmung eines IC_{50} -Wertes (3,3 μM) gestattete. Bei Zhang et al. 2013 wurde ebenfalls die Aktivität der Proteine in Kombination mit R-ABA analysiert, wobei hier zehn der 14 RCARs analysiert wurden. Analog zu den in 2.4.1 durchgeführten Messungen, wurde auch hierbei RCAR1 als insensitive für R-ABA beschrieben, wohingegen sich RCAR8 mit einem Unterschied von mehr als Faktor 2,5 als das am sensitivsten für R-ABA wirkenden regulatorischen Proteine darstellte (Abbildung 3-1B).

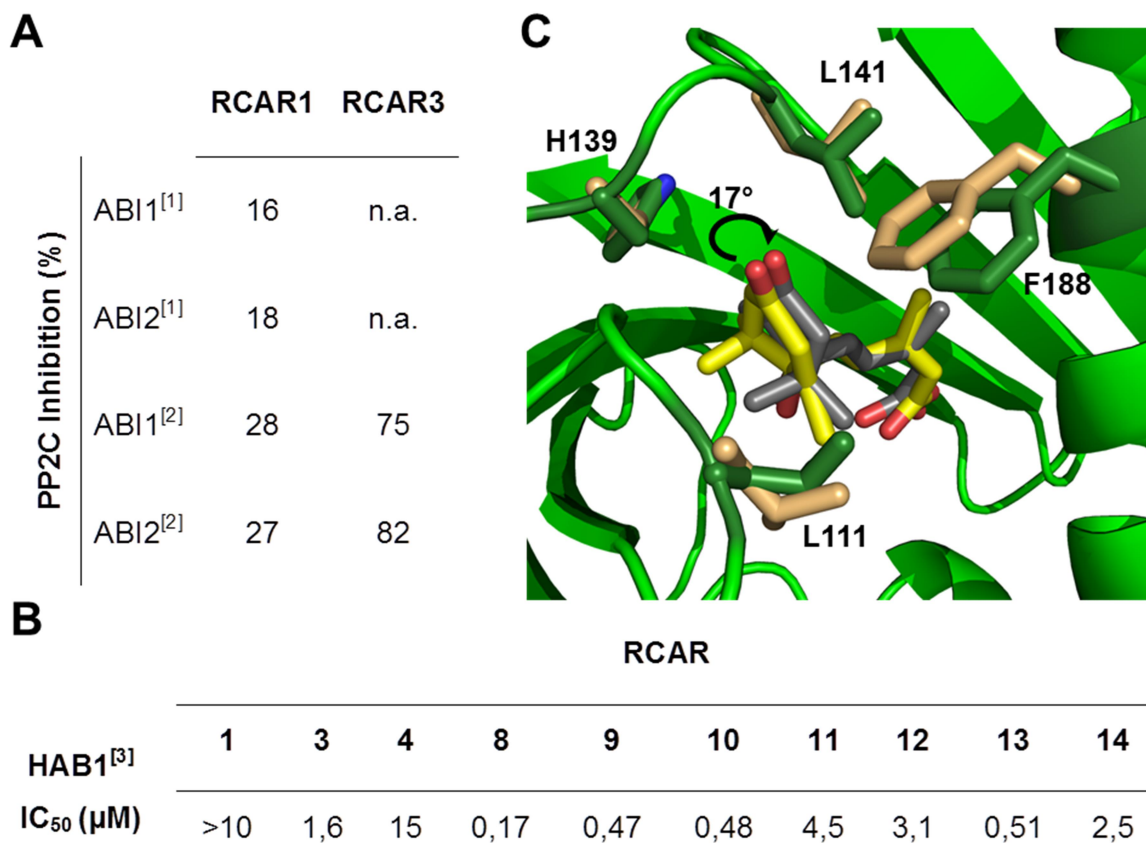


Abbildung 3-1: R-ABA vermittelte Inhibition verschiedener PP2Cs und Strukturvergleich zwischen RCAR13 im Komplex mit ABA und R-ABA

(A) Inhibition der Proteinphosphataseaktivität von ABI1 und ABI2 (50 nM) mit RCAR1 bzw. RCAR3 (200 nM) aus Ma et al. 2009 und Szostkiewicz et al. 2010 in Gegenwart von 10 µM R-ABA. (B) IC₅₀-Werte der HAB1-Phosphataseaktivität aus Zhang et al. 2013. HAB1 (0,5 µM) wurde mit der doppelten Menge an RCAR in Abhängigkeit von R-ABA analysiert. (C) Überlappende Darstellung von R-ABA (grau) und ABA (gelb) (Weng et al. 2016) im Komplex mit RCAR13 (grün). Die Aminosäurereste H139, L141, L111 und F188 die bei der Bindung von R-ABA (dunkelgrün) im Vergleich zu ABA (hellorange) eine Relokalisation durchführen und die Liganden sind als Strichmodell hervorgehoben. Alle Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot markiert. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 4JDA und 5JO2.

Eine Frage die sich stellte war, wie das strukturell unterschiedliche R-Enantiomers des Liganden in die für sein natürliches Pendant generierte und in allen RCAR-Proteinen hochkonservierte Bindungstasche passen könnte? Eine mögliche

^[1]Ma et al. 2009

^[2]Szostkiewicz et al. 2010

^[3]Zhang et al. 2013

Erklärung geht auf Milborrow und seine Strukturhypothese zurück, der eine biologische Aktivität des Stereoisomers auf Basis der Symmetrie des Moleküls begründet (Milborrow 1974). Durch Rotation an der Achse können die beiden Moleküle beinahe in Deckung zueinander gebracht werden, wodurch es möglich ist alle polaren Gruppen beider Stereoisomere über dieselben Aminosäuren zu koordinieren (Abbildung 3-1C). Die Moleküle würden sich demnach nur durch den Austausch der Positionen der Methyl- und Dimethylgruppe am Cyclohexanring unterscheiden. Die mögliche Bestätigung dieser Hypothese lieferte Zhang et al. 2013, der ein R-ABA enthaltendes RCAR13 Protein kristallisierte. Der direkte Vergleich zwischen einem ABA und einem R-ABA enthaltendem RCAR13 zeigte, dass die Unterschiede der Strukturen nur gering sind. In den Proteinstrukturen führte der Cyclohexenring des Moleküls eine Rotation um 17° gegen den Uhrzeigersinn bei R-ABA im Verhältnis zu ABA durch (Abbildung 3-1C). Diese Drehung des Moleküls führte zu einer Positionsänderung der Ketogruppe, welche in einer Relokalisation der Aminosäuren H139 und L141 von $0,8 \text{ \AA}$ resultierte. Des Weiteren verschoben sich die Aminosäuren L111 und F188 um $0,7 \text{ \AA}$ um die Bindungstasche ausreichend zu erweitern, damit die veränderte Position der Methylgruppen kompensiert werden konnte (Abbildung 3-1C) (Zhang et al. 2013). Allerdings warf die Diskriminierung des R-ABA Liganden bei den in dieser Studie durchgeführten Analysen die Frage auf, ob diese in den Proteinkristallen sichtbaren Neuausrichtungen der Aminosäurereste auch bei aktiven regulatorischen Proteinen stattfinden oder einen durch die Bedingungen der Kristallisation begünstigten Zustand darstellten. Im Gegensatz zu den in 2.4.1 durchgeführten Untersuchungen, die ausschließlich eine Bestimmung des IC_{50} -Wertes für RCAR8 zuließen, konnte dieser bei Zhang et al. 2013 für neun von zehn getesteten regulatorischen Proteinen außer RCAR1 ermittelt werden (Abbildung 3-1B).

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanzen der in dieser Studie durchgeführten Messungen und den publizierten Daten war neben der verwendeten Proteinphosphatase, auch eine unterschiedliche Quelle des R-ABAs. Bei einer Analyse verschiedener R-ABA Quellen zeigte sich, dass die von Sigma-Aldrich bezogene einen um Faktor vier, die von Loewen-Labratory einen um Faktor 13 und die von A. Christmann erhaltene Probe einen um Faktor 100 höheren IC_{50} -Wert als das natürliche Pendant aufwies (vgl. 2.4.1). Bei der Probe von A. Christmann handelte es sich hierbei um ein von Sigma-Aldrich bezogenes R-ABA, welches

zusätzlich über eine Chromatographiesäule (Cyclobond I column, Sigma-Aldrich) an der HPLC gereinigt wurde. Dieser Reinigungsschritt erhöhte, nach den unter 2.4.1 gemessenen Daten, den Reinheitsgehalt des R-ABAs um einen Faktor von 25. Die Tatsache, dass der Ursprung des Liganden einen derartigen Einfluss auf die Messwerte hatte, belegte die Schwierigkeit reines R-ABA kommerziell zu erhalten und für Analysen zu verwenden.

Die unterschiedliche Wirkung von R-ABA Proben verschiedener Herkunft belegte die Schwierigkeit die in dieser Studie gewonnenen Daten mit denen der Literatur zu vergleichen. Orientiert man sich ausschließlich an den hier durchgeführten Messungen muss davon ausgegangen werden, dass R-ABA eine um etwa Faktor 100 schlechtere Wirkung als ABA besaß. Alternativ muss nach der Analyse der verschiedenen Quellen und der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des jeweiligen R-ABAs allerdings auch hierbei berücksichtigt werden, dass eine Kontamination mit ABA vorlag, auf die die regulatorischen Effekte zurückzuführen waren. Folglich ist R-ABA entweder kein alternativer Ligand für die RCARs oder benötigt für seine Funktion sehr hohe Konzentrationen, die seine biologische Relevanz fraglich erscheinen lassen.

3.1.2. Synthetische ABA-Analoga

Eines der Ziele der Verwendung von R-ABA war einen Liganden zu erhalten der langsamer metabolisiert wird als natürliches ABA und durch seine vergleichbare Wirkungsweise eine länger anhaltende Aktivierung der Signaltransduktion vermittelt. Einen alternativen Ansatz zu dieser Vorgehensweise stellte die Verwendung von synthetischen chemischen Verbindungen dar, deren Struktur auf ABA basiert. In dieser Studie wurde eine Reihe solcher modifizierten Verbindungen getestet. Hierbei wurden die C-Atome, welche die Ziele der drei verschiedenen oxidativen Abbauewege von ABA darstellen (siehe Einleitung), durch verschiedene Gruppen modifiziert.

Mittels *in vitro* Analysen mit allen 14 RCARs sollte der Einfluss der Modifikationen auf die Effizienz der Liganden im Vergleich zu ABA analysiert werden. Zusätzlich konnte über den Einsatz dieser Substanzen die Spezifität der Bindungstasche analysiert werden um herauszufinden, ob bei einigen der 14 regulatorischen Proteine die Bindungstasche trotz ihrer hohen Konservierung, flexibler ist und somit alternativen

Liganden leichter zugänglich. Alle fünf der in dieser Arbeit analysierten zu ABA-analogen Substanzen zeigten durchgehend eine zu ABA ähnliche Wirkung. Im Falle von PBI 694 war diese um den Faktor zwei und im Falle von PBI 352 um Faktor 20 schwächer im Vergleich zum natürlichen Liganden. Die anderen drei Analoga, waren in ihrer inhibitorischen Wirkung beinahe identisch zu ABA.

Einer der getesteten Liganden war PBI 413; bei diesem wurde durch die Einführung eines aromatischen Ringes die Vinylmethylgruppe ersetzt wodurch es nicht mehr möglich ist, das C7'-Atom zu oxidieren und demnach ein entsprechender katabolischer Mechanismus, wie er für ABA besteht (vgl. 1.1.2) verhindert werden würde (Abbildung 3-2A). Für ABI2 in Kombination mit allen 14 RCARs konnte gezeigt werden, dass die Größenzunahme des Liganden keinen Einfluss auf seine Wirkung im Vergleich zu natürlichen ABA hatte (vgl. 2.4.2). Dies konnte ebenfalls für ABI1, HAB1 und PP2CA in Verbindung mit RCAR1 bestätigt werden. Der gemessene IC₅₀-Wert für PBI 413 von 56 nM bestätigte die von Kepka et al. 2011 gemessene inhibitorische Wirkung (Abbildung 3-2C und D). Ebenfalls zeigten die *in vivo* Studien von Herrn Kepka, bezüglich Keimung, Wurzelwachstum und Stomataregulierung keinen Unterschied zwischen der Wirkungsweise von ABA und PBI 413 (Abbildung 3-3A) (Benson et al. 2014). Bei Nyangulu et al. 2006 zeigte sich PBI 413 sogar als wirkungsvoller gegenüber der Samenkeimung als ABA, was wahrscheinlich auf eine langsamere Metabolisierung des Liganden zurückzuführen war. Durch die Analyse des Liganden mittels der zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen konnte festgestellt werden, dass dieser zu groß für die Abmessungen der Bindungstasche ist. Dies zeigt die Flexibilität der Bindungstasche. In Abbildung 3-2B wurde am Beispiel von RCAR14 dargestellt, dass eine Relokalisation der Aminosäure L91 um ca. 0,4 Å notwendig ist um den nötigen Raum für eine Aufnahme des modifizierten Moleküls zu schaffen. Die Tatsache, dass keine der RCARs den Liganden diskriminiert hatte zeigte, dass diese Flexibilität der Bindungstasche in allen 14 regulatorischen Proteinen vorhanden ist.

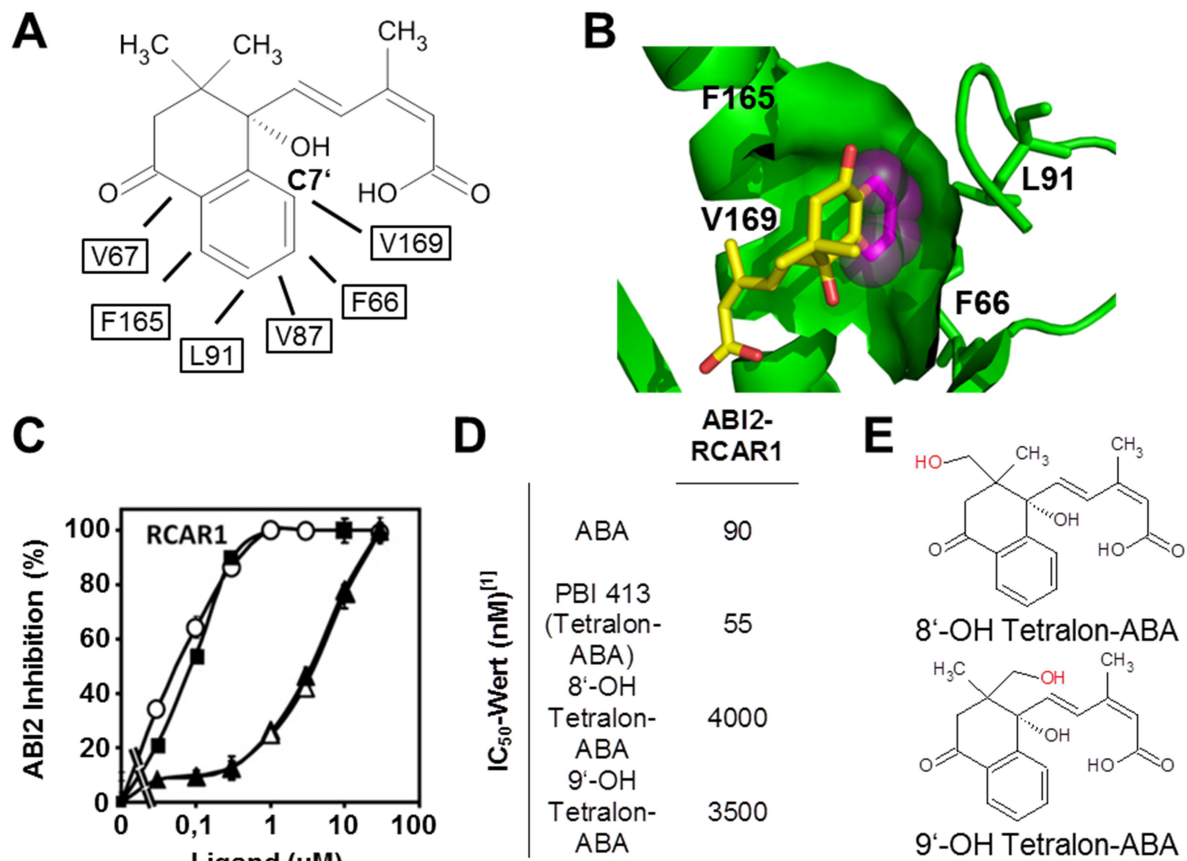


Abbildung 3-2: Mögliche Koordination des Liganden PBI 413 in der Bindungstasche; *in vitro* Studien zu PBI 413 und seinen Derivaten

(A) Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen zwischen den Aminosäuren der Ligandentasche des RCAR14-Proteins mit PBI 413 erstellt nach Melcher et al. 2009. (B) Struktur der ABA-analogen Substanz PBI 413. Der Ligand ist als gelbes Strichmodell gezeichnet, wobei die im Vergleich zu ABA jeweils modifizierten Seitengruppen in magenta hervorgehoben und ihre Größe mit transparenten Kugeln verdeutlicht ist. Die Grenzen der Bindungstasche sind in Oberflächendarstellung gezeigt und wichtige Aminosäuren der RCARs markiert und als Strichmodell hervorgehoben. Alle Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDB: 3KB3. (C) Regulation der Proteinphosphataseaktivität von ABI2 (50 nM) in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration von ABA (schwarze Quadrate), PBI 413 (weiße Kreise), 8'-OH-Tetralon (weiße Dreiecke) und 9'-OH-Tetralon (schwarze Dreiecke) mittels RCAR1 (100 nM) (Kepka et al. 2011). (D) IC_{50} -Werte der in (C) gemessenen Liganden (Kepka et al. 2011). (E) Strukturen von 8'-OH-Tetralon und 9'-OH-Tetralon, die modifizierten Gruppen im Vergleich zu PBI 412 wurden rot markiert.

^[1]Kepka et al. 2011

Die Liganden PBI 425 und 514 besitzen eine Substitution an einer Methylgruppe der ABA durch eine Ethinyl- am C8' bzw. eine Propinylgruppe am C9'-Atom. Es konnte bereits festgestellt werden, dass die Modifikation von PBI 425 es dem Molekül gestattet die Funktion der ABA-8'-Hydroxylase zu inhibieren, was eine entsprechende Metabolisierung unmöglich macht (Cutler et al. 2000). *In vitro* konnte bei keinem der gemessenen RCARs und auch bei keiner Kombination von RCAR1 mit den verschiedenen Proteinphosphatasen ein Unterschied zum natürlichen Liganden beobachtet werden (vgl. 2.4.2). Demzufolge waren alle RCAR-Proteine in der Lage die Substanzen mit der gleichen Effizienz zu binden, wie den natürlichen Liganden, demzufolge konnte sich die Bindungstasche der regulatorischen Proteine problemlos an beide Modifikationen anpassen. Bei diesen Substanzen ist laut Kristallstruktur eine Neuausrichtung einer Aminosäure (PBI 425: V87 PBI 514: F112) um etwa 0,3 Å notwendig um eine Aufnahme des modifizierten Moleküls zu ermöglichen (Abbildung 3-3B und C).

Die *in vivo* generierten Daten spiegelten die Erkenntnisse der *in vitro* Studien wieder, obwohl beide Substanzen einen, im direkten Vergleich zu ABA, schwächeren Einfluss auf das Wurzelwachstum besaßen (Abbildung 3-3A) (Benson et al. 2014), war ihr Einfluss auf die Keimung von Arabidopsissamen mindestens mit der von ABA gleichzusetzen (Abbildung 3-3A). Dies war konsistent mit den Beobachtungen von Cutler et al. 2000, der bei beiden Liganden eine stärkere inhibitorische Wirkung auf die Keimung nachgewiesen hatte als sie von ABA ausging. Angesichts dessen, dass die Gleichwertigkeit der beiden Substanzen mit ABA in *in vitro* Analysen festgestellt werden konnte, kann dieser Unterschied nur auf die inhibitorische Wirkung der Substanzen gegenüber der ABA-Hydroxylase zurückzuführen sein. Beide Substanzen würden demzufolge langsamer metabolisiert werden als ABA und vermittelten dementsprechend eine länger anhaltende Aktivierung der Signaltransduktion bei gleicher Konzentration des Hormons.

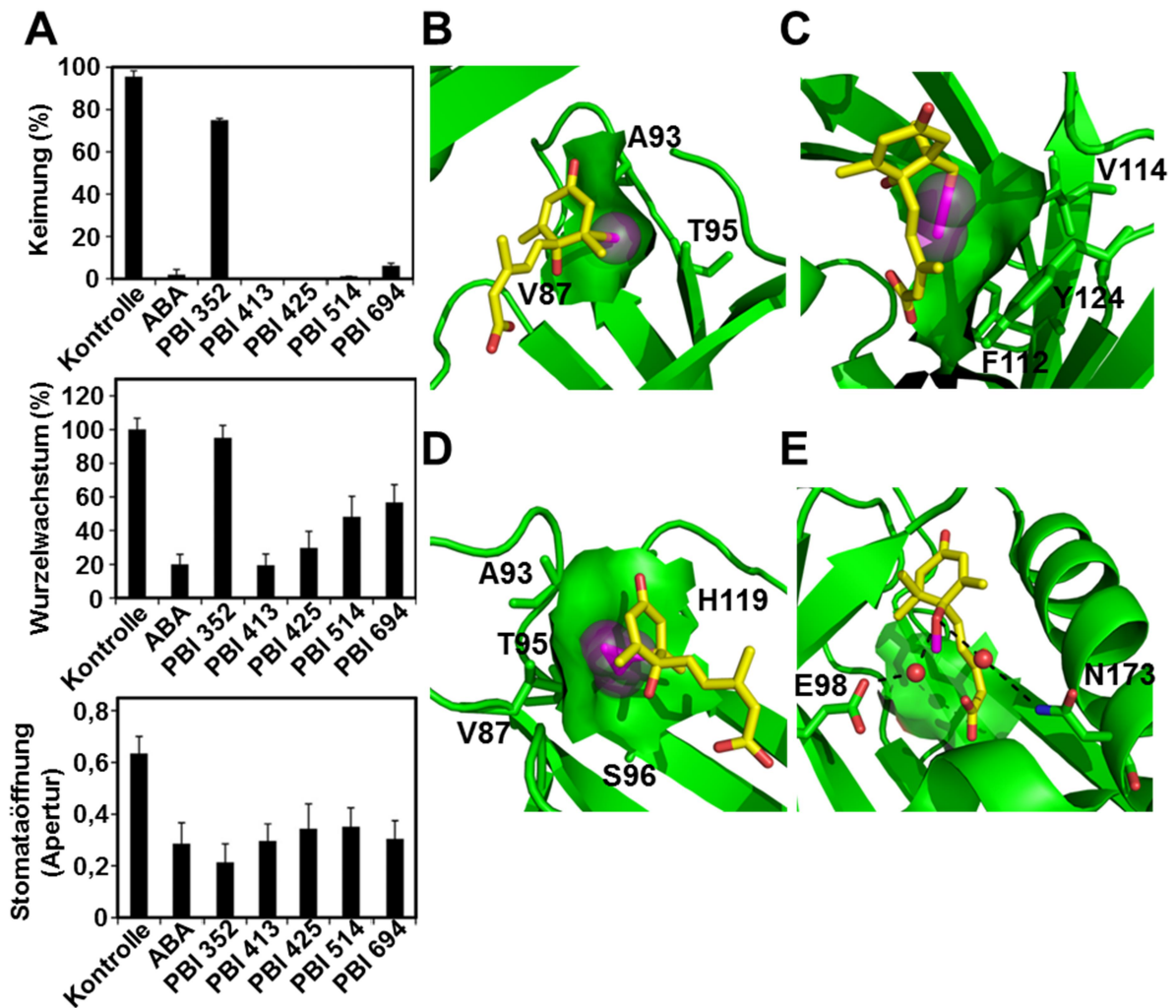


Abbildung 3-3: *In vivo* Studien und mögliche Koordination der Strukturen der ABA-analogen Substanzen innerhalb der Bindungstasche

(A) Übersicht über die physiologischen Reaktionen von *A. thaliana* auf die zu ABA analogen Substanzen (Benson et al. 2014). Dargestellt sind die Strukturen der ABA-Derivate PBI 425 (B), 514 (C), 694 (D) und 352 (E). Der Ligand ist jeweils als gelbes Strichmodell gezeichnet, wobei die im Vergleich zu ABA jeweils modifizierten Seitengruppen in magenta hervorgehoben und ihre Größe mit transparenten Kugeln bzw. wichtige Interaktionen mit schwarzen Linien verdeutlicht sind. Die Grenzen der Bindungstasche sind in Oberflächendarstellung gezeigt und wichtige Aminosäuren der RCARs markiert und als Strichmodell hervorgehoben. Alle Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDB: 3KB3.

Im Unterschied zu den übrigen Modifikationen wurde bei PBI 694 eine Cyclopropylgruppe am C8'-Atom eingeführt, die deutlich größer ist, als die bei PBI 425 eingearbeitete Ethinylgruppe. Dies spiegelte sich in der um Faktor zwei schwächeren inhibitorischen Fähigkeit des Liganden in Kombination mit ABI2-

RCAR1 wider. Allerdings bestätigten auch die *in vitro* Analysen der übrigen RCARs und PP2C Kombinationen diese Differenz (vgl. 2.4.2). Die deutliche Vergrößerung des Moleküls markierte demnach die Grenzen der Flexibilität der Bindungstasche. *In vivo* konnte ebenfalls eine bei dieser Substanz durchgehend schwächere Wirkung im Vergleich zu den bisherigen Substanzen nachgewiesen werden (Abbildung 3-3A) (Benson et al. 2014). Dennoch war es ein Beweis für die hohe Flexibilität der Bindetasche, dass der Ligand von allen RCARs gebunden werden konnte, obwohl bestehende Kristallstrukturen implizieren, dass eine Neuausrichtung von fünf Aminosäuren (V87, A93, T95, S96, H119) um $\approx 0,4 \text{ \AA}$ notwendig ist um diesen in der Bindungstasche aufzunehmen (Abbildung 3-3D).

Die bisherigen Modifikationen der ABA hatten sich nicht auf die chemischen Eigenschaften des Moleküls ausgewirkt. Bei PBI 352 hingegen wurde die Hydroxylgruppe des Ringes von ABA durch einen Ether ersetzt. Die *in vitro* Analyse zeigte, dass der IC_{50} -Wert dieses Liganden um den Faktor 20 schwächer war (vgl. 2.4.2). Eine Analyse aller RCARs erbrachte, dass RCAR8 und 9 diesen Liganden im Vergleich zu den übrigen regulatorischen Proteinen bevorzugten. Hierbei musste berücksichtigt werden, dass vor allem RCAR8 besonders sensitiv für ABA im Allgemeinen und auch für alternative Liganden im Speziellen war (vgl. 2.2.2) (Okamoto et al. 2013; Zhang et al. 2013). Eine präzisere Analyse von RCAR8 im direkten Vergleich mit RCAR1 und den PP2Cs ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA zeigte, dass in Kombination mit RCAR1 die inhibitorische Wirkung mindestens um den Faktor zwei und maximal um den Faktor drei schlechter war (vgl. 2.4.2). Es war naheliegend anzunehmen, dass RCAR8 über eine höhere Flexibilität der Bindungstasche verfügte als andere regulatorische Proteine. Die Kombination des Liganden PBI 352 mit PP2CA-RCAR8 war um den Faktor zehn schlechter, als in Kombination mit den vergleichenden Proteinphosphatasen. Diese allgemein schwächere Regulation im Vergleich zu natürlicher ABA zeigte sich auch *in vivo*, allerdings mit Ausnahme der Stomata-Regulierung (Abbildung 3-3A) (Benson et al. 2014). Es ist möglich, dass die schwache Beeinflussung der Stomataregulation auf eben jene Kombinationen zurückzuführen war die durch den Liganden schwächer beeinflusst wurden als andere. Die Flexibilität der Bindungstasche geriet hierbei allerdings an ihre Grenze. Aus der Kristallstruktur ging hervor, dass die Größenzunahme durch die eine hinzugefügte Methylgruppe vermutlich nicht die

Ursache für die schwächere Wirkung des Liganden war. Begründet lag dieser Unterschied wahrscheinlich in einer Störung der Interaktionen von E98 und N173, welche wasservermittelte H-Brückenbindungen mit der Alkoholgruppe innerhalb der Bindetasche ausbilden (Abbildung 3-3E). Da dennoch eine ABA-ähnliche Wirkung, lediglich bei deutlich höheren Konzentrationen, eintrat, konnte davon ausgegangen werden, dass die Hydroxygruppe am C1'-Atom entweder für die ABA-Bindung nicht absolut notwendig war, oder die eingeführte Ethergruppe bei höheren Ligandenkonzentrationen in der Lage war ein vergleichbares Netzwerk an H-Brückenbindungen zu etablieren. Vergleichbares wurde bei Kepka et al. 2011 gezeigt. Während PBI 413 (ABA-Tetralon) in seiner Effektivität eine zu ABA identische Wirkung besaß, konnte bei den modifizierten Versionen dieses Liganden 8'-OH-ABA-Tetralon und 9'-OH-ABA-Tetralon eine um etwa Faktor 65 reduzierte Wirkung festgestellt werden (Abbildung 3-2C, D und E). Die Liganden PBI 425 und 514, welche beide ebenfalls deutlich größere Modifikationen am 8' bzw. 9' C-Atom tragen, belegen, dass die Bindungstasche in diesen Bereichen flexibel genug ist, einen vergrößerten Liganden aufzunehmen. Die hydrophoben Interaktionen innerhalb der Bindungstasche sind offensichtlich die flexiblen Bereiche, welche auch die Aufnahme größerer Liganden gestatten und die Bindung dieser stabilisieren können, was vor allem durch die Aufnahme des PBI 694 Liganden bestätigt wurde, der trotz seiner erheblichen Größenzunahme durch die Cyclopropylgruppe am C8'-Atom einen nur um Faktor zwei schlechteren inhibitorischen Effekt als ABA zeigte. Dagegen ist das komplexe Netzwerk von Interaktionen, das von den polaren Aminosäureresten innerhalb der Bindungstasche ausgeht, der entscheidende Faktor. Eine Störung dieses Netzwerkes durch das Kaschieren (PBI 352) oder durch das Hinzufügen einer polaren Gruppe (8'- bzw. 9'-OH-ABA-Tetralon) hat direkte Auswirkungen auf die Affinität des regulatorischen Proteins zum Liganden (K_D RCAR8-ABA = 1,1 μ M; K_D RCAR8-PBI 352 = 34 μ M) (Benson et al. 2014). Es belegt die Flexibilität der Bindetasche, dass diese sich dennoch an den geänderten Liganden anpassen konnte, auch wenn hierbei die Affinität um Faktor 30 reduziert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von jedem der synthetischen Analogen ebenfalls das entsprechende R-Stereoisomer *in vitro* analysiert. Wie nach den Ergebnissen für die R-Form der natürlichen ABA erwartet, induzierten die Stereoisomere der Substanzen eine um Faktor 5-10 schlechtere Regulation im Vergleich mit ihrem jeweiligen S-Pendant (vgl. 2.4.2). Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in den physiologischen

Untersuchungen zu Wurzelwachstum, Keimung und Stomataregulierung wieder (Benson et al. 2014). Die Grenzen der Flexibilität der regulatorischen Proteine bezüglich ihres Liganden waren, wie schon bei ABA deutlich wurde, bei der Stereoselektivität der Bindetasche erreicht.

3.1.3. LA als alternativer Ligand zu ABA

LA wurde als erstes aus *Lunularia cruciata* isoliert und als eine das Wachstum inhibierende und die Dormanz induzierende Substanz beschrieben, die ebenfalls in einer Reihe von Leberblümchen (*Hepatica*) und Algen gefunden wurde (Pryce 1971; Valio et al. 1969). Die verwandte Struktur und ähnliche biologische Aktivität von LA gegenüber ABA brachte die Vermutung auf, dass dieses Hormon in höheren Pflanzen an den gleichen Rezeptor wie ABA binden könnte (Yoshikawa et al. 2002). Es wurden mittlerweile in *Marchantia polymorpha* sowohl eine Proteinphosphatase als auch regulatorische Proteine identifiziert (Bhalerao R.P. unveröffentlicht) (Tougane et al. 2010). In dieser Arbeit wurden zwei der RCARs und die PP2C, welche aus dem Lebermoos stammen, *in vitro* analysiert. Da *M. polymorpha* sowohl über ABA, als auch über LA verfügt, wurde durch die Interspeziesanalyse mit ABI2 und RCAR8 aus *A. thaliana* die Austauschbarkeit und gegenseitige Regulierbarkeit der entsprechenden Proteine getestet. Es konnte festgestellt werden, dass die Proteinphosphatasen beider Spezies ABA-abhängig von allen getesteten regulatorischen Proteinen inhibiert wurden, allerdings zeigte nur MpRCAR2 eine LA-induzierte Regulation.

Aus Arabidopsis wurden die Proteinphosphatasen ABI2 und RCAR8, welches sich in den vorherigen Untersuchungen als das regulatorische Protein mit der höchsten Sensitivität gegenüber alternativer Liganden präsentiert hatte, verwendet. Hierbei zeigte sich, dass ABI2 in Gegenwart von ABA von beiden regulatorischen Proteinen aus *M. polymorpha* effektiv inhibiert werden konnte. Die gemessenen IC₅₀-Werte lagen hierbei im selben Bereich (16-32 nM) wie die der meisten RCARs aus Arabidopsis (vgl. 2.2.2 und 2.4.3). Eine identische Beobachtung konnte im Falle der aus *M. polymorpha* stammenden Proteinphosphatase gemacht werden. Alle regulatorischen Proteine waren in der Lage die Aktivität des Enzyms bei ähnlichen Konzentrationen an ABA um 50% der enzymatischen Aktivität

(IC₅₀-Werte: 30-60 nM) zu inhibieren. Im Unterschied hierzu konnte in Gegenwart von LA weder bei RCAR8 noch bei MpRCAR1 in Kombination mit beiden Proteinphosphatasen eine Regulation beobachtet werden (vgl. 2.4.3). MpRCAR2 konnte als einziges der getesteten Proteine neben der ABA- ebenfalls eine LA-abhängige Regulation induzieren. Diese wies mit einem IC₅₀-Wert von ca. 1 µM mit beiden getesteten Proteinphosphatasen eine, im Verhältnis zu ABA, um zwei Größenordnungen höhere Konzentration des Liganden auf. Dennoch handelt es sich hierbei um einen physiologisch relevanten Konzentrationsbereich, da LA *in vivo* in Konzentrationen von ca. 1,1 µM vorliegt (Abe and Ohta 1984).

Um zu ermitteln warum MpRCAR2 als einziges der regulatorischen Proteine diese Wirkungsweise aufwies stellte sich zuallererst die Frage wie beide Liganden auf dieselbe Art wirken könnten. Die Strukturen der beiden Liganden (Abbildung 3-4A) zeigen, dass diese in Größe und Struktur sehr ähnlich zueinander sind. Aus den Studien der ABA-analogen Substanzen war bekannt, dass die hydrophoben Interaktionen innerhalb der Bindungstasche eine ausreichende Flexibilität besitzen um auch, im Verhältnis zu ABA, größere Liganden aufzunehmen und stabilisieren zu können. Der entscheidendere Faktor sind die polaren Interaktionen des Liganden mit den entsprechenden Aminosäureresten. Die Aufrechterhaltung dieses Netzwerkes dürfte der zentrale Bestandteil für eine mögliche Bindung von LA sein. Aus den in Abbildung 3-4A gezeigten Strukturen geht hervor, dass LA zum Einen die polare Gruppe am C1'-Atom von ABA fehlt, welche bereits bei ihrer Modifikation zu einem Methylether in PBI 352 gezeigt hatte, dass sie von Bedeutung für das polare Interaktionsnetzwerk des Liganden ist und zum anderen besitzt LA eine zusätzliche Hydroxygruppe am C15-Atom. In Yoshikawa et al. 2002 wurde untersucht ob LA eine zu ABA-ähnliche Konformation einnehmen kann. Die Kalkulationen ergaben, dass das Konformer mit der besten Überlappung eine Energiedifferenz von 1,7 kcal/mol im Verhältnis zum stabilsten Konformer von LA aufweist, dieses Konformer wurde *in silico* zentral in der Bindungstasche von RCAR14 positioniert (Abbildung 3-4B). Unter der Prämisse, dass LA und ABA die gleichen biologischen Funktionen mit identischen Proteinen ausüben können, weist die Energiedifferenz in den Konformeren bereits daraufhin, dass der energetisch ungünstigere Zustand von LA durch das Protein stabilisiert werden müsste.

Diese Strukturhypothese zeigte, dass jede der polaren Gruppen des Liganden innerhalb des Proteins in entsprechender Nähe zu polaren Aminosäureresten zu liegen hätte um direkt oder indirekt über Wasserstoffbrücken durch diese stabilisiert werden zu können (Abbildung 3-4C). Die Alkoholgruppe würde dabei über Glu und Asn stabilisiert werden, während, ähnlich zu ABA, die Carboxygruppe durch ein komplexes Interaktionsnetzwerk der Aminosäuren Lys, Glu und Asn koordiniert würde (Miyazono et al. 2009; Santiago et al. 2009a). Die Alkoholgruppe am Ring im Eingangsbereich wäre deckungsgleich mit der Ketogruppe von ABA und würde entsprechend über den *gate* und *latch loop* stabilisiert werden (Abbildung 1-7B) (Nakagawa et al. 2014; Yin et al. 2009).

Sequenzvergleiche der in Arabidopsis und Lebermoos identifizierten RCARs zeigen, dass die Aminosäuren, welche die Bindungstasche bilden, in MpRCAR2 größtenteils mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Eine Abweichung von dieser bildet ein Asparagin, das durch ein Histidin ersetzt wurde (Abbildung 3-4D). Diese Aminosäure kommt exklusiv nur in MpRCAR2 vor. Laut dem in Abbildung 3-4C vorgeschlagenen polaren Interaktionsnetzwerk würde sowohl die Alkohol- als auch die Carboxygruppe der LA über Asn koordiniert werden. Diese Aminosäure stellt damit vielleicht den zentralen Kern der polaren Wechselwirkungen für LA dar. Die Substitution in MpRCAR2 von diesem Asparagin zu einem Histidin und die daraus resultierende Implementation eines neuen Interaktionsnetzwerkes (Abbildung 3-4E) könnte den Schlüssel zur LA-abhängigen Regulation der RCAR-Proteine darstellen. Einen zusätzlichen Hinweis auf diese Option bot die Beobachtung, dass die methylierte Variante der LA, welche an der Carboxygruppe modifiziert wurde (vgl. 2.4.3), nicht mehr in der Lage war die Regulation von MpRCAR2 zu induzieren. Die Modifikation an dieser funktionellen Gruppe würde das vorgeschlagene, für die Bindung von LA möglicherweise entscheidende, Interaktionsnetzwerk stören.

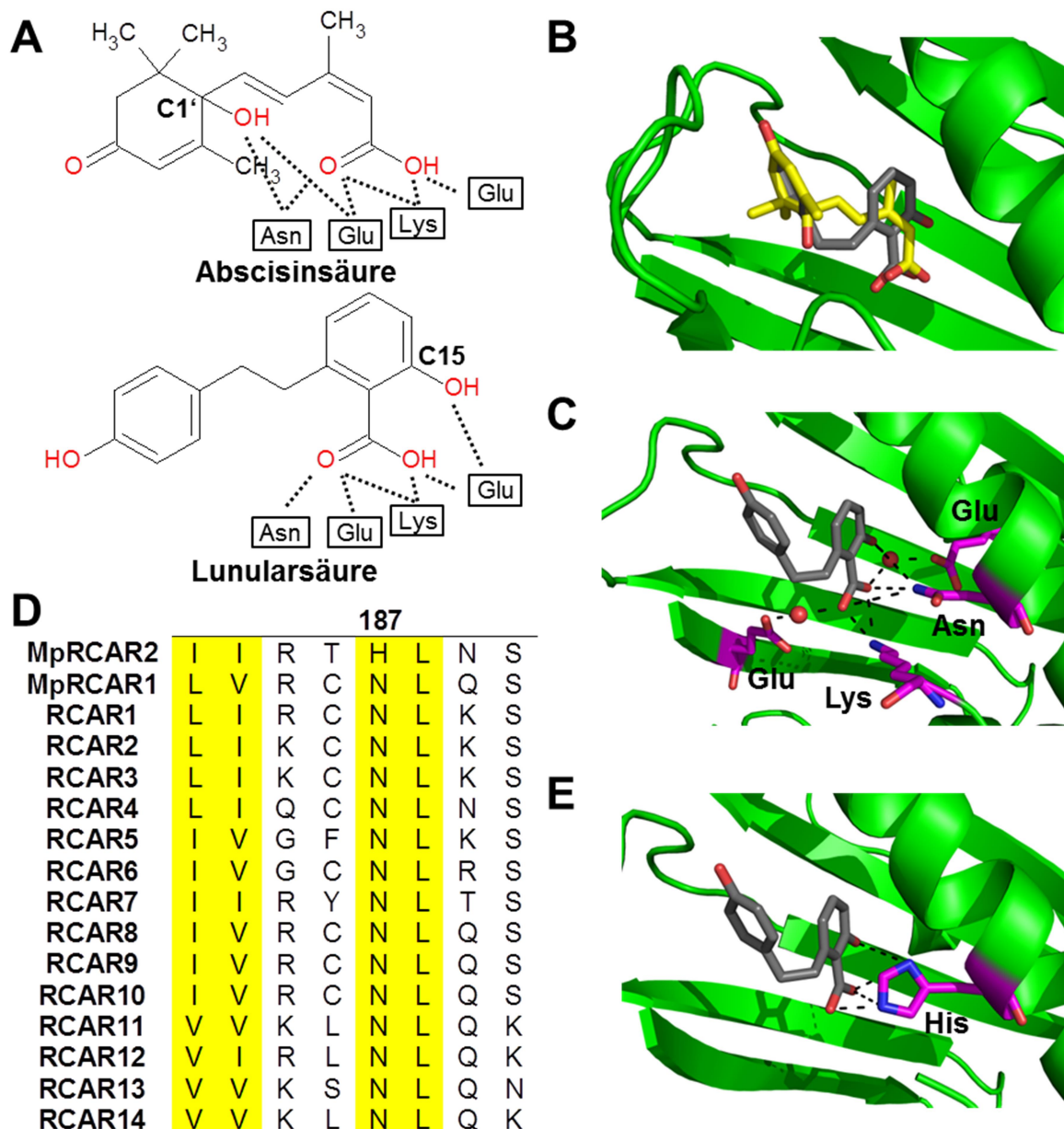


Abbildung 3-4: Strukturvergleich zwischen ABA und LA; mögliche LA-Koordination innerhalb der Bindetasche von AtRCAR14 und MpRCAR2

(A) Strukturvergleich zwischen ABA und LA. Die polaren Gruppen der Moleküle sind rot hervorgehoben. Polare Interaktionen mit den Aminosäureresten der RCARs sind als schwarze Linien dargestellt. (B) Überlappende Darstellung von ABA (gelb) und LA (grau) in der Bindetasche von RCAR14. (C) Mögliches Interaktionsnetzwerk der polaren Aminosäuren von RCAR mit der Alkohol- und der Carboxygruppe von LA (schwarze Linien). (D) Ausschnitt des Sequenzvergleiches der zwei RCARs aus *M. polymorpha* und der 14 RCARs aus *A. thaliana*. (E) Mögliche Koordination von LA in der Bindetasche durch das Histidin von MpRCAR2. Wichtige Aminosäuren der RCARs sind als Strichmodell in Magenta hervorgehoben. Alle Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDB: 3KB3, die des Liganden basierend auf den Strukturvergleich zwischen ABA und LA (Yoshikawa et al. 2002).

Die erfolgreiche Induktion einer LA-vermittelten Regulation durch MpRCAR2 hat bewiesen, dass LA über ABA-ähnliche Eigenschaften verfügte. Neben LA wurde *in silico* eine Reihe von in Pflanzen vorkommenden Molekülen gefunden, welche chemische und/oder strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Liganden besitzen (vgl. 2.4.3.2). Auf Basis der strukturellen Verwandtschaft zu LA, sollten diese Moleküle einen Einblick in das Interaktionsnetzwerk vermitteln, welches es speziell MpRCAR2 gestattete in Kombination mit LA eine ABA-ähnliche Wirkung zu vermitteln. Des Weiteren wurden die Substanzen mit MpRCAR1 und RCAR8 getestet um zu ermitteln, ob einige über ein breiteres Wirkungsspektrum verfügen und die Spezialisierung auf MpRCAR2 verloren geht. Von den getesteten fünf Substanzen zeigten drei Liganden keinen Effekt mit den verwendeten PP2C-RCAR Kombinationen. Nur die Substanzen LAL12 (Hydrangenol) und LAL15 (Batatsin III) waren in der Lage eine Inhibierung der Proteinphosphataseaktivität zu vermitteln; allerdings ausschließlich in Kombination mit MpRCAR2. Die Effizienz der Induktion der Regulierung lag hierbei im gleichen Konzentrationsbereich wie bei LA ($IC_{50} \approx 1 \mu M$).

In Bezug auf LAL12 war dieses Resultat zu erwarten, da die funktionellen Gruppen identisch mit denen von LA sind (Abbildung 3-5). Die beiden Moleküle unterscheiden sich nur dadurch, dass die Carboxylgruppe bei LAL12 in einem Carbonsäureester fixiert ist und das Molekül dementsprechend über eine geringere Flexibilität in seiner Struktur im Vergleich zu LA verfügt. Die identische Regulation der Proteinphosphatasen über MpRCAR2 bei beiden Molekülen spricht für eine übereinstimmende Koordination der beiden Substanzen. Folglich stützte diese Beobachtung die in Abbildung 3-4 vorgeschlagene Bindungshypothese für LA, da in der dargestellten Konformation kein Unterschied zwischen der Positionierung der polaren Gruppen von LA und LAL12 bestehen würde.

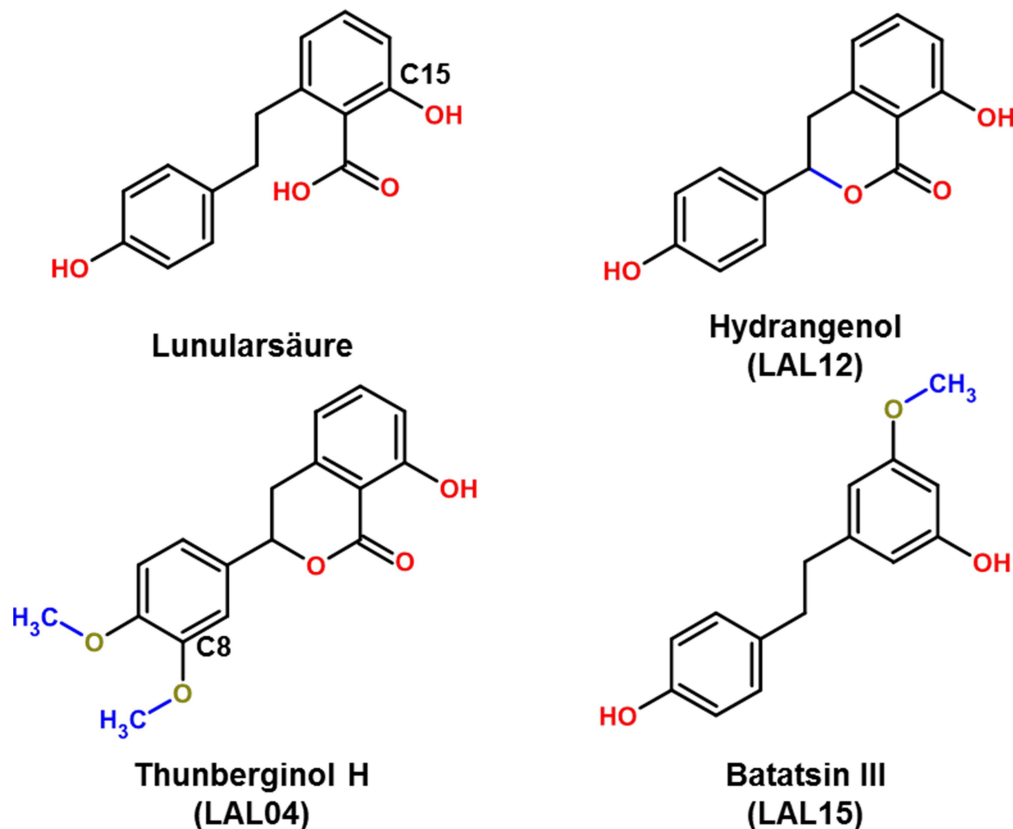


Abbildung 3-5: Strukturen von LA und verwandten natürlichen Substanzen

Polare Gruppen sind in rot, im Vergleich zu LA neu eingefügte Verbindungen bzw. methylierte Seitengruppen sind blau dargestellt. Methylierte Sauerstoffatome wurden grün markiert.

Die Struktur von LAL12 besitzt, was die funktionellen Gruppen betrifft, eine große Ähnlichkeit mit dem inaktiven LAL04 (Thunberginol H) (Abbildung 3-5). Allerdings wurde hier diejenige polare Gruppe, welche mit der Ketogruppe von ABA identisch ist methyliert. Wie am Beispiel der inaktiven methylierten LA und des synthetischen Liganden PBI 352 zu erkennen war, kann die Methylierung einer kritischen polaren Gruppe des Liganden, dessen Affinität zum RCAR-Protein verhindern bzw. verringern, was eine mögliche Erklärung für dessen Inaktivität darstellte. Ein weiterer Punkt der berücksichtigt werden muss wäre, dass gemäß der vorgeschlagenen Bindungshypothese die methylierte Alkoholgruppe im Eingangsbereich der Bindetasche läge und die Methylgruppe in dieser Region dazu führen würde, dass die Interaktionen des *gate/latch*-Mechanismusses gestört würden und eventuell ebenfalls die inhibitorisch wichtige Interaktion mit dem Tryptophan der Proteinphosphatase verhindert wird. (vgl. 1.3.2). Der zweite Methylether, welcher am C8-Atom angefügt wurde, könnte ebenfalls die Bindung des Liganden beeinflussen.

Jedoch hat bereits die Analyse der synthetischen Analoga ergeben, dass die Bindungstasche in diesem Bereich flexibel für vergrößerte Liganden ist (Benson et al. 2014) und dass eine Ethanthiolgruppe an dieser Stelle in ABA, ebenfalls die Effektivität des Liganden nicht behindert (Takeuchi et al. 2014). Sollte dieses Molekül in der Lage sein an das regulatorische Protein zu binden ohne das inhibitorische Signal an die Proteinphosphatase zu vermitteln, wäre es ein Ansatzpunkt für einen ABA-Antagonisten, wobei allerdings noch das Wirkungsspektrum auf andere RCARs getestet/ausgedehnt werden müsste.

Überraschend war die regulatorische Funktion des Liganden LAL15 (Batatsin III). Im Hinblick auf die bisherigen Ergebnisse wäre zu erwarten gewesen, dass dieses Molekül nicht in der Lage sein sollte eine Regulation zu induzieren da ihm die Carbonsäuregruppe fehlt, welche sowohl in LA, als auch in LAL12 vorhanden ist. Jedoch zeigte dieser Ligand, ebenfalls nur in Kombination mit MpRCAR2, eine regulatorische Wirkung. Dies implizierte, dass diese Regulation ebenfalls auf die Besonderheit dieses regulatorischen Proteins gegenüber den anderen RCARs zurückzuführen ist. Es ist daher möglich, dass in Kombination mit MpRCAR2 die Hydroxylgruppe am C15-Atom den für LA zentralen Bestandteil des polaren Interaktionsnetzwerkes zwischen Ligand und Protein darstellt.

Insgesamt blieb festzuhalten, dass sowohl durch die zu ABA analogen synthetischen, als auch durch die natürlichen zum Hormon ähnlichen Substanzen Einblicke in die Flexibilität und Spezifität der RCAR-Bindetasche gewonnen werden konnten. Das System der genetischen Redundanz der ABA-Rezeptoren und der mit ihnen assoziierten Signalkomponenten erschwert es die Bedeutung einzelner Kombinationen innerhalb des komplexen Signaltransduktionsnetzwerkes zu verstehen. Die verschiedenen Affinitäten von ABA zu einzelnen RCARs, obwohl die Bindungstasche über alle RCARs hinweg konserviert ist, belegt jedoch, dass diese Unterschiede existieren müssen (Dupeux et al. 2011b; Ma et al. 2009). Um dieses Netzwerk aufzuklären ist ein möglicher Ansatz mittels Liganden eine Differenzierung zwischen den Kombinationen zu erreichen. Die daraus folgende Chance spezielle Substanzen zu besitzen um spezifische Komplexe zu aktivieren und damit bestimmte Prozesse innerhalb der Pflanze zu begünstigen, stellt ein großes Potential dar, welches eine Vielzahl neuer Möglichkeiten offeriert.

3.2. RCAR7; ein Spezialfall im RCAR-PP2C-Netzwerk

Im Verlauf dieser Arbeit konnte für alle 14 RCAR-Proteine nachgewiesen werden, dass sie in der Lage sind beinahe ausnahmslos die untersuchten Proteinphosphatasen des Typs 2C zu regulieren (vgl. 2.2.2). Nur wenige Kombinationen wurden diskriminiert und zeigten keine bzw. eine schlechte Inhibition der Proteinphosphataseaktivität in Abhängigkeit von ABA. Als besonders interessant kristallisierte sich hierbei RCAR7 heraus, da in der Literatur postuliert wurde, dass es sich bei diesem Protein um keinen wirksamen ABA-abhängigen Regulator handele (Fujii et al. 2009; Li et al. 2013; Zhao et al. 2013). Allerdings konnte in 2.3 *in vitro* eine ABA-abhängige Regulation bei nanomolaren Ligandenkonzentrationen für die RCAR7-Komplexe mit PP2CA, ABI1 und ABI2 nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnte die enzymatische Aktivität von HAB1 auch bei mikromolekularen Konzentrationen von ABA nicht durch RCAR7 inhibiert werden. Die Ausnahme der regulatorischen Fähigkeit gegenüber HAB1 konnte an zwei Aminosäuren festgemacht werden, deren Substitution eine ABA-abhängige Regulation durch RCAR7 wiederum ermöglichte.

Die Einzigartigkeit von RCAR7 wurde an drei von der konservierten Sequenz abweichenden Aminosäureresten festgemacht (Fujii et al. 2009; Li et al. 2013; Zhao et al. 2013): Glutamin 38, Leucin 67 und Phenylalanin 71. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass durch die am Eingang der Bindungstasche liegenden Aminosäuren L67 und F71 und die mit der Carbonsäuregruppe von ABA interagierende Aminosäure Q38 entscheidende Wechselwirkungen in RCAR7 verloren gingen, was in einer Verhinderung der Bindung der ABA resultierte (Abbildung 3-6). Diese nur in RCAR7 auftretende Besonderheit sollte dazu dienen dem Protein eine selektive, ABA-unabhängige Regulation der Proteinphosphatase PP2CA zu ermöglichen (Li et al. 2013; Zhao et al. 2013). Die in 2.3 durchgeführten Analysen zeigten allerdings, dass RCAR7 in der Lage ist PP2CA, ABI1 und ABI2 ABA-abhängig zu regulieren. Die regulatorische Aktivität bei vergleichbaren ABA-Konzentrationen wie bei anderen RCARs (vgl. 2.2.2) belegte, dass RCAR7 in dieser Hinsicht keine Sonderstellung unter RCARs einnimmt. Eine Übereinstimmung mit Li et al. 2013 und Zhao et al. 2013 besteht darin, dass RCAR7 von allen getesteten PP2Cs sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* PP2CA am effektivsten regulieren konnte

(Fuchs et al. 2014). Allerdings stand die ABA-Abhängigkeit dieser Regulation zweifelsfrei fest. Aus der regulatorischen Fähigkeit von RCAR7 konnte gezeigt werden, dass die Ligandenhöhle ein hochflexibles Konstrukt ist, welches sich an veränderte Parameter, wie den Austausch bestimmter Aminosäuren, anpassen kann. Die Kristallstrukturen der RCAR-Proteine geben durch das Fehlen jeglicher Dynamik in der dreidimensionalen Struktur nur eine eingeschränkte Vorstellung von der gesamten Komplexität des Systems der ABA-Bindung; denn theoretisch würde nach den bestehenden Kenntnissen der Struktur der Bindetasche die Koordination des Liganden durch die polaren und hydrophoben Wechselwirkungen verhindert werden (Abbildung 3-6).

Überraschend war die Feststellung, dass eine Wiederherstellung der Konsensussequenz von RCAR7 in der enzymatischen Aktivität mit der Proteinphosphatase ABI2 keinen Unterschied zur wildtypischen Sequenz zeigte (vgl. 2.3) (Fuchs et al. 2014). Zu erwarten wäre eher gewesen, dass sich die Affinität des Liganden entweder verbessert, da die Konsensussequenz eine effektivere Koordination gestattet, als es die RCAR7-spezifischen Aminosäurereste ermöglichen oder dass eine Verschlechterung der ABA-abhängigen Inhibition eintritt, da der Ligand in einer zu den übrigen RCARs neuen Koordination vorliegt und deren Wechselwirkungen durch die Substitutionen gestört werden könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass vor allem das Ausbleiben der Interaktionen mit Lysin zur Koordination der Carbonsäuregruppe (Abbildung 3-6A und B) einen großen Einfluss auf die Ligandenbindung hat und ein Wegfall dieser Koordination zu einer ABA-insensitiven RCAR-Variante führt (Melcher et al. 2009). Die in dieser Arbeit gemessenen identischen IC_{50} -Werte belegten hingegen, dass die Ligandenhöhle des Proteins ausreichend anpassungsfähig ist um die Aufnahme des Liganden zu gestatten, wenn die RCAR-spezifischen Aminosäuren Q38, L67 und F71, durch Aminosäuren ersetzt wurden, die in ihren chemischen und strukturellen Eigenschaften über eine ausreichende Ähnlichkeit verfügten (vgl. 2.3). Das RCAR7 Protein ist demnach in seiner Bindungstasche flexibel genug um sowohl mit den proteinspezifischen Aminosäuren, als auch mit den konsensuspezifischen Aminosäuren gleichwertig den Liganden zu koordinieren. Es ist daher möglich, dass es sich bei RCAR7 tatsächlich um einen Spezialfall innerhalb der RCAR-Proteine handelt, der sich vor allem durch eine in seiner ABA-Koordination veränderte, aber in der Effektivität der ABA-Bindung dennoch gleichwertige Ligandenhöhle auszeichnet.

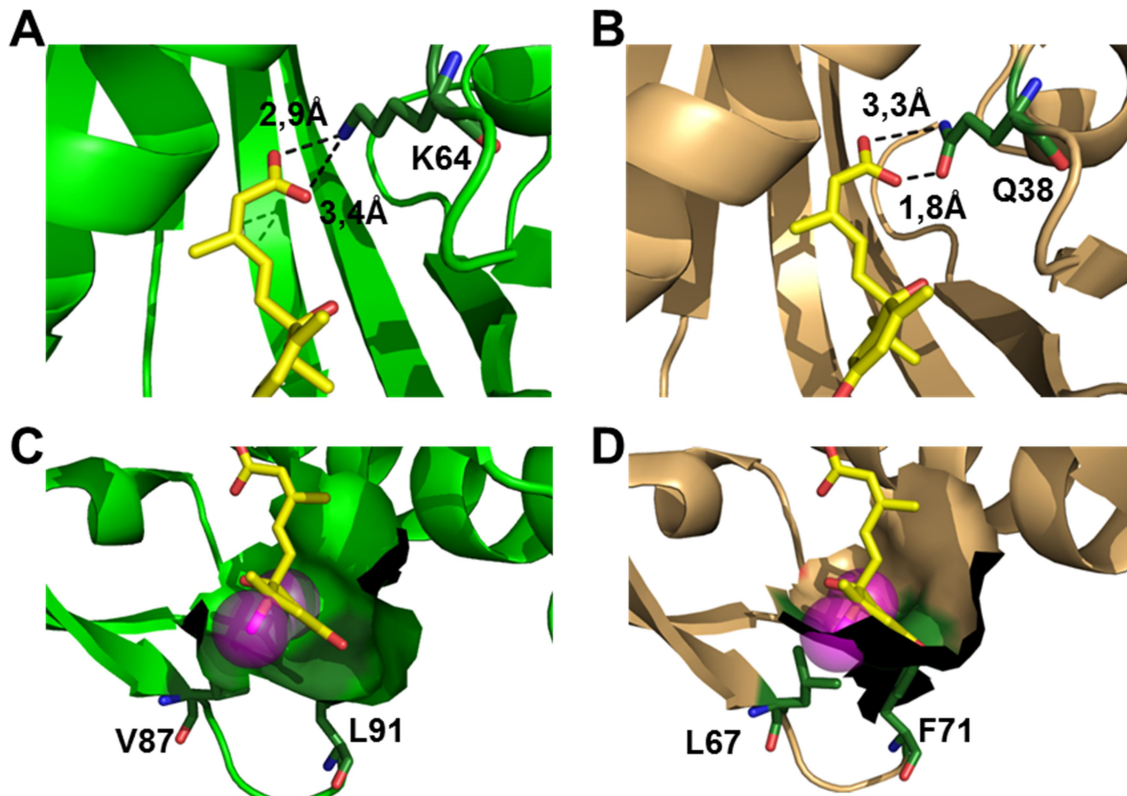


Abbildung 3-6: Vergleich der ABA-Bindungstasche von RCAR14 und 7

Interaktionen der polaren Aminosäuren K64 von RCAR14 (grün) (A) bzw. Q38 von RCAR7 (hellorange) (B) mit der Carboxygruppe von ABA. Die für die Methylgruppe von ABA bereitgestellte hydrophobe Tasche ist als Oberflächendarstellung für RCAR14 (C) und RCAR7 (D) gezeigt. Die Methylgruppe und ein Methylrest der Dimethylgruppe von ABA sind jeweils violett markiert und ihre Größe mittels einer transparenten Kugel verdeutlicht (Li et al. 2013; Melcher et al. 2009). ABA wurde jeweils als gelbes Strichmodell gezeichnet. Alle Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die wichtigen Aminosäuren sind dunkelgrün markiert und als Strichmodell hervorgehoben. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 3KB3 und 3N0G.

Eine weitere Auffälligkeit von RCAR7 war, dass keine Inhibierung der enzymatischen Aktivität von HAB1 auch bei sehr hohen ABA-Konzentrationen (0,1 mM) nachgewiesen werden konnte (vgl. 2.3). Dagegen konnte die zu HAB1 am nächsten verwandte getestete Proteinphosphatase ABI1 mit einem IC_{50} -Wert von 160 nM reguliert werden. Dieser IC_{50} -Wert ist im Vergleich zu dem mit PP2CA und ABI2 um Faktor drei höher, doch zeigte sich keine Diskriminierung wie im Fall von HAB1.

Es stellte sich die Frage, warum HAB1, trotz seiner Homologie mit den getesteten und durch RCAR7 regulierbaren Proteinphosphatasen eine derartige regulatorische Ausnahmestellung besitzt. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen in den

Interaktionsbereichen zwischen RCAR-Proteinen und Proteinphosphatasen so fällt auf, dass diese Bereiche in ihrer Sequenz und in den zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen hochkonserviert vorliegen (Dupeux et al. 2011a; Yin et al. 2009; Melcher et al. 2009; Nishimura et al. 2009). Erst in der Peripherie dieser Interaktionsflächen konnten Varianzen zwischen HAB1 und ABI1 ermittelt werden. Hierbei unterscheiden sich die HAB1 Aminosäuren (S322 und Q386) zu den korrespondierenden ABI1 Aminosäuren (P237 und N301) (Abbildung 3-7A). Die wesentlichen Unterschiede zwischen den Aminosäuren Serin und Prolin sind zum einen, dass es sich bei Serin um eine polare Aminosäure handelt, während Prolin eine unpolare Aminosäure darstellt; zum anderen ist Prolin die einzige Aminosäure die aufgrund ihrer besonderen Struktur einen partiellen Doppelbindungscharakter besitzt und diese Eigenschaft oft eine stabilisierende Wirkung auf Bereiche innerhalb von Proteinen ausübt (Abbildung 3-7B). Im Unterschied dazu ist davon auszugehen, dass die Substitution der Aminosäure von Asparagin zu Glutamin, aufgrund dessen, dass diese beiden Aminosäuren in ihren chemischen Eigenschaften identisch sind und sich nur um ein C-Atom in der Größe unterscheiden, keinen direkten Einfluss auf die Interaktionsfläche besitzen sollte. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Veränderung dieser Aminosäure einen Einfluss auf das benachbarte Tryptophan besitzt, welches, wie in der Einleitung beschrieben, eine entscheidende Interaktion für die Inhibierung der enzymatischen Aktivität der Proteinphosphatasen darstellt (Abbildung 3-7C). Der Verlust des Tryptophans resultiert in einer Proteinphosphatase die nicht mehr durch die RCAR-Proteine reguliert werden kann (Dupeux et al. 2011a; Miyazono et al. 2009).

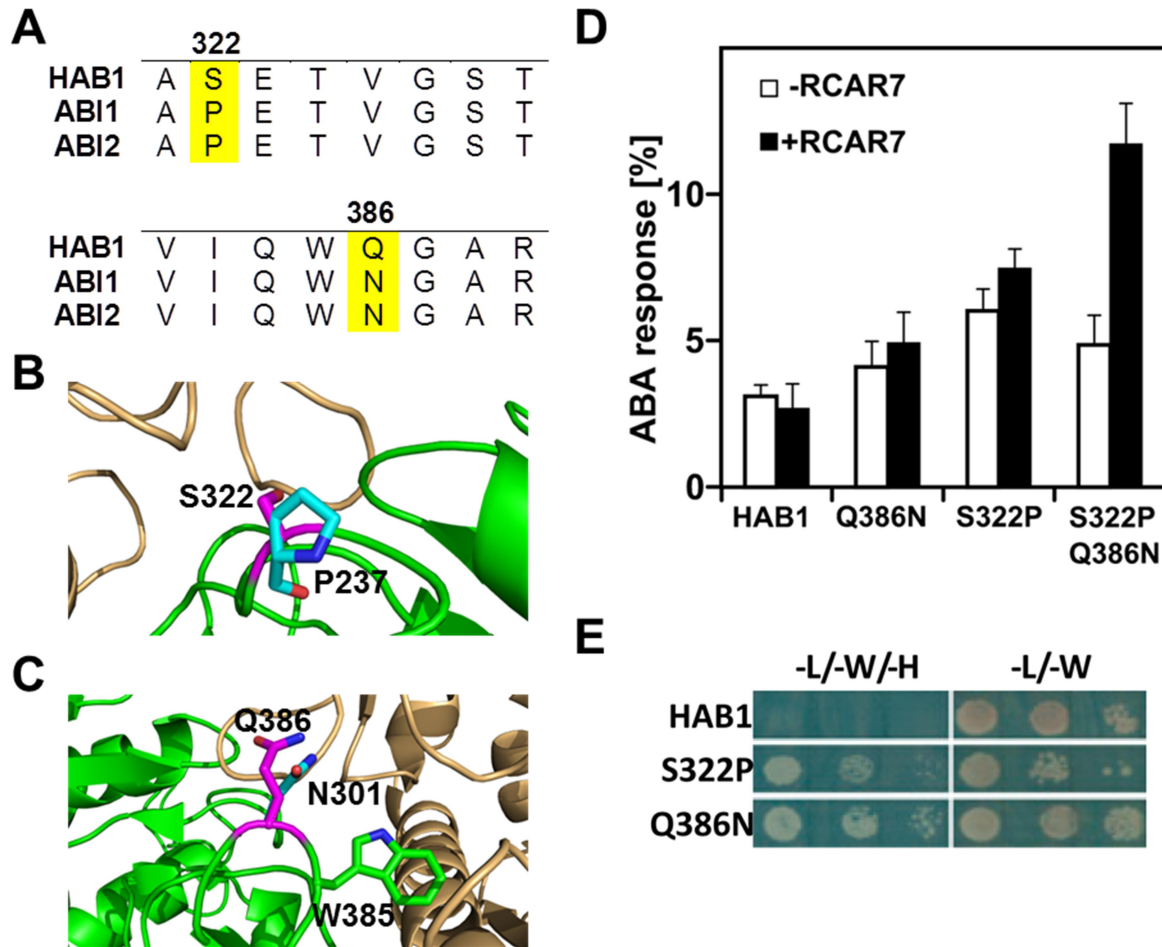


Abbildung 3-7: Unterschiede zwischen HAB1 und ABI1; *in vivo* und Y2H-Studien der HAB1-Varianten

(A) Ausschnitte des Sequenzvergleichs zwischen drei Vertretern HAB1, ABI1 und ABI2 aus *A. thaliana*. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind gelb hervorgehoben. Vergleich der Aminosäuren der Interaktionsfläche von S322 und P237 (B) sowie Q386 und N301 (C). Wichtige Aminosäuren sind als Strichmodell dargestellt, diejenigen aus HAB1 wurden in magenta hervorgehoben, die aus ABI1 in cyan. Tryptophan 385 aus HAB1 ist als grünes Strichmodell gezeigt. Die PP2C ist in grün, das RCAR Protein hellorange dargestellt. Alle Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome rot eingefärbt. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 3KB3 und 3KDJ. (D) Aktivierung der ABA-abhängigen Regulation in Protoplasten durch Zugabe von RCAR7 in Gegenwart von 0,1 mM ABA. (E) Y2H-Analyse der Interaktion von wildtypischen HAB1 und der beiden Substitutionsvarianten in Kombination mit RCAR7. Beide Aminosäuresubstitutionen erzielten ein Wachstum der Hefen auf dem Selektionsmedium. Die Abbildungen D und E stammen aus Fuchs et al. 2014.

Die Doppelsubstitution der beschriebenen Aminosäuren in die Konsensussequenz konnte eine geringfügige Regulation (Reduktion der enzymatischen Aktivität auf 43%) bei sehr hohen ABA-Konzentrationen (0,1 mM) in Kombination mit RCAR7

erzielen. Dieses Ergebnis konnte *in vivo* mittels *Arabidopsis* Protoplasten bestätigt werden (Fuchs et al. 2014) (Abbildung 3-7D). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die beiden Varianten mit nur einer Aminosäuresubstitution in HAB1 in Hefe die Interaktion der beiden Proteine im Vergleich zum Wildtyp wieder etablieren (Abbildung 3-7E). Allerdings führten diese Einzelmутanten weder in den in 2.3 durchgeführten *in vitro* Aktivitätsanalysen noch in den *in vivo* Protoplastenassays (Fuchs et al. 2014) (Abbildung 3-7D) zu einer Regulation der PP2C. Aus den Daten geht hervor, dass jede der eingeführten Aminosäuren für sich alleine in der Lage zu sein scheint die Interaktion des Komplexes wieder zu etablieren, doch erst durch ihre Kombination konnte ebenfalls die regulatorische Wirkung wieder reaktiviert werden. Bislang konnte gezeigt werden, dass die Bindung von ABA an RCAR durch Substitutionsvarianten verbessert werden kann (Nakagawa et al. 2014; Pizzio et al. 2013). Diese Analyse zeigte zum ersten Mal, dass es möglich ist durch den gezielten Austausch einiger Aminosäuren einer PP2C sowohl die Interaktion mit einem RCAR als auch dessen regulatorische Funktion wieder zu etablieren. Jedoch weist die im Vergleich zu ABI1 um fast Faktor 500 höhere notwendige ABA-Konzentration darauf hin, dass nicht nur die identifizierten Aminosäurereste die Regulation beeinflussen, sondern weitere Aminosäurereste die Regulierbarkeit der PP2Cs bestimmen.

3.3. Funktionelle Differenzierung der RCAR-PP2C Komplexe

Die Bindung des Phytohormons in der hydrophoben Ligandentasche der RCARs und die daraus resultierende Inhibition der PP2Cs bzw. die Aufhebung der PP2C-vermittelten Inhibition der Proteinkinasen ist der zentrale Mechanismus der ABA-induzierten Signalkaskade (Hauser et al. 2011; Miyazono et al. 2009; Raghavendra et al. 2010). Angesichts der 14 in *Arabidopsis* vorkommenden RCARs und der neun PP2Cs, die diesen gegenüber stehen, ist die Bildung des RCAR-PP2C-Komplexes ein System von 126 möglichen Kombinationen. *In vitro* wurde bisher nur ein Bruchteil dieser Kombinationen untersucht (Hao et al. 2011; Li et al. 2015; Ma et al. 2009; Okamoto et al. 2013; Szostkiewicz et al. 2010). In dieser Arbeit wurden erstmals alle 14 RCARs aus *Arabidopsis thaliana* in Kombination mit den Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA getestet. Es konnte festgestellt werden, dass *in vitro* bereits eine Regulation der Proteinphosphatasen durch einige der RCARs in Abwesenheit des Liganden stattfindet, welche nicht nur vom eingesetzten

regulatorischen Protein, sondern ebenfalls von der beteiligten Proteinphosphatase abhängig war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit einer Ausnahme, alle 14 RCARs in der Lage waren die vier Proteinphosphatasen mit unterschiedlicher Effizienz *in vitro* ABA-abhängig zu inhibieren, nur die HAB1-RAR7-Kombination zeigte keine Regulation.

Der Einfluss der Interaktion zwischen PP2C und RCAR in Abwesenheit eines Phytohormons auf die Aktivität des Enzyms, wurde in Abschnitt 2.2.1 untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der regulatorischen Proteine die Aktivität der PP2Cs beeinflusste. Hierbei waren, im Gegensatz zur dritten Untergruppe, die Unterfamilien I und II, mit Ausnahme von RCAR10, in der Lage, die Aktivität der Proteinphosphatase ABI2 negativ zu regulieren, im Gegensatz dazu zeigten sich die Proteinphosphatasen ABI1 und HAB1 deutlich resistenter gegen eine ABA-unabhängige Regulation und wurden hauptsächlich von RCAR7 und 9 (ABI1), sowie RCAR 8 und 9 (HAB1) inhibiert. Die Analyse von PP2CA, als Vertreter der zweiten Untergruppe der PP2Cs, hingegen ergab, dass die meisten RCARs nicht in der Lage waren die enzymatische Aktivität des Proteins zu inhibieren (Abbildung 3-8A). Mit RCAR1 und RCAR4 zeigten nur zwei der regulatorischen Proteine die Fähigkeit PP2CA in Abwesenheit des Liganden zu inhibieren. Die inhibitorische Wirkung war demzufolge, also nicht ausschließlich vom verwendeten RCAR, sondern von der Konstellation des Rezeptor-Korezeptor-Komplexes abhängig.

Die durchgeführten Messungen zeigten, dass keines der RCARs, der dritten Unterfamilie (RCAR11, RCAR12 und RCAR14), welche in der Literatur als Dimere beschrieben werden (Dupeux et al. 2011b; Nishimura et al. 2009; Santiago et al. 2012), sowie RCAR13, welches *in vitro* als ein *trans*-Dimer mit einem eigenen ABA-abhängigen Mechanismus beschrieben wird (Zhang et al. 2012), in der Lage war die enzymatische Aktivität in Abwesenheit des Liganden zu inhibieren. Zusätzlich konnte auch bei RCAR10, keine negative Regulation beobachtet werden. Die Analysen bestätigten in weiten Teilen die Ergebnisse von Hao et al. 2011 (Abbildung 3-8A). In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass die dritte Untergruppe und RCAR10 keine bzw. nur eine schwache inhibitorische Wirkung des regulatorischen Proteins besaß und PP2CA resistenter gegen die Regulation der RCARs in Abwesenheit des Liganden war (Abbildung 3-8A). RCAR4 kristallisierte sich als das Protein mit der stärksten ABA-unabhängigen Regulation heraus.

Das die Interaktion der RCAR-Proteine mit den PP2Cs in Abwesenheit eines Liganden einen wichtigen Abschnitt der ABA-regulierten Signaltransduktion darstellt, wurde bereits bei der Identifikation der ABA-bindenden Proteine festgestellt, da ein an eine PP2C gebundenes RCAR eine im Vergleich zum ungebundenen regulatorischen Protein um zwei Größenordnungen höhere Affinität zu ABA besaß (Ma et al. 2009; Nakagawa et al. 2014; Santiago et al. 2009b). Überraschend war insofern die inhibitorische Wirkung der RCAR-Proteine, da wie in der Einleitung ausgeführt, hierfür die Relokalisation des *gate loops* eine wichtige Rolle spielt. Erst durch die Interaktion des Serins mit einem Glutamin im katalytischen Zentrum der PP2C nach der Konformationsänderung des *gate loops*, kann die Aktivität der PP2C inhibiert werden (Abbildung 3-8B) (Dupeux et al. 2011a; Miyazono et al. 2009; Yin et al. 2009). Diese inhibitorische Interaktion sollte erst durch die Bindung des Phytohormons, welches die Konformationsänderung induziert, entstehen.

Die beobachtete Inhibierung der enzymatischen Aktivität in Abwesenheit des Liganden könnte dahingehend gedeutet werden, dass die Bindungstasche sich auch in Abwesenheit des Liganden schließt und somit die inhibierende Interaktion des Serins mit dem katalytischen Zentrum der PP2C stattfindet. RCAR4 als das regulatorische Protein, welches auf alle getesteten PP2Cs die stärkste Inhibition besaß, wurde bereits als ABA-unabhängiger Regulator beschrieben (Hao et al. 2011; Sun et al. 2012). Der Zustand eines geschlossenen *gate loops* in Abwesenheit eines Liganden, müsste bei diesem Protein im Verhältnis am häufigsten auftreten. Eine Bestätigung dieser Hypothese ist möglicherweise, dass das regulatorische Protein bereits in Abwesenheit des Liganden in offener (Sun et al. 2012) und geschlossener Konformation (Hao et al. 2011) kristallisiert werden konnte.

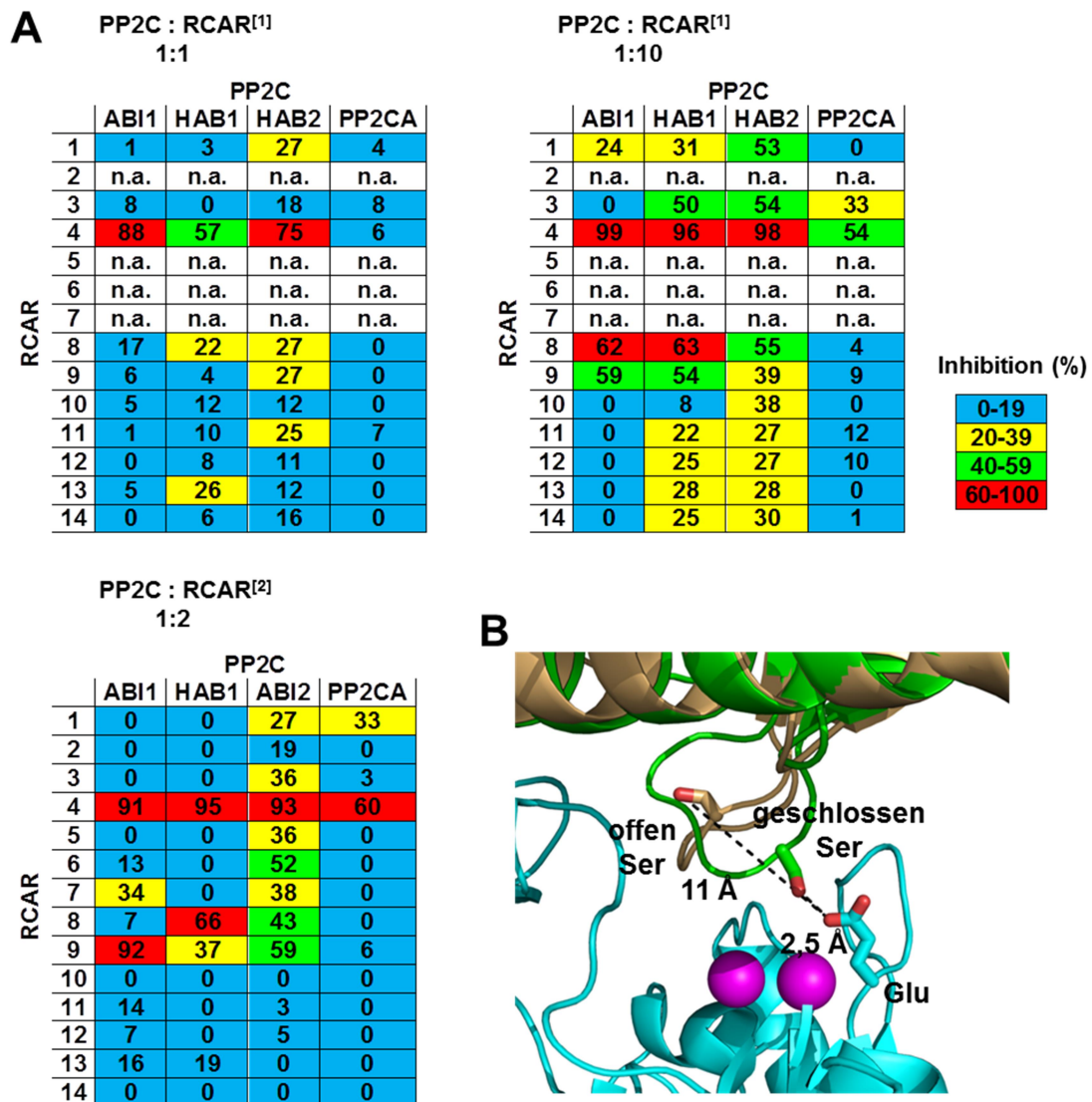


Abbildung 3-8: RCAR-abhängige Regulation der PP2Cs; inhibitorische Interaktion zwischen PP2C und RCAR

(A) Inhibitorische Wirkung der RCAR-Proteine in verschiedenen Konzentrationen relativ zur PP2C. Die Daten des PP2C:RCAR Verhältnisses von 1:1 und 1:10 wurden Hao et al. 2011 entnommen. (B) Dreidimensionale Darstellung des aktiven Zentrums von HAB1 (cyan) mit seinen Metallkofaktoren (Kugeln, magenta) (Miyazono et al. 2009). Das regulatorische Protein ist in offener (hellorange) und geschlossener (grün) Konformation dargestellt. Die Interaktionen zwischen den Serinen der beiden RCAR Konformationen und dem Glutamin der PP2C sind als schwarze Linien dargestellt (Melcher et al. 2009; Miyazono et al. 2009). Wichtige Aminosäuren sind als Strichmodell hervorgehoben, deren Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome rot markiert wurden. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 3KB3 und 3KAZ.

^[1]Hao et al. 2011

^[2]2.2.1

Neben dem negativen regulatorischen Effekt konnte in dieser Studie bei einer Reihe von RCAR-Proteinen allerdings ebenfalls eine Verbesserung der enzymatischen Aktivität der PP2Cs beobachtet werden. Dieser positive Effekt zeigte sich vor allem bei PP2CA in Verbindung mit RCAR5, 7 und 14, da sich die enzymatische Aktivität in Kombination mit diesen Proteinen annähernd verdoppelte. Allerdings waren solche positiven Effekte, wenngleich die Verbesserung nur ca. ein Drittel der Gesamtaktivität betrug, auch bei ABI2 in Verknüpfung mit RCAR10 und 14 zu beobachten (vgl. 2.2.1). Ein Erklärungsansatz hierfür wäre, dass die Bindung des RCAR Proteins an die hydrophobe Bindeseite der PP2C das aktive Zentrum des Enzyms stabilisiert und gleichzeitig unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen verhindert. Das in den Analysen verwendete synthetische Substrat MUP ist ein kleines Molekül und müsste nicht um die Bindestelle an den PP2Cs mit den RCARs konkurrieren wie es bei den Proteinkinasen der Fall ist (Fuchs et al. 2014). Ob es sich bei dieser Steigerung der enzymatischen Aktivität folglich um einen Effekt der *in vitro* Analysen handelte oder dieser Effekt auch *in vivo* beobachtet werden könnte bleibt unklar, da *in vivo* Analysen zu diesem Aspekt aufgrund des endogenen ABA-Gehalts der Organismen nicht möglich waren.

Somit stellte sich die Frage nach dem Ausgangszustand der am Komplex beteiligten Komponenten. Ausgehend von den gemessenen Daten könnte man schlussfolgern, dass die RCARs welche einen Einfluss, sowohl negativ, als auch positiv, auf die Aktivität der PP2Cs besaßen als Monomere vorlagen (RCARs1-10, sowie 13 und 14) und nur diejenigen RCARs, welche die Proteinphosphatasen nicht beeinflussten (RCAR11 und 12) Dimere bildeten. Die dimeren RCAR-Proteine interagieren miteinander bis zur Bindung des ABA-Liganden, dieser induziert eine Konformationsänderung, welche die Monomerisierung gestattet; erst danach ist es dem RCAR Protein möglich an eine PP2C zu binden und sie zu inhibieren (Yin et al. 2009). Die Einteilung der RCARs stimmt mit den in der Literatur als Monomere bzw. Dimere definierten Untergruppen überein (Dupeux et al. 2011b; Okamoto et al. 2013), bis auf die Tatsache, dass RCAR14 in der Literatur ebenfalls als ein Dimer angesehen wird; da es aber in der Lage war alle PP2Cs positiv zu regulieren besteht die Möglichkeit, dass es, wie sein am nächsten verwandtes regulatorisches Protein RCAR13, nicht in einer mit RCAR11 bzw. 12 vergleichbaren dimeren Form vorkommt, sondern einen ähnlichen *trans*-dimeren Mechanismus folgt, wie er für

RCAR13 beschrieben wurde (Zhang et al. 2012). Dieser beruht darauf, dass das regulatorische Protein in einer Mischung aus *cis*- und *trans*-Homodimeren existiert, wobei die *trans*-Homodimere eine Interaktionsfläche für die PP2Cs exponieren, welche die Dissoziation des Dimers erleichtert (Zhang et al. 2012). Bei RCAR13 wird dieser *trans*-Zustand über die ABA-Bindung aktiviert. Im Fall von RCAR14 könnte die positive Regulation mit allen Proteinphosphatasen darauf schließen lassen, dass der *trans*-Übergangszustand stattdessen durch die Bindung einer PP2C erfolgte.

Erstmals wurde in dieser Studie auch die ABA-Abhängigkeit aller 14 RCARs *in vitro* analysiert. Hierbei zeigte sich, dass der Großteil der RCARs in der Lage war die Proteinphosphataseaktivität bereits in einem Bereich um 30 nM auf mindestens 30% der Ausgangsaktivität zu inhibieren (vgl. 2.2.2) (Abbildung 3-9A). Eine Beobachtung, die sowohl durch Weng et al. 2016, als auch Okamoto et al. 2013 bestätigt wurde. Hierbei ist zu beachten, dass die Messungen von Okamoto et al. 2013 auf die Gesamtaktivität in Anwesenheit des RCARs normiert wurden, während bei den Daten dieser Studie eine Normierung auf den regulatorischen Bereich erfolgte (4.3.8). Eine identische Normierung der Messdaten hätte zur Folge, dass die Werte bei Okamoto et al. 2013 RCAR-abhängig noch etwas niedriger wären und sich mehr denen in dieser Arbeit gemessenen und bei Weng et al. 2016 veröffentlichten Daten angleichen würden. Dies ändert jedoch nichts an der Tendenz der IC₅₀-Werte aus Abbildung 3-9A. Hierbei zeigte sich, dass die als Dimere definierten regulatorischen Proteine (RCAR11 und 12) stets erst bei etwas höheren Konzentrationen regulatorisch aktiv wurden. RCAR14 und RCAR13 regulierten die getesteten PP2Cs hingegen im gleichen Maße wie die als monomer definierten RCARs. Es verstärkt sich damit der bereits aus der ABA-unabhängigen Regulation gewonnene Eindruck, dass es sich bei diesem Protein funktionell eher um ein Monomer als ein Dimer zu handeln scheint und somit nicht nur RCAR13 sondern auch RCAR14 einen *trans*-Übergangszustand besitzt, der die Monomerisierung der Dimere bei niedrigeren ABA-Konzentrationen gestattet (Zhang et al. 2012).

A

IC ₅₀ (nM)	RCAR													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
PP2C														
ABI2 ^[1]	143	6350	44	78	47	53	39	17	23	59	79	274	18	31
ABI1 ^[2]	73	n.a.	19	39	23	n.a.	n.a.	8	13	29	39	139	9	18
HAB1 ^[3]	60	n.a.	57	121	64	n.a.	n.a.	27	29	68	307	301	70	151

B

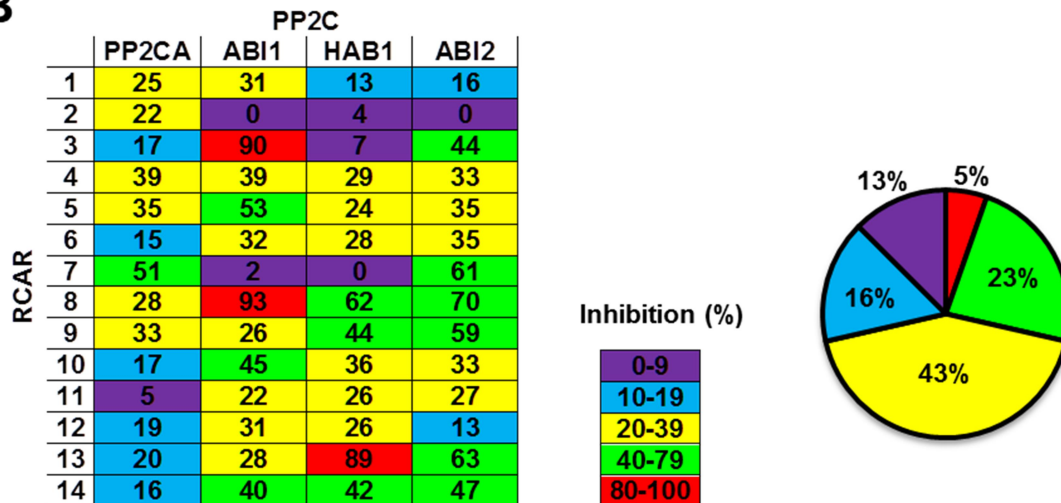


Abbildung 3-9: ABA-abhängige Regulation der Proteinphosphatasen ABI1, ABI2, HAB1 und PP2CA

(A) IC₅₀-Werte der durch ABA-induzierten Inhibierung von ABI2 (2.2.2), ABI1 (Weng et al. 2016) und HAB1 (Okamoto et al. 2013). Die Messungen wurden bei einer PP2C Konzentration von 50 nM und der doppelten Menge an RCAR durchgeführt; mit Ausnahme der Messungen von Weng et al. 2016, welche bei doppelten Proteinmengen durchgeführt wurden und deren IC₅₀-Werte zum besseren Vergleich halbiert wurden. (B) Zusammenfassung der ABA-abhängigen Inhibition der PP2Cs bei 30 nM ABA mit allen 14 RCARs. Die Matrix basiert auf der Auswertung der Daten aus Abbildung 2-5 und Abbildung 2-7. Die 56 gemessenen Kombinationen wurden entsprechend ihrer ABA-induzierten inhibitorischen Wirkung in fünf Kategorien unterteilt.

Weiterhin zeigte sich, dass einige wenige PP2C-RCAR Kombinationen, deutlich höhere ABA-Konzentrationen benötigten. Die diskriminierten Kombinationen waren hierbei unterschiedlich und gehörten keinen gemeinsamen Untergruppen an. Das gesamte *in vitro* zur Verfügung stehende Netzwerk aus 56 möglichen Kombinationen

^[1]2.2.2

^[2]Weng et al. 2016

^[3]Okamoto et al. 2013

zwischen PP2Cs und RCARs wurde in Abbildung 3-9B in verschiedenen inhibitorische Untergruppen eingeteilt. Es hat sich dabei gezeigt, dass 5% der Komplexe bereits bei der zur Verfügung stehenden sehr niedrigen ABA-Konzentration von 30 nM die Aktivität der PP2Cs um über 80% reduzieren, während bei 72% der Komplexe die Inhibierung hierbei noch unter 40% lag. Die Kombination mit der PP2C war dabei entscheidend für die Effektivität des regulatorischen Proteins. RCAR1 stellte sich beispielsweise als ein besseres regulatorisches Protein für die Inhibierung der Aktivität von ABI1 und HAB1 im Vergleich zu PP2CA und ABI2 dar. Vergleichbares wurde bereits in Szostkiewicz et al. 2010 beobachtet, hierbei wurde auch die unterschiedliche regulatorische Fähigkeit von RCAR3 aufgezeigt, welche durch diese Arbeit bestätigt wurde und aus Abbildung 3-9B hervorgeht. Die regulatorische Fähigkeit von RCAR3 hängt hierbei im großen Maß von der interagierenden PP2C ab.

Auffällig war, dass 13% der getesteten Kombinationen eine besonders schlechte ABA-abhängige Regulation zeigten. Jede der getesteten Proteinphosphatasen besaß demnach mindestens ein und maximal drei RCARs durch die diese erst bei hohen ABA-Konzentrationen reguliert werden konnten. Dabei war überraschend, dass die RCARs und PP2Cs, welche diese Kombinationen bilden, willkürlich aufzutreten scheinen, mit Ausnahme von RCAR2, welches für drei der vier getesteten PP2Cs eine schlechte Regulation zeigte. Diese Kombinationen waren weder innerhalb der regulatorischen Proteine noch der Proteinphosphatasen mit den auf Sequenzhomologien basierenden Untergruppen in Einklang zu bringen. Zu erwarten wäre eher ein Schlüssel-Schloss-Konzept gewesen, bei dem von einer kleineren Anzahl an sehr spezifischen Wechselwirkungen ausgegangen werden könnte und jedes enzymatische Protein von einer bestimmten Komposition aus RCARs reguliert werden würde. Stattdessen zeigte sich eine hohe Redundanz innerhalb der gesamten RCAR-Familie mit einigen spezifischen Rezeptor-Korezeptor-Komplexen, die über eine erhöhte Resistenz gegenüber ABA verfügten. Es stellte sich daher die Frage, ob in diesen Kombinationen eine Art Feinabstimmung vorhanden ist.

Eine Auffälligkeit innerhalb der in dieser Studie durchgeführten Analysen war, dass die Aktivitätsmessungen der Proteinphosphatasen meistens bei einer Konzentration von 50 nM PP2C und 100 nM RCAR lagen. Die Abschätzung der Konzentrationen erfolgte zwar optisch, doch wurde durch eine Titration das Verhältnis und die

enzymatische Aktivität der einzelnen Komponenten bestätigt (vgl. 2.1), insgesamt sind daher keine großen Abweichungen der jeweiligen Konzentrationen zu erwarten. Die grundlegende Annahme einer jeden Messung war die Bildung des heterotrimeren Komplexes in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 durch die Bindung eines RCARs und eines ABA-Moleküls an eine PP2C. Die theoretisch bestmögliche Konzentration des Liganden, um die enzymatische Aktivität um 50% zu inhibieren läge demnach bei 25 nM. Damit waren IC_{50} -Werte in diesem Bereich bzw. darunter in praktischen Messungen eigentlich nicht möglich, wurden aber sowohl in dieser Arbeit als auch bei Weng et al. 2016 und Okamoto et al. 2013 gemessen. Die ABA-unabhängige Regulation der Proteinphosphatasen bietet eine Erklärung für diese Auffälligkeit. Wenn bereits ein Teil der PP2Cs in Abwesenheit von ABA durch die RCARs inhibiert wurde und dieser inhibierte Rezeptor-Korezeptor-Komplex nicht mehr in der Lage war einen Liganden zu binden so erklärt dies, warum eine niedrigere Konzentration des Liganden ausreichte um eine Reduktion der enzymatischen Aktivität der verbliebenen Proteinphosphatasen zu erreichen.

Die beobachtete Inhibierung in Abwesenheit des Liganden bedeutet demnach, dass die Bindungstasche geschlossen sein muss, damit die inhibierende Interaktion des Serins mit dem katalytischen Zentrum der PP2C stattfinden kann und folglich keine Bindung eines Liganden mehr möglich ist. Das Paradebeispiel für diese Hypothese scheint RCAR4 zu sein, da es sich sowohl bei den in dieser Studie durchgeführten Messungen als auch bei Hao et al. 2011 als das Protein mit der stärksten ABA-unabhängigen Regulation herauskristallisiert hat. Allerdings konnte in den in Abbildung 3-9B gezeigten Studien die ABA-Abhängigkeit von RCAR4 nachgewiesen werden. Auch wenn diese aufgrund der Tatsache, dass das Protein in der Lage ist den größten Teil der enzymatischen Aktivität der PP2Cs in Abwesenheit des Liganden zu regulieren bezweifelt wurde (Hao et al. 2011; Sun et al. 2012), zeigten diese Ergebnisse doch, dass für die Regulation der verbliebenen Proteinphosphataseaktivität ABA notwendig war. Diese Beobachtungen wurden von Li et al. 2015 bestätigt und hatten darüber hinaus gezeigt, dass die Anwesenheit von Fremdproteinen (hier: BSA) die Aktivität von RCAR4 beeinflusste und die Bindung von ABA an das Protein zu einer Erhöhung der Flexibilität der dreidimensionalen Struktur führte. Dies zeigte, dass neben den in 1.3 ausgeführten Konformationsänderungen von *gate*- und *latch loop*, die Bindung des Liganden zu

weiteren konformationellen Neuausrichtungen in der dreidimensionalen Struktur der regulatorischen Proteine führte, welche insbesondere die Bindungstasche betreffen. Diese durch Ligandenbindung induzierte Erhöhung der Flexibilität im Bereich der gesamten Bindungstasche und der Interaktionsfläche des PP2C-RCAR Komplexes konnte zum Teil auch bereits während dieser Arbeit bestätigt werden. Da die Bindung verschiedener Liganden ebenfalls gezeigt hatte, dass es sich bei der Ligandenhöhle um ein flexibles Konstrukt handelt und das neben den aus den Kristallstrukturen ersichtlichen und messbaren Konformationsunterschieden möglicherweise weitere Interaktionen entstehen die die Inhibition der PP2C unterstützen oder wie im Falle von HAB1 und RCAR7 verhindern. Letztendlich sind also nicht nur die direkt in der Interaktionsfläche befindlichen hochkonservierten Aminosäuren von Bedeutung, sondern ebenfalls die, welche das gesamte flexible Rückgrat der regulatorischen Proteine ausbilden. Eine Flexibilität die offenbar auch durch die Anwesenheit von anderen Proteinen beeinflusst werden kann (Li et al. 2015).

Nimmt man die erhaltenen Erkenntnisse zusammen, dann ließe sich die Regulation der ABA-Signalkaskade in mehrere Ebenen unterteilen, diese wurden in Abbildung 3-10 schematisch dargestellt. Eine Ebene bilden die dimeren RCARs, sie benötigen für eine Monomerisierung eine hohe ABA-Konzentration und werden daher erst in Anwesenheit großer Ligandenmengen aktiviert. Der Großteil der RCARs liegt dagegen in monomerer Form vor (Dupeux et al. 2011b). Hierbei würde für jedes der RCAR-Proteine ein spezifisches Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation des *gate loops* existieren. Da es sich bei den regulatorischen Proteinen um hochflexible Konstrukte handelt kann dieses Gleichgewicht von außen beeinflusst werden (Li et al. 2015). Diese Mischpopulationen zweier Konformationen sind in der Lage den RCAR-PP2C Komplex zu bilden, wobei der Komplex mit der geschlossenen Form inaktiv ist und keinen Liganden binden kann, während die offene Form aktiv bleibt. Bei niedrigen ABA-Konzentrationen würden diese Rezeptor-Korezeptor-Komplexe aktiviert werden und die ABA-Signaltransduktionskaskade in Gang setzen. Die dann noch ungebundenen Proteinkinasen würden bei steigenden ABA-Konzentrationen durch die als Dimere vorliegenden RCARs inhibiert werden. Diejenigen PP2C-RCAR Kombinationen welche nur bei sehr hohen ABA-Konzentrationen zu inhibieren sind, könnten bei diesem Mechanismus von entscheidender Bedeutung sein und würden eine basale PP2C-Aktivität aufrechterhalten. Die inaktiven Komplexe könnten bei

sinkenden ABA-Konzentrationen durch ein Signal aktiviert werden und somit für eine schnelle Inhibition der Proteinkinasen sorgen.

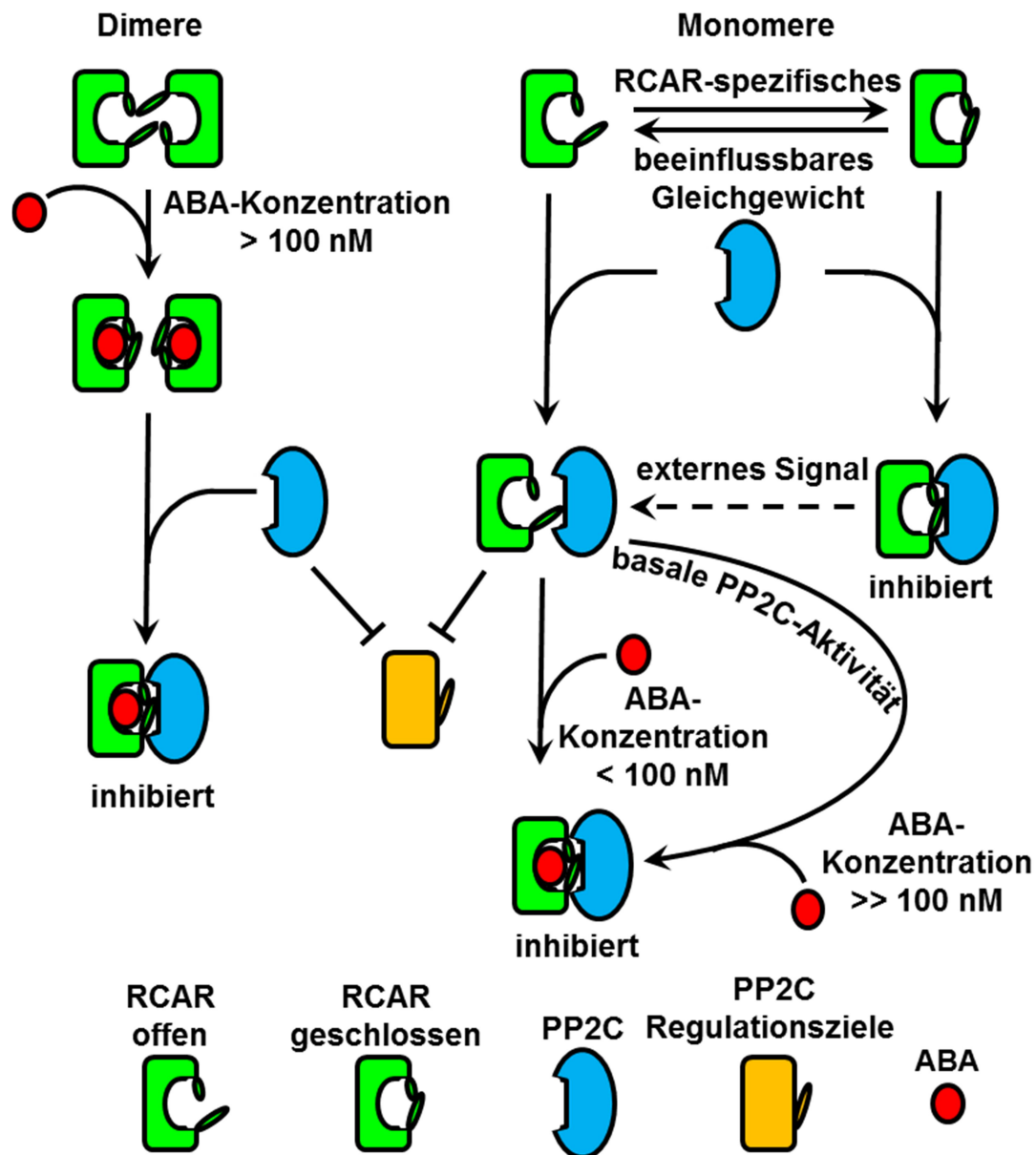


Abbildung 3-10: Schematische Darstellung einer möglichen ABA-Signaltransduktion

Modell einer zweistufigen ABA-abhängigen Signaltransduktion. Die RCARs liegen sowohl als Dimere, als auch als Monomere vor. Alle RCAR-Monomere bilden eine Mischpopulation aus RCARs mit geöffneten bzw. geschlossenen *gate loop*. Die monomeren RCARs bilden RCAR-PP2C Komplexe mit entweder aktiven oder inaktivierten Proteinphosphatasen. Bei ABA-Konzentrationen unter 100 nM werden die RCAR-PP2C Komplexe durch Bildung des heterotrimeren Komplexes inaktiviert. Höhere ABA-Konzentrationen führen anschließend zur Monomerisierung der dimeren RCARs und zur Inhibition der verbliebenen PP2Cs. Einige wenige Rezeptor-Korezeptor-Komplexe, die über eine erhöhte Resistenz gegenüber ABA verfügen, halten eine basale Proteinphosphataseaktivität aufrecht. Der ABA-unabhängig inaktivierte RCAR-PP2C Komplex dient bei sinkenden ABA-Konzentrationen als Schnellantwort und wird über ein externes Signal aktiviert.

3.4. Prolylisomerisierung als regulatorischer Schalter

Als Mitglieder der Bet v 1 Superfamilie besitzen die RCARs einen strukturell konservierten Bereich aus sieben β -Faltblattstrukturen und zwei flankierenden α -Helices und sind kleine Eindomänenproteine die eine Reihe an konservierten aliphatischen und aromatischen Aminosäuren aufweisen. Ähnliches gilt für die Familie der FKBP-Proteine, deren Grundstruktur eine fünfsträngige β -Faltblattstruktur und eine kurze α -Helix bilden (Harrison and Stein 1990). Bei den FKBP-Proteinen handelt es sich um eine Klasse von Prolylisomerasen. Die 3D-Struktur der beiden Proteinklassen ist in Abbildung 3-11 (A und B) gezeigt. Der violett markierte Bereich des RCAR-Proteins zeigt hierbei eine große Ähnlichkeit mit der dreidimensionalen Grundstruktur, welche typisch für Vertreter der FKBP-Proteine ist.

Es ist bereits bekannt, dass Prolylisomerisierungen als limitierende Schritte in der Proteinfaltung eine regulatorische Funktion in zellulären Prozessen ausüben (Schmid et al. 1991). Ein Beispiel hierfür bildet das Enzym Pin1, welches über die Isomerisierung von Phosphothreonin- oder Phosphoserin-Prolyl-Bindungen eine regulatorische Funktion im Zellzyklus übernimmt (Lu et al. 2002; Yaffe et al. 1997).

Es konnte mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass einige Proteine nach der Faltung als ein heterogenes Gemisch vorliegen, in welchem sowohl *cis*-, als auch *trans*-Proline vorhanden sind. Voraussetzung hierfür ist, dass die Proline in einem ungefalteten, flexiblen Bereich des Proteins vorliegen. Hierbei ist ein eindeutiger konformationeller Zustand für die vollständige Faltung eines Proteins nicht zwingend erforderlich. Eine derartige Heterogenität eines Proteins kann für dessen Funktion von entscheidender Bedeutung sein. Ein Beispiel hierfür bildet die Tyrosinkinase Itk, welche in einer *cis*- und einer *trans*-Konformation von Pro287 vorliegt. Beide Isomere unterscheiden sich wesentlich in ihrer Aktivität (Andreotti 2003; Brazin et al. 2002; Mallis et al. 2002).

Allerdings können auch intramolekulare Wechselwirkungen durch die Ausbildung verschiedener Isomere wesentlich beeinflusst werden. Das Protein Crk (CT10 Regulator of Kinase), gehört zu einer Familie von Adapterproteinen, welche eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb einer Signaltransduktionskette spielen. Dieses Protein besteht aus einer Reihe von SH2

und SH3-Domänen (src- homology domains). In der C-terminalen SH3 Domäne wurde eine Prolinpeptidbindung (Gly237-Pro238) nachgewiesen. Die Isomerisierung dieser Peptidbindung dient als ein regulatorischer Schalter, welcher zu einer Neuausrichtung der benachbarten Aminosäuren führt. Durch diese Relokalisation einiger Aminosäuren, werden die Interaktionen der C-terminalen SH3 Domäne mit der N-terminalen SH2 Domäne wesentlich beeinflusst (Sarkar et al. 2007).

Für die Untergruppe der Cyclophiline wurden neun Aminosäuren als wichtig für die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität der Proteine beschrieben (Davis et al. 2010; Ruan et al. 2011). Der Sequenzvergleich zwischen fünf Vertretern der Cyclophiline aus *A. thaliana* mit den in 2.5 untersuchten RCARs 1, 8 und 11 (Abbildung 3-11C) zeigte zum einen, dass diese Aminosäuren auch innerhalb der PPlasen nicht konserviert vorliegen und zum anderen, dass alle drei RCAR-Proteine über ähnliche Aminosäuren an entsprechenden Stellen ihrer Sequenz verfügen. Hierbei besitzen vor allem die Proteine RCAR8 und RCAR11 eine hohe Vergleichbarkeit in ihrer Aminosäurekomposition.

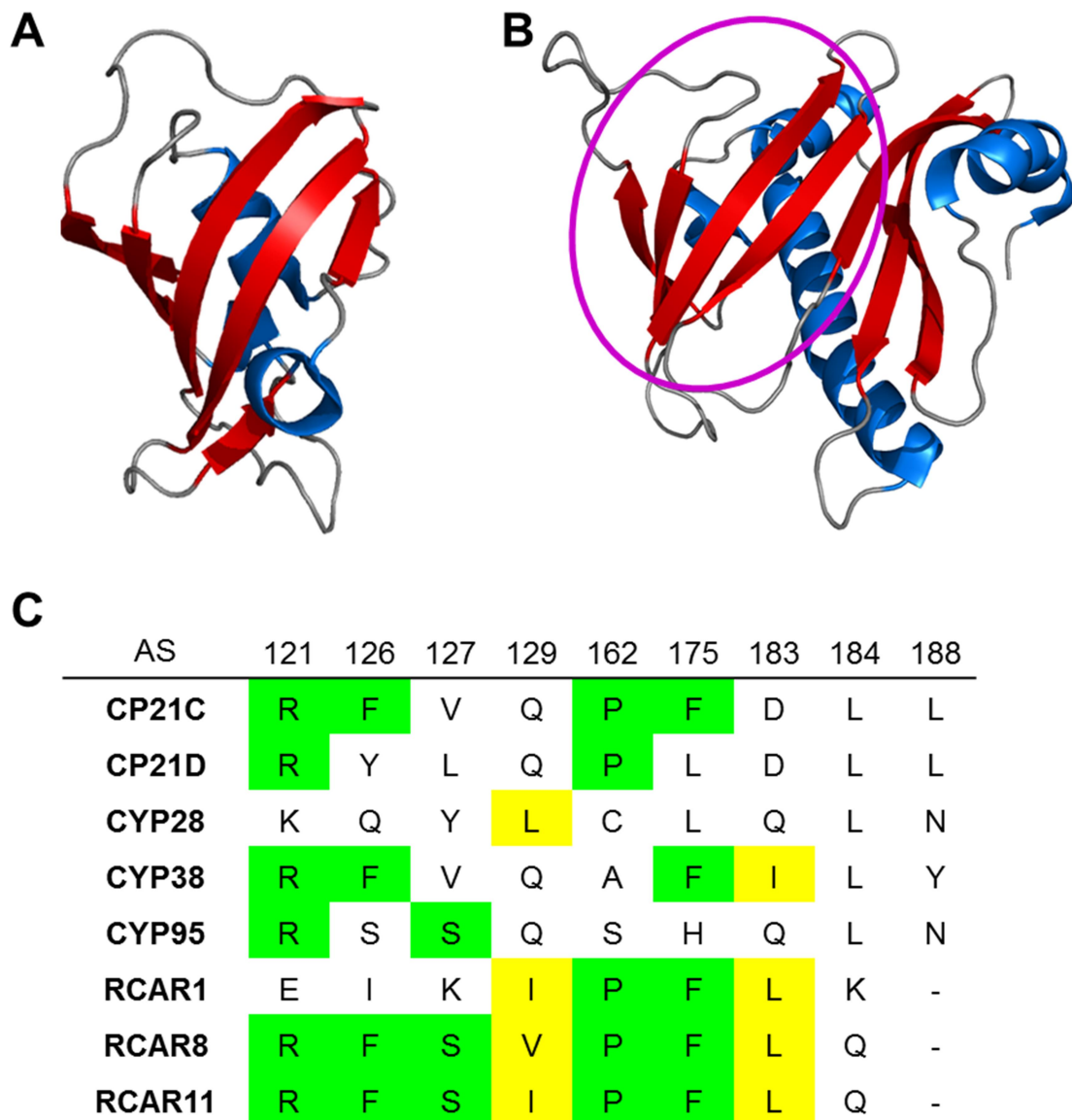


Abbildung 3-11: Vergleich zwischen RCAR-Protein und den Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen

Darstellung der dreidimensionalen Struktur von humanen FKBP12 (A) (Szep et al. 2009) und RCAR11 (B) (Weng et al. 2016). In blau sind die α -Helices, in rot die β -Faltblattstrukturen und in grau die *random-coil*-Bereiche der Proteine markiert. In (B) ist der zu FKBP12 strukturell verwandte Bereich von RCAR11 violett umrandet. (C) Sequenzvergleich zwischen fünf Vertretern der Cyclophilinen aus *A. thaliana* und drei Vertretern der RCAR-Familie. Gezeigt sind die neun Aminosäuren, welche von Davis et al. 2010 und Ruan et al. 2011 als wichtig für die Aktivität der Cyclophilinen beschrieben wurden. Identische Aminosäuren zwischen Cyclophilinen und RCARs sind in grün, chemisch und strukturell vergleichbare Aminosäuren sind in gelb hervorgehoben. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 2PPN und 5JO1.

Diese Aminosäuren in Cyclophilin sind die Grundlage für die Aktivität der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. Das aktive Zentrum dieser Proteine umfasst eine Reihe hydrophober, aliphatischer und polarer Aminosäuren von denen jede zur Interaktionsoberfläche beiträgt. Wie bereits in 1.4.1 dargelegt besitzen Peptidbindungen an welchen die Aminosäure Prolin beteiligt ist partiellen Doppelbindungscharakter. Für eine erfolgreiche Isomerisierung einer solchen Bindung muss eine Aktivierungsenergie von etwa 80 kJ/mol aufgewendet werden. Durch die Platzierung in einer hydrophoben Umgebung, sowie der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum N-Atom der Peptidbindung kann der Einzelbindungscharakter dieser Bindung gefördert und die benötigte Aktivierungsenergie gesenkt werden. Auf diesen beiden Konzepten basiert das aktive Zentrum der PPIasen. In Abbildung 3-12A und B ist die Interaktionsoberfläche eines Vertreters der Cyclophiline und der FKBP's dargestellt. Bei beiden Proteinen ist die Oberfläche am aktiven Zentrum hervorgehoben. Die hydrophobe Bindungstasche an dieser Stelle generiert eine Umgebung, welche den PPIasen ihre katalytische Aktivität ermöglicht.

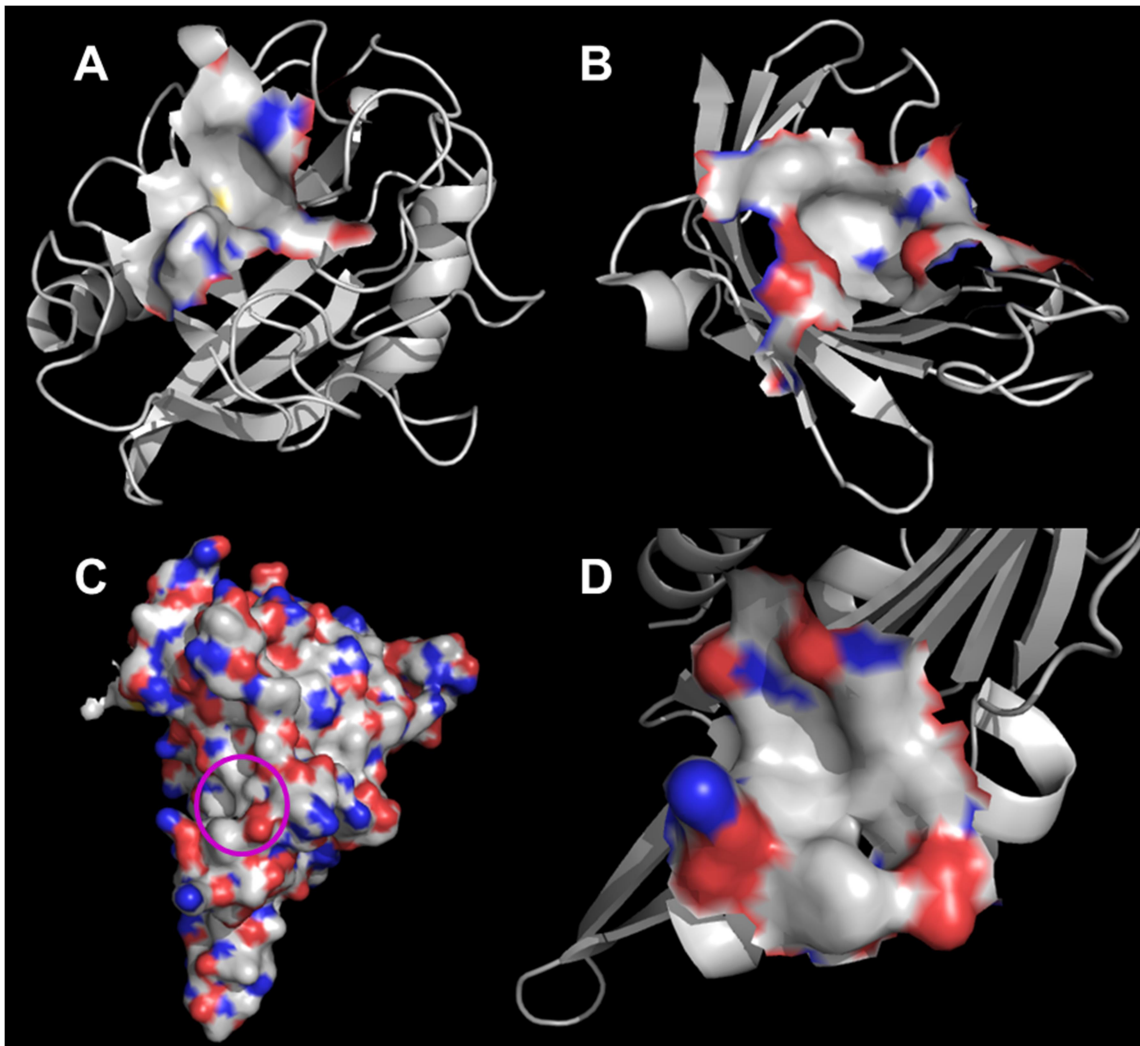


Abbildung 3-12: Vergleich der aktiven Zentren von humanen Cyclophilin und humanen FKBP12, sowie Vergleich mit RCAR11

In (A) und (B) sind die Sekundärstrukturen von Cyclophilin (Ottiger et al. 1997) bzw. FKBP12 (Szep et al. 2009) in grau dargestellt. Alle Aminosäuren, welche bei beiden Proteinen das aktive Zentrum bilden, wurden um die Oberflächendarstellung ergänzt. Die Ladungen der Aminosäuren sind in blau (positiv), rot (negativ) und grau (neutral) farbig hervorgehoben. In (C) ist die Oberflächenstruktur und deren Ladung von RCAR11 (Weng et al. 2016) gezeigt. Der violett markierte Bereich wurde vergrößert und in (D) analog zu (A) und (B) dargestellt. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL basierend auf den PDBs: 1OCA, 2PPN und 5JO1.

Das grundlegende Prinzip der Proteinfaltung besteht darin hydrophobe Aminosäuren in den Kern der Proteine zu bringen und eine Oberfläche aus polaren Aminosäuren zu schaffen um eine möglichst kompakte dreidimensionale Struktur zu generieren. Hierbei müssen die polaren Anteile des Rückgrats der Proteine über die Bildung von Sekundärstrukturen (α -Helices und β -Faltblattstrukturen) kompensiert werden und tragen durch die Bildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zur

Stabilität des Proteins bei (Park and Saven 2005; Rose et al. 1983). Die Oberfläche der Proteine ist also meist stark polar, wie man am Beispiel von RCAR11 erkennen kann (Abbildung 3-12C). Ein hydrophober Bereich auf der Oberfläche der Proteine ist daher selten und oft ein Anzeichen für einen Interaktionsbereich mit einem anderen Makromolekül. Einen derartigen Bereich bietet zum einen die Interaktionsfläche der regulatorischen Proteine mit den Proteinphosphatasen (vgl. 1.3). Allerdings konnte auf der Oberfläche des Proteins abseits der Interaktionsfläche ein weiterer hydrophober Bereich identifiziert werden (Abbildung 3-12D).

Die Tatsache, dass die Konformationsänderung von einem *cis*- zu einem *trans*-Prolin einen zentralen Schritt der ABA-Bindung darstellt, war ein Hinweis darauf, dass eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität einen regulatorischen Schritt in der ABA-Signaltransduktion innehaben könnte. In Reis wurde bei Analysen des Cyclophilins OsCYP2, welches einen zentralen Bestandteil der Stressantwort auf Salz in Reis darstellt (Ruan et al. 2011), nachgewiesen, dass die Behandlung von Samen (Shanyou 10) mit ABA die Expression von OsCYP2 fördert. Ein Zusammenhang zwischen ABA und den Cyclophilinen in der Stressantwort scheint daher möglich.

Die aufgeführten Homologien in der Sequenz und der Struktur der RCARs zu zwei verschiedenen Klassen von PPlasen, sowie die Entdeckung einer möglichen zweiten Bindestelle bzw. eines katalytischen Zentrums neben der PP2C-RCAR-Interaktionsoberfläche ließen weiterhin die Möglichkeit erkennen, dass es sich bei den RCAR-Proteinen selbst um PPlasen handelt, welche diesen regulatorischen Schritt kontrollieren. Es wurde beschrieben, dass die RCARs sowohl in monomerer als auch in dimerer Form vorliegen (Dupeux et al. 2011a; Nishimura et al. 2010; Okamoto et al. 2013). Die regulatorische Wirkung der RCARs wurde stets nur für die monomere Form beschrieben. Erst die Bindung von ABA an die Dimere des regulatorischen Netzwerkes soll zu einer Veränderung der Interaktionsfläche und zur Monomerisierung der Proteine führen. Es wäre möglich, dass eine Prolylisomerase als regulatorischer Schalter dient um diesen entscheidenden Schritt zu regeln.

Die Prolin-Sequenz aus RCAR wurde in einem Quintapeptid mit dem Fluorophor 2-Aminobenzoyl und dem Fluoreszenzlöcher p-Nitroanilin versehen und die Isomerisierungsrate in Anwesenheit verschiedener RCARs getestet. Bei RCAR8 zeigte sich eine leichte Beschleunigung der unkatalysierten Reaktion (Abbildung

2-31). Allerdings konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass diese Steigerung der apparenten Raten nicht mit der Menge an eingesetzten RCAR8 korreliert. Des Weiteren wäre selbst bei einer schlechten Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase eine Beschleunigung der apparenten Raten mind. um den Faktor 1,5 zwischen jedem der Konzentrationsschritte zu erwarten gewesen (Zoldak et al. 2009). Die Unterschiede zwischen den Messungen sind daher eher normalen Messschwankungen zuzuordnen. Ebenfalls die Ausweitung der Messungen um die RCARs 1 und 11, sowie die Ergänzung durch das Phytohormon ABA zeigten keine Verbesserung der apparenten Raten im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion (Abbildung 2-32). Obwohl bei allen Reaktionen, die Isomerisierungsrate in Anwesenheit von ABA schneller war, ist die Steigerung derselben nur marginal und kann nicht dahingehend ausgelegt werden, dass die Anwesenheit von ABA, die PPIase-Aktivität „aktiviert“. Es ist eher davon auszugehen, dass es sich um einen Zufall innerhalb normaler Messschwankungen handelt.

Da das verwendete Peptid gegenüber dem natürlichen kleiner ist, hat es auch leichteren Zugang zum katalytischen Zentrum eines Enzyms. Es wäre demnach leichter zu isomerisieren als das übliche Substratprotein. Die Tatsache, dass in Abbildung 2-31 und Abbildung 2-32 keine wesentliche Beschleunigung der Isomerisierung beobachtet werden konnte belegt, dass es sich bei den drei getesteten RCARs um keine PPIasen handelt. Da diese drei RCARs jeweils einen Vertreter der drei Unterfamilien der RCAR-Proteine darstellen, ist davon auszugehen, dass es sich bei keinem der RCAR-Proteine um eine Prolylisomerase handelt. Dennoch bleibt bestehen, dass es sich bei der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolin um einen zentralen Schritt der ABA-Bindung handelt, der über eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase katalysiert bzw. reguliert werden könnte. Aus den durchgeführten Experimenten geht lediglich hervor, dass diese Regulation nicht von den RCARs selbst ausgehen kann.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad p.A. von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und MBI Fermentas (St. Leon Roth) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), bezogen.

R-ABA wurde von Sigma-Aldrich oder von Loewen-Labratory (Kanada) bezogen. Die R-ABA Probe von A. Christmann wurde von Sigma-Aldrich bezogen und zusätzlich über eine Cyclobond I column an der HPLC gereinigt. Die ABA-Analogen wurden von Prof. Suzanne Abrahams (National Research Council of Canada) bezogen in DMSO aufgenommen und eine Stammlösung von 50 mM hergestellt. LA wurde von Prof. Rishikesh Bhalerao (Umeå Plant Science Centre) zur Verfügung gestellt und in Methanol gelöst (Endkonzentration 50 mM). Die Methylierung von LA wurde von A. Christmann durchgeführt und LA-methyliert anschließend in Methanol aufgenommen (Endkonzentration 50 mM). Die Derivate von LA wurden von der Firma AnalyticCon Discovery (Potsdam, Deutschland) aus Pflanzen extrahiert und in DMSO aufgenommen (Endkonzentration 50 mM). Für die Durchführung der Experimente lagen alle Liganden in den jeweiligen Messpuffern verdünnt vor.

4.1.2. Geräte

Tabelle 4-1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Elektrophorese-Netzteil	Electrophoresis Power Supply EP S 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Elektroporationssystem	Eporator	Eppendorf
Gelelektrophorese	E844	Consort
Inkubator	Innova 43R	New Brunswick
	Thermoshaker	Gerhardt
	WTC	Binder
Kippschüttler	HulaMixer	Invitrogen
	RotoShake Genie	Scientific Industries

Magnetrührer	HSC (Heating magnetic Stirrer)	Velp Scientifica
	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
Mikrowelle	MC-9287UR	LG
NanoDrop Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
Peristaltikpumpe	Peristaltic Pump P1	Pharmacia Biotech
	REGLO ICC	Ismatec
pH Meter	Multical pH 526	WTW
Photometer	Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech
SDS-PAGE System	Mini Protean Tetra System	BioRad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls	Bandelin
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vortexer	MS3 basic	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
	Handy	Sartorius
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5424	Eppendorf
	Typ 5424C	Eppendorf
	Typ 5424D	Eppendorf
	Typ 5424R	Eppendorf
	Universal 16	Hettich
Fluoreszenzmessgerät	Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer (FP-6500)	Jasco
	Synergy 2 Plate Reader	BioTek
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Wasserbad	Julabo 7A	Julabo

4.1.3. Software

Alle *in silico* Analysen wurden mit folgenden Programmen und online zur Verfügung stehender Software durchgeführt.

DNA-Sequenzen:

- TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)
- UniProt (<http://www.uniprot.org/>)

Vergleich Aminosäure- und DNA-Sequenzen:

- BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

Dreidimensionale Strukturanalyse von Proteinen:

- RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)
- PyMOL (DeLanoScientific LLC)

Erstellung phylogenetischer Bäume:

- MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>)

Erstellung chemischer Strukturen:

- ChemSketch (ChemSketh ink.)

Analyse der Messdaten:

- Grafit 3.0 (Erithacus Software)
- Origin 5.0 (OriginLab)

4.1.4. Verwendete Bakterienstämme und ihre Kultivierung

In dieser Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet:

Tabelle 4-2: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Resistenz	Firma
XL1Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 sdR17 supE44 relA1 lac [F ⁻ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)]	Tetracyclin	Stratagene
DH5α	F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ ,mk ⁺) phoA	keine	Invitrogen
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) galcmne131 (DE3)	keine	Promega
M15 [pREP4]	K12, NaIS strS rifS thi ⁻ lac ⁻ ara ⁻ gal ⁺ mtl ⁻ , F ⁻ recA ⁺ uvr ⁺ lon ⁺ [pREP4 KanR]	Kanamycin	Quiagen
Rosetta (DE3) pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) galDCM (DE3) pLysSRARE2 (Cam ^R)	Chloramphenicol	Novagen

Die Bakterienstämme XL1Blue und DH5 α wurden für die Expression von Plasmid-DNA verwendet. Die anderen Bakterienstämme und ebenfalls XL1Blue dienen zur Expression von Proteinen. Die Kultivierung erfolgte in LB- oder TB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten im Inkubator bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt.

LB-Medium

10 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 15 g/l Agar (Festmedium)
 pH = 7,0

TB-Medium

12 g/l Trypton
 24 g/l Hefeextrakt
 4 ml/l 87%Glycerin
 100 ml/l 10 x P-puffer

10 x P-puffer

94 g/l K₂HPO₄
 22 g/l KH₂PO₄

Die Nährmedien und der 10 x P-puffer wurden separat autoklaviert. Anschließend wurde der 10 x P-puffer dem TB-Medium hinzugefügt. Zur Selektion auf entsprechende Plasmide wurden den Medien Antibiotika gemäß Tabelle 4-4 zugesetzt. Die verwendeten Antibiotika-Stammlösungen wurden in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentration im Nährmedium

Antibiotikum	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (μ l/ml)
Ampicillin	200, in H ₂ O	100
Kanamycin	100, in H ₂ O	25
Chloramphenicol	68, in 100% EtOH	34

4.1.5. Plasmide und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 4-4 aufgeführt. Sie sind entsprechend der Stammsammlung des Lehrstuhls Botanik nummeriert und bei -80 °C gelagert.

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen

4.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden die entsprechenden *E. coli* Stämme in einer Kultur von 250 ml (Medium A) unter Schütteln im Inkubator kultiviert (18 °C, 200 rpm), bei einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation (15 min, 2500 g, 4 °C) geerntet. Das Pellet wurde in eiskalten T-Medium (80 ml) aufgenommen und mit 0,7 ml DMSO versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis konnten die Zellen aliquotiert (200 µl) und in flüssigen Stickstoff schockgefroren werden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Zellen bei -80 °C.

Medium A		T-Medium	
20 g/l	Trypton	10 mM	PIPES, pH 6,4
5 g/l	Hefeextrakt	55 mM	MnCl ₂
10 mM	NaCl	15 mM	CaCl ₂
2,5 mM	KCl	250 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂		
10 mM	MgSO ₄		

4.2.1.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Bei der Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde der entsprechende *E. coli* Stamm in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 bei 37 °C kultiviert. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis konnte das Medium durch Zentrifugation abgetrennt werden (10 min, 5000 rpm, 4 °C). Die Zellen wurden im Anschluss zweimal mit 500 ml kalten mQ H₂O gewaschen und das Wasser nach jedem Waschschrift durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 5000 rpm, 4 °C). Nach

Aufnahme des Zellpellets in 20 ml 10% (v/v) Glycerol aufgenommen wurde analog zu den bisherigen Zentrifugationen wiederum pelletiert. Abschließend konnten die Zellen in 3 ml 10% (v/v) Glycerol resuspendiert und in Aliquots von je 200 µl in flüssigen Stickstoff schockgefroren werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

4.2.2. Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

4.2.2.1. Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die bei -80 °C gelagerten chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl der Plasmid-DNA-Lösung (50-200 ng DNA) versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation des Ansatzes auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 60 s bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt und danach mit 400 µl LB-Medium versetzt. Nach einer 1,5-stündigen Inkubation bei 37 °C unter Schütteln im Thermomixer wurde die Zellsuspension auf LB-Platten, die mit dem entsprechenden Antibiotika versetzt waren, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2.2. Transformation elektrokompetenter Zellen

Analog zu den chemisch kompetenten Zellen tauten die elektrokompetenten Zellen auf Eis auf. Die Transformation wurden etwa 200 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 5 µl mQ H₂O in einer in Eis gekühlten Elektroporationsküvette vorgelegt. Der Abstand der Küvettenelektroden betrug 0,2 cm. Nach Vermischen der DNA mit 40 µl Zellsuspension erfolgte die Elektroporation ($U = 2000 \text{ V}$; $C = 25 \text{ µF}$; $R = 700 \text{ Ω}$; $t = 17,5 \text{ ms}$). Im Anschluss wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und diese in ein Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurde, analog zu den chemisch kompetenten Zellen, für 1,5 Stunden bei 37 °C unter Schütteln im Thermomixer inkubiert und die Zellsuspension danach auf, mit dem entsprechenden Antibiotika versehenen, LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.3. Plasmid-Präparation

4.2.3.1. Plasmid Mini Präparation

Die Plasmid Mini Präparation wurde mit Hilfe des Kits „Plasmid DNA purification“ der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Plasmid-DNA erfolgte photometrisch über Messung der Absorption bei 280 nm und 260 nm an einem Nanophotometer (Serva).

4.2.3.2. Plasmid Midi Präparation

Zum Erhalt größerer Mengen an Plasmid DNA wurde das JETSTAR Midiprep Kit der Firma Genomed verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Nach Aufnahme der gereinigten DNA in mQ H₂O wurde die Konzentration analog zu 4.2.3.1 am Nanophotometer (Serva) bestimmt.

4.3. Proteinbiochemische Methoden

4.3.1. Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden über Nacht Vorkulturen mit mehreren Einzelkolonien von frisch mit den entsprechenden Plasmid transformierten Zellen bzw. mit 5 µl der jeweiligen Glycerinkultur des gewünschten Proteins in 50 ml LB- oder TB-Medium hergestellt und bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Medien wurden zuvor mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Proteinexpression erfolgte in einer Hauptkultur von 400 ml (1l Erlenmeyerkolben) bzw. 2l (5l Erlenmeyerkolben), die mit 5 bzw. 20 ml der Vorkultur versetzt und bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert wurde. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 (LB-Medium) bzw. 1-1,4 (TB-Medium) wurde die Proteinexpression induziert. Die Induktion erfolgte hierbei entweder mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM (LB-Medium) bzw. 1 mM (TB-Medium) oder mit einer Laktoselösung

Endkonzentration von 0,5% (LB-Medium) bzw. 1% (TB-Medium). Bei einer Induktion mit Laktose wurde eine entsprechende Laktoselösung (30% (w/v) Lactose) frisch hergestellt. Die Laktoselösung wurde mehrmals in der Mikrowelle erhitzt und zwischendurch regelmäßig geschwenkt bis alle Festbestandteile gelöst waren. Anschließend wurde das durch das Erhitzen verloren gegangene mQ H₂O wieder aufgefüllt. Vor Verwendung wurde die Lösung auf RT temperiert. Proteinexpressionen bei 18 °C wurden vor der Induktion für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bedingungen der jeweiligen Expressionen sind Tabelle 4-4 zu entnehmen.

Tabelle 4-4: Zur Proteinexpression verwendete Konstrukte und Expressionsbedingungen

Protein	Stamm	Plasmid	Resistenz	Induktion	Expression	Strainlist
RCAR1	BL21 (DE3)	pQE30	Amp	IPTG	20h, 18 °C	1136
RCAR2	BL21 (DE3)	pET21a(+)	Amp, Cam	Lactose	20h, 18 °C	2772
RCAR3	BL21 (DE3)	pQE30	Amp	IPTG	20h, 18 °C	1168
RCAR4	BL21 (DE3)	pET21a(+)	Amp	IPTG	20h, 18 °C	7742
RCAR5	BL21 (DE3)	pET24a(+)	Kan	IPTG	20h, 18 °C	2852
RCAR6	Rosetta pLYS	pET24a(+)	Kan	IPTG	4h, 37 °C	2880
RCAR7	XL1Blue	pQE70	Amp, Kan	IPTG	20h, 18 °C	3933
RCAR8	M15 pREP4	pQE70	Amp, Kan	IPTG	4h, 37 °C	2258
RCAR9	M15 pREP4	pQE70	Amp, Kan	IPTG	20h, 18 °C	2417
RCAR10	M15 pREP4	pQE70	Amp, Kan	IPTG	4h, 37 °C	2413
RCAR11	M15 pREP4	pQE70	Amp, Kan	IPTG	4h, 37 °C	2258
RCAR12	Rosetta pLYS	pET21a(+)	Amp, Cam	IPTG	4h, 37 °C	2773
RCAR13	Rosetta pLYS	pET24a(+)	Kan, Cam	IPTG	4h, 37 °C	2881
RCAR14	Rosetta pLYS	pET24a(+)	Kan, Cam	IPTG	4h, 37 °C	2882
ABI1	M15 pREP4	pQE70	Amp	IPTG	2,5h, 37 °C	2158
ABI2	Rosetta pLYS	pQE70	Amp, Cam	IPTG	2,5h, 37 °C	2023
HAB1	Rosetta pLYS	pQE70	Amp, Cam	IPTG	2,5h, 37 °C	4338
PP2CA	Rosetta pLYS	pET21a(+)	Amp, Cam	IPTG	2,5h, 37 °C	2729
MpABI1	BL21 (DE3)	pET28b(+)	Kan	IPTG	2,5h, 37 °C	6672

MpRCAR1	BL21 (DE3)	pET28b(+)	Kan	IPTG	2,5h, 37 °C	6671
MpRCAR2	BL21 (DE3)	pET28b(+)	Kan	IPTG	20h, 18 °C	6670

Nach Beendigung der in Tabelle 4-4 angegebenen Expressionsdauer wurden die Zellen durch Zentrifugation (17.000 g, 15 min, 4 °C) geerntet und die Zellpellets in 1 ml Lysepuffer bzw. LEW-Puffer je Gramm Zellen aufgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Ausschlaggebend für die Wahl des Puffers war hierbei ob die Proteinisolation nach 4.3.3.1 oder 4.3.3.2 durchgeführt wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

IPTG Stammlösung

1 M IPTG, in H₂O
sterilfiltriert
Lagerung -20 °C

Lysepuffer

100 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
pH = 7,9

Laktoselösung

30% (w/v) Laktose

LEW-Puffer

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
pH = 8,0

4.3.2. Zellaufschluss

Vor dem Zellaufschluss wurden die gefrorenen Zellpellets in den 50 ml Falcons für fünf Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen am Sonoplus Homogenisator GM2070 zweimal für je eine Minute mit 9 Zyklen bei 100% der Ultraschallstärke aufgeschlossen. Anschließend wurde der Vorgang zweimal für je 35 Sekunden bei gleichen Bedingungen wiederholt. Zwischen den vier Ultraschallbehandlungen wurden die Zellen jeweils mit Hilfe eines Vortexers vermischt und für mindestens drei Minuten auf Eis inkubiert.

4.3.3. Proteinaufreinigung

Die Zellsuspension aus 4.3.2 wurde 45 Minuten bei 25.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und noch in der Lösung vorhandene unlösliche Partikel wurden über einen 0,45 µm Staubfilter abgetrennt. Alle Proteine besaßen zur Reinigung am C-terminalen Ende ein Hexahistidin-Tag. Durch diesen His-Tag konnten die Proteine über Affinitätschromatographie gereinigt werden.

4.3.3.1. Reinigung via Nickel-TED Säulen

Die Reinigung der mit Hexahistidin versehenen Proteine erfolgte mittels des Kits "Protino-Purification of His-tag proteins" von Macherey-Nagel über „Protino® Ni-TED“ Säulen. Hierbei wurden nach dem Prinzip der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), die mit einem His-Tag versehenen Proteine von den endogenen *E. coli* Proteinen abgetrennt. Die „Protino® Ni-TED“ ist eine auf Silikat basierende Säule mit geladenen Ni²⁺-Ionen. Die Bindung basiert auf der Interaktion der Stickstoffatome der Seitenketten des Hexahistidin-Tags mit den immobilisierten Ni²⁺-Ionen. Hierbei werden fünf der sechs verfügbaren Koordinationsstellen des Nickelions über den Chelator Triscarboxymethylethyldiamin (TED) besetzt, während die freie sechste Bindestelle des Ni²⁺-Ions für die Proteinbindung verantwortlich ist.

Puffer A		Puffer B	
50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
pH = 8,0		250 mM	Imidazol
		pH = 8,0	

Die Säulen wurden zunächst mit 4 ml Puffer A äquilibriert und danach mit dem Lysat beladen. Der Durchbruch wurde zur Erhöhung der Proteinausbeute ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen, bevor diese zweimal mit je 4 ml Puffer A gewaschen wurden. Das gebundene Protein wurde anschließend durch Zugabe von 5 ml Puffer B eluiert. Hierbei wurden die ersten 0,5 ml verworfen (Totvolumen der Säule) und

das übrige Volumen in zwei Fraktionen getrennt. Die Säule wurde abschließend mit 4 ml Puffer A gewaschen und in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

4.3.3.2. Reinigung via HisTrap FF crude Säulen

Für die Reinigung der Proteine über eine „HisTrap FF Crude“ Säule (GE Healthcare) wurde eine Peristaltikpumpe (REGLO ICC, Ismatec) verwendet. Vor dem Beginn der Reinigung wurde der Überstand aus 4.3.2 zunächst mit Puffer B versetzt (Endkonzentration Imidazol = 20 mM), anschließend wurden vorhandene unlösliche Partikel über einen 0,45 µm Staubfilter abgetrennt. Nach Äquilibrierung der HisTrap FF Crude Säule mit dem Fünffachen Säulenvolumina (5 cV) mit Waschpuffer (96:4 (v/v) Puffer A:Puffer B) bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde die Proteinlösung anschließend mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Bindung des rekombinanten Proteins basiert auf demselben Prinzip wie bei den Nickel-TED Säulen (vgl. 4.3.3.1). Nachdem durch Waschen mit 10 cV Waschpuffer (96:4 (v/v) Puffer A:Puffer B) nichtbindende Proteine entfernt wurden (Flussrate 0,4 ml/min), wurde das rekombinante Protein in 5 cV Elutionspuffer (50:50 (v/v) Puffer A:Puffer B) eluiert (Flussrate 0,4 ml/min).

Die verwendeten Säulen wurden anschließend, abhängig von der Menge an aufgetragener Proteinlösung, regeneriert. Bei einem Auftrag von 40 cV Proteinlösung wurde eine einfache Regeneration mit 5 cV Regenerationspuffer und 10 cV mQ H₂O durchgeführt. Die Verwendung größerer Volumina an Proteinlösung führten zu stärkeren Verunreinigungen der Säulen, diese wurden daher mit 5 cV EDTA-Lösung (Endkonzentration 100 mM) und 5 cV Regenerationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Säulen mit 5 cV mQ H₂O gespült und mit 2 cV 0,1 M NiSO₄ regeneriert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 10 cV mQ H₂O wurden die Säulen in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei einer Flussrate von 1 ml/min.

Puffer A

100 mM Tris/HCL
 100 mM NaCl
 pH = 7,9

Puffer B

100 mM Tris/HCL
 100 mM NaCl
 500 mM Imidazol
 pH = 7,9

Regenerationspuffer

100 mM Tris/HCL
 100 mM NaCl
 500 mM Imidazol
 6 M GdmCl
 pH = 7,9

4.3.4. Dialyse

Mittels Dialyse wurden niedermolekulare Substanzen aus der Proteinlösung entfernt. Die Dialyse der Proteinlösungen aus 4.3.3 erfolgte in Dialysekammern (hergestellt am Lehrstuhl von J. Reischenbeck) unter Verwendung von Dialysemembranen (VISKING® dialysis tubing Durchmesser = 16 mm, Molekulargewichtsausschlussgrenze = 12-14 kDa). Die Präparation der Membranen erfolgte nach dem Protokoll der Firma VISKING. Insgesamt wurden die Proteinlösungen zweimal für mindestens vier Stunden oder über Nacht gegen das 100-fache Volumen an Dialysepuffer bei 4 °C unter leichtem Rühren dialysiert. Die Proteine wurden anschließend mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 10% (v/v)), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Dialysepuffer

100 mM Tris/HCL
 100 mM NaCl
 1 mM DTT
 pH = 7,9

4.3.5. Protein-Konzentrierung

Bei Proteinlösungen deren Konzentration zu gering war wurde der A_{280} -Wert der Lösung am Nanophotometer bestimmt und diese anschließend mittels eines Konzentrators (Millipore Amicon® Ultra, 10.000 MWCO) eingeengt. Hierbei wurde das Volumen der Lösung in mehreren Zentrifugationsschritten (10-30 Minuten, 14.000 g, 4 °C) verringert. Nach Abschluss der Protein-Konzentrierung wurde das *filter device* invers in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die konzentrierte Lösung durch Zentrifugation (2 Minuten, 1.000 g, 4 °C) in dieses transferiert. Die Konzentration wurde anschließend über das Verhältnis der A_{280} -Werte vor Beginn und nach Ende der Konzentrierung bestimmt.

4.3.6. TCA-Präzipitation von Proteinlösungen

Mittels 10% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) wurden Proteinlösungen präzipitiert. Hierbei wurde die Probe mit dem Fünffachen Volumina an eiskalter TCA-Lösung versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das ausgefällte Protein durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 14.000 g, RT) und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde danach ein weiteres Mal mit 10% (w/v) TCA und zweimal mit 90% (v/v) Aceton (-20 °C) wiederholt. Abschließend wurde das Pellet für 15 Minuten bei RT an der Luft getrocknet.

4.3.7. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde benutzt, um Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 5 kDa zu trennen. Als Folgeion wurde Glycin verwendet. Die SDS-Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem 4%igen Sammelgel und einem 15 %igen Trenngel. Die Lösung des Trenngels wurde wie unten aufgeführt hergestellt und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS gestartet. Anschließend wurden die gegossenen Gele mit Isopropanol überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation (ca. 45 min) wurde das Isopropanol entfernt und die Gele mit mQ H₂O gespült. Im Anschluss wurde mit der Lösung des Sammelgels analog zum Trenngel verfahren und die

Trenngele mit der Sammelgellösung überschichtet. Nach Einsetzen der Kämme (zehn oder 15 Zähne) und einer weiteren Polymerisation (ca. 45 min) konnten die fertigen Gele verwendet werden.

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (6x) versetzt, zur Denaturierung 10 min lang bei 95 °C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert (30 s, 14.000 g, RT). Die Elektrophorese erfolgte in einer BIORAD-Elektrophorese-Apparatur bei einer Stromspannung von 200 V und einer Stromstärke von 120 mA für 60 Minuten. Zum Probenauftrag wurde je Probe ein Volumen von 5-10 µl, abhängig von der Größe der Probenflaschen verwendet.

	15% Trenngel	4% Sammelgel
Acrylamidlösung	5 ml	390 µl
mQ H₂O	2,3 ml	2,3 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	255 µl
10% SDS	100 µl	30 µl
TEMED	5µl	3 µl
APS	50 µl	15 µl

Acrylamidlösung

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

TEMED

unverdünntes Tetramethylethyldiamin

APS

10% (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
-----------	------------------------

SDS-Probenpuffer (6x)

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

Sammelgelpuffer

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

Trenngelpuffer

2 M	Tris/HCl
pH = 8,8	

Elektrodenpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS
pH = 6,8	

Größenstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus

4.3.8. Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Acrylamidgel in die Färbelösung gegeben. Anschließend wurde das Gel für 1,5 Minuten in der Mikrowelle bei 450 Watt erhitzt und danach auf dem Kippschüttler für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Färbelösung entfernt und das Gel mehrmals mit Wasser gewaschen um Rückstände der Lösung zu beseitigen. Zur Entfärbung wurde das Trenngel in der Entfärbelösung bedeckt und für 3,5 Minuten in der Mikrowelle bei 450 Watt erhitzt und für eine Stunde auf dem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurde der Lösung ein Papiertuch hinzugefügt, um den in der Entfärbelösung gelösten Farbstoff zu binden. Die SDS-Gele mit sichtbaren Proteinbanden wurden anschließend in VE-Wasser

gelagert und an der Gel-Dokumentationsstation fotografiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über einen Standard aus BSA-Lösungen mit definierten Konzentrationen (Ramagli and Rodriguez 1985).

Färbelösung

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

Entfärbelösung

10% (v/v)	Essigsäure
-----------	------------

4.3.9. Proteinphosphatase-Aktivitätstest

Die enzymatische Aktivität und Regulation der Proteinphosphatasen wurde mit Hilfe des Substrates Methylumbelliferylphosphat bestimmt (Meinhard and Grill 2001). Hierbei wurde die Phosphatgruppe von MUP durch die eingesetzten Enzyme abgespalten. Diese Dephosphorylierung wurde anhand der Änderung der Fluoreszenz des Substrates nach Anregung bei einer Wellenlänge von 360 nm bei 460 nm mit Hilfe eines Mikroplattenlesers (Synergy 2, Biotek) verfolgt. Die Intensität des Signals nahm hierbei proportional zur Konzentration des entstehenden 4-Methylumbelliferons zu. Die Messung folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik und wurde über einen Zeitraum von insgesamt 20 min gemessen. Durch das im großen Überschuss eingesetzte Substrat wurde in diesem Zeitraum der lineare Anteil der Kinetik verfolgt. Die Intensität des Fluorophors wurde in „Relative Fluorescence Units“ (RFU) gemessen. Die Steigung der Gerade entsprach der Aktivität des eingesetzten Enzyms und wurde mit Hilfe der Software „Gen 5.105“ von Biotek bestimmt und in mRFU/min angegeben.

Für die Durchführung des Proteinphosphatase-Aktivitätstests wurde zunächst eine Proteinlösung angesetzt, welche die Proteinphosphatase und den entsprechenden Reaktionspartner enthielt. Da die $MnCl_2$ -Lösung leicht oxidiert, wurde die Stammlösung täglich frisch hergestellt. Diese Enzymlösung wurde für 10 min bei 35 °C unter Schütteln inkubiert, damit sich ein möglicher RCAR-PP2C-Komplex ausbilden konnte. Danach wurde die Lösung mit einer entsprechenden Konzentration an ABA bzw. einem alternativen Liganden versetzt und für weitere 10 min bei 35 °C unter Schütteln inkubiert. In dieser Zeit wurde die Substratlösung vorbereitet und für

5 min bei 35 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Abschluss der Präinkubation wurden je 40 µl der Substratlösung in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von jeweils 40 µl Proteinlösung gestartet. Die Messung der Proteinphosphataseaktivität erfolgte für 20 Minuten in 30 Sekunden-Intervallen bei 30 °C. Während Proteinlösungen mit RCARs nach Gebrauch wieder bei -20 °C gelagert werden konnten, wurden PP2C-haltige Lösungen nach einmaligen Auftauen vollständig verbraucht bzw. nach Gebrauch verworfen.

Stammlösungen

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

Enzymlösung

25 µl	8 x Puffer
3 µl	20 mM MnCl ₂
x µl	PP2C
x µl	RCAR
20 µl	ABA bzw. Ligand
Zugabe von mQ H ₂ O	
Endvolumen 200 µl	

8 x Puffer

1 ml	1 M Tris/HCl (pH = 7,9)
0,2 ml	5 M NaCl
50 µl	1 M DTT

Substratlösung

100 µl	1 M Tris/HCl (pH = 7,9)
50 µl	0,1 M MUP
20 µl	5 M NaCl
15 µl	20 mM MnCl ₂
815 µl	mQ H ₂ O

4.3.10. Isomerisierung des Peptids Abz-SGLPA-pNa

Zur Untersuchung ob die RCAR-Proteine über eine Prolylisomeraseaktivität verfügen, wurde ein Peptid (Aminobenzoyl-Ser-Gly-Leu-Pro-Ala-p-Nitroanilin) der Firma Bachem als Substrat benutzt. Hierbei wurde die Zunahme der Fluoreszenz von Aminobenzoyl gemessen, welche durch p-Nitroanilin, bei *cis*-Konformation des Peptids, gequencht wurde (Zoldak et al. 2009). Durch 100-fache Verdünnung des Peptids in dem Messpuffer wurde die *cis/trans*-Isomerisierung initiiert und der zeitliche Verlauf der Zunahme der Fluoreszenz verfolgt. Die Peptidkonzentration

betrug 2,5 µM und es wurden entsprechende Konzentrationen an RCAR Proteinen vorgelegt. Die zu untersuchenden Proteine wurden jeweils vor Zugabe des Peptids für mindestens 3 min lang in einer Fluoreszenzküvette unter Rühren inkubiert. Die *cis/trans*-Isomerisierung des Peptids wurde über die Zunahme der Fluoreszenz bei 416 nm (Emissionsbandbreite: 5 nm) nach Anregung bei 316 nm (Bandbreite: 3 nm) mit der Sensitivität medium an einem Fluoreszenzspektrophotometer (FP-6500) der Firma Jasco verfolgt. Die Messwerte wurden um die Fluoreszenz des Puffers und der Proteine korrigiert und der Fluoreszenzverlauf der *cis/trans*-Isomerisierung des Peptids mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion angeglichen und die apparenten Raten bestimmt.

$$y(t) = y_0 + \sum_{i=0}^n A_i \cdot \exp(-k_i \cdot t)$$

$y(t)$	Fluoreszenzsignal zur Zeit t
y_0	Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$ s
A_i	Amplitude der Signaländerung
k_i	Rate der Signaländerung (in s^{-1})

Messpuffer

100 mM	Tris/HCL
100 mM	NaCl
pH = 7,9	

Peptidlösung

250 µM Abz-SGLPA-pNa
in 0,55 M LiCl/TFE

5. Anhang

MpRCAR3	FIKDFNMPYKHLHVGCHRVKGE-----GVGSI RRCVIRSGIAAKYSVER CEIMDED
MpRCAR2	ILRQFDKPHIYKEFLVGRMVEGD-----TPGSI RHVQVQTGLPATDSIEQ LELLDDE
AtRCAR4	IVRRFDEPQKYKPFISRCVVQGKKL-----EVGSV REVDLKSGLPATKST EVLEILLDDN
AtRCAR3	LVRREFDQPQKYKPFISRCVVKGN-M-----EIGTV REVDVKSGLPATRST ERLEILLDDN
AtRCAR1	LVRREFDQPQKYKPFVSRCTVIGD-P-----EIGSL REVNKSGLPATTS TERLEILLDDE
AtRCAR2	LVRREFDQPQKYKPFISRCTVNGD-P-----EIGCL REVNKSGLPATTS TERLEQLDDE
MpRCAR1	IVRRFDQPQSYKHFLQSSSLLIGEG-----APGSV REVRVLSGLPATNSI ERLEVLDDA
AtRCAR7	ILRSFDKPPQAYQRFVKSCMTRSGGGGGKGGEGKGSV RDVTLVSGFPADF STERLEELDDE
AtRCAR5	ILRRFDNPPQAYKQFVKTCNLSSGDG-----GEGSV REVTVVSGLPAEFS RERLELDDE
AtRCAR6	ILRRFDNPKTFKHFKVKTCKLRSGD-----GEGSV REVTVVSDLPASF SLERLELDDE
AtRCAR9	ILSRFEHPQAYKHFKVKSCHVVIGDGR-----EVGSV REVRVVSGLPAAFS LERLEIMDDD
AtRCAR8	LVRREFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGL-----HVGDL REVMVVSGLPAVSS TERLEILLDDE
AtRCAR10	VVRREFDNPPQAYKHFLKSCSVIGGDG-----NVGSL RQVHVVSGLPAASS TERLDILLDDE
AtRCAR11	IVRRFDKPPQTYKHFIKSCSVEQNF-----EMRVG CTRDVIVISGLPANT STERLDILLDDE
AtRCAR12	VVRREFDRPQIYKHFIKSCNVSEDF-----EMRVG CTRDVNVISGLPANT SRELDLLDDD
AtRCAR13	FVRDFANPNKYKHFIKSCIRVNGN-GIKEIKVGTI REVSVVSGLPASTS VEILEVLDEE
AtRCAR14	LIRREFDNPEYKHFVKRCRLISGD-----GDVGSV REVTVISGLPAST STERLEFVDDD
MpRCAR3	NRV ASFRV VGGEHRCRNYQSITSLHARL-----DHGLR ATLVI ESYVCDVLRGYSTDEVE
MpRCAR2	NKV LSFRIL GGDNRLKNYTSVTSVADRTL----VNGRQ GCLVIE SYIVDIPDGN TGDQ TV
AtRCAR4	EHIL GI RIVGGDHRLKNYSSITSLHSET-----IDGKT GTLAI ESFVVDVPEGN TKEET C
AtRCAR3	EHIL SI RIVGGDHRLKNYSSII SL HPET-----IEGRIG TLVI ESFVVDVPEGN TKDE TC
AtRCAR1	EHIL GI KIIGGDHRLKNYSSIL TV HP PEI -----IEGRAG TMVIE SFVVDV PQGN T KDE TC
AtRCAR2	EHIL GIN IIGGDHRLKNYSSIL TV HP PEM -----IDGRSG TMVME SFVVDV PQGN T KDD TC
MpRCAR1	NHV SSFRV LGGGHRLKNYWSVTSLHERV----SNGRR KTMVIE SYVVDVPEGN SKED TM
AtRCAR7	SHVM VVSI IIGGNHRLVNYKSKTKVVASPED---M--AKKT VVVE SYVVDVPEGT SEED TI
AtRCAR5	SHV MMISI IIGGDHRLVNYRSKTM AFVAA -D---T--E EKT VVVE SYVVDV PEGN SEE ETT
AtRCAR6	SHV MVISI IIGGDHRLVNYQSKTT VFAA -E-----E EKT VVVE SYVVDV PEGN TEE EET
AtRCAR9	RHV ISF SVVGGDHRLMNYKSVTT VHESEED ---SDGKK RTRVVE SYVVDV PAGN D KEET C
AtRCAR8	RHV ISF SVVGGDHRLKNYRSVTT LHASDDE -----G TVVVE SYIVDV PPGN T EE ETL
AtRCAR10	RHV ISF SVVGGDHRLSNYRSVTT LHPS PIS-----G TVVVE SYVVDV PPGN T KEET C
AtRCAR11	RRV TGFSI IIGGEHRLTNYKSVTT VHRFEKE ----NRIW TVVLE SYVVD MPEGN SE DD TR
AtRCAR12	RRV TGFSI TGGEHRLRNYKSVTT VHRFEKEE --E EERI W TVVLE SYVVDV PEGN SE ED TR
AtRCAR13	KRI LSFRV LGGEHRLN NYRSV TSVNEFV VLEKDKKRV SVVLE SYIVDI PQGN T EE D TR
AtRCAR14	HRV LSFRV VGGEHRLK NYKSV TSVNEFL NQD ---SGK VYTVVLE SYTVDI PEGN T EE DTK
MpRCAR3	VYCDG FVKE LLSRLNEVASAKWRDARLS---IWSK Q R-----
MpRCAR2	S V VNTI IR THLNSLDRIT M MERR-----
AtRCAR4	F V EAL I QC N LN S LADVTERLQAESMEK K I-----
AtRCAR3	Y F EAL I K C N L KSLADISERLAVQD T TES R V-----
AtRCAR1	Y F EAL I R C N L KSLADV S ERLASQD I TQ-----
AtRCAR2	Y F ES L I K C N L K SLACV S ERLAAQD I TNSIATFCNASNGYREKN H TET N L
MpRCAR1	V F VD T L V R C N L KSLTTVAEQ T VLQ T TT S NL K IK S EV-----
AtRCAR7	F F VD N I I R Y N L TSLAKLTK K MMK-----
AtRCAR5	S F AD T I V G F N L KSLAKLSERVAHL K L-----
AtRCAR6	L F AD T I V G C N L RS L AKLSEK M MELT-----
AtRCAR9	S F AD T I V R C N L QSLAKLAENTSK F S-----
AtRCAR8	S F VD T I V R C N L QSLARST N RQ-----
AtRCAR10	D F VD I V R C N LQSLAKIAENTAAESK K KM-SL-----
AtRCAR11	M F AD T V V K L N L QKLATVAEAMARNSGDGSG S QVT-----
AtRCAR12	L F AD T V I R L N L QKLASITEAMNRNNNNNNNSQ V R-----
AtRCAR13	M F VD T V V K S N L QNLAVISTAS P T-----
AtRCAR14	M F VD T V V K L N L QKLGVAATSAPMH D DE-----

Abbildung 5-1: Sequenzvergleich der 14 RCARs aus *A. thaliana* und der drei RCARs aus *M. polymorpha*

Dargestellt ist ein Auszug aus dem Sequenzvergleich der 14 RCARs aus *A. thaliana* und der drei RCARs aus *M. polymorpha*. Gelb hervorgehoben wurden die Aminosäuren, welche zur Struktur der Bindungstasche beitragen.

AHG1	SEIGGLPADIGGFLAPPAA-----SSC----QKSEAPVWKGEETEDDEPLYGIVSVMGR
PP2CA	ENK-----KARSAV-----TNS----N---SVTEAESFFSDVPKIGTTSVCGR
HAI1	STVAASTSTVFYETAKEVV-----VLC----ESLSSTVVALPDPEAYPKYGVASVCGR
HAI3	SRED-----FS-----DQNVDVSSPRYGVSSVCGR
HAI2	ESVSLESDSVSISDGNSSV-----N-D----VAVIPSKKTVKETDLRPRYGVASVCGR
MpABI1	-----MLHSQGT PVDRLKVS GERSLNLD DTTMAPSTSSSNFIDDGQCPPHGLVSVCGR
HAB1	VLIAGVNQDT----NTSEVV-----IRLPDENSNHL-VKGRSVYELDCIPLWGTVSIQGN
HAB2	VLIASLNHDVNMEVATSEVV-----IRLPEENPNVA-RGSRSVYELECIPLWGTISICGG
ABI1	ADIVVVDISAGDEINGSDI-----TSEKKMISR-TESSLFEFKSVPLYGFTSICGR
ABI2	SAMAGVDISAGDEINGSDEFDPRS-MNQSEKKVLSR-TESSLFEFKCVPLYGVTISICGR
	* * * : *
AHG1	SRKMEDSVTVKPNLCKPEVN-----RQRPVHFFAVYDGHGGSQVSTLCSTTM
PP2CA	RRDMEDAVSIHPSFLQRNS-----ENHHFYGVFDGHGCSHVAEKCRERL
HAI1	RREMEDAVAVHPFFSRHQTEY-----SSTGFHYCGVYDGHGCSHVAMKCRERL
HAI3	RREMEDAVAIHPSFSSPKN-----SEFPQHYFGVYDGHGCSHVAARCRERL
HAI2	RRDMEDAVALHPSFVRKQTEF-----SRTRWHYFGVYDGHGCSHVAARCKERL
MpABI1	RREMEDAVAAVPAFLSVPCDVT--GCSCRD SYGVHAPLHFFGVYDGHGGSQAAVFCADR L
HAB1	RSEMEDAFAVSPHFLKLPKMLMGDHEGMSPSLTHLTGHFFGVYDGHGGHKVADYCRDR L
HAB2	RSEMEDAVRALPHFLKLPKMLMGDHEGMSPSLPYLTSHFHFGVYDGHGGAQVADYCHDR I
ABI1	RPEMEDAVSTIPRFLQSSSGSMLDGR-----FDPQSAAHFFGVYDGHGGSQVANYCRERM
ABI2	RPEMEDSVSTIPRFLQVSSSSLLDGR-VTNGFNPHLSAHFFGVYDGHGGSQVANYCRERM
	.***: . * : * : .*:**** :.: * :
AHG1	HTFVKEELEQNLEEE--EEGSENDVVERKWRGVMKRSFKRMDEMA-----
PP2CA	HDIVKKEVEV--MA-----SDEWTETMVKSFQKMDKEVSQRECNLVVNGATRS
HAI1	HELVREEFE----A-----DADWEKSMARSFTRMDMEVVALN-----AD-
HAI3	HKLQVEELSSDMED-----EEWKTTMERSFTRMDKEVVSWG-----DSV
HAI2	HELVQEEALSD--K-----KEEWKMMERSFTRMDKEVVVRWG-----ETV
MpABI1	HHALAEEMKTLNAGSSSLGCSHNYWDLQWQRAMLACFLRMDAEVE-----
HAB1	HFALAEIEIERIKDEL--CKRNTGEGRQVQWQDKVFTSCFLTVDGEIEGKIGRAVVGSSDK-
HAB2	HSALAEIEIERIKEEL--CRRNTGEGRQVQWEKVFVDCYLKVDDEVKGINRPVVGSSDR-
ABI1	HLALAEIEIAKEK PML--CDG---DTWLEKWKKALFNSFLRVDSEIES-----
ABI2	HLALTEEIVKEKPEF--CDG---DTWQEKWKKALFNSFMRVDSEIET-----
	* : :* . * : .: :* :
AHG1	-TSTCVCGT SVPLCNC DPREAAISG STAVTAVLTHDHIIVANTGDSRAVLCRNGMAIPLS
PP2CA	MKNSCRCELQSPQC-----DAVGSTAVVSVVTPEKIIVSNCGDSRAVLCRNGVAIPLS
HAI1	GAACKRCELQRPDC-----DAVGSTAVVSVLTPEKIIIVANC GDSRAVLCRNGKAIALS
HAI3	VTANCKCDLQTPAC-----DSVGSTAVVSVITPDKIIVANC GDSRAVLCRNGKPVPLS
HAI2	MSANCRCELQTPDC-----DAVGSTAVVSVITPEKIIIVANC GDSRAVLCRNGKAVPLS
MpABI1	-----PIAPETVGSTAVVAVV GSCQIIIVANC GDSRAVLSRGGRAIALS
HAB1	-----VLEAVASETVGSTAVVALVCSSHIIVSNC GDSRAVLFRGKEAMPLS
HAB2	-----MVLEAVSPETVGSTAVVALVCSSHIIVSNC GDSRAVLLRGKDSMPLS
ABI1	-----V--APETVGSTSVVAVVF PSHIFVANC GDSRAVLCRGTALPLS
ABI2	-----VAHAPETVGSTSVVAVVF PTHIFVANC GDSRAVLCRGTPLALS
	:*.::: :*.:* ** *. : **

AHG1	NDHKPDRPDERARIEAAGGRVLVVDGARVEGILATSRAIGDRYLKPMVAWEPEVTFMRRE
PP2CA	VDHKPDRPDELIRIQQAGGRVIYWDGARVLGVLAMSRAIGDNYLKPYPVVPDPEVTVDRT
HAI1	SDHKPDRPDELDRIQAGGRVIYWDGPRVLGVLAMSRAIGDNYLKPVISRPEVTVDRA
HAI3	TDHKPDRPDELDRIEGAGGRVIYWDGPRVLGVLAMSRAIGDNYLKPYSCEPEVTITDRR
HAI2	TDHKPDRPDELDRIQEAGGRVIYWDGARVLGVLAMSRAIGDNYLKPYPVTSEPEVTVDRT
MpABI1	NDHKPEREDEMARVEAAGGRVIFWNGYRVLGVLAMSRAIGDRYLKPYVIAEPEVTCTQRS
HAB1	VDHKPDREDEYARIENAGGKVIQWQGARVFGVLAMSRSIGDRYLKPYVPEPEVTFMPRS
HAB2	VDHKPDREDEYARIEKAGGKVIQWQGARVSGVLAMSRSIGDQYLEPFVVPDPEVTFMPRA
ABI1	VDHKPDREDEAARIEAAGGKVIQWNGARVFGVLAMSRSIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRV
ABI2	VDHKPDRDEAARIEAAGGKVIQWNGARVFGVLAMSRSIGDRYLKPSVIPDPEVTSVRRV
	****:* ** *: : **:* : : ** *:* **:*:**.*:* : **** *
AHG1	SGDECLVLASDGLWDVLSQLACDIARFCLREETPSSLDLNRMA-----
PP2CA	DEDECLILASDGLWDVVPNETACGVARMCLRGAGAGD-----
HAI1	NGDDFLILASDGLWDVVSNETACSVVRMCLRGKVNQVSS----SPERE--MTGVGAG--
HAI3	D-DDCLILASDGLWDVVSNETACSVARMCLRGGR-----
HAI2	EEDEFLILATDGLWDVVTNEAACTMVRMCLNRKSGRGRRRGETQTPGRRSEEEGKEEEEK
MpABI1	EEDECLILASDGLWDVLSNELVCEIARKCLIGRRSSDLSLNM-----
HAB1	REDECLILASDGLWDVMNNQEVCIEIARRRILMWHKKNGA-----
HAB2	REDECLILASDGLWDVMSNQEACDFARRRILAWHKKNGA-----
ABI1	KEDDCLILASDGVVDVMTDEEACEMARKRILLWHKKNVAVAGDASL-----
ABI2	KEDDCLILASDGLWDVMTNEEVCDLARKRILLWHKKNAMAGEAL-----
	*: *:*:**:*:**: .: .* ..* :
AHG1	----QEDDNDGEQNP SRSVLAATLLTRLALGRQSSDNISVVVIDLKNSSQ-----
PP2CA	-----DSDAAHNACSDAALLLTKLALARQSSDNVSVVVVDLKRKRNNQASS--
HAI1	----NVVVGGLDLPDKACEEASLLLTRLALARQSSDNVSVVVVDLRRDT-----
HAI3	----RQDNEDPAISDKACTEASVLLTKLALARNSSDNVSVVVVDLRR-----
HAI2	VVGSRKNGKRGEITDKACTEASVLLTKLALAKHSSDNVSVVVVDLRRRRKRHVA---
MpABI1	----GPS-LDDEAEESPASVAAALLTKLALARGSSDNISVVVVVDMARPSRLS----
HAB1	----PPLAERGKIDPACQAAADYLSMLALQKGSKDNISIIVIDLKAQRKFKTRT--
HAB2	----LPLAERGVGEDQACQAAAEYLSKLAIQMGSKDNISIIVIDLKAQRKFKTRS--
ABI1	----LADERRKEGKDPAAMSAAEYLSKLAIQRGSKDNISVVVVVDLKP RRKLKSKPLN
ABI2	----LPAEKRGEGKDPAAMSAAEYLSKMLALQKGSKDNISVVVVVDLKGIRKFKSKSLN
	. * : * : :* : *.*:**:*:***

Abbildung 5-2: Sequenzvergleich der 9 PP2Cs aus *A. thaliana* und MpABI1 aus *M. polymorpha*

Dargestellt ist die Phosphatasedomäne aus dem Sequenzvergleich der 9 PP2Cs aus *A. thaliana* und MpABI1 aus *M. polymorpha*.

6. Literaturverzeichnis

- Abe S, Ohta Y (1984) The concentrations of lunularic acid and prelunularic acid in liverworts. *Phytochemistry* 23 (7):1379-1381. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80469-0
- 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 (3822):1493
- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19 (5):1665-1681. doi:10.1105/tpc.106.048041
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (12):3460-3479. doi:10.1105/tpc.104.025833
- Andreotti AH (2003) Native state proline isomerization: an intrinsic molecular switch. *Biochemistry* 42 (32):9515-9524. doi:10.1021/bi0350710
- Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Peirats-Llobet M, Pizzio GA, Fernandez MA, De Winne N, De Jaeger G, Dietrich D, Bennett MJ, Rodriguez PL (2013) PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant physiology* 161 (2):931-941. doi:10.1104/pp.112.208678
- 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 physiology* 158 (2):970-980. doi:10.1104/pp.111.188623
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* 4:63. doi:10.3389/fpls.2013.00063
- Bajguz A, Hayat S (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem* 47 (1):1-8. doi:10.1016/j.plaphy.2008.10.002
- Balbach, J. & Schmid, F. X. (2000). Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding* (Pain, R. H., ed.), pp. 212-237. Oxford University Press, Oxford.
- Balsevich JJ, Cutler AJ, Lamb N, Friesen LJ, Kurz EU, Perras MR, Abrams SR (1994) Response of Cultured Maize Cells to (+)-Abscisic Acid, (-)-Abscisic Acid, and Their Metabolites. *Plant physiology* 106 (1):135-142
- Benson CL, Kepka M, Wunschel C, Rajagopalan N, Nelson KM, Christmann A, Abrams SR, Grill E, Loewen MC (2014) Abscisic acid analogs as chemical probes for dissection of abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. doi:10.1016/j.phytochem.2014.03.017
- Bertauche N, Leung J, Giraudat J (1996) Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 241 (1):193-200
- Bewley JD (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9 (7):1055-1066. doi:10.1105/tpc.9.7.1055
- Bhaskara GB, Nguyen TT, Verslues PE (2012) Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs. *Plant physiology* 160 (1):379-395. doi:10.1104/pp.112.202408

- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279 (40):41758-41766. doi:10.1074/jbc.M405259200
- Bouvier F, d'Harlingue A, Huguene P, Marin E, Marion-Poll A, Camara B (1996) Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J Biol Chem* 271 (46):28861-28867
- Brazin KN, Mallis RJ, Fulton DB, Andreotti AH (2002) Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4):1899-1904. doi:10.1073/pnas.042529199
- Bruzzone S, Basile G, Mannino E, Sturla L, Magnone M, Grozio A, Salis A, Fresia C, Vigliarolo T, Guida L, De Flora A, Tossi V, Cassia R, Lamattina L, Zocchi E (2012) Autocrine abscisic acid mediates the UV-B-induced inflammatory response in human granulocytes and keratinocytes. *J Cell Physiol* 227 (6):2502-2510. doi:10.1002/jcp.22987
- Campos ML, Kang JH, Howe GA (2014) Jasmonate-triggered plant immunity. *J Chem Ecol* 40 (7):657-675. doi:10.1007/s10886-014-0468-3
- Cao M, Liu X, Zhang Y, Xue X, Zhou XE, Melcher K, Gao P, Wang F, Zeng L, Zhao Y, Zhao Y, Deng P, Zhong D, Zhu JK, Xu HE, Xu Y (2013) An ABA-mimicking ligand that reduces water loss and promotes drought resistance in plants. *Cell Res* 23 (8):1043-1054. doi:10.1038/cr.2013.95
- Chazin WJ, Kordel J, Drakenberg T, Thulin E, Brodin P, Grundstrom T, Forsen S (1989) Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional ¹H NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7):2195-2198
- Cherel I, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H, Thibaud JB (2002) Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* 14 (5):1133-1146
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275 (3):1723-1730
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)* 8 (3):314-325. doi:10.1055/s-2006-924120
- Cutler AJ, Rose PA, Squires TM, Loewen MK, Shaw AC, Quail JW, Krochko JE, Abrams SR (2000) Inhibitors of abscisic acid 8'-hydroxylase. *Biochemistry* 39 (44):13614-13624
- 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
- Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *Embo j* 15 (24):6798-6809
- Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, Bernstein G, MacKenzie F, Tempel W, Ouyang H, Lee WH, Eisenmesser EZ, Dhe-Paganon S (2010) Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* 8 (7):e1000439. doi:10.1371/journal.pbio.1000439
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* 266 (5188):1247-1250. doi:10.1126/science.266.5188.1247
- Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I, Wasternack C (2006) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*--enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)* 8 (3):297-306. doi:10.1055/s-2006-923935

- Dupeux F, Antoni R, Betz K, Santiago J, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Rubio S, Park SY, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA (2011a) Modulation of abscisic acid signaling in vivo by an engineered receptor-insensitive protein phosphatase type 2C allele. *Plant physiology* 156 (1):106-116. doi:10.1104/pp.110.170894
- Dupeux F, Santiago J, Betz K, Twycross J, Park SY, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Jensen MR, Krasnogor N, Blackledge M, Holdsworth M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA (2011b) A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *Embo j* 30 (20):4171-4184. doi:10.1038/emboj.2011.294
- Evans PA, Dobson CM, Kautz RA, Hatfull G, Fox RO (1987) Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature* 329 (6136):266-268. doi:10.1038/329266a0
- Feng Y, Hood WF, Forgey RW, Abegg AL, Caparon MH, Thiele BR, Leimgruber RM, McWherter CA (1997) Multiple conformations of a human interleukin-3 variant. *Protein Sci* 6 (8):1777-1782. doi:10.1002/pro.5560060821
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12 (4):599-609
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10 (6):1043-1054
- Fischer G, Bang H, Berger E, Schellenberger A (1984a) Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim Biophys Acta* 791 (1):87-97
- Fischer G, Bang H, Mech C (1984b) [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomedica biochimica acta* 43 (10):1101-1111
- Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337 (6206):476-478. doi:10.1038/337476a0
- Fuchs S, Grill E, Meskiene I, Schweighofer A (2013) Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J* 280 (2):681-693. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x
- Fuchs S, Tischer SV, Wunschel C, Christmann A, Grill E (2014) Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (15):5741-5746. doi:10.1073/pnas.1322085111
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462 (7273):660-664. doi:10.1038/nature08599
- 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 (12):2123-2132. doi:10.1093/pcp/pcp147
- Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Lowenstein H, Spangfort MD (1996) X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* 3 (12):1040-1045
- Galvez-Valdivieso G, Fryer MJ, Lawson T, Slattery K, Truman W, Smirnoff N, Asami T, Davies WJ, Jones AM, Baker NR, Mullineaux PM (2009) The high light response in Arabidopsis involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *Plant Cell* 21 (7):2143-2162. doi:10.1105/tpc.108.061507

- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270 (5244):1986-1988
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* 4 (173):ra32. doi:10.1126/scisignal.2001346
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (50):21425-21430. doi:10.1073/pnas.0912021106
- Ghosh TK, Kaneko M, Akter K, Murai S, Komatsu K, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Takezawa D (2015) Abscisic acid-induced gene expression in the liverwort *Marchantia polymorpha* is mediated by evolutionarily conserved promoter elements. *Physiol Plant*. doi:10.1111/ppl.12385
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernandez 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 (6):2483-2496. doi:10.1105/tpc.112.098574
- Han W, Rong H, Zhang H, Wang MH (2009) Abscisic acid is a negative regulator of root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and biophysical research communications* 378 (4):695-700. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.080
- Hao Q, Yin P, Li W, Wang L, Yan C, Lin Z, Wu JZ, Wang J, Yan SF, Yan N (2011) The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins. *Mol Cell* 42 (5):662-672. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.011
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF (2000) CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* 5 (4):154-159
- Harrison RK, Stein RL (1990) Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* 29 (16):3813-3816
- Hauser F, Waadt R, Schroeder JI (2011) Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Curr Biol* 21 (9):R346-355. doi:10.1016/j.cub.2011.03.015
- Hedden P, Sponsel V (2015) A Century of Gibberellin Research. *J Plant Growth Regul* 34 (4):740-760. doi:10.1007/s00344-015-9546-1
- Himmelbach A, Iten M, Grill E (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353 (1374):1439-1444. doi:10.1098/rstb.1998.0299
- Hooley R (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant molecular biology* 26 (5):1529-1555
- Huai J, Wang M, He J, Zheng J, Dong Z, Lv H, Zhao J, Wang G (2008) Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. *Plant cell reports* 27 (12):1861-1868. doi:10.1007/s00299-008-0608-8
- Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR, Cutler AJ (2007) Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50 (3):414-428. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03056.x
- Huttly AK, Baulcombe DC (1989) A wheat alpha-Amy2 promoter is regulated by gibberellin in transformed oat aleurone protoplasts. *EMBO J* 8 (7):1907-1913

- Iten M, Hoffmann T, Grill E (1999) Receptors and signalling components of plant hormones. *J Recept Signal Transduct Res* 19 (1-4):41-58. doi:10.3109/10799899909036636
- Iyer LM, Koonin EV, Aravind L (2001) Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins* 43 (2):134-144
- Jabs A, Weiss MS, Hilgenfeld R (1999) Non-proline cis peptide bonds in proteins. *J Mol Biol* 286 (1):291-304. doi:10.1006/jmbi.1998.2459
- Jadhav AS, Taylor DC, Giblin M, Ferrie AM, Ambrose SJ, Ross AR, Nelson KM, Irina Zaharia L, Sharma N, Anderson M, Fobert PR, Abrams SR (2008) Hormonal regulation of oil accumulation in Brassica seeds: metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'- and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of *B. napus*. *Phytochemistry* 69 (15):2678-2688. doi:10.1016/j.phytochem.2008.08.010
- Kageyama A, Ishizaki K, Kohchi T, Matsuura H, Takahashi K (2015) Abscisic acid induces biosynthesis of bisbibenzyls and tolerance to UV-C in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry* 117:547-553. doi:10.1016/j.phytochem.2015.05.009
- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H (2004) Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 279 (14):14049-14054. doi:10.1074/jbc.M314195200
- Ke HM, Zydowsky LD, Liu J, Walsh CT (1991) Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (21):9483-9487
- Kepka M, Benson CL, Gonugunta VK, Nelson KM, Christmann A, Grill E, Abrams SR (2011) Action of natural abscisic acid precursors and catabolites on abscisic acid receptor complexes. *Plant physiology* 157 (4):2108-2119. doi:10.1104/pp.111.182584
- Kerk D, Templeton G, Moorhead GB (2008) Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant physiology* 146 (2):351-367. doi:10.1104/pp.107.111393
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61:561-591. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112226
- Klingler JP, Batelli G, Zhu JK (2010) ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *Journal of experimental botany* 61 (12):3199-3210. doi:10.1093/jxb/erq151
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* 16 (5):1163-1177. doi:10.1105/tpc.019943
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61 (3):377-383. doi:10.1111/j.1399-3054.1984.tb06343.x
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ (1998) (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant physiology* 118 (3):849-860
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22 (3):541-563. doi:10.1105/tpc.109.072686
- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI (2006) The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant physiology* 140 (1):127-139. doi:10.1104/pp.105.070318

- Kulik A, Wawer I, Krzywinska E, Bucholc M, Dobrowolska G (2011) SnRK2 protein kinases--key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omics* 15 (12):859-872. doi:10.1089/omi.2011.0091
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* 23 (7):1647-1656. doi:10.1038/sj.emboj.7600121
- Lackman P, Gonzalez-Guzman M, Tilleman S, Carqueijeiro I, Perez AC, Moses T, Seo M, Kanno Y, Hakkinen ST, Van Montagu MC, Thevelein JM, Maaheimo H, Oksman-Caldentey KM, Rodriguez PL, Rischer H, Goossens A (2011) Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in Arabidopsis and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (14):5891-5896. doi:10.1073/pnas.1103010108
- Lang K, Schmid FX, Fischer G (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* 329 (6136):268-270. doi:10.1038/329268a0
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126 (6):1109-1120. doi:10.1016/j.cell.2006.07.034
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (50):21419-21424. doi:10.1073/pnas.0910601106
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chefdor F, Giraudat J (1994) Arabidopsis ABA response gene AB11: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264 (5164):1448-1452
- Li J, Shi C, Sun D, He Y, Lai C, Lv P, Xiong Y, Zhang L, Wu F, Tian C (2015) The HAB1 PP2C is inhibited by ABA-dependent PYL10 interaction. *Sci Rep* 5:10890. doi:10.1038/srep10890
- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287 (5451):300-303
- 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 (12):1369-1379. doi:10.1038/cr.2013.143
- Lin BL, Wang HJ, Wang JS, Zaharia LI, Abrams SR (2005) Abscisic acid regulation of heterophylly in *Marsilea quadrifolia* L.: effects of R(-) and S(+) isomers. *Journal of experimental botany* 56 (421):2935-2948. doi:10.1093/jxb/eri290
- Lopez-Molina L, Chua NH (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41 (5):541-547
- Lu KP, Liou YC, Zhou XZ (2002) Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends in cell biology* 12 (4):164-172
- 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 (5930):1064-1068. doi:10.1126/science.1172408
- Mallis RJ, Brazin KN, Fulton DB, Andreotti AH (2002) Structural characterization of a proline-driven conformational switch within the I τ k SH2 domain. *Nat Struct Biol* 9 (12):900-905. doi:10.1038/nsb864
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Huguency P, Frey A, Marion-Poll A (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved

- in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 15 (10):2331-2342
- Meinhard M, Grill E (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 508 (3):443-446
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462 (7273):602-608. doi:10.1038/nature08613
- Melcher K, Xu Y, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Chinnusamy V, Suino-Powell KM, Kovach A, Tham FS, Cutler SR, Li J, Yong EL, Zhu JK, Xu HE (2010) Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat Struct Mol Biol* 17 (9):1102-1108. doi:10.1038/nsmb.1887
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126 (5):969-980. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054
- Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25 (3):295-303
- Meyer K, Leube MP, Grill E (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264 (5164):1452-1455
- Mikol V, Kallen J, Pflugl G, Walkinshaw MD (1993) X-ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 234 (4):1119-1130. doi:10.1006/jmbi.1993.1664
- Milborrow BV (1974) The chemistry and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol* 25: 259–307. doi:10.1146/annurev.pp.39.060188.002255
- Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang HJ, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira KS, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462 (7273):609-614. doi:10.1038/nature08583
- Monke G, Altschmied L, Tewes A, Reidt W, Mock HP, Baumlein H, Conrad U (2004) Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* 219 (1):158-166. doi:10.1007/s00425-004-1206-9
- Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (3):234-244. doi:10.1038/nrm2126
- Mosquna A, Peterson FC, Park SY, Lozano-Juste J, Volkman BF, Cutler SR (2011) Potent and selective activation of abscisic acid receptors in vivo by mutational stabilization of their agonist-bound conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (51):20838-20843. doi:10.1073/pnas.1112838108
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant physiology* 140 (1):249-262. doi:10.1104/pp.105.072348
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14 (12):3089-3099
- Nakagawa M, Kagiyama M, Shibata N, Hirano Y, Hakoshima T (2014) Mechanism of high-affinity abscisic acid binding to PYL9/RCAR1. *Genes Cells* 19 (5):386-404. doi:10.1111/gtc.12140
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including

- RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 60 (1):51-68. doi:10.1007/s11103-005-2418-5
- 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
- Nambara E, Suzuki M, Abrams S, McCarty DR, Kamiya Y, McCourt P (2002) A screen for genes that function in abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 161 (3):1247-1255
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K (2008a) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452 (7186):483-486. doi:10.1038/nature06720
- Negi S, Ivanchenko MG, Muday GK (2008b) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55 (2):175-187. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03495.x
- 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 (5958):1373-1379. doi:10.1126/science.1181829
- Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park SY, Wang A, Carvalho PC, Lee S, Caddell DF, Cutler SR, Chory J, Yates JR, Schroeder JI (2010) PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61 (2):290-299. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04054.x
- 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. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50 (6):935-949. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03107.x
- Niyogi KK, Grossman AR, Bjorkman O (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10 (7):1121-1134
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A (2007) The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50 (5):810-824. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03094.x
- Nyangulu JM, Nelson KM, Rose PA, Gai Y, Loewen M, Loughheed B, Quail JW, Cutler AJ, Abrams SR (2006) Synthesis and biological activity of tetralone abscisic acid analogues. *Org Biomol Chem* 4 (7):1400-1412. doi:10.1039/b509193d
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* 142 (3599):1592-1593. doi:10.1126/science.142.3599.1592
- Okamoto M, Peterson FC, Defries A, Park SY, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (29):12132-12137. doi:10.1073/pnas.1305919110
- Ottiger M, Zerbe O, Guntert P, Wuthrich K (1997) The NMR solution conformation of unligated human cyclophilin A. *J Mol Biol* 272 (1):64-81. doi:10.1006/jmbi.1997.1220
- Park S, Saven JG (2005) Statistical and molecular dynamics studies of buried waters in globular proteins. *Proteins* 60 (3):450-463. doi:10.1002/prot.20511
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein

- phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324 (5930):1068-1071. doi:10.1126/science.1173041
- Peterson FC, Burgie ES, Park SY, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA, Chang CE, Cutler SR, Phillips GN, Jr., Volkman BF (2010) Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nat Struct Mol Biol* 17 (9):1109-1113. doi:10.1038/nsmb.1898
- Pizzio GA, Rodriguez L, Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Yunta C, Merilo E, Kollist H, Albert A, Rodriguez PL (2013) The PYL4 A194T mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for abscisic acid signaling and plant drought resistance. *Plant physiology* 163 (1):441-455. doi:10.1104/pp.113.224162
- Priest DM, Ambrose SJ, Vaistij FE, Elias L, Higgins GS, Ross AR, Abrams SR, Bowles DJ (2006) Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (3):492-502. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02701.x
- Pryce RJ (1971) Lunularic acid, a common endogenous growth inhibitor of liverworts. *Planta* 97 (4):354-357. doi:10.1007/bf00390214
- Radauer C, Lackner P, Breiteneder H (2008) The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC evolutionary biology* 8:286. doi:10.1186/1471-2148-8-286
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15 (7):395-401. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.006
- Ramagli LS, Rodriguez LV (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *ELECTROPHORESIS* 6 (11):559-563. doi:10.1002/elps.1150061109
- Reeves WM, Lynch TJ, Mobin R, Finkelstein RR (2011) Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant molecular biology* 75 (4-5):347-363. doi:10.1007/s11103-011-9733-9
- Robert N, Merlot S, N'Guyen V, Boisson-Dernier A, Schroeder JI (2006) A hypermorphic mutation in the protein phosphatase 2C HAB1 strongly affects ABA signaling in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 580 (19):4691-4696. doi:10.1016/j.febslet.2006.07.047
- 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 molecular biology* 38 (5):879-883
- Rose GD, Young WB, Gierasch LM (1983) Interior turns in globular proteins. *Nature* 304 (5927):654-657
- Ruan SL, Ma HS, Wang SH, Fu YP, Xin Y, Liu WZ, Wang F, Tong JX, Wang SZ, Chen HZ (2011) Proteomic identification of OsCYP2, a rice cyclophilin that confers salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings when overexpressed. *BMC plant biology* 11:34. doi:10.1186/1471-2229-11-34
- Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim TH, 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 physiology* 150 (3):1345-1355. doi:10.1104/pp.109.137174
- 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 : for cell and molecular biology* 37 (3):354-369
- 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 physiology* 141 (4):1389-1399. doi:10.1104/pp.106.081018
- Santiago J, Dupeux F, Betz K, Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Marquez 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
- Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA (2009a) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* 462 (7273):665-668. doi:10.1038/nature08591
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Marquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL (2009b) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 60 (4):575-588. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03981.x
- Sarkar P, Reichman C, Saleh T, Birge RB, Kalodimos CG (2007) Proline cis-trans isomerization controls autoinhibition of a signaling protein. *Mol Cell* 25 (3):413-426
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake H, Goto DB, Uozumi N (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* 424 (3):439-448. doi:10.1042/BJ20091221
- Scherer G, Kramer ML, Schutkowski M, Reimer U, Fischer G (1998) Barriers to Rotation of Secondary Amide Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society* 120 (22):5568-5574. doi:10.1021/ja980181t
- Schmid FX (2001) Prolyl Isomerases. In: *Advances in Protein Chemistry*, vol Volume 59. Academic Press, pp 243-282. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(01)59008-7
- Schmidpeter PA, Jahreis G, Geitner AJ, Schmid FX (2011) Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline. *Biochemistry* 50 (21):4796-4803. doi:10.1021/bi200442q
- Schreiber G, Fersht AR (1993) The refolding of cis- and trans-peptidylprolyl isomers of barstar. *Biochemistry* 32 (41):11195-11203
- Schroeder JI, Nambara E (2006) A quick release mechanism for abscisic acid. *Cell* 126 (6):1023-1025. doi:10.1016/j.cell.2006.09.001
- Schwartz SH, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Zeevaart JA (1997) Biochemical characterization of the aba2 and aba3 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* 114 (1):161-166
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant physiology* 131 (4):1591-1601. doi:10.1104/pp.102.017921
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* 9 (5):236-243. doi:10.1016/j.tplants.2004.03.007
- Shaw PE (2002) Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO reports* 3 (6):521-526. doi:10.1093/embo-reports/kvf118
- Shen Q, Gomez-Cadenas A, Zhang P, Walker-Simmons MK, Sheen J, Ho TH (2001) Dissection of abscisic acid signal transduction pathways in barley aleurone layers. *Plant molecular biology* 47 (3):437-448
- Shibata N, Kagiya M, Nakagawa M, Hirano Y, Hakoshima T (2010) Crystallization of the plant hormone receptors PYL9/RCAR1, PYL5/RCAR8 and PYR1/RCAR11 in the presence of (+)-abscisic acid. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66 (Pt 4):456-459. doi:10.1107/S1744309110007037

- Siegel RS, Xue S, Murata Y, Yang Y, Nishimura N, Wang A, Schroeder JI (2009) Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59 (2):207-220. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03872.x
- Simon S, Petrasek J (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci* 180 (3):454-460. doi:10.1016/j.plantsci.2010.12.007
- Singh A, Giri J, Kapoor S, Tyagi AK, Pandey GK (2010) Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genomics* 11:435. doi:10.1186/1471-2164-11-435
- Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2000) Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant physiology* 124 (4):1752-1765
- Soon FF, Ng LM, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MH, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang H, Yang H, Jiang H, Li J, Yong EL, Cutler S, Zhu JK, Griffin PR, Melcher K, Xu HE (2012) Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* 335 (6064):85-88. doi:10.1126/science.1215106
- Stewart DE, Sarkar A, Wampler JE (1990) Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J Mol Biol* 214 (1):253-260. doi:10.1016/0022-2836(90)90159-j
- Szep S, Park S, Boder ET, Van Duyne GD, Saven JG (2009) Structural coupling between FKBP12 and buried water. *Proteins* 74 (3):603-611. doi:10.1002/prot.22176
- Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61 (1):25-35. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04025.x
- 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 (6):477-482. doi:10.1038/nchembio.1524
- Terada T, Shirouzu M, Fukumori Y, Fujimori F, Ito Y, Kigawa T, Yokoyama S, Uchida T (2001) Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *J Mol Biol* 305 (4):917-926. doi:10.1006/jmbi.2000.4293
- Tossi V, Lamattina L, Cassia R (2009) An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *New Phytol* 181 (4):871-879. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02722.x
- Tougan K, Komatsu K, Bhyan SB, Sakata Y, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Takezawa D (2010) Evolutionarily conserved regulatory mechanisms of abscisic acid signaling in land plants: characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-like type 2C protein phosphatase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant physiology* 152 (3):1529-1543. doi:10.1104/pp.110.153387
- 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 (11):1821-1839. doi:10.1093/pcp/pcq156
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (41):17588-17593. doi:10.1073/pnas.0907095106

- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (21):11632-11637. doi:10.1073/pnas.190309197
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452 (7186):487-491. doi:10.1038/nature06608
- Valio IFM, Burdon RS, Schwabe WW (1969) New Natural Growth Inhibitor in the Liverwort *Lunularia cruciata* (L) Dum. *Nature* 223 (5211):1176-1178
- Verslues PE, Bray EA (2006) Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *Journal of experimental botany* 57 (1):201-212. doi:10.1093/jxb/erj026
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Lauriere C, Merlot S (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 21 (10):3170-3184. doi:10.1105/tpc.109.069179
- Walker-Simmons MK, Anderberg RJ, Rose PA, Abrams SR (1992) Optically pure abscisic Acid analogs-tools for relating germination inhibition and gene expression in wheat embryos. *Plant physiology* 99 (2):501-507
- Wang KL, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14 Suppl:S131-151
- Weng JK, Ye M, Li B, Noel JP (2016) Co-evolution of Hormone Metabolism and Signaling Networks Expands Plant Adaptive Plasticity. *Cell* 166 (4):881-893. doi:10.1016/j.cell.2016.06.027
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmulling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18):10487-10492. doi:10.1073/pnas.171304098
- Xie T, Ren R, Zhang YY, Pang Y, Yan C, Gong X, He Y, Li W, Miao D, Hao Q, Deng H, Wang Z, Wu JW, Yan N (2012) Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the Arabidopsis thaliana abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. *J Biol Chem* 287 (1):794-802. doi:10.1074/jbc.M111.313106
- Xu ZJ, Nakajima M, Suzuki Y, Yamaguchi I (2002) Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant physiology* 129 (3):1285-1295. doi:10.1104/pp.001784
- Xu ZY, Lee KH, Dong T, Jeong JC, Jin JB, Kanno Y, Kim DH, Kim SY, Seo M, Bressan RA, Yun DJ, Hwang I (2012) A vacuolar beta-glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 24 (5):2184-2199. doi:10.1105/tpc.112.095935
- Xue T, Wang D, Zhang S, Ehlting J, Ni F, Jakab S, Zheng C, Zhong Y (2008) Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* 9:550. doi:10.1186/1471-2164-9-550
- Yaffe MB, Schutkowski M, Shen M, Zhou XZ, Stukenberg PT, Rahfeld JU, Xu J, Kuang J, Kirschner MW, Fischer G, Cantley LC, Lu KP (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278 (5345):1957-1960

- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57:781-803. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444
- Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Wu D, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N (2009) Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16 (12):1230-1236. doi:10.1038/nsmb.1730
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 43 (12):1473-1483
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K (2006a) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *J Biol Chem* 281 (8):5310-5318. doi:10.1074/jbc.M509820200
- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2006b) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant physiology* 140 (1):115-126. doi:10.1104/pp.105.070128
- Yoshikawa H, Ichiki Y, Sakakibara KD, Tamura H, Suiko M (2002) The biological and structural similarity between lunularic acid and abscisic acid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66 (4):840-846. doi:10.1271/bbb.66.840
- Zaharia LI, Walker-Simmon MK, Rodríguez CN, Abrams SR (2005) Chemistry of Abscisic Acid, Abscisic Acid Catabolites and Analogs. *Journal of Plant Growth Regulation* 24 (4):274-284. doi:10.1007/s00344-005-0066-2
- Zhang X, Jiang L, Wang G, Yu L, Zhang Q, Xin Q, Wu W, Gong Z, Chen Z (2013) Structural insights into the abscisic acid stereospecificity by the ABA receptors PYR/PYL/RCAR. *PLoS One* 8 (7):e67477. doi:10.1371/journal.pone.0067477
- Zhang X, Zhang Q, Xin Q, Yu L, Wang Z, Wu W, Jiang L, Wang G, Tian W, Deng Z, Wang Y, Liu Z, Long J, Gong Z, Chen Z (2012) Complex structures of the abscisic acid receptor PYL3/RCAR13 reveal a unique regulatory mechanism. *Structure* 20 (5):780-790. doi:10.1016/j.str.2012.02.019
- Zhao Y, Chan Z, Xing L, Liu X, Hou YJ, Chinnusamy V, Wang P, Duan C, Zhu JK (2013) The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell Res* 23 (12):1380-1395. doi:10.1038/cr.2013.149
- Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Loewen MK, Jadhav AS, Ross AR, Taylor DC, Abrams SR (2004) A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant physiology* 134 (1):361-369. doi:10.1104/pp.103.030734
- Zhou Y, Xia X, Yu G, Wang J, Wu J, Wang M, Yang Y, Shi K, Yu Y, Chen Z, Gan J, Yu J (2015) Brassinosteroids play a critical role in the regulation of pesticide metabolism in crop plants. *Sci Rep* 5:9018. doi:10.1038/srep09018
- Zoldak G, Aumuller T, Lucke C, Hritz J, Oostenbrink C, Fischer G, Schmid FX (2009) A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases. *Biochemistry* 48 (43):10423-10436. doi:10.1021/bi9014242

Publikationen

Fuchs S, Tischer SV, **Wunschel C**, Christmann A, Grill E (2014) Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. PNAS 111 (15):5741-5746. doi:10.1073/pnas.1322085111

Benson CL, Kepka M, **Wunschel C**, Rajagopalan N, Nelson KM, Christmann A, Abrams SR, Grill E, Loewen MC (2014) Abscisic acid analogs as chemical probes for dissection of abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry. doi:10.1016/j.phytochem.2014.03.017

Franz-Oberdorf K, Langer A, Strasser R, Isono E, Ranftl QL, **Wunschel C**, Schwab W. (2017) Physical interaction between the strawberry allergen Fra a 1 and an associated partner FaAP: Interaction of Fra a 1 proteins and FaAP. Proteins. doi: 10.1002/prot.25343

Tischer SV, **Wunschel C**, Papacek M, Kleigrew K, Hofmann T, Christmann A, Grill E. (2017) Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. PNAS 114 (38):10280-10285. doi: 10.1073/pnas.1706593114

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Willi Wunschel
Geburtsdatum und –ort:	27.05.1984 in Marktredwitz
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung/akademischer Werdegang

seit 07/2011	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erwin Grill
10/2008 – 03/2011	Universität Bayreuth Master-Studiengang Biochemie und Molekulare Biologie Abschluss: Master of Science
10/2005 – 09/2008	Universität Bayreuth Bachelor-Studiengang Biochemie Abschluss: Bachelor of Science
10/2003 – 09/2005	Universität Bayreuth Diplom-Studiengang Chemie

Schulbildung

09/1994 – 06/2003	Besuch des Luisenburg-Gymnasiums Wunsiedel Abschluss: Abitur
09/1990 – 07/1994	Besuch der Grundschule Röslau

Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Erwin Grill dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen. Außerdem danke ich ihm für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Dr. Farhah Assaad danke ich dafür, dass sie sich immer die Zeit nahm, auch kurzfristig, wenn es darum ging Teile dieser Arbeit und Publikationen kritisch zu lesen.

Bei Dr. Alex Christmann bedanke ich mich nicht nur für die Reinigung der Liganden, sondern auch für seine Geduld, seinen Humor und seine Fröhlichkeit, die immer eine verlässliche Konstante im Laboralltag bildeten.

Bei Beate möchte ich mich dafür bedanken, dass sie immer alle bürokratischen Hürden beseitigte. Beate ohne dich würden wir alle untergehen. Danke dir!

Ein ganz besonderer Dank geht noch an Chrisi und Sepp für die schnelle Hilfe bei fehlendem Material, dringenden Klonierungen und kreativen Beschaffungswünschen. Zusammen hatten wir viel Spaß und dank euch war ich auch nicht immer der älteste in der Runde.

Außerdem möchte ich mich bei Michl und Steffi dafür bedanken, dass sie es schafften vieles zum Leben zu erwecken, was ich in meinem Glas sah. Auch wenn es übertrieben war, das Büro in einen Urwald zu verwandeln, nur um mir das Mysterium Pflanze näherzubringen.

Bei allen Botany Allstars and Friends bedanke ich mich für die gute Laune und die geniale Atmosphäre in Büro und Labor, aber auch für die mannigfaltigen Freizeitaktionen. Erst durch die Gemeinschaft an unserem Institut konnten die letzten Jahre zu dem werden was sie waren. Danke an euch!

Und zum Schluss möchte ich mich bei den wichtigsten Personen in meinen Leben; bei meinen Eltern und bei Kerstin bedanken. Danke für eure große Unterstützung durch die ihr mir vieles erst ermöglicht habt!