

Institut für Biochemie und Biologie
Arbeitsgruppe Pflanzenmetabolismus

**Identifizierung und Charakterisierung neuer Komponenten der
SnRK1-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"Doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Molekulare Pflanzenphysiologie"

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Madlen Nietzsche

Potsdam, April 2016

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Nietzsche, M., Schießl, I., Börnke, F. (2014) The complex becomes more complex: protein-protein interactions of SnRK1 with DUF581 family proteins provide a framework for cell- and stimulus type-specific SnRK1 signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* 5:54

Nietzsche, M., Landgraf, R., Tohge, T., Börnke, F. (2016) A protein-protein interaction network linking the energy-sensor kinase SnRK1 to multiple signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Current Plant Biology* 5:36-44

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-98678
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-98678>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis.....	vi
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Energie-/Zuckersensoren in Pflanzen.....	5
1.1.1 Glucosesensoren.....	6
1.1.2 Weitere Energiesensoren.....	8
1.2 Die SNF1/AMPK/SnRK1 Proteinfamilie.....	11
1.2.1 Aufbau des Komplexes.....	11
1.2.2 Regulation der SNF1, AMPK und der SnRK1.....	13
1.2.3 Biologische Prozesse an denen die SnRK1 beteiligt ist.....	20
1.2.4 Bekannte Zielprotein der SnRK1.....	23
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	27
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.2 Oligonukleotide, Vektoren und Sequenzierungen.....	28
2.1.3 Antikörper.....	28
2.1.4 Bakterienstämme.....	29
2.1.5 Hefestämme.....	29
2.1.6 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen.....	29
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Pflanzentransformation.....	31
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	32
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.4 Biochemische und physiologische Methoden.....	38
2.2.5 Mikroskopische Methoden.....	45
3 Ergebnisse.....	46
3.1 Identifizierung von Interaktionspartnern der <i>A. thaliana</i> SnRK1 α -Untereinheiten.....	46
AKIN10 und AKIN11.....	46
3.1.1 SnRK1 α -Untereinheiten interagieren in Hefe mit Proteinen der pflanzenspezifischen DUF581-Proteinfamilie.....	48
3.1.2 Die DUF581-Domäne ist ausreichend und notwendig für die Interaktion mit SnRK1.....	52

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Lokalisierung von DUF581-Proteinen in <i>N. benthamiana</i>	55
3.1.4	Die Ko-Expression mit DUF581-Proteinen beeinflusst die Lokalisierung von AKIN10.....	56
3.1.5	Interaktionsnachweis von SnRK1 α -Untereinheiten und DUF581-Proteinen <i>in planta</i>	58
3.2	Identifizierung von Interaktionspartnern der <i>A. thaliana</i> DUF581-Proteinfamilie	60
3.2.1	DUF581-2 interagiert mit den DELLA-Proteinen GAI und RGA in Hefe und <i>in planta</i>	64
3.3	AKIN10/AKIN11 und DUF581-18 haben STKR1 als gemeinsamen Interaktionspartner	66
3.3.1	Lokalisierung von STKR1 in <i>N. benthamiana</i>	70
3.3.2	<i>In planta</i> -Interaktionsnachweis von AKIN10 und STKR1	71
3.3.3	Die STKR1-Proteinmenge wird durch AKIN10 stabilisiert	72
3.3.4	Studien zur Phosphorylierung von STKR1	73
3.4	Herstellung und Analyse von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen mit veränderter <i>STKR1</i> -Expression.....	80
3.4.1	Herstellung von <i>STKR1</i> -überexprimierenden <i>A. thaliana</i> -Linien	81
3.4.2	Genotypisierung einer <i>stkr1</i> T-DNA-Insertionsmutante.....	81
3.4.3	Analyse von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen mit veränderter <i>STKR1</i> -Expression	82
4	Diskussion.....	99
4.1	Identifizierung neuer SnRK1-interagierender Proteine als mögliche Komponenten der SnRK1-Signaltransduktion	99
4.1.1	SnRK1-Untereinheiten interagieren mit DUF581-Proteinen.....	101
4.2	Identifizierung von Interaktionspartnern der DUF581-Proteine	105
4.3	AKIN10 und DUF581-Protein haben gemeinsame Interaktionspartner	110
4.4	STKR1, ein gemeinsamer Interaktionspartner von DUF581-18 und SnRK1 α -Untereinheiten in Arabidopsis	112
4.4.1	STKR1 ist ein Phosphoprotein mit potentiellen SnRK1-Zielmotiven	113
4.4.2	STKR1 beeinflusst das Wachstum und die Entwicklung in <i>A. thaliana</i>	117
4.4.3	Mögliche Korrelation des Wachstumsphänotyps durch <i>STKR1</i> -Überexpression mit dem Kohlenhydratmetabolismus	119
4.4.4	Transkriptionelle Analyse von <i>STKR1</i> -überexprimierenden Pflanzen	121
5	Literaturverzeichnis	126
6	Anhang.....	145

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Bp	Basenpaare
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (Blumenkohlmosaikvirus)
Col-0	Columbia
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i>
Fg	Frischgewicht
GA	Gibberellinsäure/Gibberelline
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GO	<i>Gene Ontology</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>HIS3</i>	<i>Imidazolglycerol-Phosphat-Dehydratase</i>
JA	Jasmonsäure
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
KT	Kurztag
<i>LacZ</i>	<i>β-Galactosidase</i>
LT	Langtag
MBP	Maltose-Bindeprotein
MeJa	Methyljasmonat
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
oD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PR	<i>Pathogenesis Related</i>
PTI	<i>PAMP-Triggered Immunity</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygene species</i>
SA	Salicylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Upm	Umdrehungen pro Minute
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Regulation des SnRK1-Komplexes.	20
Abbildung 1.2: Die Aktivierung der SnRK1 reguliert die Anpassung an stressinduzierten Energiemangel.	24
Abbildung 3.1: Direkte Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit CDKF;1 VIP1 und SKIN-ähnlichen Proteinen in Hefe.	48
Abbildung 3.2: Sequenzvergleich der DUF581-Domänen von <i>A. thaliana</i> DUF581-Proteinen.	50
Abbildung 3.3: Proteinsequenzvergleich der DUF581-Domäne von DUF581-7 und DUF581-8.	50
Abbildung 3.4: Interaktion von AKIN10 und AKIN11 mit DUF581-Proteinen aus Arabidopsis in Hefe.	51
Abbildung 3.5: Interaktion der <i>S. tuberosum</i> SnRK1 α -Untereinheit <i>StubSNF1</i> mit einem DUF581-Protein (<i>StubDUF581-6</i> -ähnlich) aus Kartoffel.	52
Abbildung 3.6: Die DUF581-Domäne ist ausreichend und notwendig in der Interaktion mit SnRK1.	53
Abbildung 3.7: Expressionsvergleich von Arabidopsis-Genen, die für DUF581-Protein codieren, mittels verfügbaren Microarray-Datensätzen der Genevestigator-Datenbank (Hruz et al., 2008).	54
Abbildung 3.8: Subzelluläre Lokalisierung von DUF581-GFP-Proteinen.	56
Abbildung 3.9: DUF581-GFP-Proteine ko-lokalisieren mit AKIN10-mCherry im Nucleus.	57
Abbildung 3.10: <i>In planta</i> -Interaktionsanalyse von AKIN10 bzw. AKIN11 und DUF581-Proteinen mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC).	60
Abbildung 3.11: Direkte Interaktion von DUF581-9-Interaktionspartnern mit anderen DUF581-Proteinen in Hefe.	62
Abbildung 3.12: Direkte Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit DUF581-Protein-Interaktionspartnern in Hefe.	63
Abbildung 3.13: DUF581-2 nicht aber AKIN10 bzw. AKIN11 interagiert mit GAI und RGA in Hefe.	64
Abbildung 3.14: <i>In planta</i> -Interaktionsanalyse von DELLA-Proteinen mit DUF581-Proteinen via Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC).	65
Abbildung 3.15: Arabidopsis Hefe-Zwei-Hybrid-Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk der SnRK1 α -Untereinheiten und DUF581-Proteine.	66
Abbildung 3.16: Direkte Interaktion von DUF581-Proteinen mit STKR1 in Hefe.	67
Abbildung 3.17: Direkte Interaktion von AKIN10/AKIN11/DUF581-18 mit STKR1 in Hefe.	67
Abbildung 3.18: Aminoterminal-verkürztes STKR1 interagiert mit AKIN10 in Hefe.	68
Abbildung 3.19: Interaktion von AKIN10- sowie DUF581-18-Deletionsmutanten und STKR1 in Hefe.	69
Abbildung 3.20: Die katalytische Domäne von AKIN10 interagiert mit DUF581-18.	70
Abbildung 3.21: Subzelluläre Lokalisierung von GFP-STKR1 in <i>N. benthamiana</i>	71
Abbildung 3.22: <i>In planta</i> -Interaktionsanalyse von AKIN10 und STKR1 mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC).	71
Abbildung 3.23: Ko-Immunopräzipitation von GFP-STKR1 und AKIN10-HA.	72
Abbildung 3.24: Stabilisierung von GFP-STKR1 durch AKIN10.	72
Abbildung 3.25: MG132-Behandlung inhibiert den Abbau von STKR1.	73
Abbildung 3.26: Nachweis von phosphoryliertem STKR1 aus Pflanzenextrakt.	75
Abbildung 3.27: <i>In vitro</i> -Kinase-Assay von STKR1 und AKIN10.	76

Abbildung 3.28: Subzelluläre Lokalisierung von STKR1 und zugehöriger Substitutionsmutanten.....	78
Abbildung 3.29: Einfluss des Verlusts eines potentiellen SnRK1-Zielmotivs von STKR1 auf die Dimerisierungseigenschaften.....	79
Abbildung 3.30: Der Verlust eines potentiellen SnRK1-Zielmotivs beeinflusst die Dimerisierung von STKR1 in Hefe.....	80
Abbildung 3.31: <i>Screening</i> -Western Blot zur Selektion STKR1-myc-exprimierender, stabil transformierter <i>A. thaliana</i> -Linien.....	81
Abbildung 3.32: Western Blot-Nachweis der stabilen Expression von <i>STKR1-myc</i> in der T ₃ -Generation.....	81
Abbildung 3.33: Verifizierung der T-DNA-Insertion der <i>stkr1</i> -Mutante.....	82
Abbildung 3.34: Phänotypische Charakterisierung der Linien 35S- <i>STKR1</i> #1, #2, #5 und <i>stkr1</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	83
Abbildung 3.35: <i>STKR1</i> -Überexpression bedingt eine verminderte Blattentwicklung und -expansion.....	84
Abbildung 3.36: Phänotyp der Linien 35S- <i>STKR1</i> #1/#2/#5 und <i>stkr1</i> im Vergleich zum Wildtyp während der reproduktiven Wachstumsphase.....	85
Abbildung 3.37: Gehalt an Chlorophyll und Carotinoiden der Linien 35S- <i>STKR1</i> #1/#2/#5 und <i>stkr1</i> sowie des Wildtyps.....	86
Abbildung 3.38: Anthocyanengehalt und <i>PAP1</i> -Expression in den Linien 35S- <i>STKR1</i> #1, #2, #5 und <i>stkr1</i> sowie des Wildtyps.....	88
Abbildung 3.39 Dunkelheit-induzierte Blattseneszenz.....	88
Abbildung 3.40: Quantifizierung der <i>SAG12</i> -Transkriptmenge in Pflanzen nach 7-wöchiger Anzucht auf Erde.....	89
Abbildung 3.41: Kohlenhydratgehalte von Arabidopsis-Pflanzen mit veränderter <i>STKR1</i> -Expression.....	90
Abbildung 3.42: Analyse der Genexpression von SnRK1-Markergenen in <i>A. thaliana</i> Col-0, 35S- <i>STKR1</i> -Linien und <i>stkr1</i>	92
Abbildung 3.43: Zuordnung deregulierter, biotischer Stress-assoziiierter Transkripte der 35S- <i>STKR1</i> -Linien verglichen mit Col-0 während der verlängerten Dunkelphase.....	94
Abbildung 3.44: Eine gesteigerte Expression von <i>STKR1</i> induziert die Expression von SAR-assoziierten Genen.....	97
Abbildung 3.45: Die erhöhte Expression von <i>STKR1</i> führt zur Hochregulierung von <i>ANAC016</i> und <i>ANAC087</i>	98
Abbildung 4.1: Model der Adaptorfunktion von DUF581-Proteinen in der SnRK1-Substratvermittlung.....	111
Abbildung 6.1: BiFC-Kontrollen zur Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit DUF581-Proteinen.....	149
Abbildung 6.2: BiFC-Negativkontrollen zur Interaktion von AKIN10 mit STKR1.....	150
Abbildung 6.3: Phänotypischer Vergleich der Linien 35S- <i>STKR1</i> #1/#2/#5 und <i>stkr1</i> im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.....	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Beste <i>blastx</i> -Treffer der mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung identifizierten möglichen AKIN10/AKIN11-Interaktionspartner.	47
Tabelle 3.2: In TAIR annotierte Proteine mit DUF581-Domäne.....	49
Tabelle 3.3: Beste <i>blastx</i> -Treffer der mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung identifizierten möglichen DUF581-Interaktionspartner..	61
Tabelle 3.4: Potentielle SnRK1-Phosphorylierungsmotive in STKR1.	73
Tabelle 3.5: Auswahl induzierter SAR-assoziiertes Transkripte in 35S- <i>STKR1</i> -Linien verglichen mit Col-0 während der verlängerten Dunkelphase.	95
Tabelle 3.6: Heraufregulierte ANAC- und WRKY-Transkriptionsfaktoren in 35S- <i>STKR1</i> -Linien verglichen mit Col-0 während der verlängerten Dunkelphase.....	96
Tabelle 6.1: GO-Anreicherung signifikant hochregulierter Gene in den 35S- <i>STKR1</i> -Linien im Vergleich zum Wildtyp nach einer verlängerten Dunkelphase.....	151
Tabelle 6.2: Deregulierte Gene der 35S- <i>STKR1</i> -Linien im Vergleich zu Col-0 während der Lichtphase.....	152
Tabelle 6.3: Deregulierte Gene der 35S- <i>STKR1</i> -Linien im Vergleich zu Col-0 während der verlängerten Dunkelphase.....	155

Zusammenfassung

Für alle Organismen ist die Aufrechterhaltung ihres energetischen Gleichgewichts unter fluktuierenden Umweltbedingungen lebensnotwendig. In Eukaryoten steuern evolutionär konservierte Proteinkinasen, die in Pflanzen als SNF1-RELATED PROTEIN KINASE1 (SnRK1) bezeichnet werden, die Adaption an Stresssignale aus der Umwelt und an die Limitierung von Nährstoffen und zellulärer Energie. Die Aktivierung von SnRK1 bedingt eine umfangreiche transkriptionelle Umprogrammierung, die allgemein zu einer Repression energiekonsumierender Prozesse wie beispielsweise Zellteilung und Proteinbiosynthese und zu einer Induktion energieerzeugender, katabolischer Stoffwechselwege führt. Wie unterschiedliche Signale zu einer generellen sowie teilweise gewebe- und stressspezifischen SnRK1-vermittelten Antwort führen ist bisher noch nicht ausreichend geklärt, auch weil bislang nur wenige Komponenten der SnRK1-Signaltransduktion identifiziert wurden.

In dieser Arbeit konnte ein Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk um die SnRK1 α -Untereinheiten aus Arabidopsis AKIN10/AKIN11 etabliert werden. Dadurch wurden zunächst Mitglieder der pflanzenspezifischen DUF581-Proteinfamilie als Interaktionspartner der SnRK1 α -Untereinheiten identifiziert. Diese Proteine sind über ihre konservierte DUF581-Domäne, in der ein Zinkfinger-Motiv lokalisiert ist, fähig mit AKIN10/AKIN11 zu interagieren. *In planta* Ko-Expressionsanalysen zeigten, dass die DUF581-Proteine eine Verschiebung der nucleo-cytoplasmatischen Lokalisierung von AKIN10 hin zu einer nahezu ausschließlichen zellkernspezifischen Lokalisierung begünstigen sowie die Ko-Lokalisierung von AKIN10 und DUF581-Proteinen im Nucleus. In Bimolekularen Fluoreszenzkomplementations-Analysen konnte die zellkernspezifische Interaktion von DUF581-Proteinen mit SnRK1 α -Untereinheiten *in planta* bestätigt werden. Außerhalb der DUF581-Domäne weisen die Proteine einander keine große Sequenzähnlichkeit auf. Aufgrund ihrer Fähigkeit mit SnRK1 zu interagieren, dem Fehlen von SnRK1-Phosphorylierungsmotiven sowie ihrer untereinander sehr variabler gewebs-, entwicklungs- und stimuluspezifischer Expression wurde für DUF581-Proteine eine Funktion als Adaptoren postuliert, die unter bestimmten physiologischen Bedingungen spezifische Substratproteine in den SnRK1-Komplex rekrutieren. Auf diese Weise könnten DUF581-Proteine die Interaktion von SnRK1 mit deren Zielproteinen modifizieren und eine Feinjustierung der SnRK1-Signalweiterleitung ermöglichen. Durch weiterführende Interaktionsstudien konnten DUF581-interagierende Proteine darunter Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen sowie regulatorische Proteine gefunden werden, die teilweise ebenfalls Wechselwirkungen mit SnRK1 α -Untereinheiten aufzeigten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eines dieser Proteine für das eine Beteiligung an der SnRK1-Signalweiterleitung als Transkriptionsregulator vermutet wurde näher charakterisiert. STKR1

(STOREKEEPER RELATED 1), ein spezifischer Interaktionspartner von DUF581-18, gehört zu einer pflanzenspezifischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktorfamilie und interagiert in Hefe sowie *in planta* mit SnRK1. Die zellkernspezifische Interaktion von STKR1 und AKIN10 in Pflanzen unterstützt die Vermutung der kooperativen Regulation von Zielgenen. Weiterhin stabilisierte die Anwesenheit von AKIN10 die Proteingehalte von STKR1, das wahrscheinlich über das 26S Proteasom abgebaut wird. Da es sich bei STKR1 um ein Phosphoprotein mit SnRK1-Phosphorylierungsmotiv handelt, stellt es sehr wahrscheinlich ein SnRK1-Substrat dar. Allerdings konnte eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung von STKR1 in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Der Verlust von einer Phosphorylierungsstelle beeinflusste die Homo- und Heterodimerisierungsfähigkeit von STKR1 in Hefeinteraktionsstudien, wodurch eine erhöhte Spezifität der Zielgenregulation ermöglicht werden könnte.

Außerdem wurden Arabidopsis-Pflanzen mit einer veränderten *STKR1*-Expression phänotypisch, physiologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Während der Verlust der *STKR1*-Expression zu Pflanzen führte, die sich kaum von Wildtyp-Pflanzen unterschieden, bedingte die konstitutive Überexpression von *STKR1* ein stark vermindertes Pflanzenwachstum sowie Entwicklungsverzögerungen hinsichtlich der Blühinduktion und Seneszenz ähnlich wie sie auch bei SnRK1 α -Überexpression beschrieben wurden. Pflanzen dieser Linien waren nicht in der Lage Anthocyane zu akkumulieren und enthielten geringere Gehalte an Chlorophyll und Carotinoiden. Neben einem erhöhten nächtlichen Stärkeumsatz waren die Pflanzen durch geringere Saccharosegehalte im Vergleich zum Wildtyp gekennzeichnet. Eine Transkriptomanalyse ergab, dass in den *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen unter Energiemangelbedingungen, hervorgerufen durch eine verlängerte Dunkelphase, eine größere Anzahl an Genen im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert war als während der Lichtphase. Dies spricht für eine Beteiligung von STKR1 an Prozessen, die während der verlängerten Dunkelphase aktiv sind. Ein solcher ist beispielsweise die SnRK1-Signaltransduktion, die unter energetischem Stress aktiviert wird. Die *STKR1*-Überexpression führte zudem zu einer verstärkten transkriptionellen Induktion von Abwehr-assoziierten Genen sowie NAC- und WRKY-Transkriptionsfaktoren nach verlängerter Dunkelphase. Die Transkriptomdaten deuteten auf eine stimulusunabhängige Induktion von Abwehrprozessen hin und konnten eine Erklärung für die phänotypischen und physiologischen Auffälligkeiten der *STKR1*-Überexprimierer liefern.

Summary

For all living organism maintenance of energy homeostasis under changing environmental conditions is indispensable. In eukaryotes, evolutionary conserved protein kinases, such as the SNF1-RELATED PROTEIN KINASE1 (SnRK1) in plants, integrate environmental stress signals, nutrient availability and energy depletion during adaptational responses. Activation of SnRK1 triggers a broad transcriptional reprogramming, which in general represses energy consuming processes such as proliferation and protein biosynthesis and induces energy producing catabolic pathways. Although SnRK1 acts as a convergent point for many different environmental and metabolic signals to control growth and development, it is currently unknown how these many different signals could be translated into a cell-type or stimulus-specific response. This is also due to the fact that only a few proteins participating in SnRK1 signal transduction have yet been identified.

In this work, a protein-protein interaction network of the Arabidopsis SnRK1 α -subunits AKIN10/AKIN11 was established. Thereby, members of the plant specific DUF581 protein family were identified as SnRK1 α interacting proteins. The highly conserved DUF581 domain possesses a zinc finger motif and mediates the interaction with AKIN10/AKIN11. *In planta* co-expression of AKIN10 with DUF581 proteins leads to a shift of subcellular localization from a nucleo-cytoplasmic distribution of both proteins to a nearly exclusive nuclear localization and show that AKIN10 and DUF581 proteins co-localize in nuclei of plant cells. Bimolecular fluorescence complementation analysis revealed that SnRK1 α -subunits interact with DUF581 proteins in plants. Apart from their DUF581 domain there is no strong sequence similarity between DUF581 proteins. Because of their ability to interact with SnRK1, the absence of SnRK1-target motifs and their highly variable transcriptional regulation in a tissue-, development- or stimuli-specific manner, it is possible that DUF581 proteins act as adaptor proteins recruiting substrate proteins into the SnRK1 complex under defined physiological conditions. That said, DUF581 could modify the interaction of SnRK1 with its target proteins and facilitate fine-tuning of SnRK1 signal transduction. Additional interaction studies revealed further DUF581 interacting proteins such as transcription factors, protein kinases and regulatory proteins that in part were also able to interact with SnRK1 α .

One of these proteins which is supposed to be involved in SnRK1 signaling as a transcriptional regulator was characterized in more detail: Arabidopsis STKR1 (STOREKEEPER RELATED 1) a DUF581-18 interaction partner belongs to a plant specific leucine zipper transcription factor family and is able to interact with SnRK1 in yeast and *in planta*. Co-operative regulation of target genes by STKR1 and AKIN10 is supported by the specific interaction of these proteins inside the plant nucleus. Furthermore, AKIN10 seems to stabilize protein levels of STKR1 in that it attenuates its proteasomal turnover. Due to the fact

that STKR1 is a phosphoprotein with putative SnRK1 target motives it is likely a SnRK1 substrate. However, SnRK1 mediated phosphorylation of STKR1 could not be shown in this work. Though, interaction studies in yeast revealed that a loss of putative phosphorylation sites influences the ability of homo- and hetero-dimerization of STKR1, possibly allowing a higher specificity during target gene regulation.

Another part of this work was the phenotypic, physiological and molecular characterization of Arabidopsis plants with altered expression of *STKR1*. Whereas the absence of *STKR1* expression results in plants without strong phenotypic abnormality compared to wildtype the overexpression leads to a strong decrease in plant growth as well as developmental retardations regarding to the induction of flowering and senescence reminiscent of SnRK1-overexpressing plants. Plants of these lines were not able to accumulate anthocyanins and also contain reduced levels of chlorophyll and carotenoids. Besides a higher starch turnover in dark, these plants displayed lower sucrose contents. Microarray analysis revealed that under energy deficit stress, induced by extended darkness, a higher number of genes were differentially regulated in plants overexpressing *STKR1* compared to wildtype than during the light period. This observation argues for a participation of STKR1 in processes, which are active under extended darkness, being the case for SnRK1 signaling which is strongly activated under energy deficient stress. Overexpression of *STKR1* also leads to transcriptional induction of genes associated with defense like NAC and WRKY transcription factors after an extended dark. Results of transcriptome data analysis indicate a stimulus independent induction of defense associated processes and are suitable to explain phenotypical and physiological abnormality of the *STKR1* overexpressing lines.

1 Einleitung

Als autotrophe Lebewesen sind Pflanzen in der Lage ihre Biomasse aus anorganischen Verbindungen selbst zu synthetisieren. Dies wird durch ihre Fähigkeit zur Photosynthese ermöglicht, wozu sie Lichtenergie, Wasser und Kohlendioxid benötigen. Durch die Photosynthese bilden Pflanzen einerseits den für eine Vielzahl von Organismen lebensnotwendigen molekularen Sauerstoff, welcher von diesen für die Atmung benötigt wird. Andererseits assimilieren Pflanzen durch die Photosynthese anorganischen Kohlenstoff, der in Form von Kohlenhydraten als Grundbaustein für eine Vielzahl von Biosynthesewegen dient. Die dadurch von Pflanzen als Primärproduzenten erzeugte Biomasse ist für unzählige andere Lebewesen aufgrund deren heterotropher Lebensweise eine essentielle Baustoff- und Energiequelle.

Im Gegensatz zu Tieren, die sich ungünstigen Umweltbedingungen i.d.R. durch einen Standortwechsel entziehen können, sind Pflanzen aufgrund ihres sessilen Lebensstils diesen ausgesetzt. Umso mehr sind Pflanzen darauf angewiesen sich den ständig variierenden Umwelteinflüssen anzupassen. Diese umfassen sowohl biotische Stressfaktoren, wie den Befall mit Phytopathogenen, als auch abiotischen Stress unter anderem ausgelöst durch Trockenheit, Hitze, Änderungen der Lichteinstrahlung, hohe Salzkonzentration und Überflutung.

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen komplexe inter- und intrazelluläre Signalnetzwerke entwickelt um die Vielzahl detektierter Umwelteinflüsse zu integrieren und das Überleben durch Abwehrreaktionen, angepasstes Wachstum und Entwicklung zu sichern. Dabei übernehmen Proteinkinasen durch Phosphorylierung ihrer Substrate, welche extra- und intrazelluläre Signale in zelluläre Antworten überführen, eine essentielle Funktion. Diese Phosphorylierungen können etwa Aktivitätsänderung von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren hervorrufen, welche die Anpassung an Stresssituationen begünstigen. Um Wachstum, Entwicklung und schließlich ihr Überleben unter den gegebenen Umweltbedingungen zu sichern, müssen Pflanzen ihren aktuellen Energie- und Kohlenstoffgehalt wahrnehmen und ihren Metabolismus entsprechend justieren. Um dies zu ermöglichen haben sich in Pflanzen mehrere Regulationssysteme entwickelt.

1.1 Energie-/Zuckersensoren in Pflanzen

Durch die Photosynthese sind Pflanzen in der Lage die Energie der Sonne in Kohlenhydrate umzuwandeln. Zentrale Zucker wie Glucose und Saccharose dienen der Pflanze nicht nur als Energiequelle, sondern wie mittlerweile bekannt ist, auch als wichtige Signalmoleküle. Sie agieren dabei als globale Regulatoren der Genexpression um den Metabolismus an die gegenwärtige Kohlenhydratverfügbarkeit anzupassen (Koch et al.,

Einleitung

1996; Rolland et al., 2002; Koch, 2004). Durch die Integration zusätzlicher Signale durch Phytohormone (Gazzarrini und McCourt, 2001; Rolland et al., 2002; León und Sheen, 2003; Gibson, 2004), aus dem Stickstoffkreislauf (Coruzzi und Bush, 2001; Coruzzi und Zhou, 2001), über Bestrahlungsänderungen (Ellis et al., 2002; Paul und Pellny, 2003) sowie Stress (Baena-González und Sheen, 2008) ermöglichen sie der Pflanze ihr Wachstum und die Entwicklung auf die aktuellen Konditionen zu justieren.

Zu den bisher in Pflanzen bekannten wachstumsfördernden Regulationssystemen gehören der HEXOKINASE (HXK) -Glucosesensor, der G-Protein-gekoppelte Signalweg über RGS1 (REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1), die Target of Rapamycin (TOR) -Kinase sowie das Signalmolekül Trehalose-6-Phosphat (T6P). Bei der Snf1 (Sucrose non-fermenting-1) -*related* Proteinkinase (SnRK1) und dem S1 bZIP-Transkriptionsfaktor-Netzwerk handelt es sich hingegen um wachstumshemmende Regulationssysteme (Smeekens et al., 2010). Die TOR-, T6P-, SnRK1- und S1 bZIP-Signalwege sind Glykolyse-abhängig, während HXK und RGS1 durch Glucose reguliert werden. Die genannten Regulationssysteme agieren zellautonom und beeinflussen einander teilweise in der Regulierung des Wachstums (Smeekens et al., 2010). So katalysiert die Hexokinase die Umsetzung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat (G6P), welches zusammen mit UDP-Glucose durch die Trehalose-6-Phosphat-Synthase (TPS) zu T6P umgewandelt wird. G6P und T6P inhibieren die Aktivität der SnRK1 (Toroser et al., 2000; Zhang et al., 2009), welche ihrerseits die Aktivität der S1 bZIP-Transkriptionsfaktoren beeinflusst (Ma et al., 2011; Mair et al., 2015). Weiterhin ist für das SnRK1-Ortholog in Säugetieren bekannt, dass es die TOR-Aktivität sowohl direkt als auch indirekt hemmt (Bolster et al., 2002; Inoki et al., 2003; Inoki et al., 2003; Kimura et al., 2003; Cheng et al., 2004).

1.1.1 Glucosesensoren

Das Monosaccharid Glucose kann sowohl als Metabolit als auch als Signalmolekül agieren und somit das Pflanzenwachstum und die Entwicklung beeinflussen (Sheen, 2014). Die Wahrnehmung von Glucose erfolgt in Pflanzen über mehrere Signalwege. Zum einen über die Plasmamembran durch den G-Protein-gekoppelten Signalweg unter Einbindung des REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1 (RGS1). In Arabidopsis ist der G-Protein-Komplex aus den G-Protein-Untereinheiten $G\alpha$ (AtGPA1), $G\beta$ (AtAGB1) und $G\gamma$ (AtAGG1/AtGG2), drei WNK-Kinasen (AtWNK1, AtWNK8 und AtWNK10) und dem 7-Transmembranprotein AtRGS1 aufgebaut (Temple und Jones, 2007). Im inaktiven GDP-gebundenen Zustand liegt AtRGS1 im Kern-G-Proteinkomplex gebunden vor. Dem spontanen Nucleotid-Austausch und somit der Bindung von GTP an AtGPA1 folgt die durch AtRGS1 unterstützte Hydrolyse von GTP durch AtGPA1. Dadurch wird der Komplex erneut in den inaktiven Zustand überführt und die G-Proteinsignalweiterleitung unterbrochen. Erfolgt

Einleitung

während des aktiven Zustands die Bindung von Glucose an AtRGS1, so führt diese Ligandenbindung zur Dissoziation von AtGPA1 und AtRGS1, wodurch zunächst die Hydrolyse von GTP unterbunden und damit die G-Protein-Signaltransduktion ermöglicht wird. Weiterhin hängt die nachhaltige Aktivierung des Glucosesignals teilweise von der Endocytose-vermittelten Entfernung des Ligand-gebundenem AtRGS1-Proteins von dem plasmamembranständigem Glucosesensor ab (Urano et al., 2012; Fu et al., 2014). Das G-Protein AtAGB1 rekrutiert hierfür über die WD40 *Repeat*-Untereinheit WNK-Kinasen, welche durch die Phosphorylierung von AtRGS1 die Endocytose auslösen. Dieser Signalweg ist an vielen zellulären biologischen Prozessen wie dem Zellwachstum und der Proliferation (Chen et al., 2006; Booker et al., 2010; Urano et al., 2012), der Chloroplastenentwicklung (Zhang et al., 2009), der Samenkeimung (Chen et al., 2006), der abiotischen Stresstoleranz (Chen et al., 2006; Colaneri et al., 2014) sowie der Morphogenese und Entwicklung (Chen und Jones, 2004; Chen et al., 2006) beteiligt.

Ein weiterer Glucosesensor ist die Hexokinase, welche im Gegensatz zum RGS1 die intrazelluläre Glucosekonzentration detektiert. HEXOKINASE1 (HXK1) agiert somit neben ihrer Funktion als Glucose-phosphorylierendes Enzym auch als Glucosesensor-Protein und ist in der Lage die Transkription von Glucose-regulierten Genen zu steuern. Diese Rolle der HXK1 als Glucosesensor und Signalweiterleiter ist unabhängig von ihrer enzymatischen Funktion (Moore et al., 2003). Die HXK1 ist hauptsächlich mit Mitochondrien assoziiert, aber eine kleine Fraktion der AtHXK1 bildet zusammen mit der vakuolären H⁺-ATPase B1 (vHA-B1) und dem regulatorischen Partikel des 19S Proteasoms RPT5B einen Ko-Repressor-Komplex, wodurch eine direkte Regulation spezifischer Zielgene ermöglicht wird (Cho et al., 2006). Dieser Ko-Repressor-Komplex bindet an die Promotoren spezifischer Gene wie *CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN2 (CAB2)* und *CARBONIC ANHYDRASE 2 (CA2)* und beeinflusst deren Expression unabhängig vom Glucosemetabolismus (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006). Die Arabidopsis-Mutanten *hxx1 (gin2, glucose insensitive2)*, *vha-b1* und *rpt5b* weisen einen einander ähnlichen Phänotyp auf. Dieser ist durch ein vermindertes Spross- und Wurzelwachstum, verzögerte Blüte und Seneszenz, einer veränderten Sensitivität gegenüber den Wachstumshormonen Auxin und Cytokinin (Ramon et al., 2008) sowie der Unempfindlichkeit gegenüber hohen Glucosekonzentrationen gekennzeichnet, welche in diesen Pflanzen nicht zu einem Entwicklungsstopp führen (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006). Huang und Kollegen (2015) zeigten, dass AtHXK1 und AtRGS1 *in planta* mit RHIP1 (RGS1-HXK1 INTERACTING PROTEIN 1) interagieren und dadurch eine Feinabstimmung der Expression einiger Glucose-regulierter Gene vermitteln (Huang et al., 2015).

Einleitung

1.1.2 Weitere Energiesensoren

1.1.2.1 Die TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) -Kinase

Ein weiterer Energiesensor ist die TOR-Kinase, die evolutionär konserviert ist und in Hefen, Pflanzen und Säugetieren Nährstoff- und Energiesignale integriert um die Zellproliferation und das Wachstum zu fördern (Xiong und Sheen, 2014). Heitman et al. (1991) zeigten in Hefe, dass Mutanten der TOR-Kinase resistent sind gegenüber Rapamycin, einem Inhibitor der Zellproliferation (Heitman et al., 1991). Die Hemmung der TOR erfolgt durch Bildung eines ternären Komplexes, welcher aus TOR, Rapamycin und dem FKBP12-Protein besteht (Wullschleger et al., 2006). Durch die Möglichkeit der spezifischen Inhibierung der TOR durch Rapamycin konnte die Funktion dieser Kinase gut untersucht werden. Studien zeigten, dass diese Kinase als regulatorische Schaltstelle dient, die externe sowie interne Einflüsse wie Nährstoffverfügbarkeit, Zellintegrität und die Anwesenheit von proliferationsfördernden Stimuli integriert um das Zellwachstum und die Zellteilung zu koordinieren. Der pflanzliche TOR-Komplex ist hingegen weniger gut erforscht, da die Mehrzahl der vielzelligen Landpflanzen nicht durch Rapamycin beeinflusst wird (Menand et al., 2002).

In Hefe und Säugetieren gibt es zwei TOR-Komplexe, den Rapamycin-sensitiven TORC1, welcher aus drei Hauptproteinen TOR, KOG1/RAPTOR und LST8/GbetaL aufgebaut ist. TORC2 stellt eine zusätzliche Kombination des Komplexes dar und besteht aus TOR, AVO3/RICTOR und LST8/GbetaL (Hara et al., 2002; Kim et al., 2003). Alle Komponenten des TORC1-Komplexes liegen auch in Pflanzen konserviert vor (Menand et al., 2004; Mahfouz et al., 2006; Dobrenel et al., 2011). Dass die TOR-Kinase essentielle Funktionen in Pflanzen innehat, zeigt sich schon dadurch, dass Mutationen des *TOR*-Gens in Arabidopsis embryonal sind (Menand et al., 2002). Der Verlust der Expression von *TOR* als Konsequenz von induzierter RNA-Stillegung resultiert zum einen in der Gelbfärbung der Blätter durch Chlorophyllabbau und zum anderen zu frühzeitiger Seneszenz (Deprost et al., 2007). In Hefe inhibiert Nährstoffmangel bedingt durch geringe Level an Kohlenstoff, Phosphor oder Stickstoff die TORC1-Aktivität (Beugnet et al., 2003; Urban et al., 2007). Durch Phosphorylierung der Untereinheit Raptor des mTORC1 Komplex reguliert die AMPK (AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE), das tierische Ortholog der pflanzlichen SnRK1, ihren Antagonisten direkt (Inoki et al., 2012). Eine Phosphorylierung von Raptor durch SnRK1 in Pflanzen wurde bis jetzt nicht gezeigt (Robaglia et al., 2012).

Eine Involvierung der TOR-Aktivität wurde auch bei der Unterdrückung der Seneszenz und des Nährstoff-Recyclings gezeigt. Nährstoff- oder Energiemangel lösen in Pflanzen Autophagieprozesse aus (Díaz-Troya et al., 2008; Liu und Bassham, 2010; Pérez-Pérez et al., 2010). Sowohl in Hefen wie auch in tierischen Zellen resultiert RNA-Interferenz von TOR

Einleitung

oder TAP46 in der Aktivierung von Autophagie (Liu und Bassham, 2010; Ahn et al., 2011). Im Säugetiermodell übernehmen TOR und AMPK gegensätzliche Rollen in der Induktion von Autophagie als Antwort auf Nährstofflimitierung. Beide Kinasen konkurrieren um die Phosphorylierung der ATG1/ULK1 (Kim et al., 2011). Dem ATG1/ATG13-Komplex kommt eine zentrale Rolle in der Regulierung von Autophagieprozessen als Erwiderung auf Änderungen des Nährstoffgehalts zu. So wurde für *atg13*-Mutanten eine Hypersensitivität gegenüber Kohlenstofflimitierung gezeigt (Suttangkakul et al., 2011). Unter guten Nährstoffbedingungen wird ATG13 durch TOR hypophosphoryliert. Dies führt zu einer modifizierten Interaktion mit ATG1, was wiederum Autophagieprozesse einschränkt.

Ein weiterer wichtiger Prozess an dem die TOR-Kinase beteiligt ist, stellt die Translation dar. Dieser energieverbrauchende Prozess ist gerade bei dem Zellwachstum während der Proliferation stark aktiv. Pflanzen mit konstitutiven *TOR* RNAi-Konstrukten zeigen eine verminderte Akkumulation von Polysomen und die dadurch bedingte Abnahme der Translation geht einher mit einer verminderten Größe der Pflanzen (Deprost et al., 2007). Ein weiteres Zielprotein der mTOR-Kinase ist die ribosomale S6 Kinase (S6K), welche ebenfalls in Pflanzen konserviert ist und eine stark verringert Phosphorylierung in *AtTOR* RNAi Arabidopsis-Pflanzen aufweist (Schepetilnikov et al., 2011; Xiong und Sheen, 2012).

1.1.2.2 Trehalose-6-Phosphat (T6P)

Wie bereits erwähnt spielen Kohlenhydrate nicht nur eine essentielle Rolle als zelluläre Energiequelle und Strukturkomponenten, sondern können auch Signalwirkung haben (Rolland et al., 2006; Eveland und Jackson, 2012; Lastdrager et al., 2014). Für das Intermediat der Trehalosebiosynthese, Trehalose-6-Phosphat, konnte in den letzten Jahren eine Beteiligung als Zuckersignal in zahlreiche Prozessen aufgedeckt werden. Trehalose ist ein nicht-reduzierendes Disaccharid, das aus zwei Glucosemolekülen gebildet wird, welche über eine α -1,1-glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Es ist in der Natur weitverbreitet und kann von einigen Spezies von Bakterien, Pilzen und Invertebraten in hohen Mengen akkumuliert werden, wobei es als Kohlenstoffreserve und kompatibles Solut dient (Elbein et al., 2003; Paul, 2008). In den meisten Pflanzen ist es nur in geringen Mengen nachweisbar, wodurch eine Rolle als Kohlenstoffreserve oder Stressmetabolit unwahrscheinlich ist. Interessanterweise ist eine Vielzahl von Trehalosebiosynthese Genen in pflanzlichen Organismen zu finden obgleich diese Trehalose nicht in hohen Mengen akkumulieren (Avonce et al., 2006).

T6P wird durch die Trehalose-6-Phosphat Synthase (TPS) aus Glucose-6-Phosphat und UDP-Glucose gebildet. Die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase (TPP) katalysiert anschließend die Abspaltung des Phosphatrestes, wodurch Trehalose entsteht. Diese kann durch Trehalase (TRE) in zwei Moleküle Glucose hydrolysiert werden. Das Arabidopsis-

Einleitung

Genom weist eine Vielzahl von Genen auf, die in die Trehalosebiosynthese involviert sind. So sind in Arabidopsis 11 TPS, 10 TPP und 1 TRE (Leyman et al., 2001; Lunn, 2007) zu finden, wobei nicht alle Proteine enzymatisch aktiv zu sind (Ramon et al., 2009). Durch Hefe-Komplementations-Studien mit Mutanten in der TPS- oder TPP-Aktivität, konnte zunächst nur für TPS1 eine TPS-Aktivität gezeigt werden (Blazquez et al., 1998). In einer aktuellen Studie wurde auch für TPS2 und TPS4 die Komplementation der Hefemutanten *Δtps1* und *Δtps2* durch Wachstum auf Glucose als Kohlenstoffquelle sowie die Akkumulation von T6P und Trehalose und somit eine TPS-Aktivität nachgewiesen werden (Delorge et al., 2015). Die TPS- und TPP-Gene weisen, auch wenn sie für katalytisch inaktive Enzyme codieren, ein breites Expressionsmuster während der pflanzlichen Entwicklung vom Embryo über Blätter und Blüten auf (Avonce et al., 2006; Yang et al., 2012). Für viele dieser Proteine ist ihre exakte Funktion noch unbekannt (van Dijken et al., 2004; Paul et al., 2008; Ramon et al., 2009; Gomez et al., 2010; Vandesteene et al., 2012). Gut untersucht ist hingegen die TPS1. Die *attps1* Funktionsverlust-Mutante ist embryoletal, während ein induzierter Verlust der Aktivität Wachstumsverzögerung bedingt (Eastmond et al., 2002; van Dijken et al., 2004). Im Jahr 2003 zeigten Schlupepman und Kollegen, dass die Expression der *E. coli* TPS in *attps1*-Pflanzen die Embryoletalität aufhebt und zur Entwicklung lebensfähiger Pflanzen führt, die allerdings eine Beeinträchtigung des Wachstums sowie eine verzögerte Blühinduktion aufweisen (Schlupepmann et al., 2003). Somit scheint *AtTPS1* in den gesamten Lebenszyklus von Arabidopsis involviert zu sein. Die Komplementation von *attps1* durch bakterielle TPS deutete darauf hin, dass primär das durch TPS gebildete T6P und nicht andere regulatorische Funktionen von *AtTPS1* für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sind. Die Überexpression von *AtTPS1* in Arabidopsis, welche in gesteigerten T6P-Gehalten resultiert, führt während der Keimung zur Unempfindlichkeit gegenüber hohen Glucose- und Abscisinsäure (*abscisic acid*, ABA) -Konzentrationen, welche in Wildtyp-Pflanzen die Keimungsrate negativ beeinflusst (Avonce et al., 2004; Leyman et al., 2006). Morphologisch zeigen diese Pflanzen bis auf eine veränderte Blühinduktion keine Unterschiede zu Wildtyp-Pflanzen (Avonce et al., 2004; Leyman et al., 2006). Der Einfluss erhöhter sowie verminderter T6P-Gehalte in Pflanzen wurde weiterhin durch die Überexpression bakterieller TPS (*otsA*) und TPP (*otsB*) analysiert. *otsA*-überexprimierende Pflanzen enthalten mehr T6P und sind gekennzeichnet durch eine verfrühte Blühinduktion, kleine Blätter und stark verzweigte Infloreszenzen. Ein erhöhter T6P-Gehalt untersuchter Pflanzen bedingt metabolische Änderungen, die sich positiv auf das pflanzliche Wachstum und die Entwicklung auswirken (Schlupepmann et al., 2004; Lunn et al., 2006; Martinez-Barajas et al., 2011; Wingler et al., 2012). Die Überexpression von *otsB* bedingt ein reduziertes T6P-Level und führt zu Pflanzen mit großen Blättern, wenig verzweigten Infloreszenzen, verminderter

Einleitung

Anthocyanakkumulation sowie einer Verzögerung der Blühinduktion und der Seneszenz (Schluepmann et al., 2003; Wingler et al., 2012).

Studien offenbarten, dass ein Kohlenstoffdefizit in einer Abnahme des T6P-Gehalts resultiert, wohingegen die Akkumulation von Zuckern einen schnellen Anstieg des T6P-Levels nach sich zieht (Schluepmann et al., 2004; Lunn et al., 2006; Delatte et al., 2011; Martinez-Barajas et al., 2011; Wingler et al., 2012). Eine Korrelation des T6P-Gehalts mit der Zuckerverfügbarkeit wurde daher vermutet. Lunn und Kollegen (2006) zeigten, dass der Gehalt an T6P die Saccharose-Konzentration reflektiert, womit für T6P die Funktion als Signal des Saccharose-Status in Pflanzen unterstützt wurde (Lunn et al., 2006; Lunn et al., 2014). Die umfangreichen Auffälligkeiten von Pflanzen mit verändertem T6P-Gehalt lassen darauf schließen, dass abgestimmte Mengen dieses Disaccharides essenziell für die Entwicklungsstadien von der Bildung des Embryos über das vegetative sowie reproduktive Wachstum bis hin zur Seneszenz sind. Die durch T6P-regulierten Prozesse umfassen weiterhin die Kohlenstoffverwertung, die Photosynthese und das Wachstum (Schluepmann et al., 2003; Zhang et al., 2009; Schluepmann et al., 2012; Martins et al., 2013; Yadav et al., 2014). Auch wenn der genaue Mechanismus, wie T6P das Wachstum und die Entwicklung kontrolliert, noch nicht genau bekannt ist, scheint diese Regulation zum Teil durch Inhibierung der Aktivität der SnRK1 ermöglicht. Diese inhibierende Funktion von T6P ist in Pflanzen konserviert und wurde sowohl in Mono- als auch in Dikotyledonen gezeigt (Zhang et al., 2009; Debast et al., 2011; Martinez-Barajas et al., 2011; Nunes et al., 2013).

1.2 Die SNF1/AMPK/SnRK1 Proteinfamilie

1.2.1 Aufbau des Komplexes

In Hefe ist die Serin/Threoninkinase SNF1 in die Adaption bei Glucosemangel involviert, wobei sie durch transkriptionelle Änderungen das Wachstum auf alternativen Kohlenstoffquellen ermöglicht. Orthologe der SNF1 sind in allen Eukaryoten zu finden (Polge und Thomas, 2007; Hardie, 2011) und werden generell durch zellulären Stress wie Hunger oder Hypoxie aktiviert, wobei sie anabolische Prozesse reprimieren und den Katabolismus hochregulieren um die Energie-Homöostase aufrechtzuerhalten (Ghillebert et al., 2011; Hardie, 2011). Die SNF1 aus Hefe, die AMPK der Säugetiere und die pflanzliche SnRK1 sind heterotrimere Komplexe, die aus jeweils einer α -, β -, und γ -Untereinheit aufgebaut sind (Polge und Thomas, 2007; Hedbacker und Carlson, 2008; Carling et al., 2012).

Der Hefe SNF1-Komplex setzt sich aus der α -Untereinheit Snf1, der γ -Untereinheit SNF4 und einer der drei β -Untereinheiten GAL83/SIP1/SIP2 zusammen. In Säugetieren existieren zwei α -Untereinheiten (AMPK α 1/AMPK α 2), β -Untereinheiten (AKIN β 1/AKIN β 2) und drei γ -Untereinheiten (AMPK γ 1/AMPK γ 2/AMPK γ 3) (Polge und Thomas, 2007). In Arabidopsis sind zwei α -Untereinheiten (AKIN10/AKIN11), drei β -Untereinheiten (AKIN β 1/AKIN β 2/AKIN β 3)

Einleitung

und zwei γ -Untereinheiten (AKIN γ /AKIN $\beta\gamma$) zu finden (Polge und Thomas, 2007). Die katalytische α -Untereinheit besteht aus einer Kinase-Domäne, welche einen Aktivierungs-*loop* (*T-loop*) enthält, und einer regulatorischen Domäne. Letztere weist bei der Snf1 und der AMPK eine autoinhibierende Sequenz (AIS) auf, welche in der Lage ist die Kinase-Aktivität zu inhibieren (Pang et al., 2008; Chen et al., 2009). Die AIS ist in Pflanzen nicht funktional und enthält stattdessen eine Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domäne. Es wird vermutet, dass diese zur Interaktion mit ubiquitinierten Proteinen dient (Farras et al., 2001). Im Carboxyterminus der α -Untereinheit befindet sich die Kinase-assoziierte1 (KA1) Domäne, welche sowohl die Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten als auch mit übergeordneten Phosphatasen vermittelt (Kleinow et al., 2000; Amodeo et al., 2007; Xiao et al., 2011; Rodrigues et al., 2013).

Die β -Untereinheit enthält ein Kohlenhydrat-bindendes Motiv (*carbohydrate binding motif*, CBM), welches im Falle der β -Untereinheiten der AMPK sowie GAL83 und Sip2 des SNF1-Komplexes in *in vitro*-Experimenten Glycogen binden konnte (Wiatrowski et al., 2004; McBride et al., 2009). Hingegen können die CBMs in SnRK1 keine Kohlenhydrate binden (Emanuelle et al., 2015). Für die aminoterminalen Verlängerungen der β -Untereinheiten wird vermutet, dass sie die Assoziation mit nachfolgenden Zielproteinen vermitteln und für die subzelluläre Lokalisierung des trimeren Komplexes in Hefe von Bedeutung sind (Hedbacker und Carlson, 2008). Carboxyterminal enthalten β -Untereinheiten eine ASC (Association with SNF1 Complex) -Domäne, die für die Interaktion mit der γ -Untereinheit dient. Neben den bereits näher beschriebenen Untereinheiten, besitzen Pflanzen noch zwei untypische Untereinheiten. Zum einen die β_3 -Untereinheit sowie die $\beta\gamma$ -Untereinheit, eine γ -Untereinheit, welche aminoterminal zusätzlich eine CBM-Domäne aufweist (Lumbreras et al., 2001). Gissot et al. (2004) zeigten, dass die pflanzenspezifische β_3 -Untereinheit, die nur die ASC Domäne enthält, die Hefemutante *gal83 Δ sip1 Δ sip2 Δ* , der alle drei β -Untereinheiten fehlen, komplementiert (Gissot et al., 2004). Dadurch kommt in der Hefe der β -Untereinheit wahrscheinlich die vornehmliche Rolle als Stabilisator zu, der die α - und die γ -Untereinheit zusammenhält. In Hefe und Säugetieren kontrolliert die γ -Untereinheit durch Bindung von Adenylaten an ihre Cystathionin- β -Synthase (CBS) Domäne die Aktivität der katalytischen α -Untereinheit (Bateman, 1997; Hedbacker und Carlson, 2008; Carling et al., 2012). Die Bindung von AMP an die γ -Untereinheit bewirkt eine Konformationsänderung der AMPK, wodurch sie ein geeigneteres Substrat für die Phosphorylierung des Thr172 durch die LKB1 darstellt. Sowohl die Bindung von AMP als auch von ADP hemmt die Dephosphorylierung des Thr172 (Xiao et al., 2011; Gowans et al., 2013). Eine Vielzahl γ -ähnlicher Untereinheiten ist in Pflanzen bekannt, allerdings wurde *in vivo* durch transiente Überexpression verschiedener Kombinationen von Untereinheiten in Mesophyllzellen bisher nur für die $\beta\gamma$ -Untereinheit eine Interaktion mit der β -Untereinheit und die Anordnung in einem

Einleitung

heterotrimeren Komplex gezeigt (Ramon et al., 2013; Emanuelle et al., 2015). Die β -Untereinheit ist bisher auch die einzige Untereinheit, welche die Hefemutante *snf4 Δ* , die durch den Verlust der SNF1 γ -Untereinheit gekennzeichnet ist, komplementieren kann (Ramon et al., 2013).

1.2.2 Regulation der SNF1, AMPK und der SnRK1

1.2.2.1 Posttranslationale Modifikation

Die Regulierung dieser Energiesensor-Kinasen erfolgt auf mehreren Ebenen, wobei hier zunächst die gewebs- oder stimuluspezifische transkriptionelle Regulation sowie die Zusammensetzung des Komplexes genannt werden sollte. Zusätzlich können SNF1 und AMPK durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Eine essentielle Regulierung erfolgt über die Phosphorylierung eines konservierten Threonins im *T-loop* der katalytischen Untereinheit (SnRK1 α 1T175/SnRK1 α 2T176, AMPK α T172, Snf1T210). Diese Modifikation ist essentiell für die SNF1/AMPK/SnRK1-Aktivität (Stein et al., 2000; McCartney und Schmidt, 2001; Baena-Gonzalez et al., 2007; Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010). Unter hohen Glucosekonzentrationen liegt die Snf1 in Hefezellen überwiegend dephosphoryliert und somit in ihrem inaktiven Zustand vor. Dem Transfer der Hefen auf glucosearmes Medium folgt die Aktivierung der Snf1 durch Phosphorylierung innerhalb ihres *T-Loops* am T210, (McCartney und Schmidt, 2001). Diese Aktivierung wird benötigt um die Repression von Genen während der Mangelphase aufzuheben und erfolgt etwa durch Phosphorylierung des Transkriptionsregulators Mig1, der als Folge der Phosphorylierung aus dem Repressor-Komplex gelöst und aus dem Zellkern exportiert wird. In Hefe wird die SNF1 durch Phosphorylierung der Kinasen Elm1, Tos3 und Sak1 aktiviert. Das Fehlen dieser Kinase in der Tripelmutante *sak1 Δ elm1 Δ tos3 Δ* führt zum gleichen Phänotyp wie das der *snf1 Δ* -Mutante (Hong et al., 2003). Die SNF1-aktivierenden Kinasen sind teilweise funktionell redundant. Erst der Verlust aller drei Kinasen verhindert das Wachstum auf alternativen Kohlenstoffquellen (Hong et al., 2003). Die Entfernung der Phosphorylierung erfolgt durch Protein-Phosphatasen (PP), wie der PP1-Phosphatase GLC7, der PP2C-Phosphatase Ptc1 oder der Typ 2A-Phosphatase (PP2A) Sit4 (Hedbacker und Carlson, 2008; Ruiz et al., 2011, 2013). In Säugetieren resultiert metabolischer Stress, der einhergeht mit einem verstärkten ATP-Verbrauch oder einer Beeinträchtigung der ATP-Synthese, in der Aktivierung der AMPK, wobei diese Aktivität ebenfalls von der Phosphorylierung eines konservierten Threoninrests im Aktivierungs-*loop* der Kinase abhängt (Stein et al., 2000; Hardie, 2011). Dies erfolgt zum einen durch LKB1 (LIVER KINASE B1) (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003) oder die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase CaMKK β , wodurch Ca²⁺ in die AMPK-Signalweiterleitung integriert werden kann (Hardie und Sakamoto, 2006). Die

Einleitung

Dephosphorylierung der AMPK erfolgt durch die Phosphatasen PP1, PP2A und PP2C (Carling et al., 1989; Davies et al., 1995; Garcia-Haro et al., 2010).

In Pflanzen erfolgt die Aktivierung der SnRK1 durch einen sinkenden Kohlenhydratstatus unter Bedingung, wie etwa Dunkelheit und Hypoxie, die zu einem Energieverlust führen. Diese Konditionen veranlassen unter anderem die Mobilisierung von Speicherreserven und initiieren Prozesse um einem Energiedefizit entgegenzuwirken, wie z.B. selektive Autophagie (Baena-Gonzalez et al., 2007). Andererseits werden Energie-verbrauchende Prozesse wie beispielsweise die Proteintranslation und die Zellproliferation inhibiert. Analog zu SNF1 und AMPK wird auch die SnRK1 durch übergeordnete Kinasen phosphoryliert. Die Aktivierung der SnRK1 durch *AtSnAK1/GRIK2* und *AtSnAK2/GRIK1* (SNF1-ACTIVATING KINASES/GEMINIVIRUS Rep-INTERACTING KINASE) (Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010) konnte zwar gezeigt werden, aber transkriptionelle Änderungen von Zielgenen ergaben sich durch Änderung des Phosphorylierungsstatus nicht (Baena-Gonzalez et al., 2007). So konnten in Pflanzen im Hinblick auf die *T-Loop*-Phosphorylierung keine Unterschiede in Zellextrakten unter Kontroll- und Stressbedingungen detektiert werden (Baena-Gonzalez et al., 2007; Fragoso et al., 2009; Coello et al., 2012; Rodrigues et al., 2013). Daher wird vermutet, dass zusätzliche Phosphoreste oder andere Mechanismen in die Kontrolle der Aktivität unter Stressbedingungen involviert sind (Crozet et al., 2014). So konnten Nunes et al., (2013) mittels Größen-Fraktionierung eine höhere *T-Loop*-Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit innerhalb des SnRK1-Komplexes nachweisen, wodurch die Phosphorylierungs-vermittelte Aktivierung der α -Untereinheit eventuell erst durch die Komplexbildung ermöglicht wird (Nunes et al., 2013).

Eine weitere Regulierungsmöglichkeit dieser Proteinkinasen ergibt sich durch N-Myristoylierung, wodurch Proteine an Membranen fixiert werden können. So wird etwa die cytosolische Sip1 bei Kohlenstoffstress durch N-Myristoylierung an die Vakuolenmembran rekrutiert (Hedbacker et al., 2004). Die Sip1 befindet sich in Hefen, die auf Glucose als Kohlenhydratquelle wachsen, im Cytosol. Dem Transfer der Zellen auf Kohlenhydratmangelmedium, wodurch eine Stressreaktion ausgelöst wird, folgt die Bindung der Sip1 sowie der Snf1 an die vakuoläre Membran (Hedbacker et al., 2004). Auch die β -Untereinheit Sip2 der Hefe kann myristoyliert werden und eine fehlende N-Myristoylierung der Sip2 aus Hefe führt zu einem Verlust der Resistenz auf Nährstoffmangel sowie einer verkürzten Lebensdauer (Lin et al., 2003). Durch Myristoylierung der beiden β -Untereinheiten (β 1, β 2) der AMPK kann sowohl die Aktivität als auch die subzelluläre Lokalisierung des Komplexes beeinflusst werden, da die Myristoylierung die Bindung der AMPK an die Zellmembran bedingt (Mitchelhill et al., 1997; Warden et al., 2001; Oakhill et al., 2010). Die Myristoylierung der β -Untereinheit ist essentiell für die AMP-vermittelte Aktivierung, da erst dadurch die vollständige AMPK-Aktivierung durch übergeordnete Kinase erfolgen kann

Einleitung

(Oakhill et al., 2010). Die SnRK1 kann wie ihre Orthologe SNF1 und AMPK posttranslational durch N-Myristoylierung modifiziert werden. Arabidopsis Mutanten mit Beeinträchtigungen der N-Myristoyltransferase (NMT) weisen diverse Grade von Auffälligkeiten des Sprossapikalmeristems auf. Der vollständige Verlust der NMT in *nmt1-1*-Mutanten führt zu einem Einstellen des Wachstums nach der Keimung, welches unter anderem durch das Fehlen der Myristoylierung der SnRK1 β 1- und β 2-Untereinheit bedingt ist (Pierre et al., 2007). GFP-Fusionsproteine der β 1- und β 2-Untereinheiten sind mit der Plasmamembran assoziiert, wohingegen G2A-Mutanten, die nicht mehr myristoyliert werden können, nicht mehr an die Plasmamembran gebunden vorliegen, sondern im Falle der β 1 im Nucleus und der β 2 im Cytoplasma lokalisieren. Durch das Zurückhalten des Komplexes an der Plasmamembran, einer 5-fach höheren SnRK1 Kinase-Aktivität der *nmt1-1*-Mutanten sowie der Beobachtung, dass *nmt1-1*-Mutanten Glucose-hypersensibel sind, wird angenommen, dass die Myristoylierung als negativer Regulator des SnRK1-Signalweges fungiert (Pierre et al., 2007).

Auch eine Regulierung der katalytischen Untereinheit Snf1 in Hefe durch SUMOylierung von der E3-SUMO-Ligase Mms21 ist bekannt. SUMO (SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER) sind kleine Proteine, die an Substratproteine angefügt werden um deren Aktivität oder die Lokalisierung zu beeinflussen. In Anwesenheit von Glucose wird SUMO kovalent an Snf1K549 gebunden, wodurch die Snf1 unabhängig von der *T-Loop*-Phosphorylierung inhibiert und somit der Glucosemangel-Antwort entgegengewirkt wird (Simpson-Lavy und Johnston, 2013). Die Autoren der Studie vermuten, dass die SUMOylierung zu einer intramolekularer Konformationsänderung führt und eine inaktive Konformation der Snf1 bedingt. Die SUMOylierung macht Snf1 außerdem zu einem Substrat für die SUMO-stimulierte E3-Ubiquitinligase Slx5-Slx8. Diese Interaktion führt zum Proteasom-vermittelten Abbau von Snf1 in der Zelle als Reaktion auf einen erhöhten Glucosespiegel. Die SUMOylierung der Snf1 ist reversibel, da die SUMO-Protease Ulp1 diese entfernen kann (Simpson-Lavy und Johnston, 2013). Moreno et al. (2009) zeigten die Interaktion von AMPK-Untereinheiten mit E2 SUMO-konjugierenden Enzymen in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen (Moreno et al., 2009). Auch der AMPK-Komplex kann durch SUMOylierung reguliert werden (Rubio et al., 2013), wobei die Hyper-SUMOylierung der β 2-Untereinheit die Aktivität des AMPK heterotrimeren Komplex steigert, was einerseits durch eine erhöhte *T-Loop*-Phosphorylierung der AMPK α 2 sowie einer gesteigerten Phosphorylierung des AMPK-Zielproteins Acetyl-CoA Carboxylase bestätigt wurde. Die AMPK β 2-SUMOylierung steht in Konkurrenz zu der Ubiquitinierung und wirkt daher antagonistisch zum Ubiquitin-vermittelten Abbau und der daraus resultierenden Verminderung der Aktivität des gesamten AMPK-Komplexes (Rubio et al., 2013). Durch das Anfügen von Ubiquitin kann die Stabilität von Proteinen verändert werden. Während des Wachstums auf alternativen Kohlenstoffquellen

Einleitung

hat beispielsweise Ubiquitinierung einen negativen Effekt auf die Stabilität, Phosphorylierung und Aktivität von Snf1 in Hefe. Wie bei der SUMOylierung kann auch die Ubiquitinierung aufgehoben werden (Wilson et al., 2011).

Wie schon im Falle der SNF1 und der AMPK kann auch die SnRK1 durch SUMOylierung reguliert werden. Für die SnRK1 α 1 wurde die Interaktion mit einem E2 SUMO-konjugierenden Enzym und der SUMO-Protease ESD4 in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen gezeigt (Elrouby und Coupland, 2010). Die Autoren zeigten, dass die katalytische α -Untereinheit sowohl mit SUMO1 als auch mit SUMO3-Isoformen SUMOyliert wird. Die Funktion von SUMOylierungen schließt eine Beteiligung an abiotischen Stressantworten in Pflanzen ein (Castro et al., 2012). In der Arabidopsis *siz1*-Mutante, die durch einen Verlust der SUMO E3 Ligase SAP und Miz 1 (SIZ1) gekennzeichnet ist, wurden höhere SnRK1 α 1-Level detektiert, wodurch für SIZ in regulierende Rolle der SnRK1-Homöostase vermutet wird (Castro et al., 2015). Die Autoren derselben Studie konnten für SIZ eine Beteiligung an der Kontrolle des Keimungszeitpunkt und des Sämlingwachstums über osmotische- und Zucker-abhängige Signalwege belegen. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass die SIZ1-vermittelte SUMOylierung von SnRK1-Untereinheiten, deren Ubiquitinierung und damit den proteasomale Abbau von SnRK1 begünstigt (Crozet et al., 2016). Dabei ist die SUMOylierung abhängig von der SnRK1-Aktivität. Somit ist SIZ1 in der Lage das SnRK1-Aktivitätssignal zu unterdrücken und eine Hyperaktivierung der Stressantwort zu vermeiden (Crozet et al., 2016).

1.2.2.2 Regulation durch Adenylate

Wie schon die Regulation durch Phosphorylierung oder SUMOylierung ist auch die Kontrolle durch Adenylate für alle SNF1/AMPK/SnRK1-Kinasen bekannt (Sugden et al., 1999; Mayer et al., 2011; Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011). So wird die AMPK durch Bindung von AMP an der γ -Untereinheit allosterisch aktiviert (Carling et al., 1987; Scott et al., 2004). Ein hoher Gehalt an AMP signalisiert einen niedrigen zellulären Energiestatus und den Bedarf an ATP. Die AMP-spezifische Aktivierung (Gowans et al., 2013) resultiert in einer gesteigerten Affinität als Substrat für die übergeordnete Kinase LKB1 (Hawley et al., 1995; Oakhill et al., 2010; Gowans et al., 2013; Zhang et al., 2013). Sowohl die Bindung von AMP als auch von ADP an die γ -Untereinheit bedingt eine Konformationsänderung des AMPK-Komplexes und vermindert dadurch die Dephosphorylierung und Inaktivierung durch Phosphatasen (Davies et al., 1995; Suter et al., 2006; Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011; Chen et al., 2012; Chen et al., 2015). Dabei schützt die AMP-Bindung stärker vor Dephosphorylierung als die ADP-Bindung (Gowans et al., 2013). Die Bindung der Adenylate erfolgt an CBS-Domänen. Die AMPK γ weist vier CBS-Domänen auf (Bateman, 1997), wobei die erste und dritte Domäne Adenylate reversibel binden (Scott et al., 2004; Xiao et al., 2007)

Einleitung

jedoch das an der vierten Domäne gebundene AMP nicht austauschbar ist (Xiao et al., 2011). Die drei Domänen sind gleichwertig für die allosterische Aktivierung und dem Schutz vor Phosphatasen (Oakhill et al., 2010; Gowans et al., 2013), aber abhängig von Myristoylierung der AMPK β (Oakhill et al., 2010). Im Gegensatz zur AMPK wird die SNF1 der Hefe nicht allosterisch durch die Bindung von AMP aktiviert, allerdings wird auch die SNF1 durch ADP-Bindung vor Dephosphorylierung und somit Inaktivierung geschützt (Wilson et al., 1996; Chandrashekarappa et al., 2011; Mayer et al., 2011). Es wird vermutet, dass das ADP nach der Substratphosphorylierung gebunden bleibt und dadurch die Phosphorylierung durch übergeordnete Kinasen verhindert wird (Chandrashekarappa et al., 2013). Analysen von gereinigtem SnRK1-Komplex aus Spinatblättern zeigte, dass AMP-Bindung auch den SnRK1-Komplex vor Dephosphorylierung schützt, wenn dieser mit rekombinanter tierischer PP2C inkubiert wurde (Sugden et al., 1999). Aufgrund der Konservierung des Komplexes in Eukaryoten sowie der Tatsache, dass die pflanzlichen Untereinheiten in der Lage sind Hefemutanten zu komplementieren, wird ein ähnlicher Mechanismus der Regulierung der SnRK1 durch Adenylate vermutet (Polge und Thomas, 2007).

1.2.2.3 Regulation durch Hormone

Eine weitere Ebene der Regulierung wird durch Hormone ermöglicht. In Säugetieren bewirkt das Polypeptid Leptin, welches von Adipozyten freigesetzt wird, eine schnelle Aktivierung des AMPK α 2-Komplexes in quergestreifter Muskulatur (Skelettmuskulatur), was zum Fettsäureabbau durch β -Oxidation führt (Minokoshi et al., 2002). Im Hypothalamus hingegen wird die AMPK α 2 durch Leptin inhibiert (Minokoshi et al., 2004). Das Hormon Adiponektin agiert im Hypothalamus als Antagonist des Leptins, da es die AMPK aktiviert, was in gesteigertem Appetit (Kubota et al., 2007) resultiert. Auch für die Hormone Ghrelin, Insulin und Schilddrüsenhormon Triiodthyronin wurden Effekte auf die AMPK-Aktivität beschrieben (Hardie und Ashford, 2014).

Wie die AMPK wird auch die SnRK1 durch Hormone reguliert, wobei hier dem Phytohormon ABA eine große Rolle besonders in der Samenreifung und Keimung zukommt (Lu et al., 2007; Radchuk et al., 2010; Tsai und Gazzarrini, 2012). In photosynthetisch aktivem Gewebe inhibiert ABA die 2C-Type Phosphatasen ABI1 und PP2CA, negative Regulatoren der SnRK1, was die Aktivierung der SnRK1 begünstigt (Rodrigues et al., 2013). Durch diese Möglichkeit der Regulierung kann ABA die Aktivierung der SnRK1 in Geweben ermöglichen, die nicht direkt unter Energiemangel leiden (Crozet et al., 2014). Ähnlich wie schon Leptin bei der AMPK kann auch ABA im Falle der SnRK1 in unterschiedlichen Geweben einen entgegengesetzten Einfluss haben. Während es in heterotrophen Geweben durch die Inhibierung von SnRK1-Phosphatasen einen positiven Effekt auf die SnRK1-Aktivität hat, sind auch SnRK1-hemmende bekannt. Im Verlauf der Keimung und der frühen

Einleitung

Wachstumsphase unterdrückt ABA über SnRK1A-interagierende negative Regulatoren die SnRK1-Signaltransduktion (Lin et al., 2014). Auch in Weizenwurzeln konnte ein negativer Effekt von ABA auf die SnRK1 festgestellt werden, wobei dies durch die Induktion des SnRK1-Proteinabbaus erfolgte (Coello et al., 2012).

1.2.2.4 Regulation durch Kohlenhydrate

SnRK1/Snf1/AMPK-Kinasen sind Sensoren des Energielevels und werden durch Energieverminderung oder metabolischen Stress aktiviert um das Wachstum zu inhibieren, Energie zu konservieren und somit das Überleben während ungünstigen Bedingungen zu sichern (Hardie, 2007; Baena-González und Sheen, 2008; Hedbacker und Carlson, 2008; Halford und Hey, 2009; Ghillebert et al., 2011; O'Hara et al., 2013). Da verringerte Energiegehalte häufig eng mit der Kohlenhydratverfügbarkeit assoziiert sind, ist eine Regulierung der SnRK1/Snf1/AMPK-Kinasen durch Kohlenhydrate sinnvoll. So wird die SNF1 unter Glucosemangel aktiviert um alternative Kohlenstoffquellen nutzbar zu machen, die aufgrund der energieärmeren und damit bevorzugten Metabolisierung von Glucose nicht genutzt werden. Im Gegenzug erfolgt eine schnelle Inaktivierung der SNF1 als Folge eines Glucosestimulus (Hedbacker und Carlson, 2008). Auch die AMPK-Aktivität wird durch Glucose inhibiert (Itani et al., 2003; Minokoshi et al., 2004), wobei dies möglicherweise indirekt über die direkte Aktivierung von PP1- und PP2A-Phosphatasen, die zur Dephosphorylierung der AMPK fähig sind, erfolgt (Ravnskjaer et al., 2006; Castermans et al., 2012). Die β -Untereinheit der SNF1 und der AMPK sind wie bereits erwähnt in der Lage Glycogen zu binden, was zur Inhibierung der Kinaseaktivität führt (Wiatrowski et al., 2004; McBride et al., 2009). Da Glykogen, welches aus Glucoseeinheiten aufgebaut ist, als Energiespeicher dient, wird somit eventuell nicht nur die direkte unmittelbare Energie wahrgenommen, sondern auch Energiereserven (McBride et al., 2009).

Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten der SnRK1-Regulierung, konnte auch die Kontrolle der SnRK1-Aktivität durch Kohlenhydrate gezeigt werden. Die Gehalte des T6P korrelieren stark mit dem der primären Zuckertransportform Saccharose, wodurch für T6P Signale angenommen wird, dass es Informationen über die aktuelle Kohlenhydratverfügbarkeit vermitteln kann (Lunn et al., 2006). Eine T6P-Akkumulation als Folge hoher Saccharosegehalte inhibiert die SnRK1-Aktivität in wachsenden Geweben, aber nicht in ausdifferenzierten (Zhang et al., 2009; Paul et al., 2010). Es wird vermutet, dass diese Inhibierung durch ein Protein vermittelt wird, welches nur in bestimmten Geweben (Keimlinge, junge Blätter) zu finden ist (Zhang et al., 2009). Unter optimalen Bedingungen mit guter Nährstoffverfügbarkeit und hohem Saccharosegehalt ist auch der T6P-Gehalt erhöht, wodurch die SnRK1 Aktivität reprimiert wird. Als Folge einer verminderten Zuckerverfügbarkeit sinkt das T6P-Level als Reaktion auf einen verminderten Saccharose-

Einleitung

gehalt, was zu einer Zunahme der SnRK1-Aktivität führt. Die T6P-vermittelte Inaktivierung der SnRK1 konnte ebenfalls in Zuckerrohr, Weizenkörnern, und Kartoffelknollen beobachtet werden (Wu und Birch, 2010; Debast et al., 2011; Martinez-Barajas et al., 2011). Diese Beobachtungen werden dadurch bestätigt, dass *otsA*-überexprimierende Kartoffelknollen und Arabidopsis-Pflanzen, die einen erhöhten T6P-Gehalt aufweisen, ein Expressionsprofil aufweisen, das gegensätzlich zu dem des durch SnRK1-Aktivierung hervorgerufenem ist (Zhang et al., 2009; Debast et al., 2011). So werden Gene, die durch SnRK1 aktiviert werden durch T6P reprimiert und solche die in Abhängigkeit der SnRK1-Aktivität reprimiert werden, werden durch T6P induziert. Eine negative Korrelation der Expression von SnRK1-Markergenen mit endogenen T6P-Gehalten konnte für Weizen und Arabidopsis nachgewiesen werden (Martinez-Barajas et al., 2011; Nunes et al., 2013). In Keimlingsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der SnRK1 die Sämlinge vor einer durch hohe Trehalose-Konzentration, die einen gesteigerten T6P-Gehalt verursachen, bedingten Wachstumsarretierung schützt und die Wachstumsinhibierung des Wildtyps auf Trehalose eine Folge der T6P-vermittelten SnRK1-Inhibierung ist (Delatte et al., 2011). Im Gegensatz zu Pflanzen, die SnRK1 α überexprimieren oder verminderte T6P-Gehalte und eine verzögerte Seneszenz aufweisen, bedingt eine verminderte *SnRK1 α* -Expression eine schnellere Alterung der Pflanzen (Baena-Gonzalez et al., 2007; Wingler et al., 2012). Neben T6P wird die SnRK1-Aktivität auch durch Zucker wie Glucose, Glucose-6-Phosphat (G6P), Glucose-1-Phosphat (G1P) sowie Saccharose gehemmt. G6P führt beispielsweise zu einer Inhibierung in Arabidopsis, Spinat und Zuckerrohr (Toroser et al., 2000; Wu und Birch, 2010; Nunes et al., 2013). Der Effekt von G1P auf die Aktivität der SnRK1 ist stärker als der von G6P, wobei auch für G1P und G6P die Involvierung eines intermediären Faktors in die SnRK1-Inhibierung angenommen wird (Nunes et al., 2013). Während in Arabidopsis-Keimlingen und ausgewachsenen Blättern die exogene Zufuhr von Glucose und Saccharose die SnRK1 inhibieren zu scheinen (Baena-Gonzalez et al., 2007), deuten andere Studien auf eine Aktivierung der SnRK1-Aktivität hervorgerufen durch Saccharose hin (Bhalerao et al., 1999; Jossier et al., 2009). Zusätzlich konnte auch eine Saccharose induzierte SnRK1-abhängige Aktivierung von Genen sowie Enzymaktivitäten gezeigt werden (Purcell et al., 1998; Tiessen et al., 2003; Kolbe et al., 2005; Jossier et al., 2009). Die Ursache dieser unterschiedlichen Effekte auf die SnRK1-Aktivität ist nicht bekannt, es wird vermutet, dass diese auf eine differentielle Regulierung der SnRK1 in hetero- und autotrophen Geweben zurückzuführen sind oder durch hohe Zuckerkonzentrationen verursacht werden, die zu Stress- und Abwehrantworten führen (Crozet et al., 2014). Auch die Inhibierung der SnRK1 durch Ribulose-5-Phosphat und Riboso-5-Phosphat ist bekannt, wobei hier eine indirekte Inhibierung als Folge einer ATP-Abnahme durch die ATP-abhängige Ribulose-1,5-Bisphosphat-Synthese vermutet wird

Einleitung

(Piattoni et al., 2011; Nunes et al., 2013). In der nachfolgenden Grafik sind die für SnRK1 bekannten Regulationsmechanismen schematisch dargestellt (Abbildung 1.1).

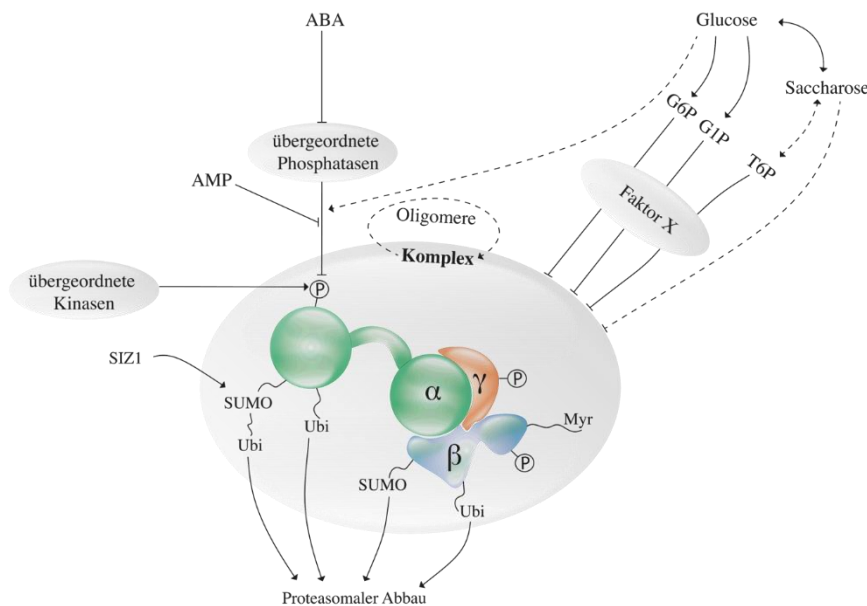


Abbildung 1.1: Regulation des SnRK1-Komplexes. Die Aktivität der SnRK1 ist abhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus, wobei übergeordnete GRIKs die SnRK1 im *T-loop* phosphorylieren, während übergeordnete Phosphatasen die Phosphorylierung entfernen können. Die Dephosphorylierung wird durch ABA und AMP inhibiert. Die Regulation des SnRK1-Komplexes erfolgt außerdem über die Komplexkomposition, Myristoylierung und SUMOylierung sowie Ubiquitinierung, wobei letztere den proteasomalen Abbau der SnRK1 begünstigen. Weiterhin wird der Komplex durch Kohlenhydrate inhibiert, wobei dies über ein bisher nicht identifiziertes Protein (Factor X) erfolgt. G6P – Glucose-6-Phosphat, G1P – Glucose-1-Phosphat, T6P – Trehalose-6-Phosphat, ABA-Abcisinsäure. Die Grafik wurde modifiziert nach Crozet et al. (2014).

1.2.3 Biologische Prozesse an denen die SnRK1 beteiligt ist

Die Effekte die sich in Abhängigkeit der SnRK1-Aktivität ergeben, deuten auf zahlreiche Funktionen während der Adaption auf Stressbedingung, aber auch während der regulären pflanzlichen Entwicklung hin. Die SnRK1-Untereinheiten werden transkriptionell unter anderem gewebespezifisch und durch Nährstoffverfügbarkeit reguliert. Hierbei können sowohl die Zielproteine als auch die SnRK1-Funktionen in Abhängigkeit von Organen (*Sink-/Source-Gewebe*), den Entwicklungsstadien oder Umweltbedingungen variieren (Polge und Thomas, 2007).

Ein Verlust der Snf1-ähnlichen Proteinkinasen *snf1a* und *snf1b* in dem Moos *Physcomitrella patens* ist zwar nicht letal, bedingt aber diverse phänotypische Veränderungen. So sind diese Mutanten durch eine Verschiebung des normalen Entwicklungsprogramms, eine frühzeitige Seneszenz, eine Hypersensitivität gegenüber Auxin sowie Hyposensitivität auf Cytokinin charakterisiert. Weiterhin sind diese Mutanten nicht fähig erniedrigte Energiegehalte zu reagieren (Thelander et al., 2004). Die Mutanten *snf1a* und *snf1b* weisen hierbei zwar eine normale Remobilisierung der eingelagerten Stärke auf, sind aber in der Akkumulation dieser beeinträchtigt (Thelander et al., 2004). Die

Einleitung

Stärkebiosynthese ist stark assoziiert mit der Kohlenstoffverfügbarkeit, da diese durch hohe Kohlenstoffgehalte begünstigt wird. So konnte auch in höheren Pflanzen der Einfluss der *SnRK1*-Expression auf die Stärkegehalte verdeutlicht werden. In Hirse überlappt die Expression von *SnRK1b* mit der Stärkeakkumulation im Endosperm und in Mikrosporen (Jain et al., 2008). In Knollenfütterungs-Experimenten konnte eine Beteiligung der *SnRK1* an der Saccharose- nicht aber Glucose-abhängigen Redoxaktivierung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase gezeigt werden (Tiessen et al., 2003). Die Expression von antisense *SnRK1*-mRNA in Gerste, was zu verminderten *SnRK1*-Gehalten führt, beeinträchtigt die Pollenentwicklung (Zhang et al., 2001). Diese Arretierung der Pollenreifung ist gekennzeichnet durch kleinere, unförmige und nahezu stärkefreie Pollenkörner. Die Autoren dieser Studie vermuten, dass die transgenen Pflanzen aufgrund des reduzierten *SnRK1*-Levels nicht mehr fähig sind auf ihren Kohlenstoffstatus zu reagieren. Die Samen dieser Pflanzen können die importierte Saccharose nicht verwerten ähnlich wie es für die Hefe *snf1*-Mutante beobachtet wurde, die auf saccharosehaltigem Medium hungert, da sie diese nicht nutzen kann (Zhang et al., 2001). Hingegen enthalten transgene *SnRK1*-überexprimierende Kartoffeln einerseits weniger Glucose, akkumulieren aber mehr Stärke als Wildtypknollen, bedingt durch eine erhöhte Aktivität der SUSY (SUCROSE SYNTHASE) und ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, Schlüsselenzymen der Stärkebiosynthese (McKibbin et al., 2006). In Reis wurde nachgewiesen, dass die Reduktion des Proteinlevels von *SnRK1A* durch RNA-Interferenz, nicht aber das von *SnRK1B*, die Keimung und das Wachstum des Sämlings beeinflusst (Lu et al., 2007). Eine verminderte *SnRK1A*-Aktivität bedingte auch unter Glucose Mangel die Repression der α -*AMYLASE3* (α -*AMY3*), einer der zwei Haupt-Amylasen, die durch Zucker reprimiert und als Folge von Zuckerverarmung exprimiert werden (Lu et al., 2007). Unter Mangelbedingungen ist die Expression von α -*AMY3* und α -*AMY8* zur Mobilisierung von Stärkereserven notwendig um Stoffwechselprozesse wie Respiration aufrechtzuhalten (Yu et al., 1996; Yu, 1999; Chen et al., 2006).

Die transiente Überexpression von *AKIN10* in Protoplasten resultiert in einer massiven transkriptionellen Umprogrammierung, welche dem durch Zuckermangel hervorgerufenem Expressionsprofils ähnlich ist. Durch die große Überlappung von Genen, die unter beiden Bedingungen ähnlich reguliert werden, wurde vermutet, dass die *SnRK1* in die Vermittlung der Antwort auf Energiedefizite involviert ist, was unter anderem zu der Repression anabolischer Prozesse, die Kohlenstoff verbrauchen um das Wachstum zu fördern, resultiert (Baena-Gonzalez et al., 2007). In Abhängigkeit der *SnRK1*-Aktivität wird die Expression von mehr als 1000 Genen moduliert, wobei dies durch die Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, durch die Modifizierung der Transkriptionsmaschinerie oder über die Umstrukturierung des Chromatins erfolgt (Baena-Gonzalez et al., 2007). *AKIN10*-überexprimierende Pflanzen zeigen Veränderungen der Stärke- und Zuckergehalte sowie

Einleitung

der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase- und Nitratreduktase-Aktivität. Die Pflanzen weisen ebenfalls Unterschiede im Expressionsprofil Zucker-regulierter Gene auf und reagieren hypersensitiv auf ABA (Jossier et al., 2009). Die Expression der *SnRK1α*-Untereinheit, transient in Blattmesophyllzellen oder in stabil transformierten Pflanzen, resultiert in veränderter SnRK1-Aktivität in Tomate und Arabidopsis, wodurch die Genexpression bezogen auf Stressantwort, Pflanzenwachstum und Entwicklung während des gesamten Lebenszyklus beeinflusst wird (Cho et al., 2012). Bradford et al., (2003) zeigten, dass die SnRK1γ-Untereinheit SNF4 in den Samen von Tomaten durch ABA und Gibberellin reguliert wird, was auf eine Verbindung zwischen Hormon- und Zuckerwahrnehmung hindeutet um Samenentwicklung, Dormanz und Keimung zu kontrollieren (Bradford et al., 2003). Ebenfalls wurde eine Beteiligung von SnRK1 in pflanzlichen Reaktionen auf verschiedene Stressesstimuli gezeigt. Hypoxie etwa induziert die Expression von *SnRK1α* und die ektopische Expression inaktiver *SnRK1* Varianten aus Arabidopsis oder Reis hebt die Toleranz von Pflanzen gegenüber Überflutung auf, was teilweise durch die fehlende Induktion von den an der anaeroben Respiration beteiligten Enzymen ADH1 (ALKOHOL DEHYDROGENASE1) und PDC1 (PYRUVATE DECARBOXYLASE1) bedingt wird (Cho et al., 2012). Eine weitere Beteiligung von SnRK1 unter abiotischen Stressbedingungen wurde in der Phosphatmangelantwort aufgedeckt. In stabil transformierten *A. thaliana*-Linien konnte unter Phosphatmangelbedingungen eine Abnahme von AKIN11-Proteingehalten bei einer gleichzeitig gesteigerten AKIN10-Aktivität ermittelt werden, wobei dies nicht mit einem veränderten Phosphorylierungsstatus einherging. Somit scheinen die beiden Untereinheiten unter Phosphat-defizienten Konditionen unterschiedliche Funktionen innezuhaben. Diese Vermutung wurde durch eine beeinträchtigte Stärkemobilisierung von *akin10*-Mutanten unter Phosphatmangel bekräftigt, welche unter ausreichender Phosphatversorgung nicht ersichtlich war und auf eine differentielle Expression von Genen des Kohlenhydrat-Metabolismus zurückzuführen ist (Fragoso et al., 2009).

Durch die Interaktion der SnRK1 mit dem PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) ist die Kinase auch indirekt in die Zucker-, Hormon- und Stress-Signalweiterleitung eingebunden (Nemeth et al., 1998). PRL1 ist ein α -Importin bindendes nucleares WD40-Protein, welches in Hefe SnRK1 α bindet und dadurch die Kinaseaktivität *in vitro* inhibiert (Bhalerao et al., 1999). Die SnRK1 α -Untereinheiten interagieren mit SKP1/ASK1 (S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1/*Arabidopsis* SKP1-LIKE 1), einer Komponente des SCF E3-Ligase-Komplex, wobei diese Wechselwirkung durch PRL1 inhibiert wird (Farras et al., 2001). Da in Proteinabbau-Experimenten eine Abhängigkeit des SnRK1 α -Abbaus von PRL1 und CUL4 festgestellt werden konnte, wird vermutet, dass PRL1 die SnRK1-Gehalte regulieren könnte indem es diese Kinasen für den Abbau durch die DDB1-CUL1 Ubiquitin-Ligase Maschinerie markiert wobei PRL1 als Substratrezeptor dient (Lee et al., 2008).

Einleitung

Neben den bereits genannten Funktionen, agiert die SnRK1 auch in der biotischen Stressantwort. So zeigen SnRK1-überexprimierende Tabakpflanzen eine gesteigerte Resistenz gegenüber einer Infektion mit Geminivirus (Hao et al., 2003), während SnRK1-defiziente Reis-Mutanten suszeptibler hinsichtlich der Infektion mit *Magnaporthe oryzae* und *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sind (Kim et al., 2015). Eine Beteiligung der SnRK1 wurde weiterhin bei der Unterdrückung der Hypersensitiven Antwort, die in Paprika durch das Resistenzprotein AvrBsT in Gegenwart des Effektorproteins AvrBs1 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ausgelöst wird, gezeigt. Die Interaktion von SnRK1 mit AvrBsT wurde sowohl in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen als auch *in planta* nachgewiesen und die Stilllegung der *SnRK1*-Expression führte zu einer Beeinträchtigung in der Hypersensitiven Antwort, die durch das Effektorprotein AvrBs1 aus hervorgerufen wird (Szczeny et al., 2010). In einer aktuellen Studie zeigten Perochon et al. (2015) auch eine Beteiligung der SnRK1 in die Abwehrantwort bei Pilzbefall (Perochon et al., 2015). So interagiert SnRK1 mit *TaFROG* (*Triticum aestivum* *Fusarium* Resistance Orphan Gene), einem durch *F. graminearum*-Befall induzierten Protein, dass die Toleranz gegenüber biotischem Stress erhöht. In Tabakpflanzen konnte eine Funktion der SnRK1 in der Toleranz gegenüber Herbivoren gezeigt werden, die durch eine Umverteilung des Kohlenstoffs aus oberirdischen Geweben in die Wurzeln als Resultat einer verminderten Expression der *SnRK1* β -Untereinheit erfolgt (Schwachtje et al., 2006). Auch eine Involvierung von miRNAs, die stromabwärts der SnRK1 in der Regulierung der Stressantwort agieren, konnte bereits gezeigt werden (Confraria et al., 2013).

1.2.4 Bekannte Zielprotein der SnRK1

Obwohl die SnRK1 in eine Vielzahl von pflanzlichen Prozessen wie der Entwicklung, das Wachstums sowie in biotische und abiotische Stressantworten involviert ist (Polge und Thomas, 2007), sind bisher nur wenige SnRK1-Zielproteine identifiziert. Die SnRK1 kann die Aktivität von Enzymen direkt durch Phosphorylierung beeinflussen und dadurch unter anderem den Metabolismus unmittelbar regulieren. So werden die pflanzlichen metabolischen Schlüsselenzyme 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) - Reduktase, Nitrat-Reduktase (NR) und Saccharose-6-Phosphat-Synthase (SPS) durch SnRK1-vermittelte Phosphorylierung inaktiviert (Sugden et al., 1999). Durch die Regulation dieser Enzyme ist SnRK1 in die Regulation der Sterolsynthese, der Nitratassimilation und der Saccharosesynthese involviert. Auch die SnRK1-vermittelte Phosphorylierung von Trehalose-Phosphat-Synthase 5 (TPS), Fructose-6-Phosphat, 2-Kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (F2KP) und der nicht-phosphorylierenden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (np-GAPDH), wurde gezeigt (Kulma et al., 2004; Harthill et al., 2006; Piattoni et al., 2011). In Säugetieren phosphoryliert die AMPK den Cyclin-abhängigen Kinase

Einleitung

Inhibitor p27^{KIP1}, was das Voranschreiten des Zellzyklus, die Autophagie und die Apoptose beeinflusst (Liang et al., 2007; Short et al., 2008; Short et al., 2010). Auch für die pflanzlichen P27^{KIP1}-Homologe AtKRP6 und AtKRP7 konnte *in vitro* die Phosphorylierung durch rekombinante, aktivierte SnRK1 α gezeigt werden. Durch Massenspektrometrie und gerichtete Mutagenese wurde die Positionen Threonin T152/151 als AtKRP6/7 Phosphorylierungsstellen identifiziert. Im Nucleus von Tabakprotoplasten konnte die Interaktion bestätigt werden. Im Gegensatz zu p27^{KIP1} in Säugetieren hat die Phosphorylierung von AtKRP6 keinen Einfluss auf die Lokalisierung im Zellkern. Wahrscheinlich erfolgt die Kontrolle der Zellproliferation durch Inhibierung der biologischen Funktion von AtKRP6 durch Phosphorylierung (Guerinier et al., 2013).

Neben der direkten posttranslationalen Regulierung durch Phosphorylierung von Enzymen und Zellzyklusregulatoren bedingt die SnRK1-Aktivität eine umfassende transkriptionelle Umprogrammierung (Abbildung 1.2). Als Folge eines niedrigen Energiegehalts reprimiert die SnRK1 anabolische Gene, die in biosynthetische Prozesse wie Aminosäure-, Zellwand-, Fettsäure-, Protein-, Stärke- sowie Saccharosebiosynthese involviert sind um ATP und Kohlenstoff zu konservieren. Andererseits werden Gene des Katabolismus induziert um etwa ATP zu generieren. Dies erfolgt durch die Hydrolyse von Saccharose, Stärke, Zellwänden, Polysaccharide sowie durch β -Oxidation von Fettsäuren.

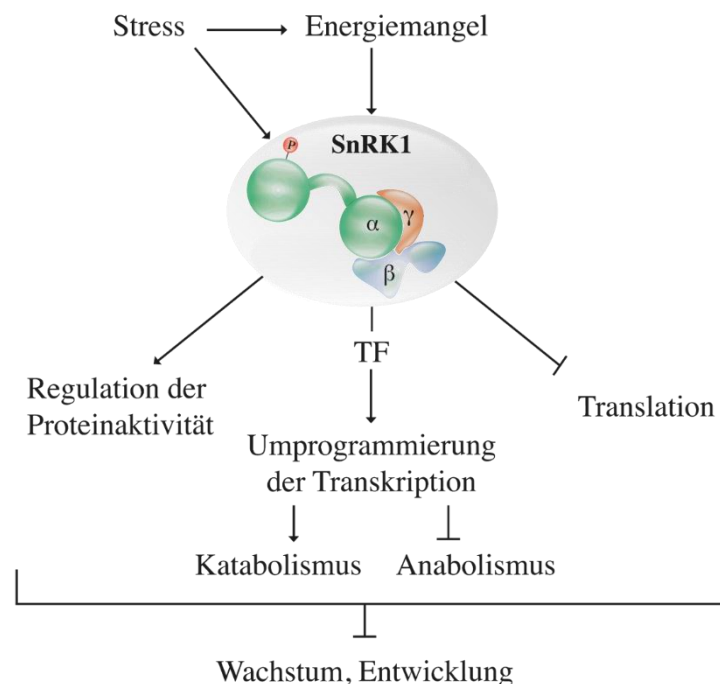


Abbildung 1.2: Die Aktivierung der SnRK1 reguliert die Anpassung an stressinduzierten Energiemangel. Unterschiedliche Arten von Stress (Dunkelheit, Hypoxie, Pathogenbefall) können in Pflanzen ein Energiedefizit auslösen, wodurch die SnRK1 aktiviert wird, die ihrerseits durch Phosphorylierung die Aktivität von metabolischen Enzymen (Nitrat-Reduktase, Saccharose-Phosphat-Synthase, HMG-CoA-Reduktase) reguliert. Die Aktivierung der SnRK1 inhibiert außerdem die Translation und resultiert unter Beteiligung von Transkriptionsfaktoren in einer transkriptionellen Umprogrammierung, wodurch katabolische Prozesse initiiert und anabolische Stoffwechselwege reprimiert werden. Dies inhibiert Wachstum und Entwicklung um die Energy-Homeostase aufrechtzuerhalten und das Überleben der Pflanze unter Stressbedingungen zu ermöglichen.

Einleitung

In früheren Studien wurden bereits einige Transkriptionsregulatoren des SnRK1-Signalwegs aus verschiedenen Transkriptionsfaktorfamilien identifiziert. Die Beteiligung von Mitgliedern der C/S1 Gruppe der *basic leucin zipper* (bZIP) Transkriptionsfaktoren in SnRK1-Signalwege konnte in protoplastenbasierten Reporteranalysen nachgewiesen werden (Baena-Gonzalez et al., 2007). Für Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie konnte eine Involvierung in die Regulation von SnRK1-Markergenen wie *ASPARAGINE SYNTHETASE 1* (*ASN1*) und *PROLINE DEHYDROGENASE 2* (*ProDH2*) gezeigt werden (Hanson et al., 2008). SnRK1 induziert die Expression von *bZIP54*, *-18*, *-63* und *-1* (Baena-Gonzalez et al., 2007; Delatte et al., 2011). Neben der transkriptionellen Kontrolle einiger bZIP-Transkriptionsfaktoren reguliert SnRK1 diese Transkriptionsfaktoren auch über posttranslationale Modifikation. Durch die direkte Phosphorylierung von bZIP63, einem Mitglied dieser Transkriptionsfaktorfamilie, an mehreren Stellen durch SnRK1 wird die Dimerisierungspräferenz dieses Transkriptionsfaktors mit anderen Mitgliedern dieser Transkriptionsfaktorfamilie moduliert. Dadurch wird die regulatorische Aktivität und schließlich die Ansteuerung von Zielgenen dieses Transkriptionsfaktors verändert. (Mair et al., 2015). Ein Transkriptionsfaktor, der durch die SnRK1 Aktivität reprimiert wird, ist bZIP11 (Baena-Gonzalez et al., 2007). Die Akkumulation von bZIP11 im Nucleus führt zu Veränderungen der Expression von Genen des Kohlenhydrat-Metabolismus, welche teilweise dem Expressionsprofil unter niedriger Kohlenstoffverfügbarkeit ähneln. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert Gene des Trehalose-Metabolismus und bZIP11 überexprimierende Pflanzen sind teilweise unempfindlich gegenüber T6P, weshalb die Autoren spekulieren, dass bZIP11 transkriptionelle Reaktionen auf T6P stromabwärts der SnRK1 vermittelt (Delatte et al., 2011). Diese gegenseitige Kontrolle spiegelt sich auch dadurch wieder, dass T6P SnRK1 inhibiert, diese wiederum steuert die Expression des Transkriptionsfaktors *bZIP11*, der Gene des Trehalose-Metabolismus kontrolliert und die Gehalte an Trehalose und T6P ändert (Delatte et al., 2011; Ma et al., 2011). Auch für andere Transkriptionsfaktoren wie den NAC Transkriptionsfaktor ATAF1 (*A. thaliana* ACTIVATING FACTOR 1), INDETERMINATE DOMAIN (IDD) -enthaltenden Transkriptionsfaktor IDD8 sowie PETAL LOSS (PTL) wurde die Interaktion mit beiden oder einer der zwei SnRK1 α -Untereinheiten aus Arabidopsis gezeigt. Allerdings konnte für diese Transkriptionsfaktoren mit Ausnahme von IDD8 nicht gezeigt werden, ob sie als Substrate für eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung dienen (Kleinow et al., 2009; Jeong et al., 2015; O'Brien et al., 2015). Die Phosphorylierung von IDD8 innerhalb einer Zinkfinger-Domäne durch AKIN10 bedingt eine verminderte transkriptionelle Aktivität von IDD8, die in einer verzögerten Blühinduktion resultiert (Jeong et al., 2015). Durch die Interaktion mit IDD8 kann SnRK1 unter Stressbedingungen, die zu Energiedefiziten führt, direkt Einfluss auf den Zeitpunkt der Blühinduktion nehmen. Der Arabidopsis NAC-Transkriptionsfaktor ATAF1 wird durch

Einleitung

Kohlenstoffmangel induziert und ist während der Reaktion auf eine geringe Kohlenhydratverfügbarkeit in die Transkriptom- und Metabolom-Umprogrammierung involviert. Die durch ATAF1 hervorgerufenen transkriptionellen Änderungen zeigen eine große Überlappung mit den Expressionsmustern von Pflanzen, die unter Kohlenstoff- oder Energiemangel leiden (Garapati et al., 2015). *Trehalase1 (TRE1)*, das einzige Gen das in Arabidopsis für eine Trehalase codiert, wird direkt durch ATAF1 reguliert. So induziert die Überexpression von *ATAF1* die Expression von *TRE1*, was zu einem reduzierten T6P-Gehalt führt und dadurch Zuckermangel signalisiert. Auch die Expression von Genen der Stärkebiosynthese sowie des Abbaus sind von einer Veränderung der *ATAF1*-Expression betroffen. So ist der Stärkegehalt in *ataf1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöht, während er in *ATAF1*-überexprimierenden Pflanzen vermindert ist. Gene, die mit der Autophagie und dem Aminosäure-Katabolismus assoziiert sind, werden durch ATAF1 induziert, wohingegen Kohlenhydrat- und Stärkebiosynthese-assoziierte Gene runterreguliert werden (Garapati et al., 2015). Ein weiterer Transkriptionsfaktor der als Substrat der SnRK1 dient, ist der B3-Domänen Transkriptionsfaktor FUSCA3 (FUS3), ein positiver Regulator der Embryogenese in Arabidopsis. AKIN10 interagiert und phosphoryliert den Aminoterminus von FUS3. Weiterhin verzögert die Überexpression von *AKIN10* den proteasomalen Abbau von FUS3, wodurch vermutet wird, dass AKIN10 ein positiver Regulator der FUS3 Proteinakkumulation ist (Tsai und Gazzarrini, 2012). Durch ihre Interaktion regulieren FUS3 und AKIN10 die Keimung, den Übergang von der embryonalen zur vegetativen sowie der vegetativen zur reproduktiven Phase und die Entwicklung lateraler Organe (Tsai und Gazzarrini, 2012).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Um sich an variable Umweltbedingungen anzupassen existieren in Pflanzen verschiedene Regulationssysteme, welche die Pflanze befähigen ihren Metabolismus auf die aktuellen Konditionen abzustimmen. Ein globaler Regulator, der den Metabolismus auf die Energieverfügbarkeit abstimmt, ist die SnRK1. Diese evolutionär konservierte Proteinkinase ist an einer Vielzahl von Prozessen während des gesamten Lebenszyklus der Pflanze beteiligt und reguliert mehr als 1000 Zielgene. Dies erfolgt wahrscheinlich über die Phosphorylierung von Transkriptionsregulatoren, allerdings sind bisher nur wenige SnRK1-Zielproteine bekannt. Wobei diese nicht ausreichen um die in Abhängigkeit der SnRK1-Aktivität verursachten Phänotypen vollständig zu erklären. Daher war das Ziel dieser Arbeit mittels Hefe- und *in planta*-Interaktionsstudien neue Komponenten der SnRK1-Signaltransduktion zu identifizieren und zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten unter Verwendung verschiedener molekularbiologischer, physiologischer und biochemischen Methoden sowie der Analyse stabil transformierter Pflanzen verschiedene Fragestellungen bearbeitet und beantwortet werden:

1. Welche weiteren Proteine fungieren als SnRK1-Interaktionspartner und dienen möglicherweise entweder als Substrate oder als regulatorische Komponenten der Proteinkinase?
2. Welche physiologischen Funktionen haben die SnRK1-Bindungspartner und an welchen biologischen Prozessen sind sie beteiligt?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Life Technologies GmbH (Darmstadt), New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main), Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sarstedt AG & Co (Nümbrecht), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), und VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien, die Aufreinigung von PCR-Produkten, die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und die RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial für die Microarray-Analyse wurden Kits der Firma Qiagen GmbH (Hilden) verwendet.

2.1.2 Oligonukleotide, Vektoren und Sequenzierungen

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion International AG (Planegg-Martinsried) synthetisiert und sind wie die verwendeten Vektoren im Anhang aufgeführt (6.1/6.2). Sequenzierungen wurden von der GATC Biotech AG (Konstanz) ausgeführt.

2.1.3 Antikörper

Zum Nachweis unterschiedlich markierter Proteine im Western Blot wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Antikörper	Verdünnung	Hersteller / Referenz
Anti-c-myc-Peroxidase-Antikörper aus Maus (Klon 9E10), monoklonal	1:1000	Roche, Mannheim
Anti-c-myc-Antikörper aus Maus (Klon 9E10), monoklonal	1:1000	Roche, Mannheim
Anti-GFP-Antikörper aus Maus (Klon 13.1 und 7.1), monoklonal	1:1000	Roche, Mannheim
Anti-HA-Peroxidase-Antikörper aus Maus (Klon12CA5), monoklonal	1:500	Roche, Mannheim
Anti-GST-Antikörper aus Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ImmunoPure® Ziege-anti-Maus-Meerrettichperoxidase-Antikörper, polyklonal	1:10000	Thermo Fischer Scientific, Bonn
ImmunoPure® Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Antikörper, polyklonal	1:10000	Thermo Fischer Scientific, Bonn

Material und Methoden

2.1.4 Bakterienstämme

Es wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet:

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F– <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen™, Karlsruhe
<i>E. coli</i> DH5 α ™	F– Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen™, Karlsruhe
<i>E. coli</i> M15/pREP4	<i>Nal</i> ^S , <i>Str</i> ^S , <i>Rif</i> ^S , <i>Thi</i> , <i>Lac</i> ⁻ , <i>Ara</i> ⁺ , <i>Gal</i> ⁺ , <i>Mtf</i> , <i>F</i> , <i>RecA</i> ⁺ , <i>Uvr</i> ⁺ , <i>Lon</i> ⁺ , <i>Kan</i> ^R	Qiagen, Hilden (Villarejo und Zabin, 1974)
<i>E. coli</i> KC8	<i>hsdR</i> , <i>leuB600</i> , <i>trpC9830</i> , <i>pyrF::Tn5</i> , <i>hisB463</i> , <i>lac</i> Δ X74, <i>strA</i> , <i>galU,K</i>	Clontech, Mountain View, USA
<i>E. coli</i> BL21/Rosetta pRARE	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB – mB –) <i>gal dcm</i> pRARE2 (Cam ^R)	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1	Rif ^R mit Helferplasmid pGV2260 (Amp ^R)	(Van Larebeke et al., 1974) (Deblaere et al., 1985)

^R Antibiotikaresistenz

2.1.5 Hefestämme

Die Hefe-Zwei-Hybrid Experimente wurden mit den folgenden *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen durchgeführt:

Stamm	Genotyp	Referenz
Y187	<i>MAT</i> α , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4</i> Δ , <i>met</i> ⁻ , <i>gal80</i> Δ , <i>URA3::GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i>	(Harper et al., 1993)
AH109	<i>MAT</i> α , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4</i> Δ , <i>gal80</i> Δ , <i>LYS2::GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>HIS3</i> , <i>GAL2</i> _{UAS} - <i>GAL2</i> _{TATA} - <i>ADE2</i> , <i>URA3::MEL1</i> _{UAS} - <i>MEL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i>	(James et al., 1996)
Y190	<i>MAT</i> α , <i>ura3-52</i> , <i>his3-D200</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4</i> Δ , <i>gal80</i> Δ , <i>URA3::GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i> , <i>cyh</i> ^r 2, <i>LYS2::GAL</i> _{UAS} - <i>HIS3</i> _{TATA} - <i>HIS3</i>	(Harper et al., 1993); (Flick und Johnston, 1990)

2.1.6 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurden *Nicotiana benthamiana* sowie Wildtypen und gentechnisch veränderte *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen verwendet.

Nicotiana benthamiana

N. benthamiana-Pflanzen wurden auf Erde (16 h Licht bei 25°C, 8 h Dunkelheit bei 20°C, 250-300 μ mol Photonen·m⁻²·s⁻¹, 40% relative Luftfeuchtigkeit) mit täglicher Bewässerung kultiviert.

Material und Methoden

Arabidopsis thaliana

Für die Anzucht von Pflanzen in Sterilkultur wurde das Saatgut zunächst oberflächensterilisiert. Hierfür wurden die Samen zunächst 10 Minuten in einer 1%igen Natriumhypochlorit-Lösung inkubiert. Dem dreimaligen Waschen der Samen in sterilem MilliQ-Wasser folgte das Aufnehmen in 0,15%iger Agarose und das Ausbringen mit einer sterilen Plastik-Pasteurpipette auf Murashige und Skoog (MS) -Platten. Um die Dormanz der Samen zu brechen und die Keimung zu synchronisieren, wurden die Platten zunächst für 2 Tage bei 4°C dunkel gestellt. Anschließend wurden die Sämlinge im Klimaschrank (Adaptis A1000, Conviron Germany GmbH, Berlin) unter Kurztagbedingungen (8 h/16 h [23°C/21°C], Licht/Dunkel-Rhythmus) angezogen. Nach Erreichen des 4-Blattstadiums (14 Tage) wurden die jungen Pflanzen in eine *Arabidopsis*-Erdmischung pikiert.

A. thaliana-Erdmischung	
65% (v/v)	Fruhstorfer Erde Typ P (Fa. Hawita, Vechta)
25% (v/v)	Sand
10% (v/v)	PERLIGRAN® G (Knauf Perlite GmbH, Dortmund)

Die Pflanzenanzucht auf Erde erfolgte im Klimaschrank (Percival® AR-95L3, CLF Plant Climatics GmbH, Wertingen) unter folgenden Bedingungen bei 70% relativer Luftfeuchte.

Bedingung	Tag (Licht)/Nacht (Dunkel)	Temperatur (Tag/Nacht)	Lichtintensität (Photonen $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
Kurztag (KT)	8 h / 16 h	22°C/19°C	100
Kurztag (KT)/ Starklicht	8 h / 16 h	22°C/19°C	300
Langtag (LT)	16 h / 8 h	22°C/19°C	100

Ab der dritten Woche nach dem Pikieren wurden die Pflanzen einmal wöchentlich mit 30 ml 0,1% WUXAL-Super Flüssigdünger (Aglukon Spezialdünger GmbH, Düsseldorf) pro Pflanze gedüngt.

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden ausschließlich *Arabidopsis*-Genotypen im Hintergrund des *A. thaliana* (L.) Heynh. Ökotypen Columbia-0 (Col-0) verwendet.

Genotyp	Beschreibung	AGI	T-DNA Insertionsmutanten	Referenz
Col-0	Columbia-0 Wildtyp			N1092 <i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i> ID diese Arbeit
35S- <i>STKR1</i> -3-fach myc (kurz: 35S- <i>STKR1</i>) <i>stkr1</i>	Konstitutive Expression von <i>AtSTKR1</i> mit 3-fachem myc-tag <i>stkr1</i> -Mutante (<i>knock-out</i>)	AT4G00270 AT4G00270	SALK_115723C	(Alonso et al., 2003); NASC

Material und Methoden

Als Anzuchtmedium für die *A. thaliana*-Sterilkultur diente ein Murashige und Skoog-Medium (MS-Medium), welches für 20 Minuten autoklaviert wurde:

Murashige und Skoog-Medium	
4,4 g/l	Murashige und Skoog Medium inkl. Vitaminen (Ducheva Biochemie, Haarlem, Niederlande)
0,5 g/l	MES
20 g/l	Saccharose
8 g/l	Phytoagar
	pH 5,7 mit KOH

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzentransformation

2.2.1.1 Transiente Transformation von *N. benthamiana*

Zur transienten Expression von Proteinen in *N. benthamiana* wurde die Agrobakterienvermittelte Transformation eingesetzt. Hierfür wurden Agrobakterien des Stamms C58C1 mit dem Helferplasmid pGV2260 (Deblaere et al., 1985; Höfgen und Willmitzer, 1988), welche das entsprechende Plasmid mit dem gewünschten Gen enthielten, in 50 ml YEB-Medium mit den benötigten Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellkultur wurde für 20 Minuten bei 4000 Upm abzentrifugiert, das Pellet in 20 ml Wasser gewaschen und erneut für 20 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 10 ml Wasser gelöst, die OD_{600} bestimmt und auf 1,0 eingestellt. Die Agrobaktériensuspension wurde mit Hilfe einer nadellosen 1 ml Spritze in die abaxiale Blattseite von *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert.

2.2.1.2 Stabile Transformation von *A. thaliana*

Um *A. thaliana*-Pflanzen stabil zu transformieren wurde die *floral dip* Methode (Clough und Bent, 1998) angewandt. Dazu wurden 250 ml YEB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion) mit 3 ml einer *A. tumefaciens*-Vorkultur beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Agrobaktériensuspension wurde am nächsten Tag in ein hohes Becherglas überführt und 8 g Saccharose sowie 200 µl Silwet zugegeben. Für die Transformation wurden Pflanzen mit möglichst vielen offenen Blüten und reifen Knospen verwendet. Nach Entfernung von schon vorhandenen Schoten wurden die Pflanzen kopfüber für 1 bis 2 Minuten in die Agrobaktériensuspension eingetaucht. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert, wobei diese direkt nach der Agrobakterienbehandlung für 2 Tage mit einer transparenten Haube abgedeckt wurden, um eine hohe Luftfeuchtigkeit und somit erhöhte Transformationsrate sicherzustellen. Nachdem die Pflanzen reife Schoten ausgebildet hatten, wurden Papiertüten über die oberirdischen Pflanzenteile gestülpt und

Material und Methoden

noch eine Woche gegossen. Samen vollständig ausgetrockneter Pflanzen wurden geerntet, oberflächensterilisiert und auf MS-Medium mit Kanamycin als Selektionsmarker ausgesät (2.1.6).

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien wurden Fest- und Flüssigmedien verwendet. Um die Selektion eines bestimmten Stammes bzw. Plasmids zu gewährleisten, wurden dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen geeignete Antibiotika hinzugegeben.

Anzucht von *Escherichia coli*-Stämmen

Die *E. coli*-Stämme DH5 α , TOP10, BL21, M15 und KC8 wurden in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) bei 37°C kultiviert.

Luria-Bertani-Medium	
10 g/l	Bacto-Trypton
10 g/l	NaCl
5 g/l	Hefeextrakt

Für LB-Festmedium wurden vor dem Autoklavieren noch 15 g/l Agar hinzugefügt. Um nach erfolgreicher Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung die Interaktionspartner identifizieren zu können, wurde die DNA aus Hefe isoliert und in *E. coli* KC8-Zellen transformiert. Zur Separation des Köder- von dem Beuteplasmid wurden die transformierten Bakterien auf M9-Medium mit den Auxotrophiemarkern –trp (Selektion auf Köderplasmid) bzw. –leu (Selektion auf Beuteplasmid) ausgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert.

M9-Minimalmedium	
20 g/l	Glucose
0,67 g/l	Aminosäuremix (-trp/-leu)
16,7 g/l	Agar

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden dem Medium Ampicillin (Endkonzentration 100 μ g/ml), Thiamin (Endkonzentration 1 mM) und M9-Salze (Endkonzentration 1-fach) hinzugefügt.

M9-Salze (10-fach)	
60 g/l	Na ₂ HPO ₄
30 g/l	KH ₂ PO ₄
5 g/l	NaCl
10 g/l	NH ₄ Cl

Material und Methoden

Anzucht und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobakterien wurden bei 28°C in YEB-Medium kultiviert. Die Transformation der Agrobakterien wurde nach der Anleitung von Höfgen und Willmitzer (1988) durchgeführt.

YEB-Medium	
5 g/l	Bacto-Trypton
1 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	Bacto-Rinderextrakt
5 g/l	Saccharose
2 mM	MgSO ₄

Zur Herstellung von YEB-Festmedium wurden vor dem Autoklavieren noch 15 g/l Agar hinzugefügt. Mit Ausnahme von Rifampicin wurden alle Antibiotika in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Rifampicin wurde in DMSO gelöst und nicht sterilfiltriert. Zur Selektion wurden folgende Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen eingesetzt:

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	200 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml	30 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Rifampicin	50 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin	10 mg/ml	20 µg/ml

2.2.2.2 Anzucht und Transformation von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Die Hefestämme AH109, Y187 und Y190 wurden auf YPAD- (Vollmedium) bzw. SCAD-Medium (Selektionsmedium) herangezogen. Die Hefen wurden mittels Lithiumacetat/Einzelstrang-DNA/PEG-Methode transformiert (Schiestl und Gietz, 1989; Gietz et al., 1992).

YPAD-Medium (Vollmedium)	
10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Pepton (aus Casein)
20 g/l	Glucose
100 mg/l	Adeninhemisulfat

YPAD-Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt. Um auf einen Stamm zu selektieren, der ein bestimmtes Plasmid enthält, wurde das Selektionsmedium SCAD mit den entsprechenden Auxotrophiemarkern im Aminosäuremix verwendet.

SCAD-Medium (Selektionsmedium)	
20 g/l	Glucose
6,7 g/l	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
0,67 g/l	Aminosäuremix pH 5,8 mit NaOH

Material und Methoden

Für SCAD-Festmedium wurden vor dem Autoklavieren noch 16,7 g/l Agar dazugegeben. Sowohl YPAD- als auch SCAD-Medien wurden für 10 Minuten autoklaviert. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Aminosäuremix:

Aminosäuremix			
2,0 g	Adeninhemisulfat	2,0 g	Methionin
0,2 g	p-Aminobenzoesäure	3,0 g	Phenylalanin
2,0 g	Arginin-HCl	2,0 g	Serin
2,0 g	Histidin-HCl	2,0 g	Threonin
2,0 g	Isoleucin	3,0 g	Tryptophan
2,0 g	Myo-Inositol	2,0 g	Tyrosin
4,0 g	Leucin	1,2 g	Uracil
2,0 g	Lysin-HCl	9,0 g	Valin

Um ein Selektionsmedium herzustellen, wurde die als Auxotrophiemarker dienende Aminosäure bei der Zusammensetzung des Aminosäuremix weggelassen. Für die Anzucht der Hefestämme auf histidinfreiem Medium wurden dem SCAD-Medium nach dem Autoklavieren noch 4 mM 3-Aminotriazol (3-AT) für die Anzucht des AH109-Stammes und für die des Stammes Y190, welcher für Tests auf direkte Interaktion verwendet wurde, 25 mM 3-AT hinzugefügt. Dieses fungiert als kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Genprodukts und ermöglicht so eine stringente Selektion auf positive Interaktionen (Klopotoski und Wiater, 1965; Struhl und Davis, 1977).

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie die Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen, Ligation von DNA mit Hilfe von Ligasen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren, Anzucht von *E. coli*, Transformation von *E. coli* sowie die Präparation von Plasmiden wurden wie von Mülhardt (2009) beschrieben, durchgeführt (Mülhardt, 2009).

PCR-Produkte wurden mit dem QiaQuick® PCR Purification Kit (Qiagen) und DNA-Fragmente aus Agarosegelen mit dem QiaQuick® Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Zur Isolierung von Bakterien-DNA wurde das QiaPrep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Einige der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden mittels pENTR™/D-TOPO® -Klonierung (Invitrogen™) angefertigt. Hierfür wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

2.2.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Varianten DUF581-9_{C47S}, DUF581-18_{C88S}, STKR1_{S27A}, STKR1_{S184A}, STKR1_{S24A/S184A} sowie AKIN10_{K48R} wurden nach dem Protokoll des QuikChange II XL Site-Directed

Material und Methoden

Mutagenesis Kits von Agilent Technologies (Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn) hergestellt.

2.2.3.2 Präparation genomischer DNA aus *A. thaliana*

Um die SALK-Linie auf Homozygotie in Bezug auf die T-DNA-Insertion zu untersuchen, wurde eine Schnellpräparation genomischer DNA nach Edwards et al. (1991) mit einem zusätzlichen PCI-Reinigungsschritt vorgenommen (Edwards et al., 1991). Die extrahierte DNA wurde als Template für eine Charakterisierungs-PCR eingesetzt um die Reinerbigkeit des Saatguts nachzuweisen.

DNA Extraktionspuffer	
200 mM	Tris HCL pH 7,5
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA
0,5% (w/v)	SDS

2.2.3.3 Isolierung von DNA aus Hefe

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern nach einer Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung, wurde die DNA diploider Hefekolonien nach der Methode von Hoffman und Winston (1987) isoliert (Hoffman und Winston, 1987).

2.2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Um Vollängen-mRNA in verschiedenen PCR Methoden nachzuweisen, wurde RNA nach der Methode von Logemann et al. (1987) isoliert (Logemann et al., 1987).

Die Ermittlung der RNA-Konzentration sowie der Reinheit der Präparationen wurde photometrisch (Nanodrop® ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durch Messung der Absorption bei A_{260} , A_{280} und A_{230} von 1 μ l RNA bestimmt. Alle wässrigen Lösungen wurden mit DEPC (Diethylcarbonat) -behandeltem Wasser angesetzt (0,1% (v/v)).

Z6 Puffer pH 7,0	
8 mM	Guanidiniumhydrochlorid
20 mM	MES
20 mM	EDTA
0,7% (v/v)	β -Mercaptoethanol

2.2.3.5 Reverse Transkription von RNA

Um mögliche DNA-Kontaminationen aus der RNA zu entfernen, wurden 2 μ g der isolierten Gesamt-RNA vor der cDNA-Synthese mit RNase-freier DNaseI nach Herstellerangaben behandelt. Die cDNA wurde unter Verwendung von Oligo(dT) Oligonukleotiden als Primer und der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reversen Transcriptase

Material und Methoden

(Thermo Fisher Scientific) synthetisiert. Zur Überprüfung der cDNA-Qualität wurde eine PCR mit den Ubiquitin-spezifischen Primern Ubi fw und Ubi rv (Anhang 6.1) durchgeführt und die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.3.6 Quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR)

Zur quantitativen Bestimmung der Transkriptmenge eines Gens, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die wie unter Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben hergestellte cDNA wurde 1:10 oder 1:100 verdünnt als Matrize eingesetzt. Amplifiziert wurde die cDNA mit dem SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix (Bioline GmbH, Luckenwalde) in einem AriaMx Realtime PCR System (Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn). Die relativen Transkriptmengen wurden durch Normierung auf das Referenzgen *UBC9 (UBIQUITIN CARRIER PROTEIN 9)* bestimmt. Pro Primerpaar wurden je drei technische Replikate sowie eine Wasserkontrolle in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Oligonukleotide wurden mit dem Online Werkzeug Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) ausgewählt, wobei die Länge der zu amplifizierenden Fragmente zwischen 90 und 250 Basenpaaren lag. Die Primer-Effizienz wurde unter Verwendung verschiedener cDNA-Verdünnungen mit Hilfe der Steigung einer Standardkurve bestimmt.

Ansatz für qRT-PCR	
1 µl	cDNA
0,8 µl	Primer 1 (10 µM)
0,8 µl	Primer 2 (10 µM)
10 µl	2x SensiFast SYBR Lo-ROX Mix
7,4 µl	MilliQ

Das folgende Thermalprofil wurde verwendet:

qRT-PCR-Programm		
1 Zyklus	2 min	95°C
40 Zyklen	5 sek	95°C
	10 sek	60°C
	10 sek	72°C
1 Zyklus	30 sek	95°C
	30 sek	60°C
	30 sek	95°C

Der letzte Zyklus diente der Aufzeichnung einer Schmelzkurve von 60°C bis 95°C um eventuelle, unerwünschte Nebenprodukte zu detektieren. Berechnet wurde die relative Quantität (RQ, *relative quantity*) nach der Formel (Rieu und Powers, 2009):

$$RQ = \frac{1}{E^{Cq}}$$

RQ Relative Quantität
E experimentell bestimmte Primer-Effizienz (E = 10^{-1/Steigung der Standardkurve})
Cq Zyklus bei dem das Amplikon-Fluoreszenzsignal einen manuell gesetzten Schwellenwert erreicht

2.2.3.7 Transkriptom-Analyse mittels ArrayXS Arabidopsis Microarray

Für die Transkriptom-Analysen wurde der ArrayXS Arabidopsis der Firma OakLabs GmbH (Hennigsdorf) verwendet. Die Pflanzen für das Probenet wurden unter Kurztagbedingungen kultiviert. Von 5 Wochen auf Erde kultivierten Pflanzen wurden nach 6 Stunden im Licht und nach einer verlängerten Dunkelphase von 22 Stunden je 2 Blätter pro Pflanzen geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Je Linie und Zeitpunkt wurden 3 Pflanzen beprobt. Die für den Microarray eingesetzte RNA wurde mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und ihre Qualität auf einem Bioanalyzer (Agilent 2100, Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn) überprüft. Die Hybridisierung des Probenets wurde von der Firma OakLabs GmbH (Hennigsdorf) durchgeführt. Transkripte, die in allen drei 35S-*STKR1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp mindestens 2-fach dereguliert waren ($p \leq 0,05$), wurden identifiziert und falsch positive Signale wurden mittels Benjamini-Hochberg Multipler Testkorrektur eliminiert.

2.2.3.8 Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Fields und Song, 1989) wurde verwendet um mögliche Interaktionspartner eines Proteins zu identifizieren.

Zunächst wurde der mit dem Vektor pGBT9, der die codierende Sequenz des Köderproteins enthielt, transformierte Hefestamm Y187 in 5 ml SCAD_{-trp}-Medium über Nacht bei 30°C inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 150 ml SCAD_{-trp}-Medium überimpft und bei 30°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Die OD_{600} der Hefekultur, die zwischen 0,5 und 1 lag, wurde bestimmt und 100 OD -Einheiten durch Zentrifugation bei 4000 Upm für 5 Minuten geerntet. Zwischenzeitlich wurden AH109-Zellen, welche die entsprechende Genbank enthielten, aufgetaut, in 20 ml YPAD-Medium resuspendiert und für 10 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die AH109-Suspension auf das Pellet der Y187-Zellen gegeben, gemischt und die Zellen nach erneuter Zentrifugation bei 4000 Upm für 5 Minuten sowie Entfernen des Überstands im Rückfluss resuspendiert. 350 μ l Aliquots der Suspension wurden auf 5 YPAD-Platten verteilt und 5 Stunden lang bei 30°C bebrütet. In dieser Zeit sollten sich die haploiden Hefen paaren und dadurch diploide Zellen bilden. Die Zellen wurden 2-mal mit je 3 ml YPAD-Medium von den Platten gespült, in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt und nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4000 Upm in 8 ml Wasser aufgenommen. Auf 7 große SCAD_{-leu-trp-his+4 mM 3-AT}-Platten wurde je 1 ml der Suspension ausplattiert.

Zur Bestimmung der Paarungseffizienz, sprich der Gesamtzahl diploider Zellen, wurden je 100 μ l von 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} -Verdünnungen auf SCAD_{-leu-trp} Platten ausgebracht, für 3 Tage

Material und Methoden

bei 30°C inkubiert und nach Zählen der gewachsenen Kolonien die Effizienz der Paarung berechnet.

Kolonien, die auf den großen SCAD_{-leu-trp-his+4} mM 3-AT-Platten gewachsen waren, wurden gepickt und auf SCAD_{-leu-trp-his+4} mM 3-AT-Platten mit beziehungsweise ohne Genescreen-Membran (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau) überstrichen. Nach der Inkubation bei 30°C für 2 Tage wurde zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktionen ein LacZ-Filter-Assay durchgeführt, bei dem die Expression des zweiten Reportergens nachgewiesen wurde. Hierfür wurde Whatman-Papier zunächst mit LacZ-Puffer [Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7,0), 0,064% X-Gal (w/v; gelöst in Dimethylformamid), 0,26% β-Mercaptoethanol (v/v)] angefeuchtet. Nach dem Zellaufschluss der Hefen in flüssigem Stickstoff wurde die Genescreen-Membran mit den Zellen auf das mit LacZ-Filter-Assay-Lösung getränkte Whatman-Papier gelegt und für 4 bis 6 Stunden bei 30°C inkubiert. Eine Blaufärbung der Hefekolonien bestätigte eine Wechselwirkung zwischen den untersuchten Proteinen.

2.2.4 Biochemische und physiologische Methoden

2.2.4.1 Induktion und Aufreinigung von affinitätsmarkierten Proteinen aus *E. coli*

Zur Aufreinigung affinitätsmarkierter Proteine wurden zunächst die entsprechenden Vektoren in *E. coli*-Zellen (M15 für MBP-Induktion, BL21 für GST-Induktion) transformiert. Eine Vorkultur dieser Bakterien wurde in 10 ml LB-Medium mit adäquaten Antibiotika angesetzt und über Nacht inkubiert. 5 ml dieser Vorkultur wurden in 100 ml frisches Medium mit Antibiotika überimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 37°C schütteln gelassen und regelmäßig die oD₆₀₀ bestimmt. Erreichte die Kultur eine oD₆₀₀ von 0,5 wurde 1 mM IPTG (Endkonzentration) dazu pipettiert und dadurch die Proteinexpression induziert. Die Kultur wurde für 3 Stunden weiter bei 37°C geschüttelt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4000 Upm und 4°C.

Zur Aufreinigung Maltose-Bindeproteine (MBP) -markierter Proteine wurden Pellets einer 50 bis 100 ml Kultur verwendet. Dafür wurde das Pellet zunächst in 1ml Säulenpuffer [20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA] aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch viermalige Sonifikation (30 Sekunden bei 30% Intensität) aufgeschlossen, für 15 Minuten (13.000 Upm, 4°C) zentrifugiert und der Überstand, welcher die löslichen Proteine enthielt, auf 300 µl einer vorher mit Säulenpuffer äquilibrierten Amylose-Harz-Matrix (New England Biolabs) gegeben. Die Adsorption des MBP-markierten Proteins an die Matrix erfolgte während einer Inkubation für 3 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfkubator (10 Upm). Nach Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C für 1 Minute wurde der Überstand verworfen und die Matrix viermal mit je 500 µl Säulenpuffer gewaschen. Die Elution gebundener Proteine von der Matrix erfolgte durch

Material und Methoden

Zugabe von 300 µl Elutionspuffer [Säulenpuffer mit 10 mM Maltose] auf die Matrix und Inkubation auf dem Überkopfkubator bei 4°C und 10 Upm für 30 Minuten. Anschließend wurde für 1 Minute bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Eluate wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Aliquots der Überstände wurden mit 4-fach Lämmli-Puffer versetzt, bei 95°C für 10 Minuten inkubiert und schließlich zur Überprüfung auf ein Proteingel aufgetragen. Die Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen erfolgte nach Herstellerangaben (GE Healthcare, München). Hemagglutinin (HA) -markierte Proteine wurden über eine Anti-HA-Agarose-Matrix nach Herstellerprotokoll (Anti-HA Agarose, Pierce Biotechnology, Rockford USA) aufgereinigt.

4-fach Lämmli-Puffer	
200 mM	Tris-HCl, pH 6,8
18% (v/v)	β-Mercaptoethanol
40% (v/v)	Glycerin
0,01% (w/v)	Bromphenolblau
8% (w/v)	SDS

2.2.4.2 Quantifizierung löslicher Proteine mittels Bradford-Methode

Der Gehalt löslicher Proteine aus Proteinextrakten wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurde das Bradford-Konzentrat 1:5 mit Wasser verdünnt, 200 µl in eine Vertiefung einer Multititerplatte vorgelegt und schließlich 1-10 µl Proteinextrakt zu pipettiert. In einem Plattenlesegerät (Synergy HT, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und mit Hilfe einer mitgeführten Eichgerade von Rinderserumalbumin konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.4.3 Kinase Assay

Für den Kinase Assay wurden zunächst Proteine wie unter Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben aufgereinigt und anschließend ihre Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (2.2.4.2) bestimmt. 1 µg AKIN10-HA beziehungsweise 2 µg MBP-GRIK2 und 1 µg GST-AKIN10 wurden zusammen mit 5 µg MBP-SAMS oder dem vermeintlichen AKIN10 Substrat MBP-STKR1 30 Minuten bei 30°C in einem Kinasepuffer [50 mM Tris HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM ATP] inkubiert. Durch Zugabe von 4-fach Lämmli und 5-minütigem Erhitzen bei 95°C wurde die Reaktion abgestoppt. Im Anschluss wurden die Proben auf ein Proteingel aufgetragen und das Gel wie unter Abschnitt 2.2.4.8 beschrieben einer Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gelfärbung unterzogen. Als Positivkontrolle diente dabei die Inkubation mit MBP-fusioniertem SAMS-Peptid, welches ein Substrat für AKIN10 darstellt. Als Negativkontrolle wurden nur die möglichen Substrate beziehungsweise zusammen mit der kinaseinaktiven AKIN10_{K48R}-Variante und/oder MBP-GRIK2 inkubiert.

Material und Methoden

2.2.4.4 GFP-Trap® aus *N. benthamiana* für Ko-Immünpräzipitation und Phosphorylierungs-Nachweis

Die GFP-Trap® wurde nach Schwessinger et al. (2011) mit wenigen Modifikationen durchgeführt (Schwessinger et al., 2011). Dazu wurden 1 bis 2 g Blattmaterial, welches das aufzureinigende Protein exprimierten, in flüssigen Stickstoff gemörsert und mit 2 ml Lysispuffer [50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄·2 H₂O, 1-fach Complete Proteaseinhibitor, EDTA-frei, 1-fach PhosSTOP, 1% (v/v) IGEPAL CA-630, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVPP)] gemischt. Nach dem Auftauen der Suspension wurde diese in ein Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (2.2.4.2.). Anschließend wurden 2 bzw. 5 mg Gesamtproteinextrakt auf eine magnetische Matrix (GFP-Trap®_M, ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried) gegeben. Die Matrix, welche mit sogenannten Nanobodies gekoppelt ist, wurde vor dem Gebrauch noch 4-mal mit Lysispuffer ohne IGEPAL äquilibriert. Die Adsorption GFP-markierter Proteine an die Matrix erfolgte während einer Inkubation von 3 Stunden bei 4°C und 10 Upm auf dem Überkopfkubator. Der Überstand wurde nach der Inkubationszeit verworfen und die Matrix 5-mal mit je 1 ml TBS [20 mM Tris, 500 mM NaCl] mit 0,5% (v/v) IGEPAL gewaschen.

Zum Nachweis von Proteininteraktionen durch Ko-Immünpräzipitation wurden die Proteine mit 4-fach Lämmli-Puffer für 10 Minuten bei 70°C eluiert und auf ein Proteingel aufgetragen. Nach der Separation der Proben in einem Proteingel wurden Western Blots mit GFP-Antikörpern und HA-Antikörpern zur Detektion des Interaktionspartners durchgeführt. Um Phosphoproteine nachzuweisen, wurden die Eluate nach der Proteingelektrophorese einer Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gelfärbung unterzogen (2.2.4.8).

2.2.4.5 Proteinabbau-Assay

Hierfür wurde zunächst *N. benthamiana*-Blattmaterial, welches HA-fusioniertes STKR1 exprimiert, in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zermahlen. Nach der Zugabe von Extraktionspuffer [50 mM HEPES-KOH, pH 7,2, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 250 mM Saccharose] wurden Zelltrümmer über Filtration des Extrakts durch eine Nylonmembran (Filter Mesh 100, CelLytic™ PN Isolation/Extraction Kit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Filtrats wurde mittels Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt und mit Extraktionspuffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Eine Probe wurde mit dem Proteasominhibitor MG132 (100 µM in 1% Ethanol) inkubiert, während zu der Kontrollprobe 1% Ethanol gegeben wurden. Jeder Probe wurden nach 0/0,5/1 und 3 Stunden Inkubation 20 µl Aliquots entnommen, mit 4-fach Lämmli versetzt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden auf ein Proteingel aufgetragen

Material und Methoden

und der Einfluss des MG132 auf die Akkumulation des STKR1-HA nach einem anti-HA Western Blot analysiert.

2.2.4.6 Proteingelelektrophorese und Western Blot

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden sowohl Bis-Tris- als auch SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

SDS-PAA-Gele					
12,5% Trenngel		10% Trenngel		Sammelgel	
0,75 ml	3 M Tris-HCl, pH 8,8	0,75 ml	3 M Tris-HCl, pH 8,8	0,4 ml	3 M Tris-HCl, pH 8,8
2,5 ml	Acrylamid (37,5:1)	2,0 ml	Acrylamid (37,5:1)	0,4 ml	Acrylamid (37,5:1)
0,06 ml	10% SDS	0,06 ml	10% SDS	0,032 ml	10% SDS
2,642 ml	Wasser	3,142 ml	Wasser	1,15 ml	Wasser
0,045 ml	10% APS	0,045 ml	10% APS	0,016 ml	10% APS
0,003 ml	TEMED	0,003 ml	TEMED	0,0016 ml	TEMED

Bis-Tris-Gele			
Trenngel		Sammelgel	
1,43 ml	3,5-fach Bis-Tris Puffer	0,71 ml	3,5-fach Bis-Tris Puffer
2 ml	Acrylamid (37,5:1)	0,35 ml	Acrylamid (37,5:1)
1,57 ml	Wasser	1,44 ml	Wasser
0,02 ml	10% APS	0,025 ml	10% APS
0,002 ml	TEMED	0,004 ml	TEMED

Um den Gesamtproteinextrakt aus Pflanzen zu analysieren, wurden Blattscheiben mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Heidolph, Schwabach) pulverisiert und mit 4-fach Lämmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 95°C erhitzt, die Zelltrümmer kurz pelletiert und 10 µl des Überstands auf ein Proteingel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Porablot, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) transferiert. Hierfür wurde die Membran zuerst in Transferpuffer [39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,0375% SDS, 20% Methanol, pH 8,2 (HCl)] äquilibriert und die Proteine aus dem Gel bei 1 mA/cm² für 1,5 Stunden auf die Membran gebloftet. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für mindestens 1 Stunde in Blockierlösung (TBS-T [20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1% Tween-20] mit 5% (w/v) Magermilchpulver) inkubiert und anschließend für 1 Stunde in der Antikörperlösung geschüttelt. Die Antikörper wurden dazu wie unter 2.1.2 beschrieben in 1% Magermilch-TBS-T verdünnt. Nach dem dreimaligen Waschen der Membran für 5 Minuten in TBS-T, wobei ungebundene Antikörper entfernt wurden, erfolgte die 1-stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, welcher mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Die Membran wurde wieder dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-T gewaschen. War der erste Antikörper schon Peroxidase-konjugiert entfiel die

Material und Methoden

Inkubation mit dem zweiten Antikörper und es wurde direkt nach dem Waschen mit dem Starten der Chemilumineszenz-Reaktion begonnen. Dazu wurde die Membran 1 Minute mit den Entwicklerlösungen 1 und 2 unter Schwenken inkubiert. Das antikörperspezifische Chemilumineszenzsignal wurde unter Verwendung eines Imagers (myECL™ Imager, Thermo Fisher Scientific) detektiert.

Entwicklerlösungen			
Lösung 1		Lösung 2	
5 ml	100 mM Tris-HCl, pH 8,5	5 ml	100 mM Tris-HCl, pH 8,5
72 µl	Culu (250 mM Luminol, 90 mM p-Cumarinsäure)	3 µl	H ₂ O ₂

2.2.4.7 Western Blot–Stripping

Zur Entfernung gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran wurde die Membran zunächst für 15 Minuten in 50 ml 50°C warmen Puffer [25 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS] inkubiert. Dem folgte die Zugabe von 500 µl β-Mercaptoethanol und eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach dreimal 5-minütigem Waschen in MilliQ-Wasser konnte die Membran abermals blockiert und anschließend mit neuen Antikörpern inkubiert werden.

2.2.4.8 Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gelfärbung

Um Phosphoproteine in SDS-PAA-Gelen nachzuweisen, wurde nach der Elektrophorese eine Färbung mit Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Bei dieser In-Gel-Detektionsmethode wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Die Detektion Fluoreszenz-markierter Phosphoproteine erfolgte an einem Octopus QPLEX Fluoreszenz Imager (NH DyeAGNOSTICS GmbH, Halle). Anschließend wurde das Gel mit InstantBlue™ Protein Stain (Expedeon Ltd, Cambridge, UK) nach Herstellerangaben gefärbt um sämtliche Proteine auf dem Gel sichtbar zu machen.

2.2.4.9 Messung der Ionen-Leckage

Die elektrische Leitfähigkeit wurde nach Stall et al. (1974) bestimmt (Stall et al., 1974). Hierbei wird die Leitfähigkeit als prozentualer Anteil von der maximal möglichen Leitfähigkeit, welche nach einstündigem Aufkochen der Proben gemessen wird, in µS/cm angegeben.

2.2.4.10 Bestimmung der Gehalte an Chlorophyll und Carotinoiden

Chlorophyll und Carotinoide wurden aus einer definierten Menge Blattmaterial durch 1-stündige Inkubation in 95%igem Ethanol extrahiert. Die Absorption der Extrakte wurde bei 648 nm, 664 nm und 470 nm im Plattenlesegerät (Synergy HT, BioTek Instruments GmbH,

Material und Methoden

Bad Friedrichshall) photometrisch bestimmt. Für die Berechnung der Chlorophyll- und Carotinoidgehalte wurden die gemessenen Werte in die folgenden Formeln eingesetzt (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Chlorophyll a } \left(\frac{mg}{g \text{ Fg}}\right) = \frac{(13,36 * A_{664}) - (5,19 * A_{648}) * V}{Fg}$$

$$\text{Chlorophyll b } \left(\frac{mg}{g \text{ Fg}}\right) = \frac{(27,43 * A_{648}) - (8,12 * A_{664}) * V}{Fg}$$

$$\text{Chlorophyll a + b } \left(\frac{mg}{g \text{ Fg}}\right) = \frac{(5,24 * A_{664}) + (22,24 * A_{648}) * V}{Fg}$$

$$\text{Chlorophyll } \frac{a}{b} \text{ Ratio} = \frac{\text{Chlorophyll a}}{\text{Chlorophyll b}}$$

$$\text{Carotinoide } \left(\frac{mg}{g \text{ Fg}}\right) = \frac{(4,785 * A_{470} + 3,657 * A_{664} - 12,76 * A_{648}) * V}{Fg}$$

A ₆₆₄	Absorption bei 664 nm
A ₆₄₈	Absorption bei 648 nm
A ₄₇₀	Absorption bei 470 nm
V	Verdünnungsfaktor (Extraktvolumen/Meßvolumen)
Fg	Frischgewicht (g)

2.2.4.11 Bestimmung des Anthocyanengehalts

Zur Quantifizierung des Anthocyanengehalts der *A. thaliana*-Pflanzen wurde nach einem abgeänderten Protokoll von Nakata und Kollegen (2013) vorgegangen (Nakata et al., 2013). Hierfür wurde eine definierte Menge Blattfrischgewicht mit einem Stator-Rotor-Homogenisator (Heidolph, Schwabach) homogenisiert und mit 500 µl Extraktionspuffer [45% Methanol, 5% Essigsäure, 50% MilliQ] gemischt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 4°C unter moderatem Schütteln und einem Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 13.000 Upm wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und abermals für 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Dieser Überstand wurde für die Absorptionsmessung am Plattenlesegerät (Synergy HT, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) bei 530 nm und 657 nm eingesetzt. Zur Berechnung des relativen Anthocyanengehalts wurden die gemessenen Werte in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{relativer Anthocyanengehalt } \left(\frac{A_{530}}{Fg}\right) = \frac{\left((A_{530} - (0,25 * A_{657})) * \text{Extraktionsvolumen}\right)}{Fg}$$

A ₅₃₀	Absorption bei 530 nm
A ₆₅₇	Absorption bei 657 nm
Fg	Frischgewicht (g)

Material und Methoden

2.2.4.12 Messung von löslichen Zuckern und Stärke aus Blattmaterial von *A. thaliana*

Die Extraktion löslicher Zucker erfolgte während einer Inkubation in 250 µl 80%igem Ethanol für 90 Minuten bei 80°C aus einer definierten Menge Blattmaterial. Nach dem Zentrifugieren der Proben für 1 Minute bei 13.000 Upm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dem Einengen der Extrakte im Vakuumkonzentrator (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg) folgte die Aufnahme in 200 µl MilliQ.

Messpuffer pH 6,9	
100 mM	Imidazol
5 mM	MgCl ₂
2 mM	NAD
1 mM	ATP
2 U/ml	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die Quantifizierung der Stärke erfolgte nach alkalischer Hydrolyse des entfärbten Blattmaterials der Ethanol-Extraktion. Mit einem Stator-Rotor-Homogenisator (Heidolph, Schwabach) wurde das Pflanzengewebe zusammen mit 500 µl 0,2 M Kaliumhydroxid homogenisiert und die Stärke durch Inkubation bei 95°C für 1 Stunde in Lösung gebracht. Die Stärkelösung wurde durch Zugabe von 45 µl 1 N Essigsäure neutralisiert. Die hydrolytische Spaltung der Stärke in Glucoseeinheiten erfolgte nach Inkubation der Stärkelösung mit 100 µl Enzymlösung [0,1 M Natriumacetat (pH 6); 7,3 U α-Amylase; 5 U Amyloglucosidase] über Nacht bei Raumtemperatur. Um die enzymatische Reaktion abzustoppen, wurde der Amyloglucosidaseverlauf für 10 Minuten bei 95°C inkubiert.

Die Gehalte der löslichen Zucker und der Glucoseeinheiten der Stärkehydrolyse wurden über einen optisch gekoppelten Test einer Substratketten-Reaktion (Bergmeyer und Gawehn, 1970) bestimmt. Hierbei ist der Umsatz der zu bestimmenden Hexosen an die NADH/H⁺ bildende Reaktion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gekoppelt. Diese katalysiert den Umsatz von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonolaktone unter Verbrauch von NAD⁺ und Bildung von NADH/H⁺, welches spektrophotometrisch (Anthos Zenyth 200rt, Mikrosysteme GmbH, Krefeld) durch einen Anstieg der Extinktion bei 340 nm gemessen werden kann. Durch Zugabe von Hexokinase wurde die Kinetik für Glucose bis zum Einstellen der Plateauphase durch vollständigen Umsatz aufgezeichnet. Anschließend folgte die Messung von Fructose nach Phosphogluco-Isomerase-Zugabe sowie von Saccharose nach dem Zugeben der Invertase.

Der Zusammenhang zwischen der Extinktionsänderung und der Konzentration wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben. Da für die Messung eine Mikrotiterplatte verwendet wurde, erfolgte die Auswertung mit Hilfe folgender Formel:

Material und Methoden

$$\Delta c = \frac{(\Delta E \cdot \pi \cdot r^2)}{\epsilon_{340} \left(\frac{NADH}{H^+} \right) \cdot V}$$

ΔE	Extinktionskoeffizient
r	Radius der Messkavität (0,35 cm)
$\epsilon_{340(NADH/H^+)}$	Extinktionskoeffizient (6,32 mM ⁻¹ ·cm ⁻¹)
V	eingesetztes Volumen

2.2.5 Mikroskopische Methoden

2.2.5.1 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (KLSM)

Soweit nicht anders beschrieben wurde die Lokalisierung von Fluorophor-Fusionsproteinen 2 Tage nach der Infiltration (2.2.1.1) untersucht. Hierfür wurden Blattstücke aus einem infiltrierten Blatt ausgestanzt, mit der abaxialen Blattseite auf einen mit doppelseitigem, transparentem Klebeband beklebten Objektträger gelegt und mit Wasser benetzt. Die konfokalen Analysen von Fluoreszenz-Reporterkonstrukten wurden an einem Leica TCS SP5 II (AOBS) Laserscanning Mikroskop (KLSM; Leica Mikroskope Vertrieb GmbH, Wetzlar) sowie einem Zeiss LSM510 Laserscanning Mikroskop (KLSM; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) durchgeführt. Die Anregung von GFP und YFP erfolgte mit einem Argonlaser bei 488 bzw. 514 nm und die Anregung von mCherry bei 561 nm. Das emittierte Licht wurde für GFP im Detektionsbereich von 497 bis 526 nm, für YFP bei 527 bis 561 nm und für mCherry im Bereich von 587 bis 610 nm aufgenommen. Die Autofluoreszenz des Chlorophylls wurde zusätzlich im Bereich von 680 bis 730 nm detektiert. Zur Bearbeitung der erhaltenen Datensätze wurde die Leica-Software LAS_AF für das Leica TCS SP5 II (AOBS) bzw. für das Zeiss-Mikroskop die Zeiss-Software ZEN sowie Adobe Photoshop CS6 verwendet.

3 Ergebnisse

Für das Überleben von sessilen Lebewesen wie Pflanzen ist es essentiell sich an nicht-optimale Umweltbedingungen, die zu Stress führen, anzupassen. Der Proteinkinasekomplex SnRK1 spielt in der Anpassung auf energetischen Stress durch metabolische und transkriptionelle Umprogrammierung eine entscheidende Rolle. Trotz der weitreichenden Effekte eines SnRK1-Aktivitätssignals sind bisher nur wenige Proteine bekannt, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein SnRK1-Interaktionsnetzwerk etabliert und ausgewählte Interaktoren näher charakterisiert. Ziel war es Komponenten zu identifizieren, die in die SnRK1-Signaltransduktion involviert sind.

3.1 Identifizierung von Interaktionspartnern der *A. thaliana* SnRK1 α -Untereinheiten AKIN10 und AKIN11

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen der SnRK1 α -Untereinheiten SnRK1.1/AKIN10 (AT3G01090) und SnRK1.2/AKIN11 (AT3G29160) aus *Arabidopsis*, wurden sowohl mit AKIN10 als auch mit AKIN11 Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterungen von cDNA-Banken durchgeführt. Dazu wurden die codierenden Sequenzen von *AKIN10* und *AKIN11* aus *A. thaliana* in den offenen Leserahmen der GAL4-Bindedomäne (BD) des pGBT9 Vektors kloniert. Der Transformation dieser Köderplasmide in den Hefestamm Y187 (Mat α) folgte die Durchmusterung einer cDNA-Bank aus *A. thaliana*-Infloreszenz (Fan et al., 1997).

Die Durchmusterungen erfolgte durch Paarung dieser Hefen mit dem Hefestamm AH109 (Mat α), der die mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) -fusionierte cDNA-Bank enthält. Um eine sättigende Durchmusterung der cDNA-Bank zu gewährleisten, wurde durch Verdünnungsreihen der diploiden Hefen auf SCAD_{-leu-trp}-Platten sichergestellt, dass in jedem Experiment mindestens $1 \cdot 10^6$ diploide Klone gesichtet wurden. Aus Klonen, die sowohl histidinautotroph als auch β -Galaktosidase positiv waren, wurden beide Plasmide isoliert und in *E. coli* KC8-Zellen transformiert. Der Separation der Transformanden auf entsprechenden Selektionsmedien, folgte die Isolierung der Plasmid-DNA, die das Beuteplasmid enthielt. Die so erhaltenen Beuteplasmide, welche für mögliche Interaktionspartner codieren, wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen in eine *blastx*-Analyse (<https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>) gegen das *Arabidopsis*-Genom eingesetzt. Die Ergebnisse der Durchmusterungen der *Arabidopsis*-cDNA-Bank sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Ergebnisse

Köder	Beute (<i>blastx</i> -Treffer)	AGI Code
AKIN10	AKINbeta1	AT5G21170
	AKINbeta2	AT4G16360
	VIP1	AT1G43700
	SKIN-ähnliches Protein	AT5G24890
	HSP20-ähnliches Chaperon	AT5G02480
	AIG2-ähnliches Protein	AT5G39730
	DUF581 Protein	AT1G22160
	DUF581 Protein	AT1G78020
	DUF581 Protein	AT5G47060
	DUF581 Protein	AT3G63210
AKIN11	AKINbeta1	AT5G21170
	AKINbeta2	AT4G16360
	CDKF;1	AT4G28980
	AIG2-ähnliches Protein	AT5G39730
	SKIN-ähnliches Protein	AT2G24550
	S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige Methyltransferase Superfamilie	AT5G27400
	DUF581 Protein	AT1G74940
	DUF581 Protein	AT1G78020
	DUF581 Protein	AT5G47060
	DUF581 Protein	AT3G63210

Tabelle 3.1: Beste *blastx*-Treffer der mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung identifizierten möglichen AKIN10/AKIN11-Interaktionspartner. Klone, welche die Interaktionspartner enthielten, wurden nach der Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung von SCAD_{-leu-trp-his}-Platten mit 4mM 3-Aminotriazol gepickt und mittels LacZ-Filter-Test auf Interaktion überprüft. Nach der Isolierung und Sequenzierung des Beuteplasmids wurden die Interaktionspartner mit Hilfe der *blastx*-Analyse identifiziert.

Mit beiden SnRK1 α -Untereinheiten wurden AKINBETA1 (AT5G21170), AKINBETA2 (AT4G16360) sowie das AIG2 (AvrRPT2-INDUCED GENE2) -ähnliche Protein AT5G39730 aus der cDNA-Bank isoliert (Tabelle 3.1). Die Durchmusterung mit AKIN10 resultierte außerdem in der Identifizierung von einem HSP-20-ähnlichem Chaperon (AT5G02480), VIP1 (VIRE2-INTERACTING PROTEIN 1, AT1G43700) und dem SKIN (SnRK1A-INTERACTING NEGATIVE REGULATOR) -ähnlichen Protein AT5G24890 als potentielle Interaktionspartner, während mit AKIN11 als Köder CDKF;1 (CYCLIN-DEPENDENT KINASE F;1, AT4G28980) und das SKIN-ähnliche Protein AT2G24550 gefunden wurden.

Die beiden SKIN-ähnlichen Proteine, sowie VIP1 und CKDF;1 wurden in einem Test auf direkte Interaktion in Hefe auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit beiden Arabidopsis SnRK1 α -Untereinheiten hin untersucht. Wie aus Abbildung 3.1 ersichtlich, waren die vier potentiellen Interaktionspartner in der Lage sowohl mit AKIN10 als auch mit AKIN11 in Hefe zu interagieren.

Ergebnisse

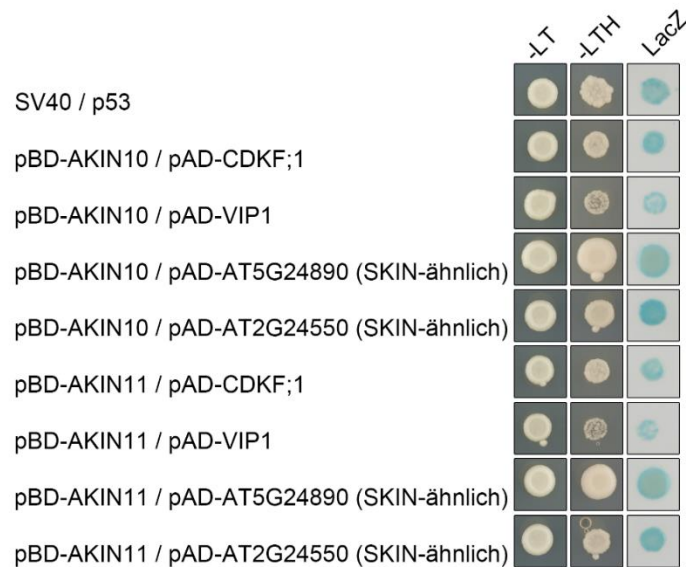


Abbildung 3.1: Direkte Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit CDKF;1 VIP1 und SKIN-ähnlichen Proteinen in Hefe. AKIN10 und AKIN11 wurden im pGBT9 Vektor an die GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert und CDKF;1, VIP1, AT5G24890 sowie AT2G24550 im pAD an die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD). Die Interaktion zwischen murinem p53 und dem SV40-Antigen diente als Positivkontrolle. Die Proteine wurden im Hefestamm Y190 ko-exprimiert. Nach Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei HIS3 das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des LacZ-Reportergens.

Neben den bereits erwähnten Proteinen konnten in Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterungen mit AKIN10 und AKIN11 noch weitere vermeintliche Interaktionspartner der beiden SnRK1 α -Untereinheiten gefunden werden (Tabelle 3.1).

Eine Gruppe von Proteinen, die gehäuft als mögliche Interaktionspartner identifiziert wurden, waren Proteine mit einer DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 581 (DUF581), eine Domäne, die noch nicht näher charakterisiert ist. So wurden in der Durchmusterung mit AKIN10 die DUF581-Proteine mit den AGI Codes AT1G22160, AT1G78020, AT5G47060 und AT3G63210 als mögliche Interaktionspartner identifiziert (Tabelle 3.1). Die Durchmusterung mit AKIN11 ergab ebenfalls die DUF581-Proteine AT1G78020, AT5G47060 und AT3G63210 sowie zusätzlich AT1G74940 als potentielle Partner für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dies führte zu der Hypothese, dass Proteine mit einer DUF581-Domäne generell in der Lage sind mit SnRK1 zu interagieren.

3.1.1 SnRK1 α -Untereinheiten interagieren in Hefe mit Proteinen der pflanzenspezifischen DUF581-Proteinfamilie

Da sowohl bei den Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterungen als auch in den Interaktom-Datenbanken IntACT (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>) und BioGRID (<http://www.thebiogrid.org.>) DUF581-Proteine als mögliche AKIN10/AKIN11-Interaktionspartner identifiziert werden

Ergebnisse

konnten, wurde vermutet, dass die DUF581-Domäne in der Vermittlung der Interaktion mit den SnRK1 α -Untereinheiten agiert.

Das Arabidopsis-Genom enthält 19 Gene, die für mögliche DUF581-enhaltene Proteine codieren (Tabelle 3.2). Die Größe der Proteine variiert von 93 Aminosäuren im Falle von DUF581-9 bis zu 344 Aminosäuren bei DUF581-14. Die Proteine DUF581-3 (AT1G53885) und DUF581-4 (AT1G53903) besitzen identische Aminosäuresequenzen, wobei das Arabidopsis-Genom zwei Loci beinhaltet, welche für diese Sequenz codieren können. Ob beide Loci funktionelle Gene darstellen oder nur ein Locus transkriptionell aktiv ist, ist momentan noch nicht bekannt. Abgesehen von der meist carboxyterminal lokalisierten DUF581-Domäne weisen die Proteine nur eine geringe Sequenzidentität auf.

Name	AGI Code	Länge (AA)	Position der DUF581 Domäne	Anzahl zugehöriger ESTs
DUF581-1	AT1G19200	215	138-192	3
DUF581-2	AT1G22160	147	67-121	61
DUF581-3	AT1G53885	126	36-85	10
DUF581-4	AT1G53903	126	36-85	4
DUF581-5	AT1G74940	222	140-192	81
DUF581-6	AT1G78020	162	78-132	76
DUF581-7	AT1G79970	250	n.d.	56
DUF581-8	AT2G25690	324	254-307	6
DUF581-9	AT2G44670	93	10-59	103
DUF581-10	AT3G22550	267	210-264	26
DUF581-11	AT3G63230	155	31-84	0
DUF581-12	AT4G17670	159	67-119	23
DUF581-13	AT4G39795	126	60-115	3
DUF581-14	AT5G11460	344	265-314	6
DUF581-15	AT5G20700	248	170-224	102
DUF581-16	AT5G47060	177	89-140	32
DUF581-17	AT5G49120	150	59-110	4
DUF581-18	AT5G65040	113	50-99	12
DUF581-19	AT3G63210	263	211-262	54

Tabelle 3.2: In TAIR annotierte Proteine mit DUF581-Domäne. Die 1. Spalte gibt die in dieser Arbeit verwendeten Namen der DUF581-Proteine an. Spalte 2 und 3 enthalten die zugehörigen AGI Codes bzw. die Länge der Aminosäuresequenz. In Spalte 4 ist die Position der DUF581-Domäne innerhalb der jeweiligen Aminosäuresequenz aufgeführt. Spalte 5 führt die laut TAIR assoziierten ESTs dieser Proteine auf.

Die DUF581-Domäne dieser Proteine umfasst 49-54 Aminosäuren und enthält zwei hochkonservierte Doppel-Cystein-Motive, die durch 19 Aminosäuren voneinander getrennt sind (C-X2-C-X8-D-X3-Y-X5-F-CSXE/QCR) (Abbildung 3.2). Die Vorhersage der Sekundärstruktur mittels JPred (Cole et al., 2008) lässt vermuten, dass die beiden Cystein-Motive in α -Helices vorliegen, die durch einen kurzen β -Strang unterbrochen werden.

Ergebnisse

```

DUF581-1      138 -AKERRVLRDCPDLTSCCLCKKQLQ-GKDIYMYKGDEGFCSEKCRSLKIMEDSLKE
DUF581-2      67 QRRHSSDYSED--FLRSCSLCKRLLVHGRDIYMYRGDRAFCSLECRQQQITVDERKE
DUF581-3      36 -----NISELCFLKICHLCNKQLHQDKDVYMYRGDLGFCSECRSOMLIDDERKE
DUF581-4      36 -----NISELCFLKICHLCNKQLHQDKDVYMYRGDLGFCSECRSOMLIDDERKE
DUF581-5      140 --RHSGDFSDAGHFLRSCALCERLLVPGRDIYMYRGDKAFCSSECRQEQMAQDERKE
DUF581-6      78 --RHSGDFSDAGHFLRSCALCERLLVPGRDIYMYRGDKAFCSSECRQEQMAQDERKE
DUF581-8      254 NKEKFGSVFSDNFLGICNFCNKKLGGGDDIYMYR-ERSFCSECRSEEMMIDEE--
DUF581-9      10 -----GCEEPHFLESCLCRKHLGLNSDIEMYRGDKAFCSNECREEQVESDEAKE
DUF581-10     210 -NESDSDYSPDPSFLSCCCNCKKSLGPRDDIEMYRGDRAFCSSECRSIEMMYSEE--
DUF581-11     31 PAEKDKAQVQLTNFLELCRFCKKRLRHDEDVEMYGYLGAFCSKQCRAKOMACDV---
DUF581-12     67 ----SYYGQPHFLDSCFLCKRRLGDNREDIEMYRGDTFFCSSECREEQBERDEAKE
DUF581-13     60 NERYGGRSSPSSFLVNCGFCKRGLAPGRDIYMYKGDAAFCSSECREEQMEHDEGK-
DUF581-14     265 -----VLPKDFLSCYGCSSKILMGEDIYMYSGYKAFCSSECRSKEIDIDEEME
DUF581-15     170 -SPENSPEFQGLGFLNSCYLCKRKLHG-QDIFTYRGEKAFCSSECRSSSHANDERKE
DUF581-16     89 ----RFDIQPHFLDSCFLCKRRLGDNREDIEMYRGDTFFCSSECRQEQBERDEAKE
DUF581-17     59 -RRCYQD----SGFLEHCFLCKRRLPAKDIYMYKGDRAFCSSECRSKOMIMDEEE-
DUF581-18     50 -----MASNYDDFLKFCSLONRSLCHREDIYMYRGNNAFCSSECREKQIKQDERK-
DUF581-19     211 ----AMETKSTESFLSRCFTCKKNLDQKODIYTYRGEKGFCSSECRYQEMLLDQME-

```

* * * *

Abbildung 3.2: Sequenzvergleich der DUF581-Domänen von *A. thaliana* DUF581-Proteinen. Die Sequenzen wurden über CLUSTALW verglichen und mittels Boxshade (www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) dargestellt. Die konservierten Cysteinreste sind durch Sterne markiert.

Eines der Proteine (AT1G79970), hier DUF581-7 genannt, welches als Mitglied der DUF581-Proteinfamilie annotiert ist, weist nicht die zwei konservierten Cysteinpaare innerhalb der DUF581-Domäne auf, wodurch es wahrscheinlich kein echtes Mitglied dieser Proteinfamilie ist (Abbildung 3.3). Mit Ausnahme von *DUF581-11* (AT3G63230) konnte die Expression von allen *DUF581*-Genen durch Amplifikation aus Arabidopsis-cDNA nachgewiesen werden.

```

DUF581-7      208 REVSAEKESEN--ACA-----EESCYS-----EEDLFPMAMPLNP*-----
DUF581-8      267 FLGICNFCNKKLGGDDIYMYREKSFCSSECRSEEMMIDEEDEEPCIDMHESLKKLF*
          * * * * *

```

Abbildung 3.3: Proteinsequenzvergleich der DUF581-Domäne von DUF581-7 und DUF581-8. Übereinstimmende Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Die konservierten Cysteinpaare sind durch Sterne gekennzeichnet.

Die Annahme, dass sämtliche DUF581-Protein mit SnRK1 α -Untereinheiten Protein-Protein-Wechselwirkungen aufweisen, wurde experimentell überprüft, indem 17 Mitglieder der DUF581-Proteinfamilie aus Arabidopsis kloniert wurden und deren direkte Interaktion mit AKIN10 und AKIN11 in Hefen getestet wurde. DUF581-4 wurde aufgrund seiner Sequenzidentität mit DUF581-3 und DUF581-11 angesichts einer nicht nachweisbarer Expression aus diesem Test ausgeschlossen. Die codierenden Sequenzen der übrigen DUF581-Proteine wurden durch Klonierung in den pGAD-Vektor (pAD), mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Die Fusion der GAL4-Bindedomäne mit AKIN10 und AKIN11 erfolgte durch Klonierung in Vektor pGBT9 (pBD). In paarweisen Kombinationen von je einem pGAD-DUF581 Konstrukt sowie AKIN10 oder AKIN11 wurden Hefen transformiert und die Interaktion der beiden Proteine auf Selektionsmedium kontrolliert. Protein-Protein-Wechselwirkungen der GAL4-Fusionsproteine ermöglichen die Expression des Reportergens

Ergebnisse

HIS3 und somit das Wachstum auf histidinfreien Medium. Die Stärke dieser Interaktion wurde durch Verdünnungsreihen analysiert (Abbildung 3.4).

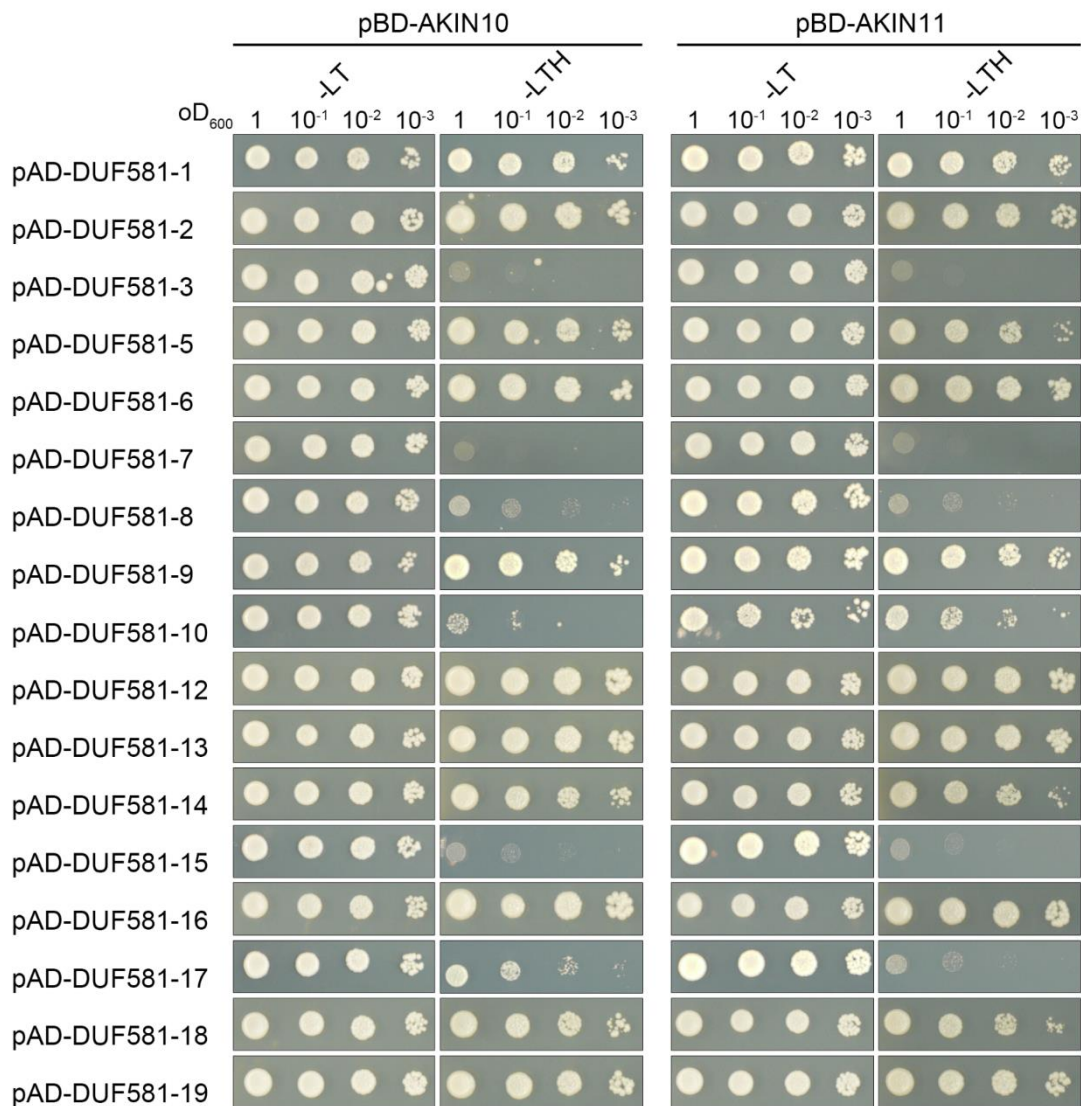


Abbildung 3.4: Interaktion von AKIN10 und AKIN11 mit DUF581-Proteinen aus Arabidopsis in Hefe. KIN10 und AKIN11 wurden im pGBT9-Vektor mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert, während DUF581-Proteine durch Klonierung in den pAD-Vektor mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert wurden. Die Expression in paarweisen Kombinationen erfolgte im Hefestamm Y190 auf Selektionsmedium für 3 Tage bei 30°C. –LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin und Tryptophan. –LTH steht für das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin und spiegelt die Expression des *HIS3*-Reportergens wider.

Die Auswertung des Hefewachstums zeigte, dass nahezu alle DUF581-Proteine mit AKIN10 und AKIN11 interagieren, wobei die Stärke der Interaktionen variiert (Abbildung 3.4). Für DUF581-10 kann eine Präferenz für die Interaktion mit AKIN11 vermutet werden, wohingegen DUF581-17 eine stärkere Interaktion mit AKIN10 aufwies. Solche Präferenzen für eine der beiden SnRK1 α -Untereinheiten wurden im Hinblick auf die übrigen DUF581-Proteine nicht detektiert. Für die Kombinationen mit DUF581-3, -7 und -15 konnte kein Wachstum auf dem Mangelmedium festgestellt werden, womit diese Proteine in Hefe nicht mit den SnRK1 α -Untereinheiten interagieren.

Ergebnisse

Ob es sich bei der Interaktion von DUF581-Proteinen mit SnRK1 um eine speziesübergreifende, konservierte Protein-Protein-Wechselwirkung handelt, wurde durch Klonieren der codierenden Sequenz eines DUF581-Proteins aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) überprüft. Dieses weist eine Sequenzidentität von 56% zu DUF581-6 aus Arabidopsis auf.



Abbildung 3.5: Interaktion der *S. tuberosum* SnRK1 α -Untereinheit *StubSNF1* mit einem DUF581-Protein (*StubDUF581-6-ähnlich*) aus Kartoffel. *StubSNF1* fusioniert mit der GAL4-BD wurde zusammen mit dem *StubDUF581-6-ähnlichen* Protein, welches mit der GAL4-AD fusioniert wurde, im Hefestamm Y190 exprimiert. – LT: Hefewachstum auf Medium ohne Leucin und Tryptophan. –LTH: Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (*HIS3*-Reportergeren). LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergerens.

Der Test der direkten Interaktion dieses Proteins gegen *StubSNF1*, einer SnRK1 α -Untereinheit aus Kartoffel, zeigte auch für diese Kombination Protein-Protein-Wechselwirkungen (Abbildung 3.5). Diese Beobachtung legt nahe, dass DUF581-Proteine und SnRK1 α -Untereinheiten aus anderen Pflanzen in Hefe interagieren und es sich somit um eine speziesübergreifende, konservierte Interaktion handelt.

3.1.2 Die DUF581-Domäne ist ausreichend und notwendig für die Interaktion mit SnRK1

Wie bereits erwähnt ist die Sequenzidentität der Arabidopsis DUF581-Proteine außerhalb der DUF581-Domäne eher gering, wodurch angenommen wurde, dass die DUF581-Domäne die Interaktion mit SnRK1 vermittelt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Deletionskonstrukt von DUF581-1, welches nur die Aminosäuresequenz der DUF581-Domäne (AS 138-192) enthält mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert und in Hefe auf Interaktion mit AKIN10 und AKIN11 getestet. Der Nachweis der Expression der Reportergene *HIS3* und *LacZ* durch Wachstum auf histidindefizienten Medium und Substratumsatz im *LacZ*-Test bestätigte, dass die DUF581-Domäne von DUF581-1 ausreichend für die Interaktion mit AKIN10 und AKIN11 ist (Abbildung 3.6 A). In der DUF581-Domäne sind die zwei hochkonservierten Cysteinpaare, die wahrscheinlich eine Zinkfinger-Struktur ausbilden (He und Gan, 2004), lokalisiert. Die Substitution eines Cysteinrestes würde zum Verlust dieser Struktur führen. Um zu überprüfen ob die Integrität des Cysteinmotives für die Interaktion der DUF581-Proteine mit der SnRK1 eine Rolle spielt, wurde das Cystein an Position 47 von DUF581-9 mittels gerichteter Mutagenese durch ein

Ergebnisse

Serin ersetzt. Während die Wildtypform von DUF581-9 eine deutliche Interaktion mit den SnRK1 α -Untereinheiten in Hefe aufwies, konnte für die DUF581-9_{C47S}-Mutante eine solche nicht detektiert werden (Abbildung 3.6 B). Die DUF581-Domäne scheint somit für die SnRK1-Interaktion sowohl ausreichend als auch notwendig zu sein.

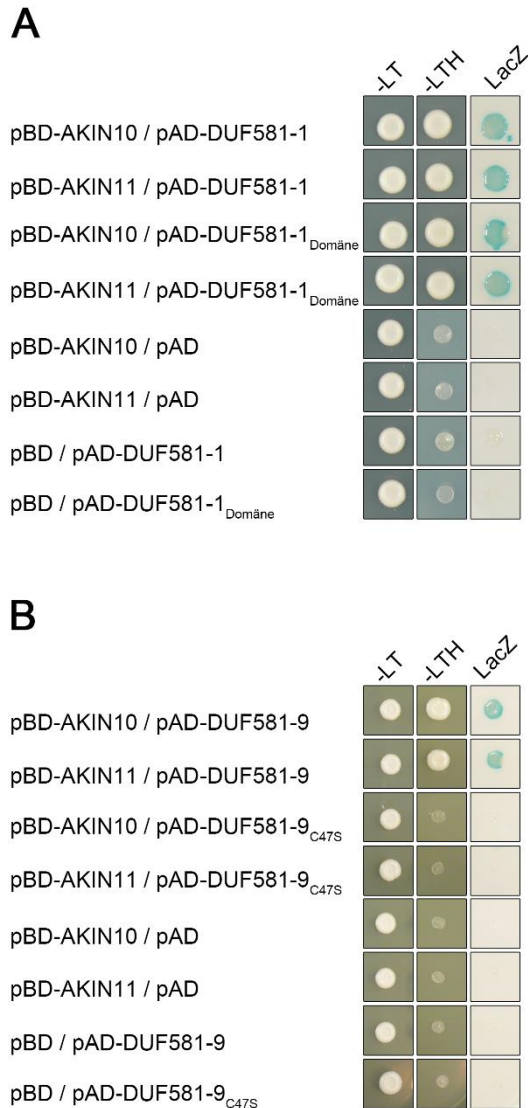


Abbildung 3.6: Die DUF581-Domäne ist ausreichend und notwendig in der Interaktion mit SnRK1. Nach dem Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. Leere pBD- und pAD-Vektoren dienen als Negativkontrollen. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium mit Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens. **A:** AKIN10 bzw. AKIN11 wurden im pGBT9-Vektor an die GAL4-DNA-BD fusioniert und in Kombination mit DUF581-1 oder DUF581-1_{Domäne} (AA 138-192) im Hefestamm Y190 exprimiert. **B:** AKIN10 bzw. AKIN11 fusioniert mit der GAL4-DNA-BD wurde mit pAD-DUF581-9 bzw. pAD-DUF581-9_{C47S} (Cystein zu Serin Substitution an Position 47) im Hefestamm Y190 ko-exprimiert.

Die Datenbank Analyse mittels Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) ergab, dass DUF581-Proteine nur in Pflanzen zu finden sind und somit offenbar pflanzenspezifische Funktion innehaben. Die in verschiedenen Pflanzenspezies zu findende Anzahl von Mitgliedern der DUF581-Proteinfamilie ist sehr variabel. So konnten in dem Moos *Physcomitrella patens* nur zwei DUF581-Proteine identifiziert werden, während in *Vitis vinifera* und *Ricinus communis* 14 bzw. 12 Mitglieder dieser Proteinfamilie nachweisbar sind. In Monokotyledonen wie Reis (*Oryza sativa*) und Rutenhirse (*Panicum virgatum*) ist ihre Anzahl mit 29 bzw. 48 Vertretern dieser Proteinfamilie sogar noch deutlich erhöht (Jamsheer und Laxmi, 2014; Jamsheer et al., 2015). Dies lässt auf eine Vervielfältigung von DUF581-Proteinen im Lauf der Evolution in höheren Pflanzen schließen.

Ergebnisse

Um erste Hinweise auf das Expressionsmuster verschiedener DUF581-Proteine in Arabidopsis zu erhalten, wurde eine Analyse mit der Genevestigator-Datenbank, welche die Datensätze verschiedener Microarray-Untersuchungen enthält, durchgeführt (Abbildung 3.7).

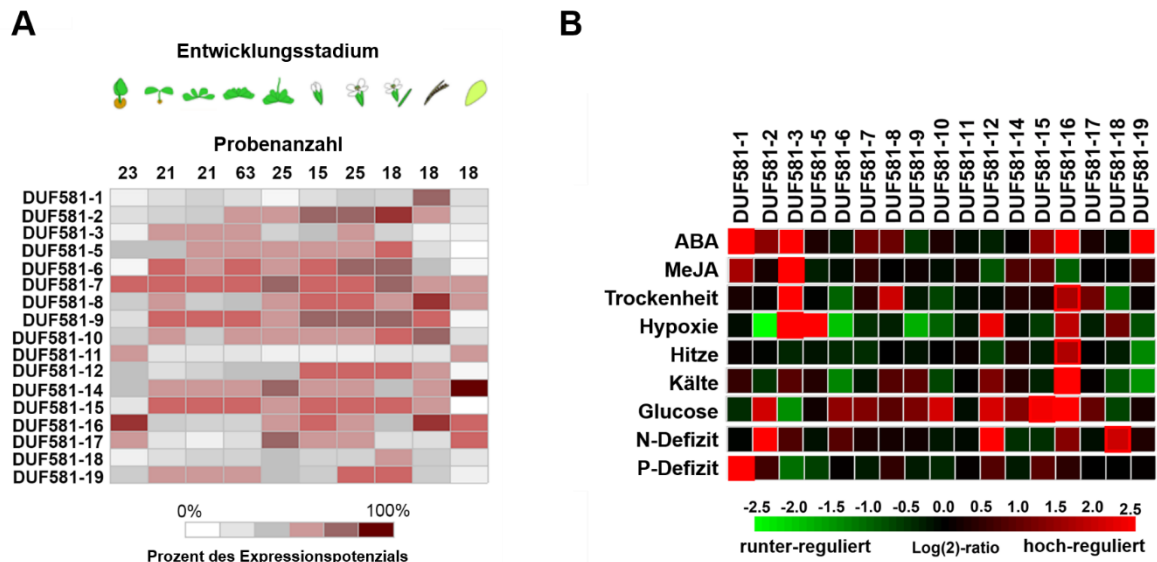


Abbildung 3.7: Expressionsvergleich von Arabidopsis-Genen, die für DUF581-Protein codieren, mittels verfügbaren Microarray-Datensätzen der Genevestigator-Datenbank (Hruz et al., 2008). **A:** DUF581 Genexpression während der pflanzlichen Entwicklung in *A. thaliana*. Die verwendeten Datensätze stammen von gewebe- bzw. entwicklungs-spezifischen Expressionsanalysen von Col-0-Pflanzen. **B:** Einfluss verschiedener Stimuli auf die DUF581-Expression. ABA; ausgeschnittene Blattproben 5 Wochen alter Col-0-Pflanzen wurden 3 h mit 50 mM ABA (Abscisinsäure) behandelt (Experiment ID AT-000433). MeJa; Zellenproben einer T87 Zellsuspension, die unter einem 16 h Licht/8 h Dunkel Rhythmus wuchsen, wurden für 24 h mit 100 µM MeJa (Methyljasmonat) inkubiert (Experiment ID-AT000539). Trockenheit; grünes Gewebe behandelter Keimlinge wurde 24 h nach Beginn der Behandlung geerntet (Experiment ID AT-000419). Hitze; 11 Tage nach Wachstum auf Torfgranulat bei 21°C wurden Keimlinge von Col-0 für 1 h bei 40° C inkubiert (Experiment ID AT-000645). Kälte; 16 Tage alte Keimlinge wurden zu 4° C unter geringer Bestrahlung transferiert und grünes Gewebe nach 24 h geerntet (Experiment ID AT-00120). Glucose; Col-0 Keimlinge, die 5 Tage auf Festmedium (0.5x Murashige und Skoog (MS) -Salz, 1% Saccharose, 0.8% Agar) wuchsen, wurden 7-mal mit Wasser und einmal mit Flüssigmedium (0.5x MS-Salz) gewaschen, 24 h in Flüssigmedium inkubiert und anschließend für 3 h in Dunkelheit in Flüssigmedium mit 3% Glucose inkubiert (Experiment ID AT-000650). N-Defizit; Col-0 Keimlinge wurden für 7 Tage in Flüssigmedium mit 4 mM KNO₃ (N-gesättigte Bedingung) angezogen und dann für 2 Tage in Medium ohne N inkubiert (N-verarmte Bedingung) (Experiment ID AT-000405).

Die Expression der DUF581-Gene während der Pflanzenentwicklung erwies sich als sehr variabel. So waren einige DUF581-Gene (*DUF581-1*, *DUF581-11*, *DUF581-12*, *DUF581-18*) nur in wenigen Entwicklungsstadien (Blüte, Schote, Samen) induziert, während andere (*DUF581-6*, *DUF581-9*, *DUF581-15*) nahezu über den kompletten Lebenszyklus der Pflanze exprimiert waren. Die Mehrzahl der DUF581-Gene wurde sowohl im vegetativen als auch im reproduktiven Stadium exprimiert. Eine erhöhte Transkription von *DUF581-1*, *DUF581-2*, *DUF581-6*, *DUF581-9*, *DUF581-12*, *DUF581-19* lag in Blütengewebe vor. Die Expression von *DUF581-7*, welches obgleich eines Verlusts der konservierten Cysteinpaare, in die Analyse eingeschlossen wurde, war in allen Entwicklungsstadien hoch. Weiterhin scheint die Transkription der DUF581-Gene aus Arabidopsis stark auf Hormone und Umweltreize zu reagieren. So wurde die Expression von *DUF581-1*, *DUF581-2*, *DUF581-3*, *DUF581-16* und

Ergebnisse

DUF581-19 durch extern zugeführte Abscisinsäure (ABA) induziert. Die Transkriptmenge von *DUF581-3* wurde zusätzlich auch nach Methyljasmonat (MeJa) -Zugabe gesteigert. Neben dieser hormonbedingten Änderung der Expressionsstärke erfolgt auch eine Regulierung durch abiotische Faktoren. So waren *DUF581-3*, *DUF581-8* und *DUF581-16* unter Trockenheit transkriptionell hochreguliert. In der Analyse wurden bei Hypoxie deutliche Unterschiede im Expressionslevel ersichtlich. Während *DUF581-3*, *DUF581-5* und *DUF581-12* stark induziert waren, führte diese Behandlung zu einer Repression von *DUF581-2*, *DUF581-6* und *DUF581-9*. Die Expression von *DUF581-16* wurde sowohl durch Hitze wie auch durch Kälte hochreguliert, während *DUF581-19* unter diesen Bedingungen reprimiert wurde. Weiterhin scheint die Nährstoffverfügbarkeit ebenfalls die Transkription dieser Gene zu beeinflussen: externe Zugabe von Glucose resultierte in einer gesteigerten Expression von *DUF581-2*, *DUF581-10*, *DUF581-12*, *DUF581-15* und *DUF581-16*, wohingegen *DUF581-13* durch Glucosezugabe reprimiert wurde. Eine mangelhafte Stickstoffverfügbarkeit erhöhte die Expression von *DUF581-2*, *DUF581-12* und *DUF581-18*. Phosphatmangel induzierte nur die Transkription von *DUF581-1*. Diese vergleichende Analyse zeigte, dass die Expression von *DUF581*-Genen gewebe- und entwicklungspezifische Unterschiede der einzelnen Gene aufweist sowie variabel auf vielzählige Stimuli reagiert.

3.1.3 Lokalisierung von *DUF581*-Proteinen in *N. benthamiana*

Die Mitglieder der pflanzenspezifischen *DUF581*-Proteinfamilie wurden bisher noch nicht näher molekular- und zellbiologisch charakterisiert. Demzufolge lagen zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch keine Daten über die subzelluläre Lokalisierung dieser Proteine vor. Die Analyse der subzellulären Lokalisierung erfolgte durch transiente Expression von *DUF581*-GFP-Fusionsproteinen in *N. benthamiana*. Dazu wurden ausgewählte *DUF581*-Proteine carboxyterminal mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP fusioniert, die Konstrukte in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Blumenkohlmosaikvirus (*Cauliflower mosaic virus 35S*, CaMV-35S) nach Agrobakterien-vermittelter Transformation transient in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert.

Die Analyse der GFP-Fluoreszenzsignale infiltrierter Blätter mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (KLSM) zeigte für die überwiegende Mehrheit der getesteten *DUF581*-Fusionsproteine eine zellkernspezifische oder nucleo-cytoplasmatische Lokalisierung (Abbildung 3.8). *DUF581-7*-GFP, welches nicht mehr zur Ausbildung der Zinkfingerstruktur in der Lage ist, konnte hingegen nur im Cytoplasma und nicht im Zellkern detektiert werden. Dies könnte daraufhin deuten, dass ein intaktes Zinkfingermotiv in der *DUF581*-Domäne für die Zellkern-Lokalisierung der *DUF581*-Proteine notwendig ist.

Ergebnisse

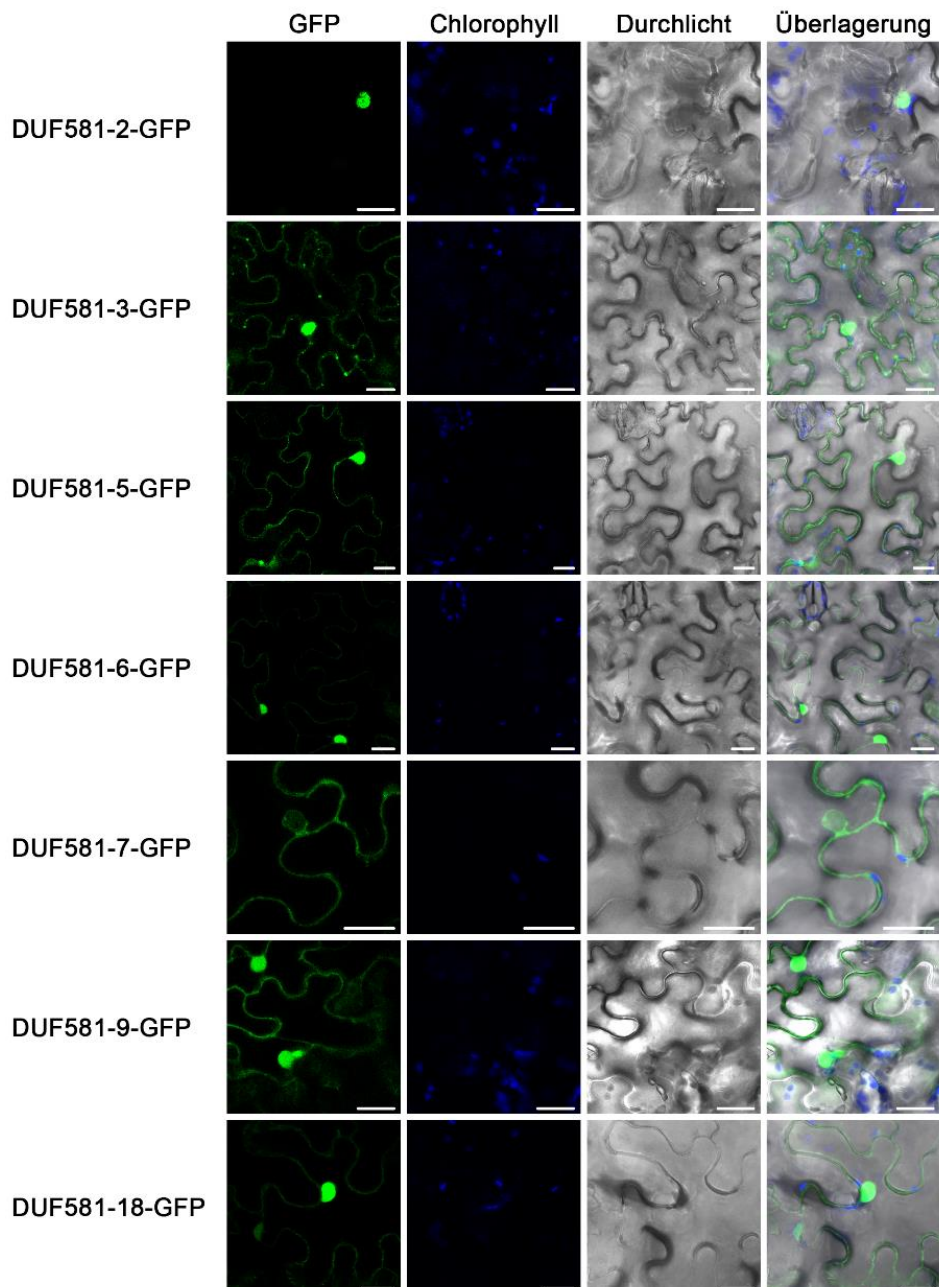


Abbildung 3.8: Subzelluläre Lokalisierung von DUF581-GFP-Proteinen. Die Analyse der subzellulären Lokalisierung von transient exprimierten, GFP-markierten DUF581-Proteinen erfolgte 48 Stunden nach Agroinfiltration in *N. benthamiana* unter dem KLSM. Grün: GFP-Fluoreszenz, Blau: Autofluoreszenz der Chloroplasten. Der Maßstab entspricht 20 μm .

3.1.4 Die Ko-Expression mit DUF581-Proteinen beeinflusst die Lokalisierung von AKIN10

Die Möglichkeit einer Interaktion von Proteinen *in planta* setzt deren zumindest teilweise überlappende Lokalisierung voraus. Eine potentielle Überlappung der subzellulären Lokalisierung von AKIN10 und DUF581-Proteinen wurde durch Ko-Expressionsstudien analysiert. Um die Proteine zu visualisieren, wurde AKIN10 mit mCherry fusioniert und

Ergebnisse

separat beziehungsweise in Kombination mit DUF581-GFP-Fusionsproteinen transient in *N. benthamiana*-Blättern infiltriert (Abbildung 3.9).

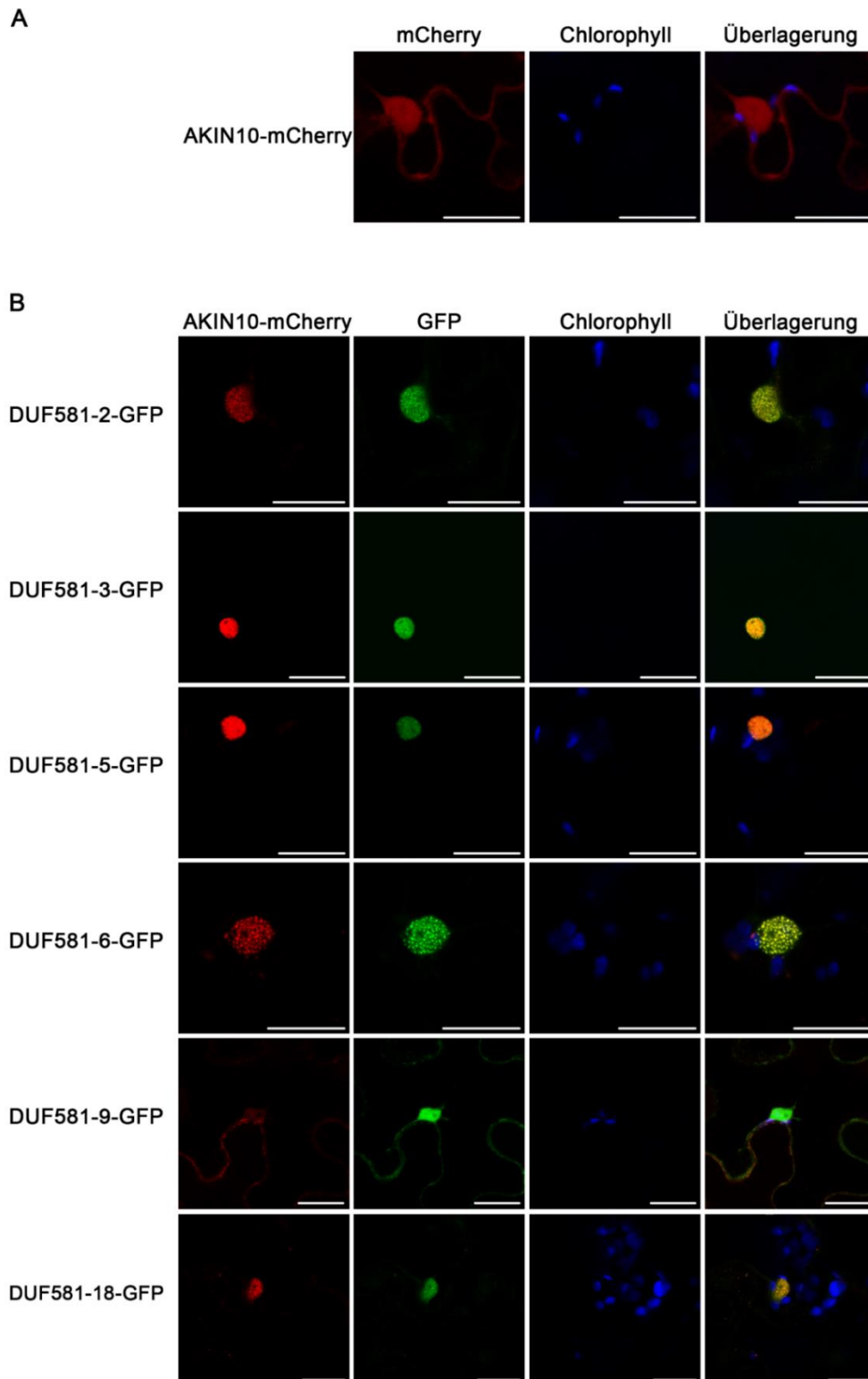


Abbildung 3.9: DUF581-GFP-Proteine ko-lokalisieren mit AKIN10-mCherry im Nucleus. Die Analyse der subzellulären Lokalisierung von transient exprimiertem AKIN10-mCherry ohne bzw. in Kombination mit GFP-markierten DUF581-Proteinen erfolgte 48 Stunden nach Agrobacterium-infiltration in *N. benthamiana* unter dem KLSM. **A:** Lokalisierung von AKIN10-mCherry ohne DUF581-Protein. **B:** Ko-Expression von AKIN10-mCherry mit unterschiedlichen DUF581-GFP-Proteinen. Rot: mCherry-Fluoreszenz, Grün: GFP-Fluoreszenz, Blau: Autofluoreszenz der Chloroplasten. Der Größenmaßstab entspricht 20 µm.

Ergebnisse

Während die alleinige Expression von AKIN10-mCherry eine wie bereits aus früheren Studien (Bitrian et al., 2011; Cho et al., 2012) bekannte deutliche, nahezu homogene Lokalisierung im Cytoplasma und im Zellkern zeigte, führte die Ko-Expression mit DUF581-GFP-Fusionsproteinen zu einer drastischen Verschiebung des AKIN10-mCherry Fluoreszenzsignals (Abbildung 3.9). So war in allen analysierten Kombinationen eine starke mCherry-Fluoreszenz im Zellkern zu finden. Im Falle der Ko-Expression mit DUF581-2, -3, -5 und -6 war das AKIN10-mCherry-Signal nahezu ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Dagegen ergab die Ko-Expression mit DUF581-9 keine sichtbare Änderung der AKIN10-Lokalisierung. Auch die gemeinsame Expression mit DUF581-18 ergab keine vollständige Verschiebung der AKIN10-mCherry-Fluoreszenz in den Zellkern, dennoch lag auch hier eine Akkumulation von AKIN10 im Zellkern vor. In allen Kombinationen ko-lokalisierten DUF581-GFP-Proteine mit AKIN10-mCherry im Nucleus. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in einigen Fällen die Fluoreszenz beider Reporterkonstrukte in subnuclearen Punkten verteilt im Zellkern auftrat. Ein solches Fluoreszenzmuster konnte nicht beobachtet werden, wenn AKIN10-mCherry oder DUF581-GFP-Proteine allein exprimiert wurden. Dies deutet daraufhin, dass DUF581-Proteine die Lokalisierung von AKIN10 in den Zellkern dirigieren und bekräftigen die Annahme das DUF581-Protein mit AKIN10 *in planta* interagieren.

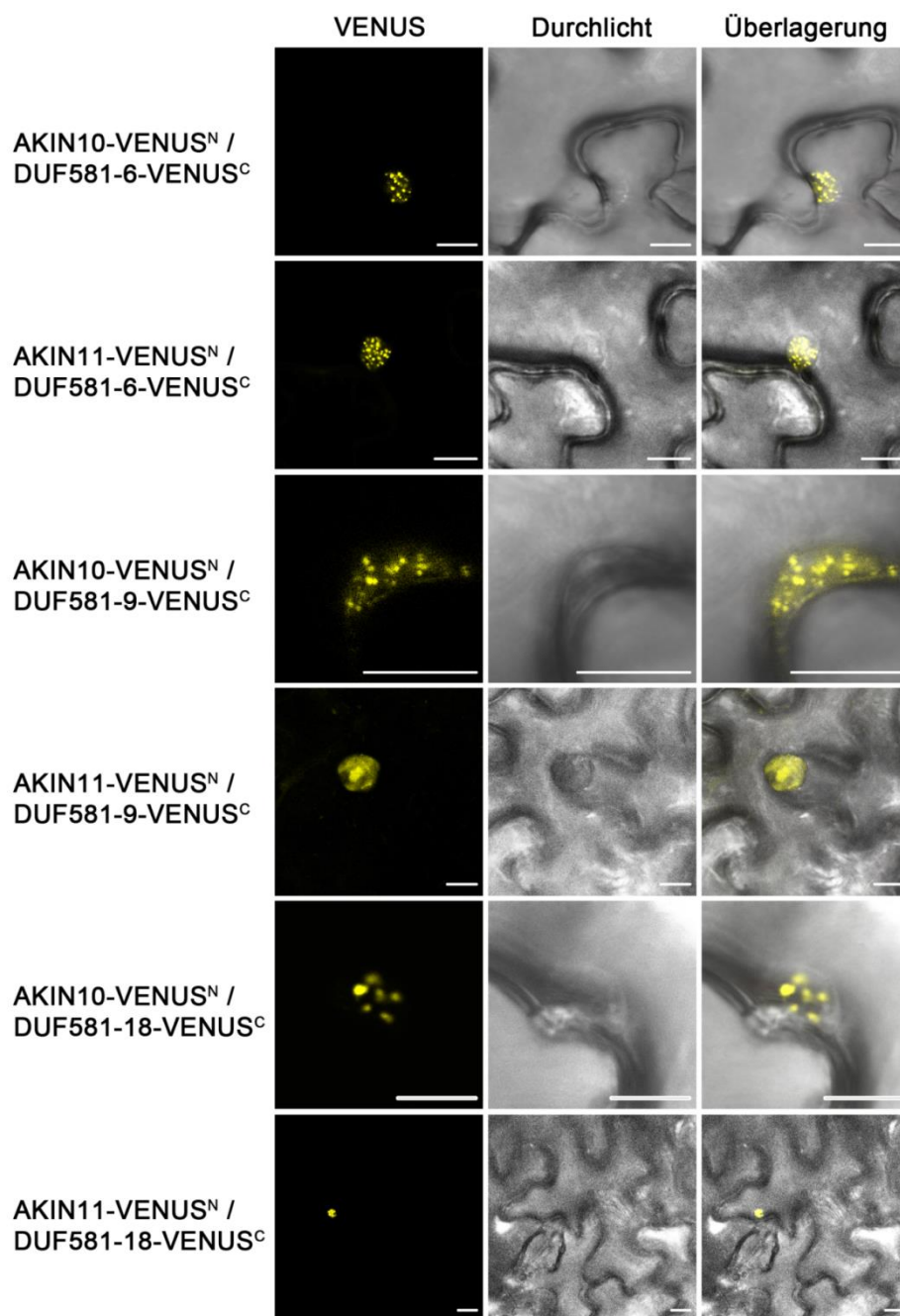
3.1.5 Interaktionsnachweis von SnRK1 α -Untereinheiten und DUF581-Proteinen *in planta*

Die Ko-Lokalisierungsstudien sowie Hefe-Zwei-Hybrid-Daten sprechen für eine Interaktion von SnRK1 α -Untereinheiten mit DUF581-enthaltenden Proteinen. Um die Interaktion *in planta* zu verifizieren, wurde eine Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) durchgeführt, womit die Interaktion zweier Proteine visualisiert werden kann (Walter et al., 2004).

Hierfür wurden AKIN10 und AKIN11 mit den ersten 173 Aminosäuren des gelb-fluoreszierenden YFP-Derivats VENUS und DUF581-6, - 9 sowie -18 als repräsentative Mitglieder der DUF581-Familie jeweils mit den übrigen carboxyterminalen Aminosäuren von VENUS fusioniert (Nagai et al., 2002). Bei einer Interaktion (direkt oder indirekt) der beiden Fusionsproteine erfolgt die Re-Konstitution des funktionalen Fluorophors, welches nach Anregung bei einer Wellenlänge von 514 nm als gelbe Fluoreszenz detektiert werden kann. Je ein Fusionskonstrukt der SnRK1 α -Untereinheiten wurde in Kombination mit einem DUF581-Fusionsprotein transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert und nach 48 Stunden mittels KLSM auf eine Interaktion hin analysiert. Als Positivkontrolle wurde FBPase-VENUS^N in Kombination mit FBPase-VENUS^C verwendet, da die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) im Cytoplasma homodimerisiert (Abbildung 6.1). Als Negativkontrollen fungierten AKIN10-VENUS^N bzw. AKIN11-VENUS^N mit FBPase-VENUS^C sowie DUF581-VENUS^C mit

Ergebnisse

FBPase-VENUS^N und die Kombination von AKIN10-VENUS^N mit DUF581-9_{C47S}-VENUS^C. Bei diesen Kombinationen konnte keine Fluoreszenz detektiert werden (Abbildung 6.1). Hingegen resultierten Kombinationen von AKIN10 bzw. AKIN11 mit DUF581-Proteinen in deutlichen Fluoreszenzsignalen innerhalb des Nucleus, wobei diese ähnlich den Ko-Lokalisationsstudien in subnuclearen Punkten detektiert werden konnten (Abbildung 3.10). Eine cytoplasmatische Interaktion konnte in keiner der Kombinationen festgestellt werden. Zusammenfassend stützen die hier gezeigten Daten die Hypothese, dass SnRK1 α -Untereinheiten mit DUF581-Proteinen im Nucleus interagieren, wobei die Interaktion abhängig von der DUF581-Domäne ist.



Ergebnisse

Abbildung 3.10: *In planta*-Interaktionsanalyse von AKIN10 bzw. AKIN11 und DUF581-Proteinen mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Transiente Ko-Expression von AKIN10-VENUS^N, AKIN11-VENUS^N mit DUF581-6-VENUS^C, DUF581-9-VENUS^C, DUF581-18-VENUS^C in *N. benthamiana* mittels Agroinfiltration. Gelb: Interaktion der beiden YFP-Hälften und somit der Interaktionspartner. Der Längenstandard entspricht 10 µm.

Wie bereits erwähnt wurden in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen unter anderem DUF581-Proteine als SnRK1 α -Interaktionspartner identifiziert. Da es sich bei den DUF581-Proteinen um eine noch nicht näher charakterisierte Proteinfamilie handelt, gibt es kaum Daten, die Aufschluss über ihre in Pflanzen relevante Funktion geben. Auch ihre Rolle während der Interaktion mit den SnRK1 α -Untereinheiten sowie die physiologischen Prozesse an denen DUF581-Proteine beteiligt sind, sind bis auf wenige Ausnahmen nicht bekannt. So resultierte die Überexpression von DUF581-18 in Arabidopsis in einer gesteigerten Resistenz gegenüber dem Befall von Blattläusen (*Myzus persicae*) (Chen et al., 2013), während DUF581-19 in die ABA-vermittelte Samenruhe involviert zu sein scheint (He and Gan, 2004).

3.2 Identifizierung von Interaktionspartnern der *A. thaliana* DUF581-Proteinfamilie

Um Hinweise zu erhalten in welche biologischen Prozesse Proteine mit einer DUF581-Domäne involviert sein könnten, ist es sinnvoll Interaktionspartner dieser Proteine zu identifizieren. Hierfür wurde erneut das Hefe-Zwei-Hybrid-System gewählt (Fields und Song, 1989).

Zunächst wurden die codierenden Sequenzen von 17 der 19 DUF581-enthaltenden Proteine aus *A. thaliana* in den offenen Leserahmen der GAL4-BD des pGBT9-Vektors kloniert. Die Köderplasmide wurden in den Hefestamm Y187 (Mat α) transformiert. Da das Konstrukt, welches die Sequenz von DUF581-1 enthielt, selbstaktivierend war, wurde es nicht für Hefeanalysen verwendet. Auch DUF581-11 wurde nicht verwendet, da es nicht gelang das korrespondierende cDNA-Fragment zu klonieren. Die Durchmusterungen erfolgten durch Paarung der transformierten Y187-Hefen mit dem Hefestamm AH109 (Mat α), der eine Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) fusionierte cDNA-Bank aus Infloreszenzgewebe von Arabidopsis enthielt. Auf Klone, die sowohl *HIS3*- als auch *LacZ*-Reporteraktivität zeigten, wurden zunächst Kolonie-PCR-Reaktionen mit AKIN10- und AKIN11-spezifischen Primern durchgeführt. Kolonien, die in diesen PCRs ein AKIN10- oder AKIN11-spezifisches Insert enthielten, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Aus den übrigen Kolonien wurden beide Plasmide isoliert und in *E. coli* KC8-Zellen transformiert. Nach Separation der Transformanden auf entsprechenden Selektionsmedien, wurde Plasmid-DNA aus Zellen isoliert, die das Beuteplasmid enthielten. Die Inserts wurden sequenziert und die erhaltene Sequenz in eine *blastx*-Analyse (<https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>) gegen das Arabidopsis-Genom eingesetzt. In Tabelle 3.3 sind die mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung gefundenen möglichen Interaktionspartner aufgeführt.

Ergebnisse

Köderplasmid	<i>blastx</i> -Treffer	Häufigkeit des gefundenen Klons	AGI Code
DUF581-2	AKIN10	2	AT3G01090
	AKIN11	10	AT3G29160
DUF581-3	AKIN10	2	AT3G01090
	eIF2B-Familie	5	AT1G72340
DUF581-5	AKIN10	3	AT3G01090
	AKIN11	3	AT3G29160
DUF581-6	AKIN10	18	AT3G01090
	AKIN11	18	AT3G29160
DUF581-8	AKIN10	2	AT3G01090
	GRF6/AFT1	1	AT5G10450
DUF581-9	AKIN10	3	AT3G01090
	AKIN11	28	AT3G29160
	CSN5B	2	AT1G71230
	TCP3	6	AT1G53230
	TCP13	3	AT3G02150
	ATHB21/ZHD3	1	AT2G02540
	SEP1	1	AT4G34190
DUF581-10	AKIN10	7	AT3G01090
	AKIN11	31	AT3G29160
	ATHB21/ZHD3	1	AT2G02540
DUF581-12	AKIN10	26	AT3G01090
	AKIN11	27	AT3G29160
DUF581-13	AKIN10	2	AT3G01090
	AKIN11	58	AT3G29160
DUF581-14	AKIN10	3	AT3G01090
	AKIN11	1	AT3G29160
	SPD1	3	AT3G10420
DUF581-16	AKIN10	21	AT3G01090
	AKIN11	37	AT3G29160
	WNK8	1	AT5G41990
DUF581-17	AKIN10	3	AT3G01090
	AKIN11	5	AT3G29160
DUF581-18	AKIN10	16	AT3G01090
	STKR1	6	AT3G00270
DUF581-19	AKIN10	2	AT3G01090
	AKIN11	25	AT3G29160

Tabelle 3.3: Beste *blastx*-Treffer der mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung identifizierten möglichen DUF581-Interaktionspartner. Klone, die potentielle Interaktionspartner enthielten, wurden nach der Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung von SCAD_{-leu-trp-his}-Platten mit 4mM 3-Aminotriazol gepickt und mittels LacZ-Filter-Test auf Interaktion überprüft. Der Isolierung und Sequenzierung der Beuteplosmide folgte die Identifizierung der Interaktionspartner mit Hilfe einer *blastx*-Analyse.

Für DUF581-7 und DUF581-15 konnten keine Interaktionspartner gefunden werden. Mit Ausnahme von DUF581-3, für das nur AKIN10 aus der cDNA-Bank isolierte wurde, konnten mit den übrigen DUF581-Proteine sowohl AKIN10 als auch AKIN11 als Interaktionspartner ermittelt werden. Für sieben DUF581-Proteine wurden neben den SnRK1 α -Untereinheiten

Ergebnisse

weitere mögliche Interaktoren isoliert. Mit Ausnahme von ATHB21 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 21), welches mit DUF581-9 und -10 zu interagieren scheint, wurden die übrigen potentiellen Bindungspartner jeweils nur als Interaktionspartner für spezifische DUF581-Proteine gefunden. Dies lässt auf eine individuelle Interaktion zwischen einzelnen Mitgliedern der DUF581-Proteinfamilie und bestimmten Bindungspartnern schließen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden TCP3 (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTORS 3), TCP13, ATHB21 sowie CSN5B, welche als DUF581-9-Interaktionspartner identifiziert wurden, auf Wechselwirkungen mit anderen DUF581-Proteinen hin analysiert (Abbildung 3.11). Während die Interaktion von TCP3 und CSN5B mit DUF581-9 spezifisch zu sein scheint, da nur in diesem Fall die Expression der Reportergene durch Wachstum auf SCAD_{-LTH}-Medium sowie Substratumsatz im LacZ-Test festgestellt werden konnte, zeigte sich für TCP13 ebenfalls eine schwache Interaktion mit DUF581-19. ATHB21 war neben der Interaktion mit DUF581-9 auch zu Wechselwirkungen mit DUF581-10 fähig, wobei die Interaktion mit DUF581-10 deutlich stärker ausfiel. Somit scheinen DUF581-Proteine gemeinsame als auch alleinige Interaktionspartner zu besitzen.

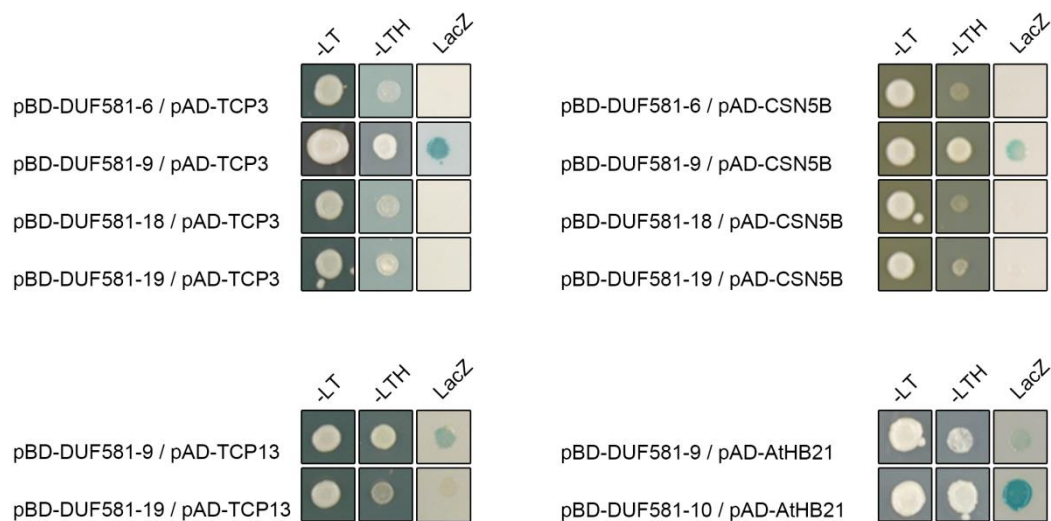


Abbildung 3.11: Direkte Interaktion von DUF581-9-Interaktionspartnern mit anderen DUF581-Proteinen in Hefe. Die Ko-Expression der Proteine erfolgte im Hefestamm Y190. Nach Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

Ihre zellkernspezifische Lokalisierung einerseits und ihr Einfluss auf die Lokalisierung von AKIN10 lassen eine Funktion der DUF581-Proteine in der SnRK1-vermittelten Genregulierung vermuten. Da die DUF581-Proteine selbst allerdings kein offensichtliches DNA-Bindemotiv aufweisen, könnte ihre Funktion eher in der von Adaptorproteinen für die Substratbindung von SnRK1 liegen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit ausgewählten DUF581-interagierenden Proteinen in

Ergebnisse

Hefe getestet (Abbildung 3.12). Die zwei Mitglieder der TCP-Transkriptionsfaktorfamilie TCP3 und TCP13, die zunächst als DUF581-9-Interaktionspartner gefunden wurden, konnten auch mit AKIN10 bzw. AKIN11 interagieren. TCP-Transkriptionsfaktoren sind an der Regulierung zahlreicher Prozesse der Pflanzenentwicklung wie Wachstum und Zellproliferation beteiligt (Cubas et al., 1999). Bisher ist eine Regulierung der Aktivität von TCP-Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung nicht bekannt. Der ATHB/ZINC FINGER HOMEODOMAIN (ZHD) -Transkriptionsfaktor ZHD3/ATHB21, der ebenfalls auf eine Interaktion mit den SnRK1 α -Untereinheiten überprüft wurde, gehört zu einer pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktorfamilie, die 14 Mitglieder in Arabidopsis beinhaltet, wobei ihre exakte Funktion noch nicht bekannt ist. ATHB21 wurde zunächst als DUF581-9 und DUF581-10-interagierendes Protein identifiziert, war im Test auf direkte Interaktion in Hefe aber auch fähig direkt an AKIN10 und AKIN11 zu binden. Um zu überprüfen, ob auch andere ATHB-Transkriptionsfaktoren mit SnRK1-Untereinheiten wechselwirken, wurde ZHD10/ATHB23 amplifiziert, in den pAD-Vektor kloniert und in Hefe auf Interaktion mit AKIN10 bzw. AKIN11 getestet (Abbildung 3.12). Wie schon ATHB21 war auch ATHB23 in der Lage mit den beiden SnRK1-Untereinheiten zu interagieren. Diese Protein-Protein-Wechselwirkungen konnten in Durchmusterungen von cDNA-Banken mit den SnRK1 α -Untereinheiten nicht detektiert werden. Mit der Proteinkinase WNK8, die als DUF581-16-Interaktor identifiziert wurde, konnte in Hefeanalysen keine Interaktion mit SnRK1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.12 B), was darauf hindeutet, dass nicht grundsätzlich alle Interaktionspartner von DUF581-Proteinen auch mit SnRK1 interagieren.

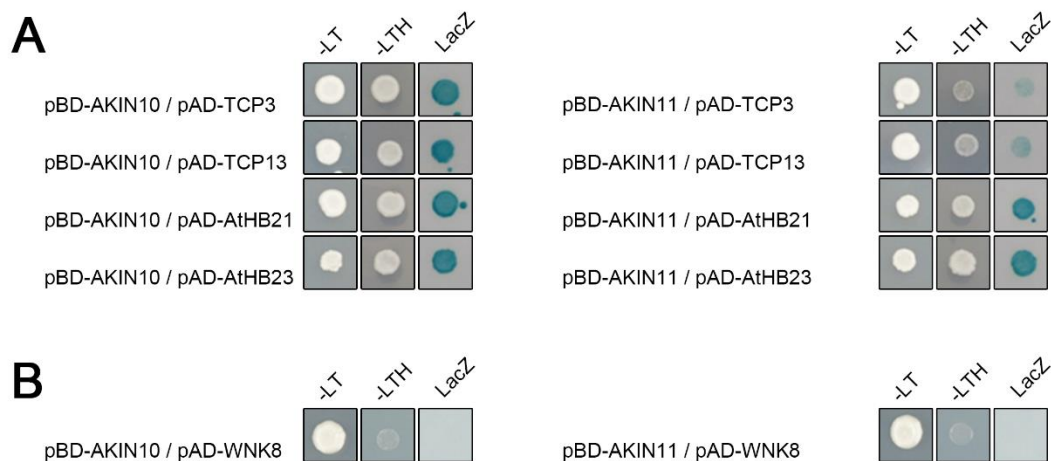


Abbildung 3.12: Direkte Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit DUF581-Protein-Interaktionspartnern in Hefe. **A:** Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. **B:** Interaktion mit der Kinase WNK8. Die Proteine wurden im Hefestamm Y190 ko-exprimiert. Nach Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

Ergebnisse

3.2.1 DUF581-2 interagiert mit den DELLA-Proteinen GAI und RGA in Hefe und *in planta*

Neben der hefebasierten Suche nach DUF581-Protein-Interaktionspartnern, wurde auch eine Analyse mittels der Interaktionsdatenbanken EBI IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>) und BioGRID (<http://thebiogrid.org/>) durchgeführt. Hierbei konnte eine weitere Gruppe von Transkriptionsregulatoren, die DELLA-Proteine, als DUF581-Protein-Interaktionspartner identifiziert werden, da die Analyse von DUF581-2 eine Interaktion mit GAI (GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE) vorhersagte. DELLA-Proteine bilden eine Subfamilie der pflanzenspezifischen GRAS (GAI, RGA und SCARECROW) -Familie von regulatorischen Proteinen (Pysh et al., 1999). Das Arabidopsis-Genom enthält fünf Gene, die für DELLA-Proteine (GAI, RGA, RGA-Like1 (RGL1), RGL2 und RGL3) codieren. DELLA-Proteine agieren als negative Regulatoren der Gibberellin-Signalweiterleitung und werden als Folge des Gibberellin-Stimulus über das Proteasom abgebaut. Die Interaktion von DUF581-2 mit den fünf DELLA-Proteinen wurde zunächst in Hefe untersucht. Dabei bestätigte sich die Vorhersage der Datenbankanalyse. DUF581-2 zeigte sowohl eine Interaktion mit GAI als auch mit RGA. Dagegen war DUF581-2 nicht zu Wechselwirkungen mit RGL1, RGL2 und RGL3 fähig (Abbildung 3.13 A).

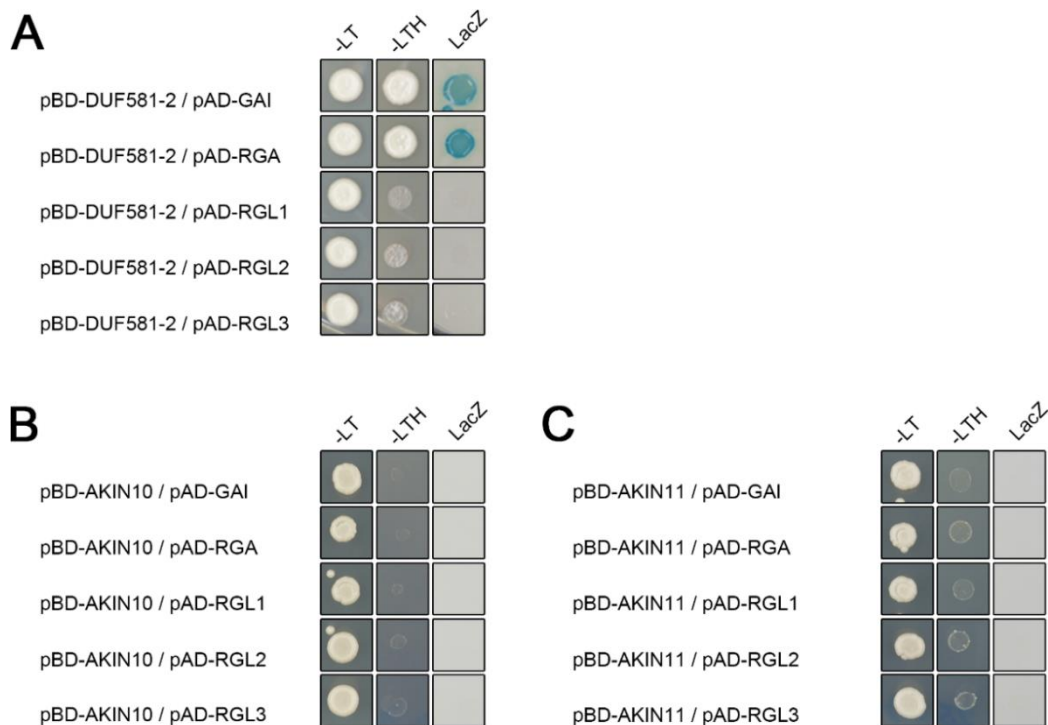


Abbildung 3.13: DUF581-2 nicht aber AKIN10 bzw. AKIN11 interagiert mit GAI und RGA in Hefe. A: DUF581-2, B: AKIN10 und C: AKIN11 wurden in den angegebenen Kombinationen mit GAI, RGA, RGL1, RGL2 sowie RGL3 im Hefestamm Y190 ko-exprimiert und nach Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 Tage ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT: Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH: Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

Ergebnisse

Weiterhin wurden die DELLA-Proteine auf Interaktion mit AKIN10 und AKIN11 getestet. Es konnte auch hier keine direkte Interaktion detektiert werden (Abbildung 3.13 B und C). Nachdem eine Interaktion von DUF581-2 mit den DELLA-Proteinen GAI und RGA in Hefe gezeigt werden konnte, wurde überprüft ob diese auch in Pflanzen vorliegt. Hierfür wurde DUF581-2 mit dem carboxyterminalen VENUS-Fragment fusioniert und zusammen mit GAI oder RGA (REPRESSOR OF GA1-3), welche mit dem aminoterminalen VENUS-Teil fusioniert waren, in *N. benthamiana*-Blättern transient ko-exprimiert. Die KLSM-Analyse infiltrierter Blättern ergab deutliche Fluoreszenzsignale, was für eine Interaktion der getesteten Proteine in der Pflanze spricht (Abbildung 3.14 A und B). Die detektierte Fluoreszenz war auf Nuclei begrenzt und wies ein Muster auf, welches Ähnlichkeit zu der subzellulären Lokalisierung von DUF581-2-GFP aufwies. Im Gegensatz dazu konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden, wenn GAI oder RGA mit DUF581-19-VENUS^C ko-exprimiert wurde (Abbildung 3.14 C und D). Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung einer spezifischen Interaktion von GAI und RGA mit DUF581-2.

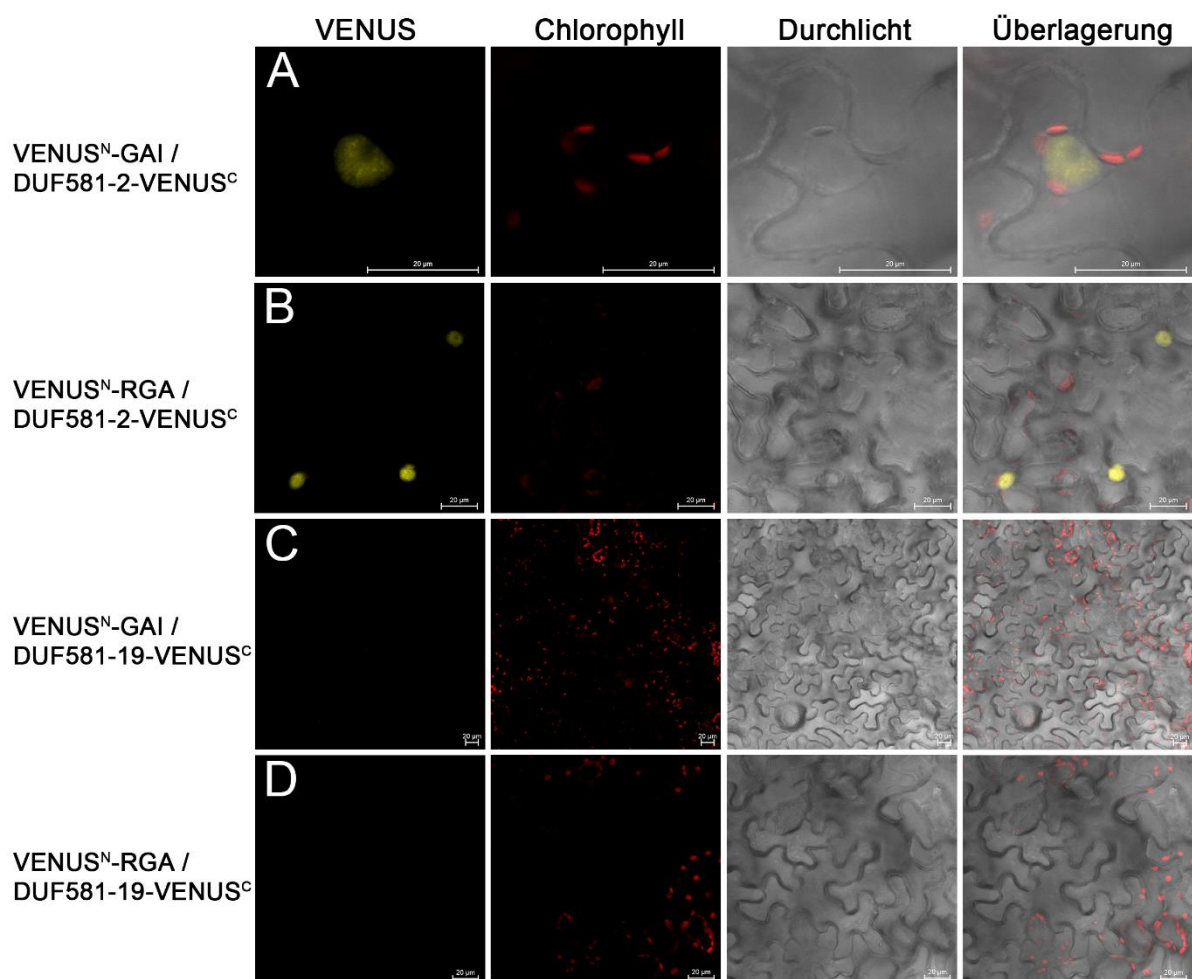


Abbildung 3.14: *In planta*-Interaktionsanalyse von DELLA-Proteinen mit DUF581-Proteinen via Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Transiente Ko-Expression von VENUS^N-GAI und VENUS^N-RGA mit DUF581-2-VENUS^C oder DUF581-19-VENUS^C. Gelb: Interaktion der beiden YFP-Hälften, rot: Chloroplasten-Autofluoreszenz. Der Größenstandard entspricht 20 µm.

Ergebnisse

Durch die Kombination von Datenbankanalyse, Hefe- sowie *in planta*-Interaktionsstudien konnten ein SnRK1-DUF581-Interaktionsnetzwerk etabliert werden, welches eine Vielzahl von potentiell in die SnRK1-Signalweiterleitung involvierten Proteinen enthält (Abbildung 3.15). Ferner lässt das Netzwerk eine Verbindung der SnRK1-Signaltransduktion mit anderen Signalwegen, die in Regulation des Wachstums und der Reaktion auf Umweltreize involviert sind, vermuten. Im Weiteren wurde ein Kandidatenprotein für die SnRK1-Signalweiterleitung näher charakterisiert.

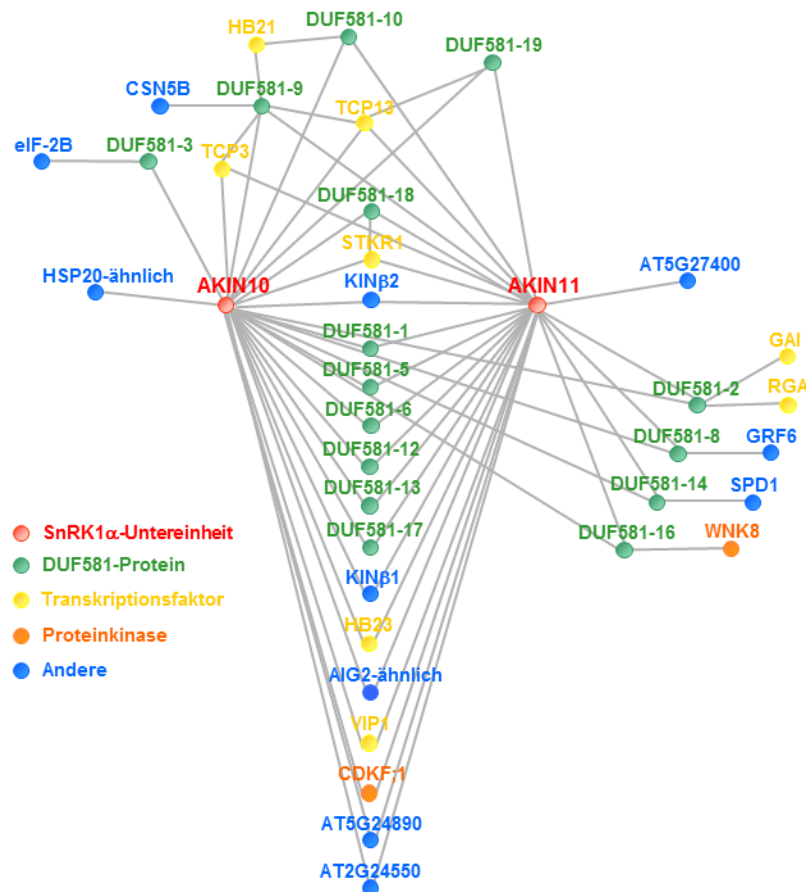


Abbildung 3.15: Arabidopsis Hefe-Zwei-Hybrid-Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk der SnRK1 α -Untereinheiten und DUF581-Proteine. Die Knotenpunkte des Netzwerks repräsentieren Proteine, wobei diese entsprechend ihrer funktionellen Klasse farblich unterlegt sind (siehe Legende). Die Grafik wurde modifiziert nach Nietzsche et al. (2016).

3.3 AKIN10/AKIN11 und DUF581-18 haben STKR1 als gemeinsamen Interaktionspartner

Die Durchmusterung der Arabidopsis cDNA-Bank mit dem Köderplasmid DUF581-18 führte zur Identifizierung von sechs Klonen, die für ein Protein, das als DNA-bindendes STOREKEEPER Protein-verwandter transkriptioneller Regulator (genannt STKR1 für STOREKEEPER RELATED 1) annotiert ist, codieren. Dieses Protein wurde für die nähere Analyse ausgewählt, da für dessen Homolog aus *S. tuberosum* eine Rolle in der

Ergebnisse

Zuckersignalweiterleitung beschrieben ist. So aktiviert das STOREKEEPER (STK) in Kartoffel die Saccharose-induzierte Patatinexpression (Zourelidou et al., 2002).

Zunächst wurde auch für STKR1 überprüft, ob es eine für DUF581-18-spezifische Wechselwirkung aufweist. Der Test auf direkte Interaktion von STKR1 mit DUF581-18 in Hefe bestätigte die in der Durchmusterung gefundene Protein-Protein-Wechselwirkung (Abbildung 3.16). Weiterhin konnte durch die Untersuchung der Interaktion von STKR1 mit anderen DUF581-Proteinen gezeigt werden, dass STKR1 spezifisch mit DUF581-18 wechselwirkt nicht aber mit anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie.

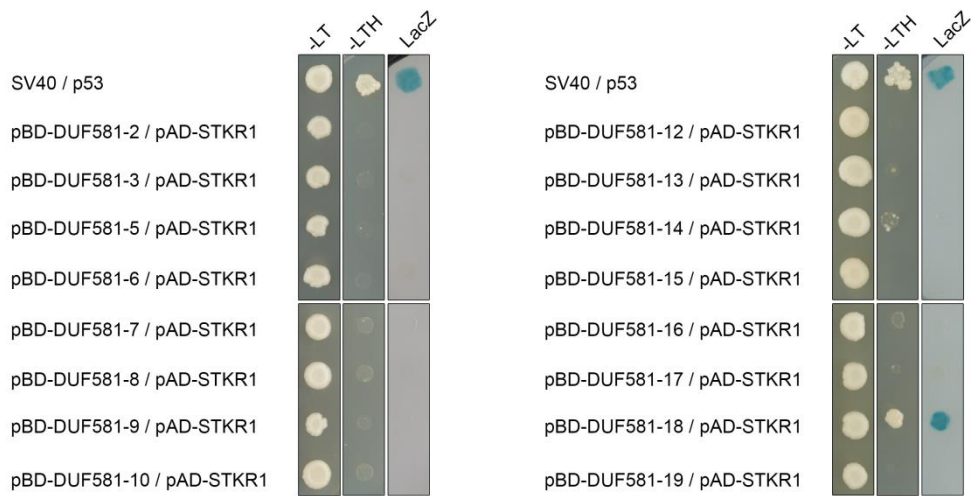


Abbildung 3.16: Direkte Interaktion von DUF581-Proteinen mit STKR1 in Hefe. Die DUF581-Proteine wurde im pGBT9-Vektor an die GAL4-BD fusioniert und *STKR1* im pAD-Vektor an die GAL4-AD fusioniert. Die Proteine wurden im Hefestamm Y190 ko-exprimiert. Die Interaktion zwischen murinem p53 und dem SV40-Antigen diente als Positivkontrolle. Nach Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

Eine potentielle Interaktion auf Proteinebene von STKR1 mit AKIN10 und AKIN11 wurde im Weiteren in Hefe untersucht. Hierbei war STKR1 in der Lage sowohl mit AKIN10 als auch mit AKIN11 zu interagieren, womit ein weiterer gemeinsamer Interaktionspartner der SnRK1 α -Untereinheiten und eines DUF581-Proteins identifiziert wurde (Abbildung 3.17).

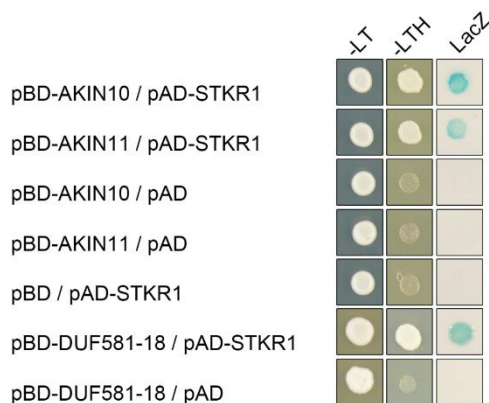


Abbildung 3.17: Direkte Interaktion von AKIN10/AKIN11/DUF581-18 mit STKR1 in Hefe. AKIN10, AKIN11 und DUF581-18 wurden im pGBT9-Vektor an die GAL4-BD fusioniert während *STKR1* im pAD-Vektor an die GAL4-AD fusioniert wurde. Leervektoren (pBD, pAD) dienen als Negativkontrollen. Die Proteine wurden im Hefestamm Y190 ko-exprimiert. Nach Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

Ergebnisse

STKR1 ist Mitglied einer Proteinfamilie, die in der Kartoffel in die Saccharose-regulierte Geneexpression involviert ist (Zourelidou et al., 2002). In Arabidopsis wurde das Protein auch als GeBP (*GL1 ENHANCER BINDING PROTEIN*) beschrieben, da es in Hefe und *in vitro* an 3'-*cis*-regulatorische Elemente von *GLABROUS1 (GL1)* binden konnte (Curaba et al., 2003). In stabil transformierten Arabidopsis-Linien, die *GeBP/STKR1* (im Folgenden als STKR1 bezeichnet) unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, konnte allerdings keine signifikante Induktion von *GL1* nachgewiesen werden (Curaba et al., 2003). STKR1 enthält neben einer zentralen DNA-bindenden Domäne (AS 62-158) sowohl eine basische Domäne (AS 209-223) als auch eine carboxyterminale Domäne (AS 225-299) mit einem Leucin-Zipper-Motiv, womit es Ähnlichkeiten zu den bZIP-Transkriptionsfaktoren aufweist (Curaba et al., 2003). In Arabidopsis codieren drei Gene (*GPL1 (GeBP-like protein 1)*, *GPL2*, *GPL3*) für Proteine mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu STKR1 (Chevalier et al., 2008). Diese liegt im Falle von GPL1 bei 68%, für GPL2 bei 54,9% und für GPL3 bei 26,9%. Diese vier Proteine sind in der Lage untereinander Homo- sowie Heterodimere zu bilden, wobei hierfür ihre carboxyterminale Domäne ausreichend ist (Chevalier et al., 2008).

Für eine detaillierte Bewertung der Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde im Weiteren der Fokus auf spezifische Interaktionsstellen gelegt. Zusätzlich wurde die Interaktion von AKIN10 beziehungsweise DUF581-18 mit den STKR1-ähnlichen Proteinen GPL1 und GPL3 untersucht. Dies sollte Aufschluss über die Spezifität der Interaktionen zwischen STKR1 mit AKIN10 und DUF581-18 geben.

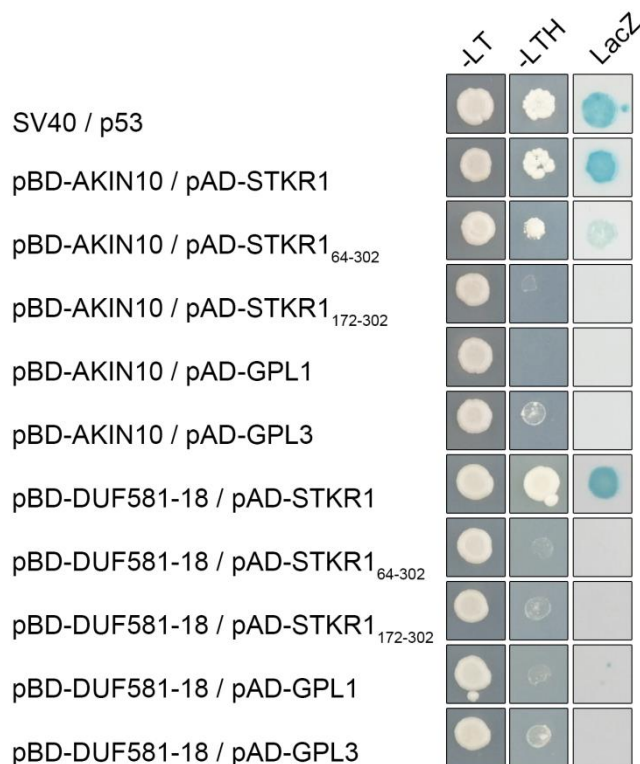


Abbildung 3.18: Aminoterminal-verkürztes STKR1 interagiert mit AKIN10 in Hefe. AKIN10 und DUF581-18 wurden an die GAL4-BD fusioniert. STKR1, STKR1₆₄₋₃₀₂, STKR1₁₇₂₋₃₀₂, GPL1 und GPL3 waren an die GAL4-AD fusioniert. Die Interaktion zwischen murinem p53 und dem SV40-Antigen diente als Positivkontrolle. Die Ko-Expression der Proteine erfolgte im Hefestamm Y190. Nach dem Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

Ergebnisse

Durch den Test auf direkte Interaktion wurde deutlich, dass AKIN10 auch mit der STKR1-Variante interagiert, welcher die ersten 63 Aminosäuren am Aminoterminus fehlen (Abbildung 3.18). Im Gegensatz dazu führte schon das Fehlen dieser Aminosäuren zu einem Verlust der Wechselwirkung mit DUF581-18. Mit der STKR1-Variante, der aminoterminal 172 Aminosäuren fehlten, konnte weder eine Interaktion mit AKIN10 noch mit DUF581-18 festgestellt werden. Die Unterschiede in der Bindungsfähigkeit mit STKR1₆₄₋₃₀₂ suggerieren, dass die Wechselwirkungen von AKIN10 und DUF581-18 an verschiedenen Stellen innerhalb der Aminosäuresequenz von STKR1 stattfinden. Ergänzend wurde getestet ob AKIN10 und DUF581-18 fähig sind mit den STKR1-ähnlichen Proteinen GPL1 und GPL3 zu interagieren. Im Gegensatz zu STKR1 waren weder GPL1 noch GPL3 in der Lage mit AKIN10 bzw. DUF581-18 zu interagieren (Abbildung 3.18). Die Protein-Protein-Wechselwirkungen von AKIN10 sowie DUF581-18 scheinen somit spezifisch für STKR1 innerhalb der STOREKEEPER-ähnlichen Protein zu sein.

Durch den Test auf direkte Interaktion in Hefe von STKR1 und unterschiedlichen Varianten von AKIN10 und DUF581-18 sollten Bereiche, die für die Interaktion beider Proteine notwendig sind, analysiert werden. So wurde untersucht, ob die katalytische Domäne (KD) bzw. die regulatorische Domäne (RD) von AKIN10 ausreichend für eine Interaktion mit STKR1 oder DUF581-18 ist (Abbildung 3.19). Zusätzlich wurde überprüft, ob eine Deletion der DUF581-18-Domäne bzw. deren Integritätsverlust durch Substitution eines konservierten Cysteins einen Einfluss auf die Wechselwirkung mit AKIN10 sowie STKR1 haben.

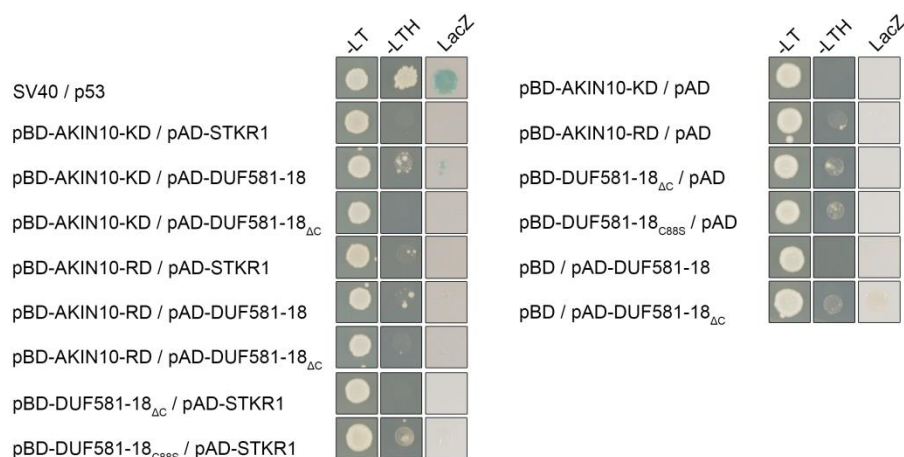


Abbildung 3.19: Interaktion von AKIN10- sowie DUF581-18-Deletionsmutanten und STKR1 in Hefe. AKIN10-KD (katalytische Domäne), AKIN10-RD (regulatorische Domäne), DUF581-18_{ΔC} (Deletion DUF581-Domäne) und DUF581-18_{C88S} (Austausch Cystein zu Serin an Position 88) wurden im Vektor pGBT9 an die GAL4-BD fusioniert. STKR1, DUF581-18_{ΔC} und DUF581-18_{C88S} waren im pAD-Vektor an die GAL4-AD fusioniert. Die Interaktion zwischen murinem p53 und dem SV40-Antigen diente als Positivkontrolle. Die Ko-Expression der Proteine erfolgte im Hefestamm Y190. Leervektoren (pBD, pAD) dienen als Negativkontrollen. Nach dem Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei HIS3 das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des LacZ-Reportergens.

Ergebnisse

Wie schon für die Interaktion mit AKIN10 beschrieben, ist auch für die Bindung mit STKR1 eine funktionsfähige DUF581-Domäne essentiell. Sowohl ein vollständiger Verlust der Domäne als auch der einzelne Austausch eines konservierten Cysteins innerhalb der Domäne führten zum Verlust der Interaktion. Wie aus Abbildung 3.19 ersichtlich, scheint weder die katalytische noch die regulatorische Domäne von AKIN10 allein für die Interaktion mit STKR1 ausreichend zu sein. Für die Interaktion der katalytischen Domäne von AKIN10 mit DUF581-18 hingegen, konnte ein schwaches Wachstum sowie eine leichte Blaufärbung im LacZ-Test beobachtet werden. Um die Beobachtung zu bestätigen, dass die katalytische Domäne von AKIN10 für eine Interaktion mit DUF581-18 genügt, wurden zur Bewertung der Stärke der Interaktion Verdünnungsreihen analysiert. Während im Falle von DUF581-18 schon die katalytische Domäne von AKIN10 ausreichend für eine Interaktion war, konnte für die Ko-Expression von STKR1 mit AKIN10-KD erneut kein Wachstum der Hefen beobachtet werden (Abbildung 3.20). Die regulatorische Domäne von AKIN10 war weder für die Interaktion mit STKR1 noch mit DUF581-18 ausreichend. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von STKR1 und DUF581-18 mit AKIN10 an verschiedenen Stellen des AKIN10 Polypeptids stattfindet.

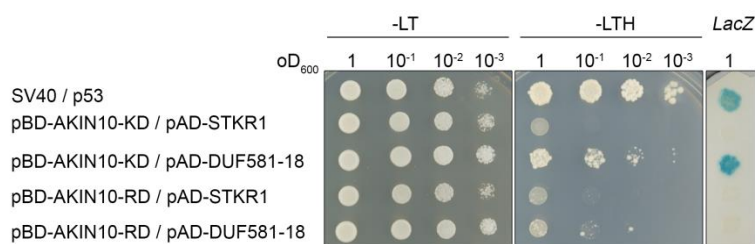


Abbildung 3.20: Die katalytische Domäne von AKIN10 interagiert mit DUF581-18. AKIN10-KD (katalytische Domäne) sowie AKIN10-RD (regulatorische Domäne) wurden im pGBT9-Vektor an die GAL4-BD fusioniert. STKR1 und DUF581-18 waren im pAD-Vektor an die GAL4-AD fusioniert. Die Interaktion zwischen murinem p53 und dem SV40-Antigen diente als Positivkontrolle. Die Ko-Expression der Proteine erfolgte im Hefestamm Y190. Verdünnungsreihen der Hefen wurden auf -LT und -LTH getropft. Nach dem Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

3.3.1 Lokalisierung von STKR1 in *N. benthamiana*

Um die Lokalisierung von STKR1 zu untersuchen, wurde STKR1 aminoterminal mit GFP fusioniert und die Lokalisierung des Fusionsproteins nach Agrobakterien-vermittelter transienter Transformation von *N. benthamiana* am KLSM analysiert. Fluoreszenz von GFP-STKR1 konnte ausschließlich im Zellkern detektiert werden, wobei diese nicht homogen, sondern in zahlreichen *Foci* auftrat (Abbildung 3.21). Darüber hinaus konnte eine Akkumulation in vermeintlichen Nucleoli beobachtet werden (Curaba et al., 2003).

Ergebnisse

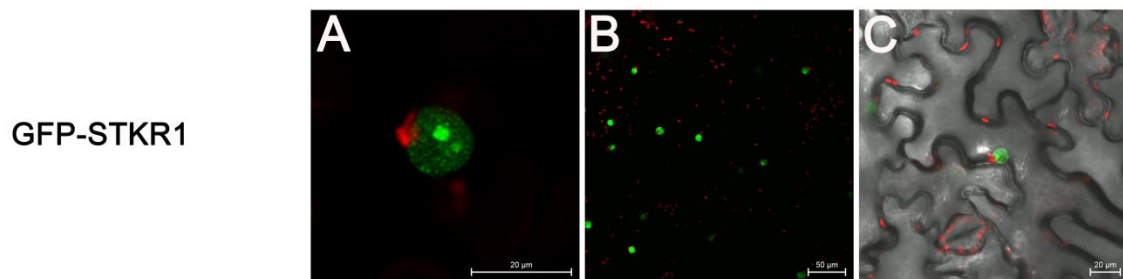
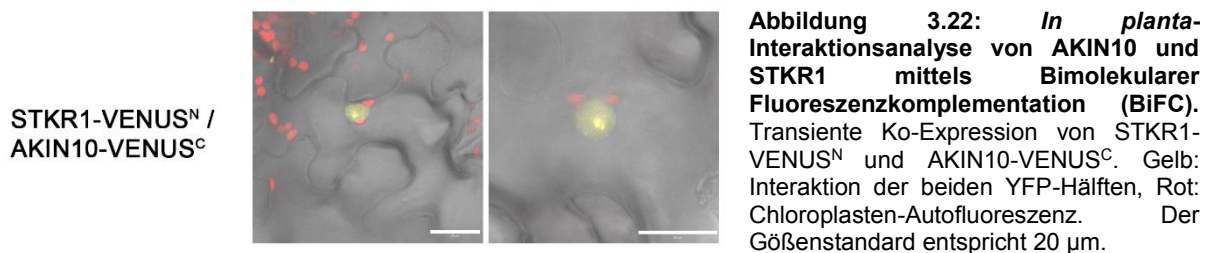


Abbildung 3.21: Subzelluläre Lokalisierung von GFP-STKR1 in *N. benthamiana*. GFP-STKR1 wurde transient mittels Agroinfiltration in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert und 48 Stunden nach Infiltration unter dem KLSM betrachtet. Grün: GFP-Fluoreszenz, Rot: Chloroplasten-Autofluoreszenz. Die Länge der Standardbalken entspricht 10 µm (A, C) bzw. 50 µm (B).

3.3.2 *In planta*-Interaktionsnachweis von AKIN10 und STKR1

Nachdem die Interaktion von AKIN10 mit STKR1 in Hefe charakterisiert wurde, sollten mit Hilfe von *in planta*-Interaktionsstudien Wechselwirkungen der beiden Proteine verifiziert werden. Dies erfolgt zunächst mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Dabei wurde STKR1 mit den ersten 173 Aminosäuren des YFP-Derivats VENUS fusioniert und AKIN10 mit den übrigen carboxyterminalen Aminosäuren des VENUS-Proteins. Die Konstrukte wurden über Agroinfiltration transient in *N. benthamiana* ko-exprimiert und nach 48 Stunden auf Interaktion durch Betrachtung mit einem KLSM analysiert. Es konnte eine deutliche YFP-Fluoreszenz und somit eine Interaktion der Proteine in der Pflanze detektiert werden, wobei das Fluoreszenzsignal auf den Nucleus beschränkt war (Abbildung 3.22). Dies deutet darauf hin, dass AKIN10 und STKR1 im Zellkern interagieren, was wiederum ein Indiz für eine kooperative Beteiligung an transkriptioneller Regulation ist.



Eine weitere Methode um Wechselwirkungen zwischen Proteinen aufzuzeigen, stellt die Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) dar. In diesem Experiment wurde eine GFP-Ko-IP durchgeführt. Hierzu wurde GFP-STKR1 in Kombination mit AKIN10-HA transient in *N. benthamiana* exprimiert und im Anschluss über die GFP-Markierung aufgereinigt. Sowohl mit den Pflanzenextrakten (Input) als auch mit den Eluaten wurden Western Blots mit anti-HA- und anti-GFP-Antikörpern durchgeführt. AKIN10-HA ko-präzipitierte mit GFP-STKR1, wodurch man auf eine Interaktion der beiden Proteine *in planta* schließen kann (Abbildung 3.23). AKIN10-HA allein diente zur Bestätigung, dass es keine Affinität zur GFP-Matrix aufweist und die Präzipitation durch GFP-STKR1 somit spezifisch ist. Das fehlende STKR1-

Ergebnisse

Signal der Inputprobe im anti-GFP Western Blot ist vermutlich auf die geringe, eingesetzte Proteinrohextraktmenge für die GFP-Aufreinigung zurückzuführen, wodurch das enthaltene GFP-STKR1 zwar nicht im Input wohl aber konzentriert in der Eluatfraktion nachweisbar ist.

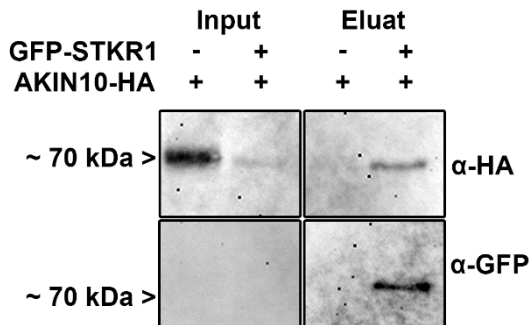


Abbildung 3.23: Ko-Immunopräzipitation von GFP-STKR1 und AKIN10-HA. GFP-STKR1 und AKIN10 wurden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation in *N. benthamiana* transient ko-exprimiert. 48 Stunden nach der Agrobakterieninfiltration wurde ein Rohextrakt (Input) gewonnen und GFP-STKR1 mittels GFP-Affinitätsmatrix aufgereinigt (Eluat). Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Western Blots mit anti-GFP und anti-HA Antikörpern analysiert. Als Negativkontrolle wurde AKIN10-HA in *N. benthamiana* exprimiert und ebenfalls über die GFP-Matrix aufgereinigt und in einem anti-HA Western Blot analysiert.

3.3.3 Die STKR1-Proteinmenge wird durch AKIN10 stabilisiert

Weiterhin konnte in Western Blot Analysen auf *N. benthamiana*-Blattmaterial, in welchem *STKR1* und *AKIN10* transient exprimiert wurden, beobachtet werden, dass die Ko-Expression mit AKIN10-GFP zu einer Anreicherung von STKR1-HA führte (Abbildung 3.24). Ob diese Stabilisierung ein indirekter oder direkter Effekt aufgrund einer AKIN10-vermittelten Phosphorylierung ist oder allein durch die Interaktion der beiden Proteine bedingt ist, muss durch weitere Experimente untersucht werden.

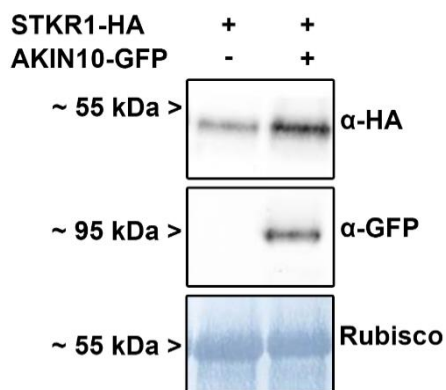


Abbildung 3.24: Stabilisierung von GFP-STKR1 durch AKIN10. STKR1-HA wurde zusammen mit AKIN10-GFP in *N. benthamiana* transient exprimiert. 48 Stunden nach Agroinfiltration wurden die Proteinmengen mittels Western Blot mit anti-HA- und anti-GFP Antikörpern analysiert. Die Amidoblack-Färbung der Rubisco diente als Ladekontrolle.

Eventuell schützt die Interaktion mit AKIN10 STKR1 vor dem Abbau. Proteine, die einem hohen Proteinumsatz unterliegen, werden häufig über das 26S Proteasom abgebaut. Ob auch STKR1 als Substrat für den proteasomvermittelten Proteinabbau dient, wurde in einem zellfreien Proteinabbauassay untersucht. Hierfür wurde aus *N. benthamiana*-Blättern, welche *STKR1-HA* transient exprimierten, ein Extrakt hergestellt, der über einen Zeitraum von drei Stunden ohne bzw. mit dem Proteasominhibitor MG132 inkubiert und anschließend in einem Western Blot mit anti-HA-Antikörpern analysiert wurde. Während zu Beginn des Experiments in beiden Ansätzen äquivalente Mengen an STKR1-HA detektiert werden konnten, war das Protein im Ansatz ohne den Proteasominhibitor MG132 nach einer Stunde nahezu

Ergebnisse

vollständig abgebaut (Abbildung 3.25). Im Gegensatz dazu resultierte die Inkubation mit MG132 in einem verminderten Abbau von STKR1-HA. Nach drei Stunden konnte allerdings in keinem der Ansätze STKR1-HA detektiert werden. Das Ergebnis lässt vermuten, dass STKR1 als Substrat für das 26S Proteasom dient.

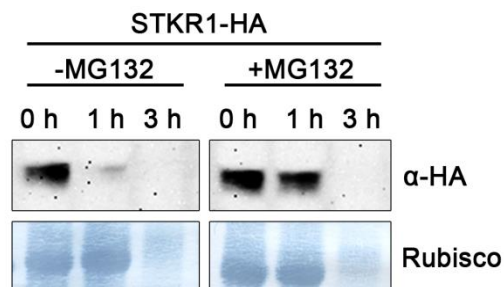


Abbildung 3.25: MG132-Behandlung inhibiert den Abbau von STKR1. STKR1-HA wurde in *N. benthamiana* transient exprimiert. 48 Stunden nach Agroinfiltration wurden ein Pflanzenextrakt gewonnen und mit MG132 (100 μ M in 1% Ethanol) bzw. ohne MG132 (1% Ethanol) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels Western Blot mit anti-HA Antikörpern analysiert. Die Amidoblack-Färbung der Rubisco diente als Ladekontrolle.

3.3.4 Studien zur Phosphorylierung von STKR1

3.3.4.1 *In planta*-Phosphorylierung von STKR1

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass STKR1 und AKIN10 in Hefe sowie *in planta* interagieren. Um allerdings als Substrat für eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung zu dienen, sollte STKR1 einerseits ein Phosphoprotein sein und andererseits ein potentiell SnRK1-Phosphorylierungsmotiv aufweisen. Die Suche nach möglichen Serin- bzw. Threoninresten, die als SnRK1-Ziel dienen, erfolgte durch Einspeisen der STKR1-Aminosäuresequenz in das *Online-Tool* „SIB ScanProsite“ (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>). Von den 18 Serin- sowie 3 Threoninresten, die potentielle Phosphorylierungsstellen aufweisen, erfüllt nur ein Serin an Position 27 exakt die Kriterien für ein geeignetes SnRK1-Motiv [MLVFI]-X-[RKH]-X(2/3)-[ST]-X(3)-[MLVFI] (Tsai und Gazzarrini, 2012). Ein weiteres Serin an Position 184, das laut PhosPhAT-Datenbankanalyse (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/phosphat.html>) in massenspektrometrischen Untersuchungen als posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert annotiert ist, wurde in die Analyse mit einbezogen, obwohl es kein perfektes SnRK1-Zielmotiv aufweist (Tabelle 3.4).

Position	Sequenz	Wahrscheinlichkeit
27	LSHRRSPRNI	1,577
184	ENRTNESGEEEM	0.972

Tabelle 3.4: Potentielle SnRK1-Phosphorylierungsmotive in STKR1. Die Positionsangabe gibt die Stelle des potentiell phosphorylierten Serins S27 sowie die des bereits beschriebenen Phosphoserins an Position 184 innerhalb der Aminosäuresequenz an. Die 2. Spalte (Sequenz) zeigt die möglichen SnRK1-Zielmotive. Rot: vorhergesagte Phosphoserine, Blau: konservierte Aminosäuren des SnRK1-Zielmotives. Die 3. Spalte gibt den Wert an mit welcher Wahrscheinlichkeit laut Vorhersage der PhosPhAT-Datenbankanalyse an diesem Serin eine Phosphorylierung erfolgt.

Ergebnisse

Ob es sich bei diesen Serinresten in STKR1 um Phosphorylierungsstellen handelt, sollte überprüft werden. Dazu wurde das Serin an Position 27 (STKR1_{S27A}) bzw. 184 (STKR1_{S184A}) durch ortsgerichtete Mutagenese zu Alanin substituiert. Zusätzlich wurde eine Mutante generiert, in welcher beide Serine durch Alanin (STKR1_{S27A/S184A}) ersetzt wurden.

Zunächst wurde untersucht ob STKR1 *in planta* phosphoryliert vorliegt. Dazu wurde GFP-markiertes STKR1 48 Stunden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation von *N. benthamiana* über die GFP-Markierung mittels GFP-Trap® aus Pflanzenextrakt aufgereinigt. Nach Separation des Fusionsproteins in einem Proteingel wurde das Gel zunächst einer Phosphoproteinfärbung und im Anschluss einer Gesamtproteinfärbung unterzogen. Als Negativkontrolle wurden 5 µg rekombinant aus *E. coli* aufgereinigtes MBP-STKR1 aufgetragen, welches nicht phosphoryliert wird. Zunächst geht aus der Färbung des Gesamtproteins hervor, dass MBP-STKR1 und GFP-STKR1 nicht in äquivalenten Mengen vorlagen, was auf den großen Anteil an Abbauprodukten der MBP-STKR1-Aufreinigung zurückzuführen ist. Dennoch ist in der Phosphoproteinfärbung deutlich zu erkennen, dass nur das aus Pflanzenextrakt gewonnene GFP-STKR1 phosphoryliert vorlag (Abbildung 3.26 A). Im Weiteren sollte bewertet werden ob die Substitution der möglichen durch SnRK1 phosphorylierten Serine durch Alanine einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von STKR1 hat. Dazu wurden GFP-STKR1, GFP-STKR1_{S27A}, GFP-STKR1_{S184A} und GFP-STKR1_{S27A/S184A} analog zu Abbildung 3.26 A über ihre GFP-Markierung aus *N. benthamiana*-Extrakt aufgereinigt separiert und gefärbt (Abbildung 3.26 B). Die Färbung des Gesamtproteins verdeutlicht, dass nicht die exakt gleichen Mengen an Fusionsprotein aufgereinigt wurden, obwohl die für die Aufreinigung eingesetzten Extrakte die gleichen Proteinkonzentrationen aufwiesen. So wurde mehr STKR1_{S184A} aufgereinigt als von den übrigen drei Fusionsproteinen, wodurch keine quantitative Aussage möglich ist. So lagen alle STKR1-Varianten phosphoryliert vor, wobei nur zwischen STKR1 und der STKR1_{S27A/S184A}-Variante ein deutlicher Unterschied im Phosphorylierungsstatus detektierbar war. Die Doppelsubstitution resultiert offenbar in einer verminderten Phosphorylierung von STKR1. Eine unspezifische Detektion bei der Phosphoproteinfärbung kann aufgrund der nicht nachweisbaren Färbung von beispielsweise MBP und GFP, welche ebenfalls in der Gesamtproteinfärbung nachweisbar waren, ausgeschlossen werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass STKR1 ein Phosphoprotein ist und dass der gemeinsame Verlust der potentiellen Phosphorylierungsstellen an Position 27 und 184 einen negativen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus von STKR1 hat nicht aber in dem kompletten Verlust der Phosphorylierung resultiert. Dies spricht für weitere Phosphorylierungsstellen in STKR1.

Ergebnisse

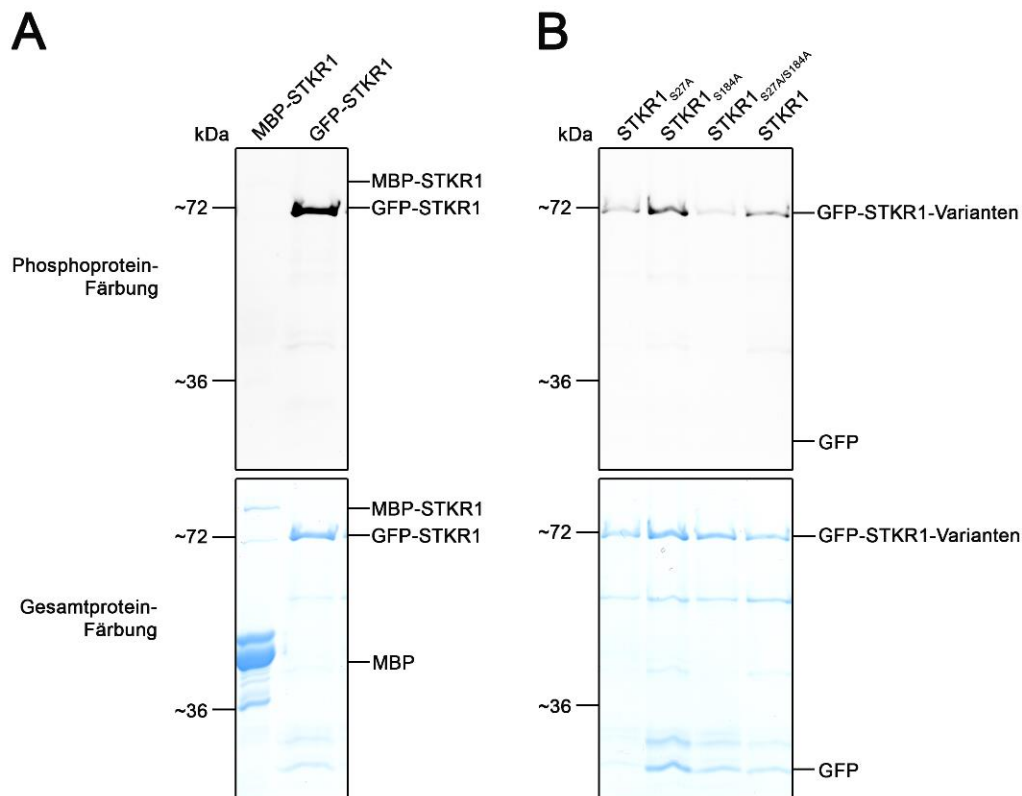


Abbildung 3.26: Nachweis von phosphoryliertem STKR1 aus Pflanzenextrakt. A: STKR1 wird in Pflanzen phosphoryliert. **B:** Die Substitution von S27 und S184 zu Alanin beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von STKR1. GFP-markiertes STKR1, STKR1^{S27A}, STKR1^{S184A} und STKR1^{S27A/S184A} wurden mittels GFP-Trap® aus *N. benthamiana*-Extrakt aufgereinigt und in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt. Rekombinantes, aus *E. coli* aufgereinigtes MBP-STKR1 diente als nicht phosphorylierte Negativkontrolle. Die Anfärbung der Phosphoproteine erfolgte mittels Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain, die des Gesamtproteins mit InstantBlue™ Protein Stain.

3.3.4.2 *In vitro*-Phosphorylierung von STKR1 durch AKIN10

Um zu überprüfen ob STKR1 als Substrat für eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung dient, wurden zwei verschiedene Kinase-Assays durchgeführt. Einerseits wurde AKIN10 aus AKIN10-HA-überexprimierenden *A. thaliana*-Pflanzen über eine anti-HA-Matrix aufgereinigt. Um möglichst viel aktivierte AKIN10 zu erhalten, wurden die Pflanzen nach einer verlängerten Dunkelphase und somit unter SnRK1-aktivierenden Bedingungen beprobt. Die aufgereinigte Kinase wurde entweder mit rekombinatem MBP-STKR1 oder mit rekombinatem MBP-SAMS-Peptid, welches als beschriebenes SnRK1-Substrat als Positivkontrolle diente, *in vitro* inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz nach Auftrennung in einem Proteingel auf AKIN10-vermittelte Phosphorylierung der Proteine hin analysiert. Dies erfolgte mittels Phosphoprotein-färbung und anschließender Gesamtprotein-färbung (Abbildung 3.27).

Ergebnisse

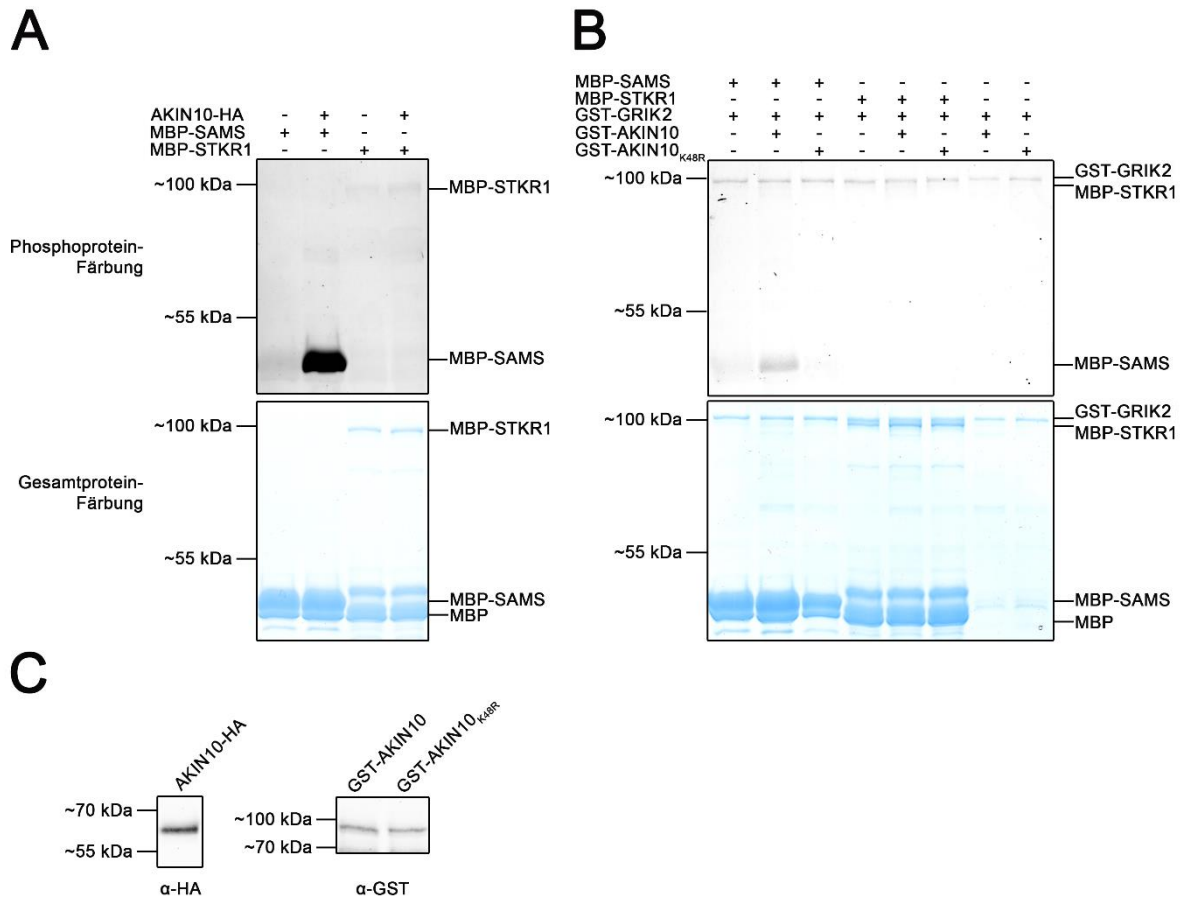


Abbildung 3.27: *In vitro*-Kinase-Assay von STKR1 und AKIN10. **A:** Aus *A. thaliana*-Pflanzenextrakt aufgereinigte AKIN10-HA wurde mit rekombinant in *E. coli* exprimierten und aufgereinigtem MBP-STKR1 oder MBP-SAMS (Positivkontrolle) in Kinasepuffer inkubiert. **B:** MBP-STKR1 oder MBP-SAMS wurden mit MBP-GRIK2 und GST-AKIN10 oder GST-AKIN10_{K48R} in Kinasepuffer inkubiert. Die verwendeten Proteine wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und über ihre Affinitätsmarkierung aufgereinigt. Die Reaktionsansätze wurden in 10%igen SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend die Phosphoproteine (Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain) sowie die Gesamtheit der Proteine (InstantBlue™ Protein Stain) angefärbt. **C:** Western Blots mit anti-HA- bzw. anti-GST-Antikörpern zum Nachweis der in den Kinase-Assay verwendeten AKIN10-HA, GST-AKIN10 und GST-AKIN10_{K48R}. Es wurde jeweils 1 µg Protein aufgetragen.

Für das SAMS-Peptid konnte nur bei Inkubation mit AKIN10 ein starkes Phosphorylierungssignal detektiert werden. Im Falle von STKR1 kann nur andeutungsweise eine Phosphorylierung bei gemeinsamer Inkubation mit AKIN10 vermutet werden, was eventuell auf eine zu geringe Proteinkonzentration von STKR1 im Ansatz zurückgeht. So wurden zwar jeweils 5 µg der MBP-SAMS- und MBP-STKR1-Aufreinigung eingesetzt, allerdings enthält das Eluat von MBP-STKR1 einen großen Anteil an Abbauprodukten und endogenem MBP. Andererseits wurden in einem weiteren Kinase-Assay rekombinant in *E. coli* exprimierte und über ihre GST-/MBP-Markierung aufgereinigte Proteine eingesetzt. Um dabei die phosphorylierungsabhängige Aktivierung von AKIN10 zu gewährleisten, wurde GRIK2 als AKIN10-phosphorylierende Kinase jedem Ansatz zugegeben. Als Negativkontrolle wurde die kinaseinaktive AKIN10_{K48R}-Variante mit einer Mutation in der ATP-Bindestelle

Ergebnisse

verwendet bzw. das AKIN10-Substrat mit GRIK2 inkubiert. Auch hierbei wurde das SAMS-Peptid als Positivkontrolle zum Nachweis der AKIN10-Aktivität im Kinase-Assay mitgeführt. Aus der Phosphoproteinfärbung des Gels geht einerseits hervor, dass GRIK2 in allen Ansätzen phosphoryliert vorliegt. Nur im Falle einer Inkubation von MBP-SAMS, MBP-GRIK2 und GST-AKIN10 konnte die Phosphorylierung des AKIN10-Substrats SAMS detektiert werden. Wurde statt GST-AKIN10 die Variante GST-AKIN10_{K48R} dem Reaktionsansatz hinzugefügt, konnte keine SAMS-Phosphorylierung beobachtet werden. In Bezug auf MBP-STKR1 konnte in keinem Inkubationsansatz eine AKIN10-vermittelte Phosphorylierung gezeigt werden. Da in beiden Kinase-Assays nur 1 µg AKIN10-HA, GST-AKIN10 oder GST-AKIN10_{K48R} eingesetzt wurden, was unterhalb der Nachweisgrenze der Gesamtproteinfärbung liegt, wurden Western Blot-Analysen mit anti-HA- bzw. anti-GST-Antikörpern zum Kinasenachweis durchgeführt. Durch die erhaltenen Befunde konnte eine Phosphorylierung von STKR1 durch AKIN10 nicht eindeutig bestätigt werden. Weiterhin scheint die Aufreinigung von AKIN10 aus Pflanzenextrakt bessere Resultate im Kinase-Assay zu liefern, wahrscheinlich aufgrund eines besseren Verhältnis von aktiver zu inaktiver Kinase als im Falle der rekombinanten AKIN10.

3.3.4.3 Lokalisierung von STKR1-Substitutionsmutanten in *N. benthamiana*

Um zu überprüfen, ob der Verlust möglicher Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die Lokalisierung von STKR1 ausübt, wurden fluoreszenzmarkierte STKR1-Substitutionsmutanten mittels KLSM analysiert. Hierfür wurden GFP-STKR1, GFP-STKR1_{S27A}, GFP-STKR1_{S184A} und GFP-STKR1_{S27A/S184A} mittels Agroinfiltration in *N. benthamiana*-Blättern transient exprimiert und die Lokalisierung nach 48 Stunden am KLSM analysiert. Sowohl STKR1 als auch die Mutanten zeigten ein starkes GFP-Fluoreszenzsignal im Nucleus, wobei die Substitution potentieller Phosphorylierungsstellen in einer gesteigerten Akkumulation im vermeintlichen Nucleolus sowie der Reduktion subnuclearer *Foci* resultierte (Abbildung 3.28). Somit scheint der Verlust dieser Serine zwar keinen Einfluss auf den Eintritt in den Zellkern zu haben, wohl aber auf die Lokalisierung innerhalb des Zellkerns.

Ergebnisse

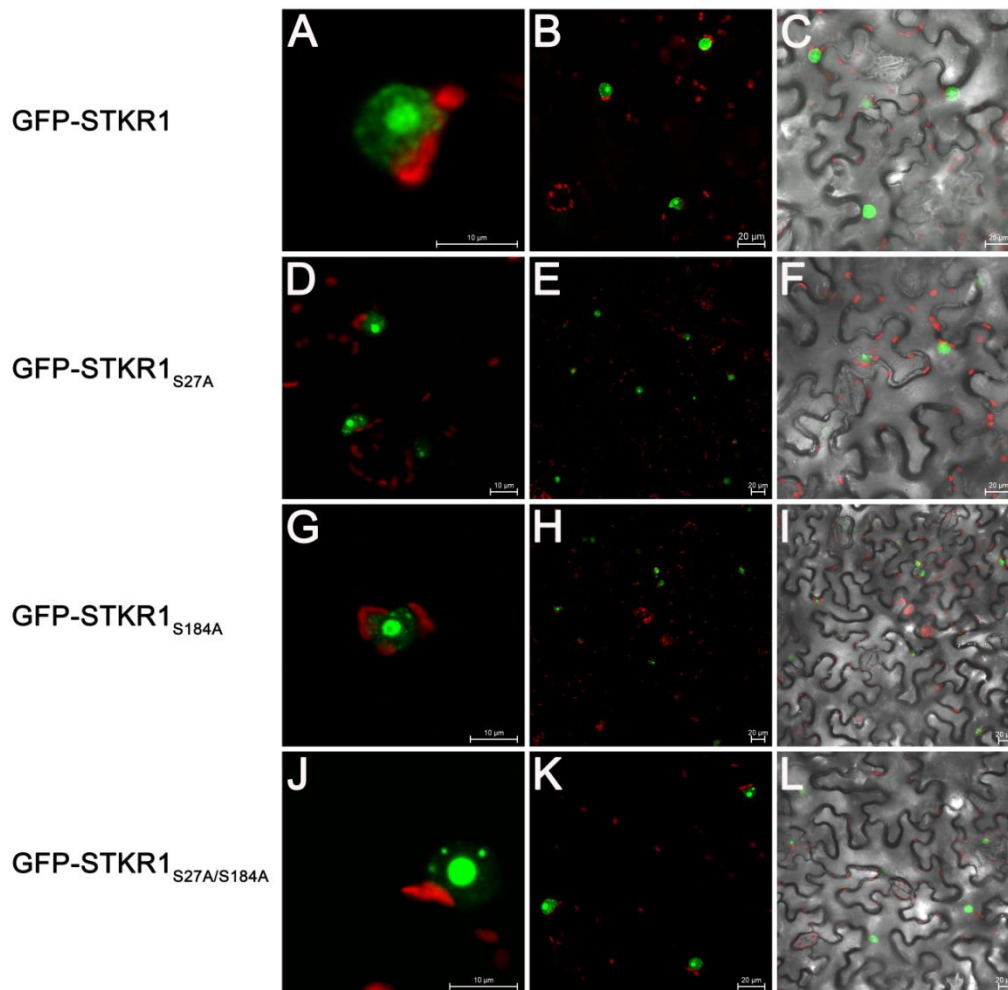


Abbildung 3.28: Subzelluläre Lokalisierung von STKR1 und zugehöriger Substitutionsmutanten. GFP-STKR1, GFP-STKR1_{S27A}, GFP-STKR1_{S184A} und GFP-STKR1_{S27A/S184A} wurden transient mittels Agroinfiltration in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert. Für die Analyse wurden die Blätter 48 Stunden nach Infiltration beprobt und unter dem KLSM betrachtet. Grün: GFP-Fluoreszenz, Rot: Chloroplasten-Autofluoreszenz. Der Größenmaßstab entspricht 10 µm (A, D, G, J) bzw. 20 µm (B-C, E-F, H-I, K-L).

3.3.4.4 Interaktionsstudien mit STKR1-Substitutionsmutanten

Mair et al. (2015) konnten zeigen, dass die SnRK1-vermittelte Phosphorylierung einen Einfluss auf die Dimerisierungspräferenz des bZIP-Transkriptionsfaktors bZIP63 ausübt und damit die Expression von Zielgenen beeinflusst (Mair et al., 2015). Ob ein Verlust des Serins an Position 184 der STKR1-Aminosäuresequenz einen Effekt auf die Dimerisierung nach sich zieht, wurde zunächst im Hefe-Zwei-Hybrid-System analysiert. War lediglich ein Protein vom Austausch des Serins an Position 184 durch Alanin betroffen, konnte nur eine leicht verminderte Homodimerisierung festgestellt werden (Abbildung 3.29). Waren jedoch beide STKR1-Proteine von diesem Austausch betroffen, konnte keine Interaktion mehr festgestellt werden (Abbildung 3.29 A). Weiterhin war auch hinsichtlich der Heterodimerisierung eine

Ergebnisse

verminderte Bindefähigkeit von STKR1_{S184} im Vergleich zu STKR1 in der Interaktion mit GPL1 als auch mit GPL3 nachweisbar (Abbildung 3.29 B).

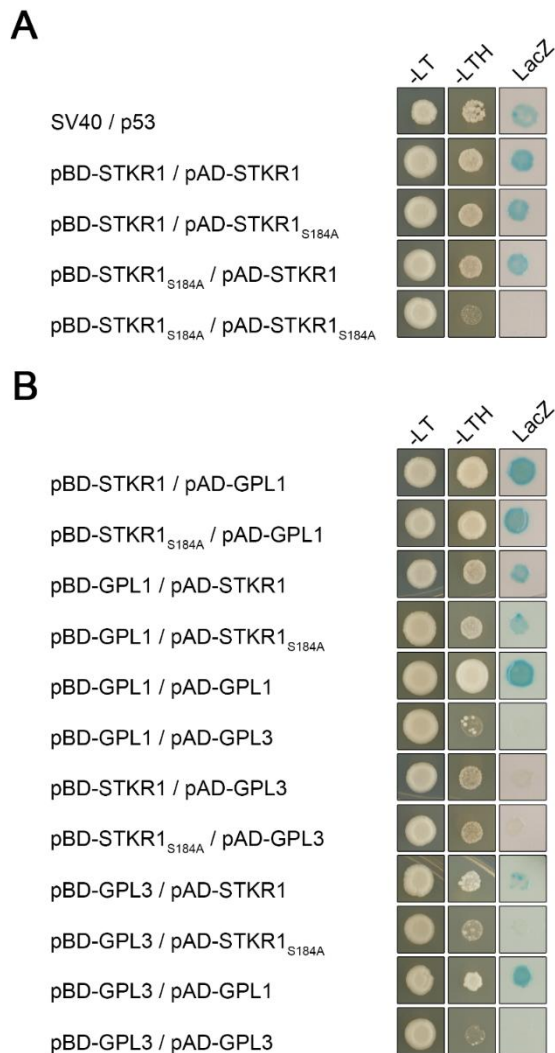


Abbildung 3.29: Einfluss des Verlusts eines potentiellen SnRK1-Zielmotivs von STKR1 auf die Dimerisierungseigenschaften. A: Homodimerisierung von STKR1 bzw. STKR1_{S184A} fusioniert mit der GAL4-BD und STKR1 bzw. STKR1_{S184A} fusioniert an GAL4-AD. **B:** Für die Heterodimerisierung wurden STKR1, STKR1_{S184A}, GPL1 und GPL3 im pGBT9-Vektor an die GAL4-BD bzw. im pAD-Vektor an die GAL4-AD fusioniert. Die Interaktion zwischen murinem p53 und dem SV40-Antigen diente als Positivkontrolle. Die Ko-Expression der Proteine erfolgte im Hefestamm Y190. Nach dem Wachstum der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium für 2 bis 3 Tage wurde ein LacZ-Filter-Test durchgeführt. –LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. –LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist. LacZ: Aktivität des *LacZ*-Reportergens.

Zur Verdeutlichung der Unterschiede in der Dimerisierung von STKR1 bzw. STKR1_{S184A} wurden Verdünnungsreihen der transformierten Hefen hergestellt und deren Wachstum auf SCAD_{-LTH}-Medium überprüft. Während STKR1 sowohl mit sich selbst als auch mit GPL1 und GPL3 interagiert, führte die Substitution des Serins an Position 184 durch ein Alanin zu einer verminderten Interaktion sowohl in der Homodimerisierung als auch in der Heterodimerisierung mit GPL1 und GPL3 (Abbildung 3.30). Ferner zeigte sich, dass die Stärke der Interaktion abhängig von der Vektorkombination war. So konnten etwa keine Unterschiede im Hefewachstum auf SCAD_{-LTH}-Medium erkannt werden, wenn pBD-GPL1 gegen pAD-STKR1 oder pAD-STKR1_{S184A} getestet wurde (Abbildung 3.30). Im Gegensatz dazu war das Wachstum der Hefen, die pBD-STKR1_{S184A} in Kombination mit pAD-GPL1 exprimierten, stark vermindert im Vergleich zu Hefen, welche die Vektorkombination pBD-STKR1 und pAD-GPL1 enthielten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust des potentiellen SnRK1-Zielmotivs die Homo-sowie Heterodimerisierungsfähigkeit vermindert.

Ergebnisse

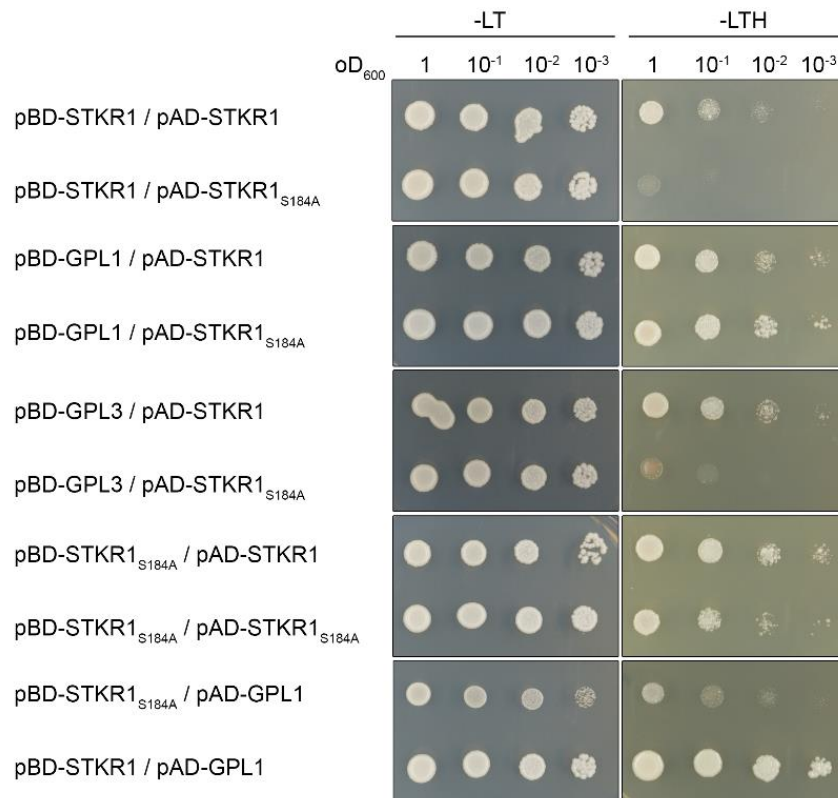


Abbildung 3.30: Der Verlust eines potentiellen SnRK1-Zielmotivs beeinflusst die Dimerisierung von STKR1 in Hefe. STKR1, STKR1_{S184A}, GPL1 und GPL3 wurden im pGBT9-Vektor an die GAL4-BD fusioniert. STKR1, STKR1_{S184A} und GPL1 waren im pAD-Vektor an die GAL4-AD fusioniert. Die Ko-Expression der Proteine erfolgte im Hefestamm Y190. Verdünnungsreihen der Hefen wurden auf -LT und -LTH-Medium getropft und das Wachstum der Zellen 2 bis 3 Tage dokumentiert. -LT zeigt das Hefewachstum auf Medium ohne Histidin und Tryptophan. -LTH stellt das Hefewachstum auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin dar, wobei *HIS3* das Reportergen ist.

3.4 Herstellung und Analyse von *A. thaliana*-Pflanzen mit veränderter *STKR1*-Expression

Bisher konnte gezeigt werden, dass SnRK1 α -Untereinheiten mit DUF581-Proteinen interagieren und sich mit eben diesen Interaktionspartnern teilen. So ist STKR1 sowohl in der Lage mit DUF581-18 als auch mit SnRK1 α -Untereinheiten zu interagieren. Die Beobachtung, dass es sich bei STKR1 um ein Phosphoprotein handelt sowie das Vorhandensein möglicher SnRK1-Zielmotive innerhalb der STKR1-Aminosäuresequenz eröffnen die Möglichkeit, dass STKR1 als Substrat für AKIN10 dient und damit Bestandteil der SnRK1-vermittelten Signaltransduktionsweges ist.

Um einen Einblick zu erhalten in welche biologischen Prozesse STKR1 involviert ist, wurden stabil transformierte *A. thaliana*-Linien, welche *STKR1* konstitutiv exprimieren, generiert. Außerdem sollte die Auswirkung eines Verlustes der *STKR1*-Expression anhand von T-DNA-Insertionsmutanten untersucht werden.

Ergebnisse

3.4.1 Herstellung von *STKR1*-überexprimierenden *A. thaliana*-Linien

Die aus *Arabidopsis*-cDNA amplifizierte codierende Sequenz von *STKR1* wurde in einen binären Vektor kloniert, wobei das Fragment am 3'-Ende translational mit einem 3-fachen myc-tag fusioniert wurde. Dies sollte später die Detektion des Proteins in Pflanzen mit Hilfe eines anti-myc Antikörpers ermöglichen. Die Expression des Transgens erfolgte unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors. Nach Transformation des Konstrukts in *Agrobakterien* wurden *A. thaliana* Col-0-Pflanzen über die *floral-dip* Methode stabil transformiert. Transformanten der T₁-Generation wurden im Weiteren mittels Western Blot auf die Anwesenheit des *STKR1-myc* Fusionsproteins analysiert (Abbildung 3.31).



Abbildung 3.31: Screening-Western Blot zur Selektion *STKR1-myc*-exprimierender, stabil transformierter *A. thaliana*-Linien. Der Expressionsnachweis myc-markierten *STKR1* erfolgte mittels Western Blot mit anti-myc-Antikörper.

Drei der positiv-getesteten Pflanzen wurden bis zur T₃-Generation gebracht (Abbildung 3.32). Nachfolgende Analysen wurden mit dem Saatgut der auf die Expression des Transgens getesteten T₃-Generation der Linien 35S-*STKR1-3xmyc* (kurz: 35S-*STKR1*) #1, #2 und #5 durchgeführt.

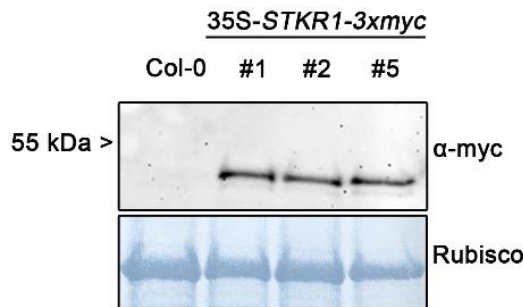


Abbildung 3.32: Western Blot-Nachweis der stabilen Expression von *STKR1-myc* in der T₃-Generation. Die Expression von myc-markierten *STKR1* wurde durch einen Western Blot mit anti-myc-Antikörper nachgewiesen. Die durch Amidoblack angefärbte Rubisco diente als Ladekontrolle.

3.4.2 Genotypisierung einer *stkr1* T-DNA-Insertionsmutante

Um neben dem Einfluss einer erhöhten Anwesenheit von *STKR1* in *A. thaliana* auch den Effekt eines Verlusts von *STKR1* zu untersuchen, wurde die Linie SALK_115723C, welche eine T-DNA-Insertion im genomischen Locus von *STKR1* aufweist, in den Analysen mitgeführt (Abbildung 3.33). Zunächst wurde die Homozygotie der Linie auf Anwesenheit der T-DNA überprüft. Dazu wurde einerseits eine PCR auf isolierte DNA von Col-0 sowie *stkr1*-Mutanten mit dem Primerpaar *STKR1* LP und RP (Anhang 6.1) durchgeführt, welche bei

Ergebnisse

Vorhandensein des Wildtypallels ein Amplikon von 1110 Basenpaaren ergibt. Andererseits wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden BP (T-DNA-spezifisch) und RP ein Fragment mit einer Länge zwischen 594 und 894 Basenpaaren erwartet, wenn die T-DNA Insertion vorliegt. Wie aus Abbildung 3.33 ersichtlich, konnte nur in Col-0 das Wildtypallel, nicht aber die T-DNA Insertion nachgewiesen werden. Die *stkr1*-Mutante zeigte in der PCR nur ein Produkt bei der PCR mit den T-DNA-spezifischen Primern, aber kein Amplikon für das Wildtypallel. Somit konnte die Homozygotie der *stkr1*-Linie in Bezug auf das Vorliegen der T-DNA-Insertion bestätigt werden. Die Überprüfung, dass diese Insertion auch zu einem vollständigen Verlust der *STKR1*-Expression führt, erfolgte nach RNA-Isolierung und deren reverser Transkription in cDNA durch eine PCR mit den *STKR1*-spezifischen Primern MN150/MN151 (Anhang 6.1). Nur im Wildtyp konnte die Expression von *STKR1* nachgewiesen werden, nicht aber in der *stkr1*-T-DNA-Insertionsmutante, womit der Verlust der *STKR1*-Expression in dieser Linie verifiziert werden konnte.

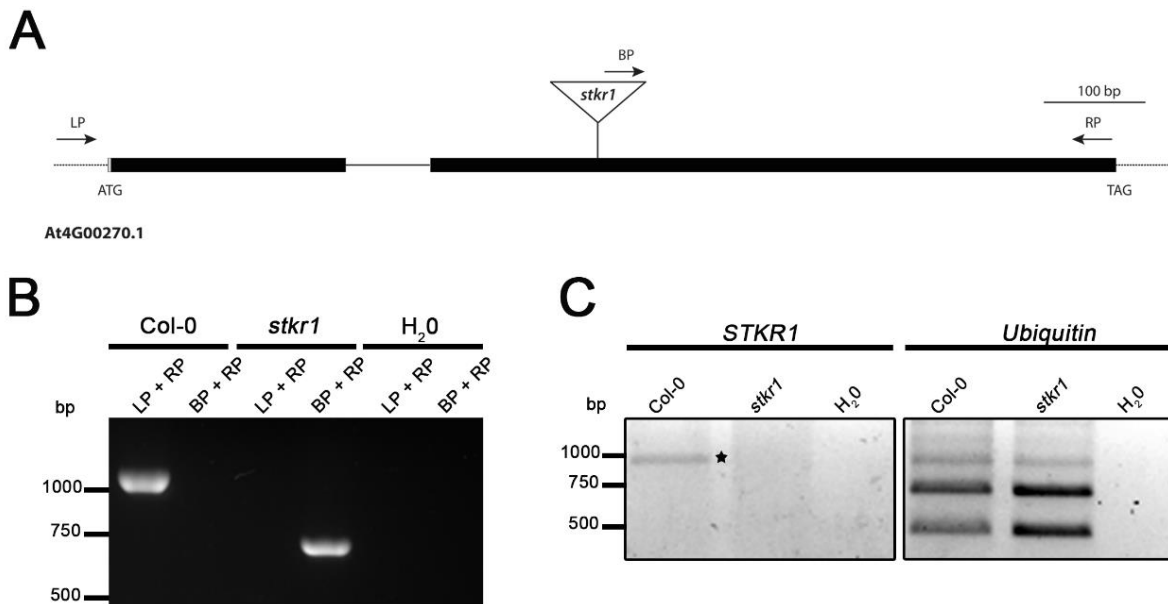


Abbildung 3.33: Verifizierung der T-DNA-Insertion der *stkr1*-Mutante. **A:** Schematische Darstellung der Genstruktur von *AT4G00270* (erstellt nach Angaben von TAIR SeqViewer Nucleotide View). Exons sind durch schwarze Boxen dargestellt, das Intron als durchgezogene schwarze Linie. Die T-DNA-Insertion der Linie *stkr1* ist im zweiten Exon lokalisiert. Die Primer LP, BP und RP wurden für die Genotypisierung verwendet. **B** PCR auf DNA von *A. thaliana* Col-0- und *stkr1*-Pflanzen mit spezifischen Primern auf Vorliegen des Wildtypallels (LP+RP) bzw. der T-DNA-Insertion (BP+RP). **C:** Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *STKR1*-Expression. Hierfür wurde aus *A. thaliana* Col-0- und *stkr1*-Pflanzen RNA isoliert, cDNA hergestellt und für RT-PCR eingesetzt. Das *STKR1*-spezifische PCR-Produkt ist durch einen Stern markiert. Der Einsatz gleicher Mengen an cDNA wurden durch die Amplifikation von *Ubiquitin* überprüft.

3.4.3 Analyse von *A. thaliana*-Pflanzen mit veränderter *STKR1*-Expression

3.4.3.1 *STKR1*-Überexpression führt zu vermindertem Pflanzenwuchs

Im Weiteren erfolgte die phänotypische Charakterisierung der Pflanzen mit gesteigerter bzw. fehlender *STKR1*-Expression. Es zeigte sich, dass auf Erde angezogene 35S-*STKR1*-

Ergebnisse

Pflanzen einen deutlich verminderten Wuchs im Vergleich zum Wildtyp Col-0 sowie der *stkr1*-Mutante aufwiesen (Abbildung 3.34).

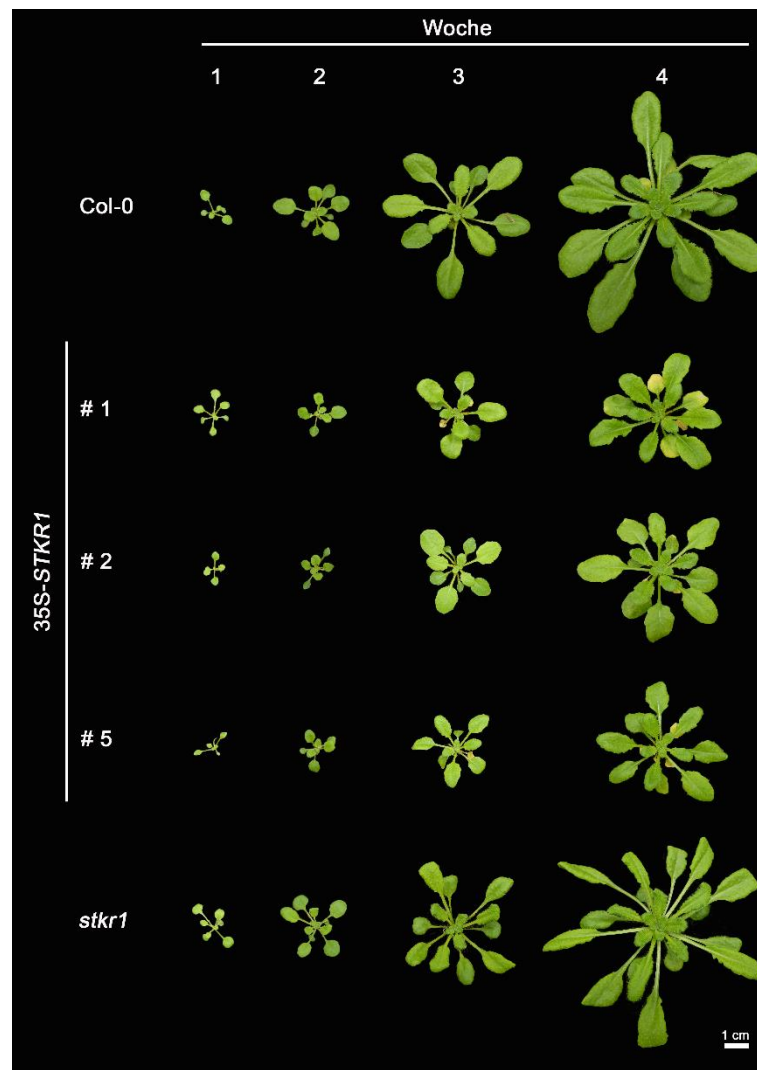


Abbildung 3.34: Phänotypische Charakterisierung der Linien 35S-STKR1 #1, #2, #5 und *stkr1* im Vergleich zum Wildtyp. Das Wachstum von Pflanzen der Linien 35S-STKR1 #1, #2, #5 sowie des Wildtyps Col-0 und der *stkr1*-Mutante wurde über einen Zeitraum 4 Wochen nach dem Pikieren wöchentlich dokumentiert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde unter Kurztagbedingungen bei einer Lichtintensität von $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Der Maßbalken entspricht 1 cm.

Auch die leicht konischen Blätter der 35S-STKR1-Pflanzen unterschieden sich von der ovalen Blattform der Col-0-Pflanzen (Abbildung 3.34 und Abbildung 3.35 A). Bei der *stkr1*-Linie konnte im Hinblick auf das Größenwachstum kein Unterschied zum Wildtyp detektiert werden, allerdings sind Blätter dieser Pflanzen kleiner und besitzen verlängerte Petiolen (Abbildung 3.34 und Abbildung 3.35 A). Im Hinblick auf die Anzahl der Blätter konnte zwischen Col-0 und *stkr1* kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.35 B). Im Gegensatz dazu bildeten Pflanzen der 35S-STKR1-Linien im Untersuchungszeitraum signifikant weniger Blätter aus als Col-0-Pflanzen (Abbildung 3.35 B). Um das vegetative Wachstum der Pflanzen genauer zu analysieren, wurden Änderungen des

Ergebnisse

Rosettendurchmessers über einen Zeitraum von sechs Wochen dokumentiert. Während die Pflanzen aller Linien zum Zeitpunkt des Pikierens (10 Tage nach Aussaat) noch gleich groß waren, wuchsen die 35S-*STKR1*-Linien langsamer als der Wildtyp und blieben im Wachstum deutlich hinter dem Wildtyp zurück (Abbildung 3.35 C). Die *stkr1*-Mutante hingegen erreichte einen größeren Durchmesser als der Col-0-Pflanzen.

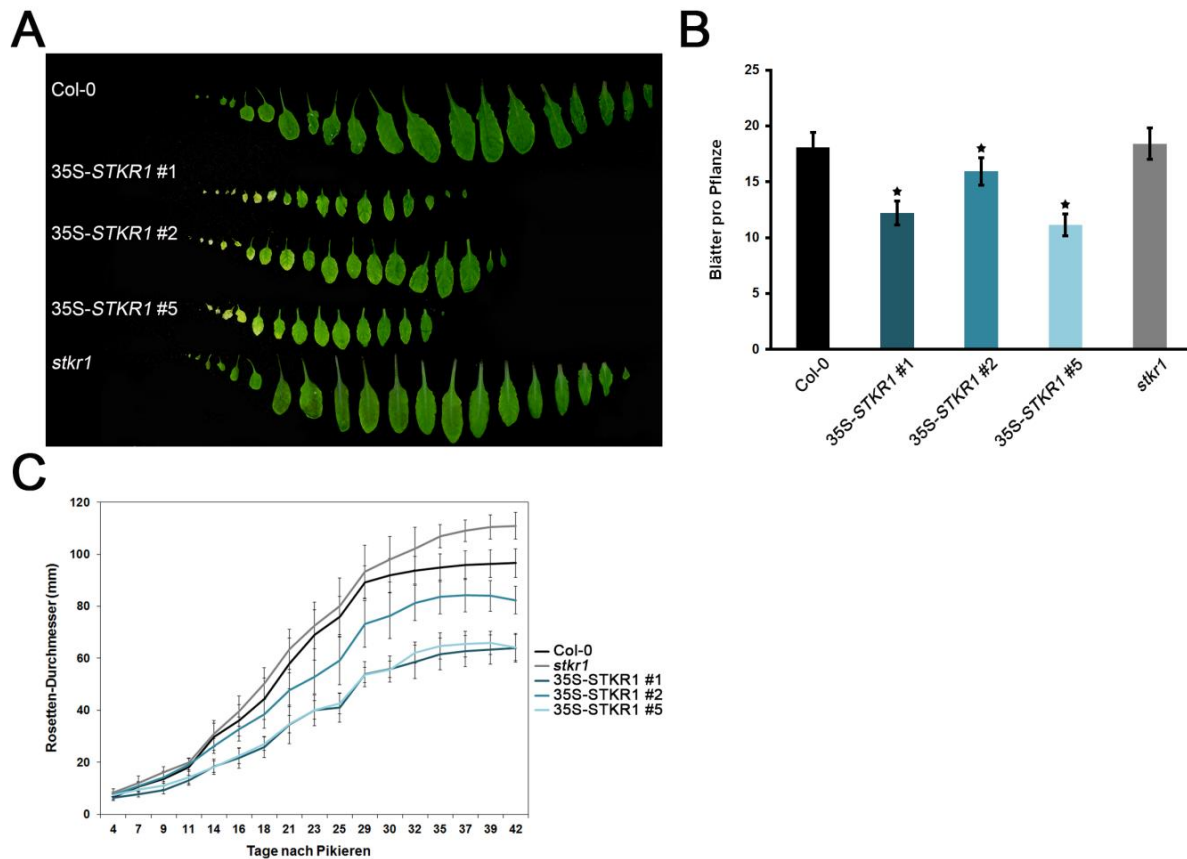


Abbildung 3.35: *STKR1*-Überexpression bedingt eine verminderte Blattentwicklung und -expansion. A: Blattreihe von Pflanzen nach 3-wöchiger Anzucht auf Erde. **B:** Durchschnittliche Anzahl der Blätter von Pflanzen, 3 Wochen nach Pikieren. Die signifikanten Unterschiede wurden mittels „*student's t-test*“ kalkuliert und sind durch * ($p \leq 0,05$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an ($n=15$). **C:** Bestimmung des Rosetten-Durchmessers über einen Zeitraum von 42 Tagen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung ($n=9$). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde unter Langtagbedingungen bei $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Während der Anzucht der Pflanzen unter Langtagbedingungen konnte beobachtet werden, dass Pflanzen der Linie *stkr1* früher von der vegetativen zur reproduktiven Phase übergingen als der Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigten die Linien, welche *STKR1* überexprimierten eine Verzögerung der Blühinduktion sowie verkürzte Stängel. Diese vom *STKR1*-Expressionslevel abhängigen gegensätzlichen Beobachtungen, deuten darauf hin, dass *STKR1* unter diesen Bedingungen einen Einfluss auf den Zeitpunkt des Übergangs zum reproduktiven Wachstum/der Blühinduktion nimmt (Abbildung 3.36).

Ergebnisse



Abbildung 3.36: Phänotyp der Linien 35S-STKR1 #1/#2/#5 und *stkr1* im Vergleich zum Wildtyp während der reproduktiven Wachstumsphase. Das Wachstum von Pflanzen der Linien 35S-STKR1 #1, #2, #5 sowie des Wildtyps Col-0 und der *stkr1*-Mutante wurde ab dem Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum drei Wochen nach dem Pikieren dokumentiert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde unter Langtagbedingungen bei $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.4.3.2 35S-STKR1-Pflanzen akkumulieren weniger Pflanzenpigmente

Neben den bereits beschriebenen phänotypischen Auffälligkeiten waren die Pflanzen der Linien 35S-STKR1 #1, #2 und #5 durch eine geringere Grünfärbung der Blätter gekennzeichnet als Col-0 oder *stkr1*-Pflanzen. Dies ließ vermuten, dass sie weniger Photosynthese-assoziierte Pigmente enthielten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden durch Ethanol-Extraktion Chlorophyll und Carotinoide aus den Blättern extrahiert und die Gehalte photometrisch quantifiziert. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp der Gehalt an Carotinoiden und Chlorophyll a in allen drei Linien signifikant reduziert war (Abbildung 3.37). Der Anteil von Chlorophyll b war in zwei der drei Linien ebenfalls signifikant niedriger als im Wildtyp. Der Gesamtgehalt an Chlorophyll wich hingegen ebenfalls in allen drei 35S-STKR1-Linien von dem des Wildtypes ab. Das Verhältnis von Chlorophyll a zu b war nur in der Linie #2 signifikant unterschiedlich zum Wildtyp, während es in den Linien #1 und #5 dem des Wildtypes entsprach. In den *stkr1*-T-DNA-Insertionsmutanten konnten in keiner dieser Analysen Unterschiede zum Wildtyp detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass eine erhöhte Präsenz von STKR1-Protein einen negativen Einfluss auf den Gehalt der photosynthetisch aktiven Pigmente Chlorophyll a und b sowie auf Carotinoide hat, während der Verlust von STKR1 keinen Einfluss zu haben scheint.

Ergebnisse

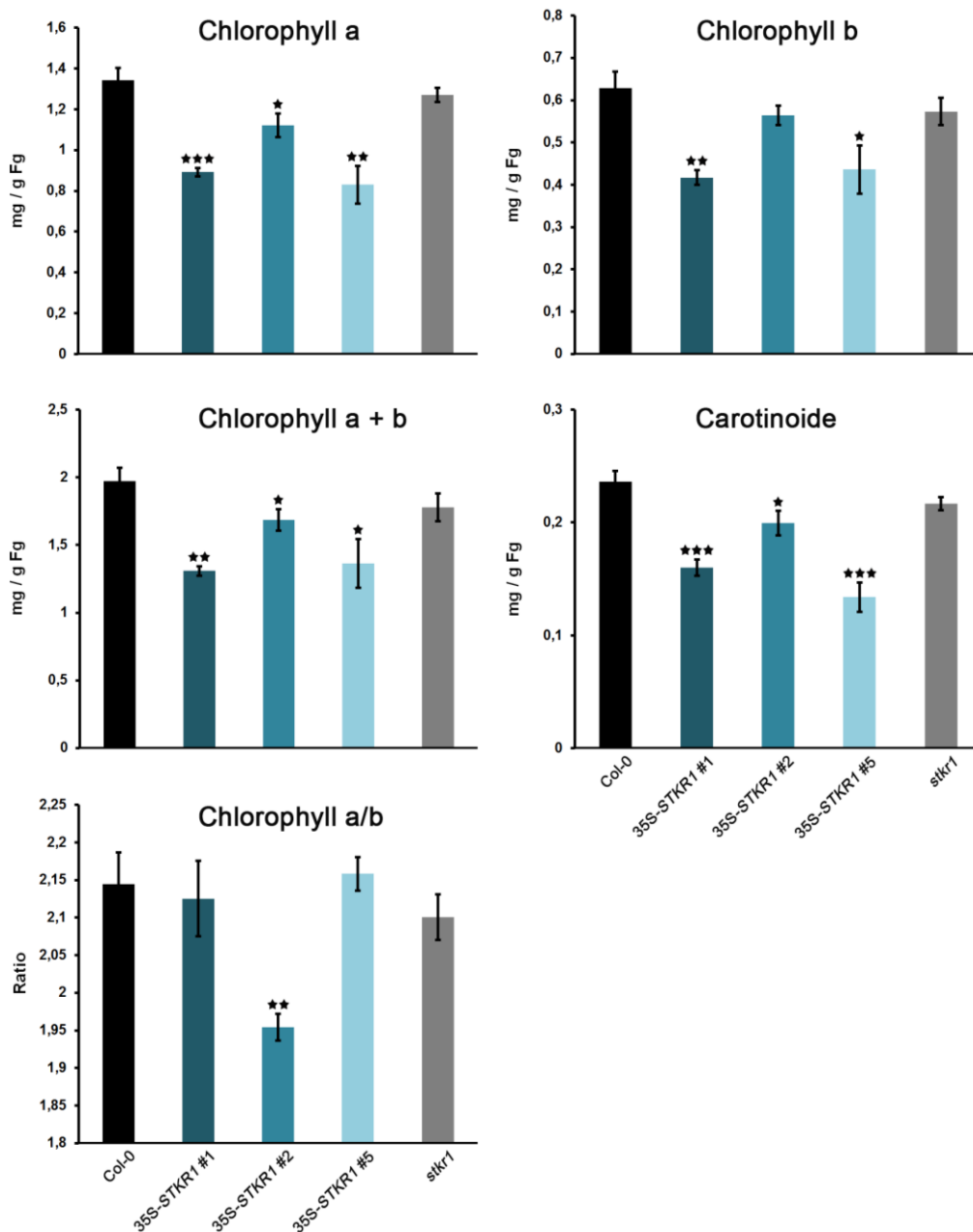
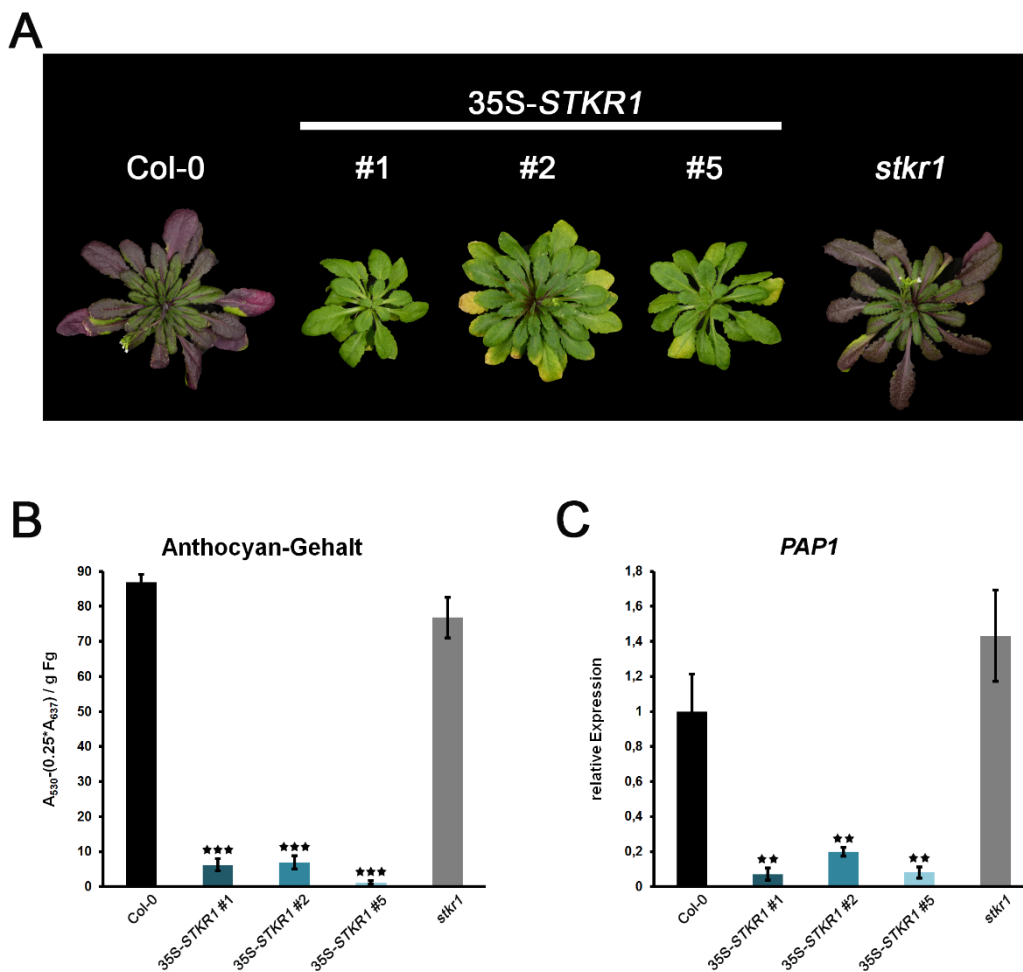


Abbildung 3.37: Gehalt an Chlorophyll und Carotinoiden der Linien 35S-STKR1 #1/#2/#5 und *stkr1* sowie des Wildtyps. Die Chlorophyll- und Carotinoidgehalte von Pflanzen der Linien 35S-STKR1 #1, #2, #5, des Wildtyps Col-0 und der *stkr1*-Mutante wurden nach Ethanol-Extraktion photometrisch quantifiziert. Die signifikanten Unterschiede wurden mittels „student's t-test“ kalkuliert und sind durch * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler ($n = 5$) an. Die Probenahme erfolgte nach Anzucht der Pflanzen auf Erde unter Kurztagbedingungen bei $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 4 Wochen.

Während der Alterung der Pflanzen zeigte sich, dass Chlorophyll und Carotinoide nicht die einzigen Pflanzenpigmente waren, die von einer gesteigerten *STKR1*-Expression betroffen waren. Ein Kennzeichen von fortschreitender Seneszenz ist die Akkumulation von Anthocyanen (Wingler et al., 2012), die hierbei vermutlich als Schutz vor Strahlungsschäden während des Chlorophyllabbaus dienen. Bei Arabidopsis Wildtypen konnte diese Einlagerung durch eine violette Färbung der Blätter beobachtet werden (Abbildung 3.38 A). Hingegen wiesen Pflanzen, die *STKR1* überexprimierten während ihres kompletten

Ergebnisse

Lebenszyklus nahezu keine violette Blattfärbung und somit Anthocyanakkumulation auf. Diese Beobachtung wurde durch Extraktion und photometrische Quantifizierung des Anthocyangehaltes von seneszierenden Pflanzen überprüft. In allen 35S-*STKR1*-Linien wurde ein signifikant reduzierter Anthocyangehalt gemessen (Abbildung 3.38 B). Ein Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese ist der myb-Domänen-Transkriptionsfaktor PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1 (*PAP1*). *PAP1*-RNAi-Linien haben stark reduzierte Level an Anthocyanen (Gonzalez et al., 2008), wohingegen die Überexpression von *PAP1* zu einem erhöhten Gehalt an Anthocyanen führt (Borevitz et al., 2000; Gonzalez et al., 2008). Weiterhin zeigte eine protoplastenbasierte Transkriptom-Analyse, dass *PAP1* ein durch AKIN10 negativ reguliertes Ziel-Gen darstellt (Baena-Gonzalez et al., 2007). Um zu überprüfen, ob der verminderte Anthocyangehalt der 35S-*STKR1*-Linien einer Repression der *PAP1*-Expression geschuldet ist, wurden die *PAP1*-Expressionslevel der Linien mittels qRT-PCR bestimmt. In den 35S-*STKR1*-Linien war die Expression von *PAP1* im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert (Abbildung 3.38 C). Dies gibt Grund zur Annahme, dass der niedrige Anthocyangehalt der 35S-*STKR1*-Linien ein Resultat der Repression des positiven Regulators der Anthocyanbiosynthese *PAP1* ist. Der Verlust von *STKR1* hingegen hat weder einen Einfluss auf den Anthocyangehalt noch auf die *PAP1*-Expression, da sich die *stkr1*-Mutante nicht vom Wildtyp unterscheidet (Abbildung 3.38 B und C).



Ergebnisse

Abbildung 3.38: Anthocyanengehalt und *PAP1*-Expression in den Linien 35S-*STKR1* #1, #2, #5 und *stkr1* sowie des Wildtyps. **A:** Phänotyp der Linien 35S-*STKR1* #1, #2, #5 sowie des Wildtyps Col-0 und der *stkr1*-Mutante 8 Wochen nach dem Pikieren. **B:** Der Anthocyanengehalt wurde nach Extraktion mit saurem Methanol photometrisch quantifiziert. **C:** Die *PAP1*-Expression wurde mittels qRT-PCR analysiert. Gesamt-RNA aus Blättern von 8 Wochen auf Erde kultivierten Pflanzen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression von *UBC9* wurde zur Normalisierung verwendet. Die *PAP1*-Expression des Wildtyps Col-0 diente als Kalibrator und wurde auf 1 gesetzt. Signifikanten Unterschiede wurden mittels „*student's t-test*“ kalkuliert und sind durch ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler ($n = 5$) wider. Die Pflanzen wurden auf Erde unter Kurztagbedingungen bei $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen.

3.4.3.3 Das Expressionslevel von *STKR1* beeinflusst die Seneszenz

Nachdem beobachtet wurde, dass eine Deregulierung von *STKR1* Einfluss auf die Blühinduktion ausübt, wurde spekuliert ob sich die Linien auch in anderen Entwicklungsprozessen, wie etwa der Seneszenz, voneinander unterscheiden. Die Blattseneszenz ist ein programmierter Zelltod, der dem Recycling nützlicher Ressourcen dient und somit essentiell für die pflanzliche Entwicklung ist. Seneszenz kann nicht nur durch den Alterungsprozess der Pflanze induziert werden, sondern auch durch Faktoren wie Trockenheit, Salzstress und Dunkelheit (Lim et al., 2007). Auch wenn alterungsbedingte (Entwicklung) und Dunkelheit- (Umwelt/Nährstoffmangel) induzierte Seneszenz nicht identisch sind, weisen beide charakteristische Seneszenzsymptome wie Chlorophyll- und Proteinabbau auf (Guo und Gan, 2005). Daher wurden Blätter von Col-0, 35S-*STKR1* #1, #2, #5 sowie der *stkr1*-Mutante in einem durch Dunkelheit-induzierten Seneszenzversuch analysiert (Abbildung 3.39). Dabei lag der Fokus auf Unterschieden in der durch den progressiven Chlorophyllabbau fortschreitenden Gelbfärbung der Blätter.

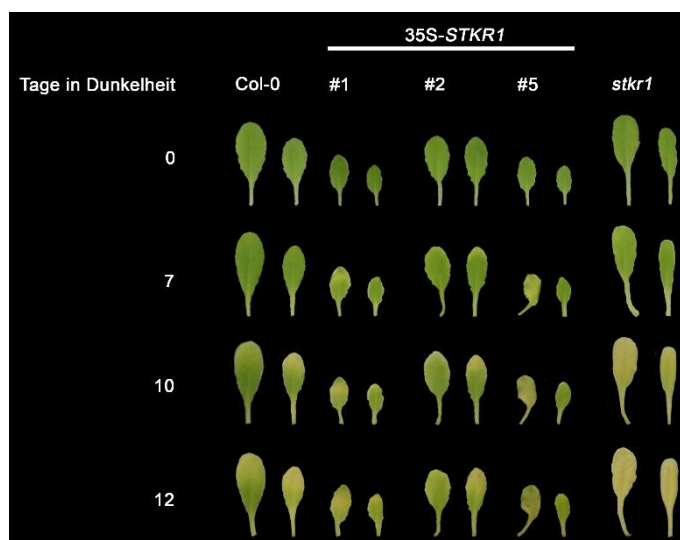


Abbildung 3.39: Dunkelheit-induzierte Blattseneszenz. 3 Wochen nach dem Pikieren wurden Blätter von Pflanzen der Linien 35S-*STKR1* #1, #2, #5, *stkr1* und des Wildtyps abgetrennt, auf angefeuchtetes Whatmanpapier gelegt und 12 Tage dunkelgestellt. Zu den Zeitpunkten 0, 7, 10 und 12 Tage Dunkelheit wurden die Blätter fotografiert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen bei $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Es konnte beobachtet werden, dass sich Blätter von *stkr1*-Mutanten deutlich schneller gelb färbten (vgl. Tag 10) als etwa Blätter von Col-0 bzw. 35S-*STKR1*. Was auf eine verfrühte Seneszenz schließen lässt. Die Blätter der 35S-*STKR1*-Linien zeigten hingegen keine sichtbaren Unterschiede zum Wildtyp, obwohl die Blätter der 35S-*STKR1*-Linien nach

Ergebnisse

bisheriger Datenlage weniger Chlorophyll enthalten als der Wildtyp (Abbildung 3.39). Dies lässt einen verlangsamten Chlorophyllabbau in diesen Linien vermuten.

Die Expression von *SAG12* (*SENESCENCE ASSOCIATED GENE 12*) ist während der Seneszenz von *A. thaliana* induziert und wird daher als Markergen zur Untersuchung von Seneszenzprozessen genutzt (Lohman et al., 1994). Zur Überprüfung des Einflusses der *STKR1*-Expression auf die alterungsbedingte Seneszenz der Pflanzen wurde die Expression von *SAG12* in 7 Wochen alten Pflanzen mittels qRT-PCR quantifiziert. Zwei der drei 35S-*STKR1* (#2 und #5) -Linien zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant verminderte *SAG12*-Expression, wobei diese Tendenz auch deutlich in der Linie 35S-*STKR1* #1 festgestellt werden konnte (Abbildung 3.40). Im Gegensatz zu der *SAG12*-Repression in den überexprimierenden Linien konnte in der *stkr1*-Mutante kein Unterschied in der Expression zum Wildtyp nachgewiesen werden.

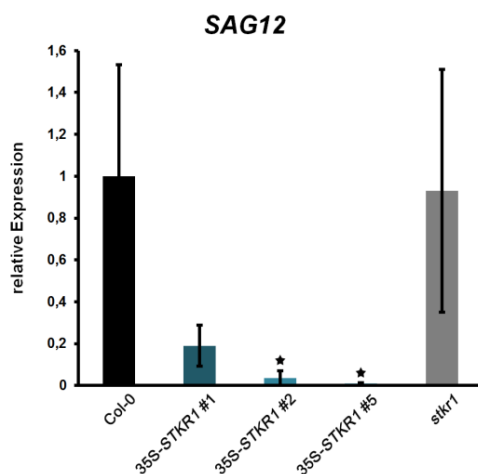


Abbildung 3.40: Quantifizierung der *SAG12*-Transkriptmenge in Pflanzen nach 7-wöchiger Anzucht auf Erde. Die Expression von *SAG12* wurde mittels qRT-PCR analysiert. Hierzu wurde 7 Wochen nach dem Pikieren aus Blättern der Linien 35S-*STKR1* #1, #2, #5, *stkr1* sowie des Wildtyps Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Zur Normalisierung wurde die Expression von *UBC9* verwendet. Als Kalibrator diente die *SAG12*-Expression des Wildtyps Col-0, die auf 1 gesetzt wurde. Mittels „student's t-test“ wurden signifikante Unterschiede kalkuliert. Diese sind durch * ($p \leq 0,05$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler ($n = 6$) an. Die Pflanzen wurden auf Erde unter Kurztagbedingungen bei $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ angezogen.

3.4.3.4 35S-*STKR1*-Pflanzen enthalten weniger Saccharose und Stärke am Ende der Dunkelphase

Um zu untersuchen, ob die beobachteten phänotypischen Veränderungen der 35S-*STKR1*-Pflanzen mit Änderungen in Metabolitgehalten einhergehen, wurde zunächst der Gehalt von löslichen Zuckern und Stärke in den transgenen Linien analysiert. Aufgrund des verminderten Wachstums der 35S-*STKR1*-Pflanzen wurde vermutet, dass diese eventuell Defekte im Kohlenstoffmetabolismus aufweisen. So kann zum Beispiel eine Störung der nächtlichen Kohlenhydratversorgung zu massiven Hungerphasen führen und unter anderem wesentliche Effekte auf das Wachstum von Pflanzen ausüben. Dazu wurden 4,5 Wochen nach dem Pikieren Pflanzen der Linien Col-0, *stkr1*, 35S-*STKR1* #1, #2 sowie #5, die unter Kurztagbedingungen bei einer Lichtintensität von 100 bzw. $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ angezogen

Ergebnisse

wurden, zum Ende der Licht- sowie der Dunkelperiode beprobt und deren Gehalte an löslichen Zuckern sowie Stärke quantifiziert (Abbildung 3.41).

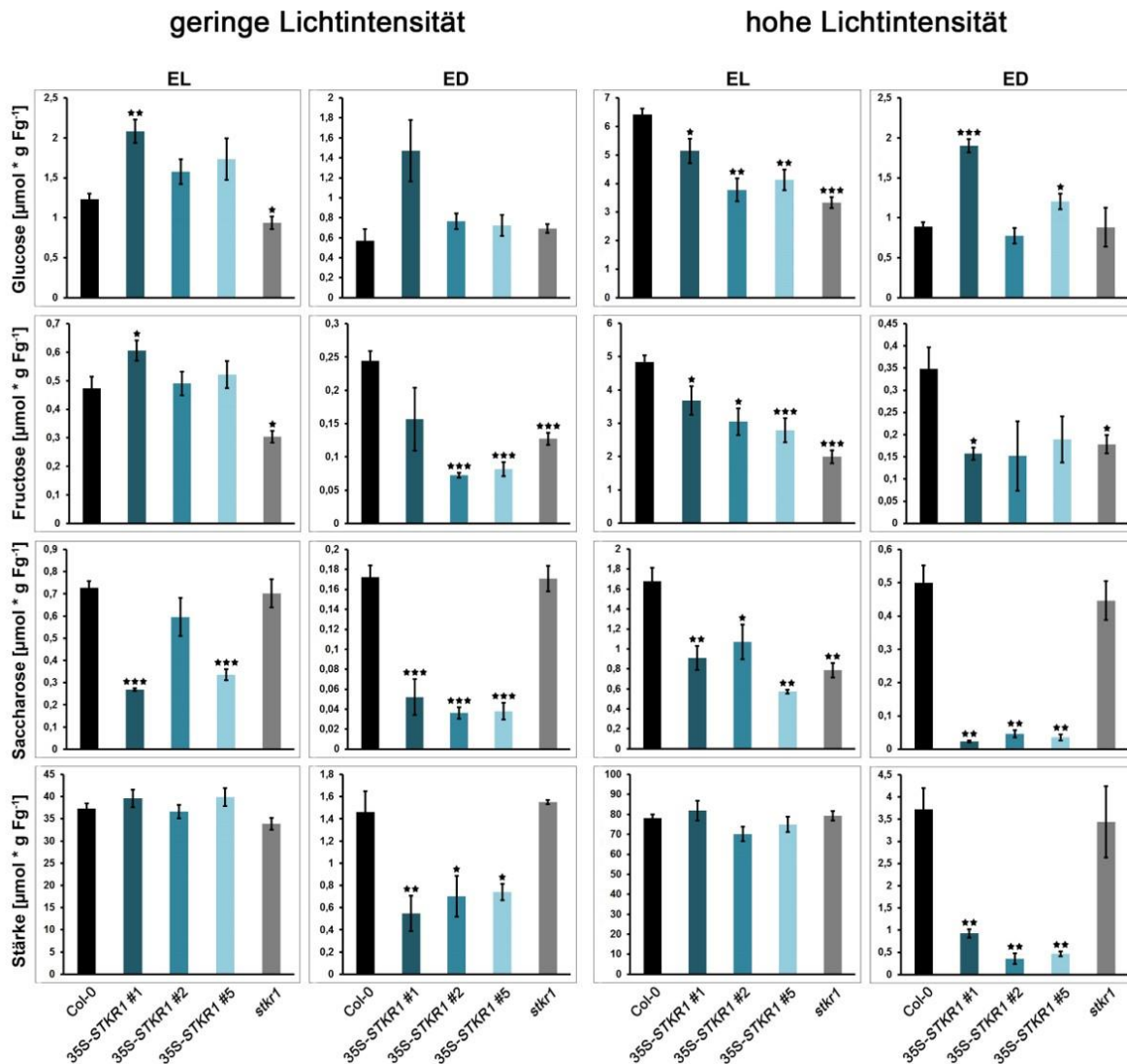


Abbildung 3.41: Kohlenhydratgehalte von Arabidopsis-Pflanzen mit veränderter *STKR1*-Expression. Die Gehalte an Hexosen, Saccharose und Stärke der Linien 35S-*STKR1* #1 #2, #5, *stkr1* sowie Col-0 wurden nach 4,5-wöchiger Anzucht auf Erde in einem 8 h Licht / 16 h Dunkel Zyklus (KT) am Ende der Dunkel- (ED) und am Ende der Lichtperiode (EL) bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus 5 biologischen Replikaten \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede zu Col-0 sind durch Sterne markiert * ($p \leq 0,05$); ** ($p \leq 0,01$); *** ($p \leq 0,01$); *student's t-test*). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde unter bei $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (geringe Lichtintensität) bzw. $300 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (hohe Lichtintensität) unter Kurztagbedingungen.

Der Gehalt an Glucose und Fructose der 35S-*STKR1*-Linien zeigten eine unterschiedliche Tendenz am Ende der Lichtphase in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Während 35S-*STKR1*-Linien und die *stkr1*-Mutante unter hoher Lichtintensität am Ende der Lichtphase reduzierte Gehalt dieser löslichen Zucker im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, war der Gehalt dieser Zucker in den 35S-*STKR1*-Pflanzen unter Anzuchtbedingungen bei $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ähnlich dem des Wildtyps, wobei er tendenziell höher war und in der Linie #1 sogar signifikant erhöht. Die *stkr1*-Mutante wies hier verminderte Gehalte an Glucose und Fructose auf. Am Ende der Dunkelperiode war bei der Anzucht unter $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ im

Ergebnisse

Glucosegehalt kein Unterschied der 35S-*STKR1*-Linien sowie der *stkr1*-Mutante mit dem Wildtyp festzustellen. Die Gehalte an Fructose waren hierbei mit Ausnahme der Linie 35S-*STKR1* #1 reduziert. Auch die Anzucht bei 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zeigte am Ende der Dunkelperiode tendenziell eine Verminderung des Fructosegehalts, wobei dieser nur für eine der drei 35S-*STKR1*-Linien sowie für *stkr1* signifikant war. Der Glucosegehalt war zu diesem Zeitpunkt in zwei der drei *STKR1*-überexprimierenden Linien erhöht. In der *stkr1*-Mutante entsprach er dem Wildtyp-Niveau.

Der Saccharosegehalt *STKR1*-überexprimierender Pflanzen war bis auf eine Ausnahme (35S-*STKR1* #2, EL, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sowohl am Ende der Licht- als auch der Dunkelperiode signifikant reduziert verglichen mit dem Wildtyp-Niveau, unabhängig von der Lichtintensität. In der *stkr1*-Mutante war unter hoher Bestrahlung am Ende der Lichtphase ebenfalls der Gehalt an Saccharose signifikant zum Wildtyp reduziert.

Die Messung der Stärke zeigte, dass Pflanzen die unter hoher Lichtintensität mehr Stärke einlagerten als solche die unter einer geringen Bestrahlung angezogen wurden. Am Ende der Lichtphase lagen in beiden Anzuchten keine Unterschiede im Stärkegehalt zwischen Linien vor. Dies verdeutlicht, dass das *STKR1*-Expressionslevel keinen Einfluss auf die Stärkebiosynthese hat. Am Ende der Dunkelphase hingegen wiesen die 35S-*STKR1*-Linien in beiden Anzuchten gegenüber der Kontrolle stark verminderte Stärkemengen auf. Dies spricht zum einen gegen einen Defekt in der Stärkemobilisierung und lässt zum anderen auf einen schnelleren Verbrauch der Stärke in diesen Linien schließen. Der Stärkegehalt der *stkr1*-Mutante entsprach dagegen dem des Wildtyps. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *STKR1*-Überexpression einen stärkeren Effekt auf den Kohlenhydratmetabolismus in der Dunkel- als in der Lichtphase hat.

3.4.3.5 Expressionsanalyse ausgewählter SnRK1-Markergene in *STKR1*-überexprimierende Pflanzen und *stkr1*-Mutanten

Durch die Interaktion von *STKR1* mit *AKIN10* wurde vermutet, dass *STKR1* eine Komponente der SnRK1-Signaltransduktion darstellen könnte. Um zu überprüfen ob Pflanzen mit veränderter *STKR1*-Expression Unterschiede in der SnRK1-Signalweiterleitung im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, wurden qRT-PCR-Analysen auf SnRK1-Markergene (Baena-Gonzalez et al., 2007) durchgeführt. Hierfür wurden die durch SnRK1 induzierten Gene *TREHALOSE-PHOSPHAT-SYNTHASE 8 (TPS8)*, *TREHALOSE-PHOSPHAT-SYNTHASE 10 (TPS10)*, *AKIN β 1* und *GLUTAMIN-ABHÄNGIGE ASPARAGIN-SYNTHEASE 1 (ASN1)* sowie die *UDP-GLUCOSE-6-DEHYDROGENASE 2 (UGD2)*, welche durch *AKIN10* reprimiert wird, gewählt (Baena-Gonzalez et al., 2007). Die Analyse einer veränderten Genexpression mittels qRT-PCR wurde mit zu zwei Zeitpunkten geernteten Probenmaterial durchgeführt. Hierfür wurde einerseits Blattmaterial zum

Ergebnisse

Zeitpunkt sechs Stunden nach Beginn der Lichtperiode analysiert. Unter diesen Bedingungen wird SnRK1 im Wildtyp durch photosynthetisch gebildete Assimilate wie Glucose-1-Phosphat (G1P), Glucose-6-Phosphat (G6P) und Trehalose-6-Phosphat (T6P) inhibiert und ist daher vorrangig inaktiv (Nunes et al., 2013). Zudem wurden Proben einer verlängerten Dunkelphase von insgesamt 22 Stunden (16 h + 6 h, KT-Bedingungen) untersucht. Unter dieser durch Energiemangel gekennzeichneten Bedingung liegt die SnRK1 in ihrer aktiven Form vor (Baena-González und Sheen, 2008; Mair et al., 2015).

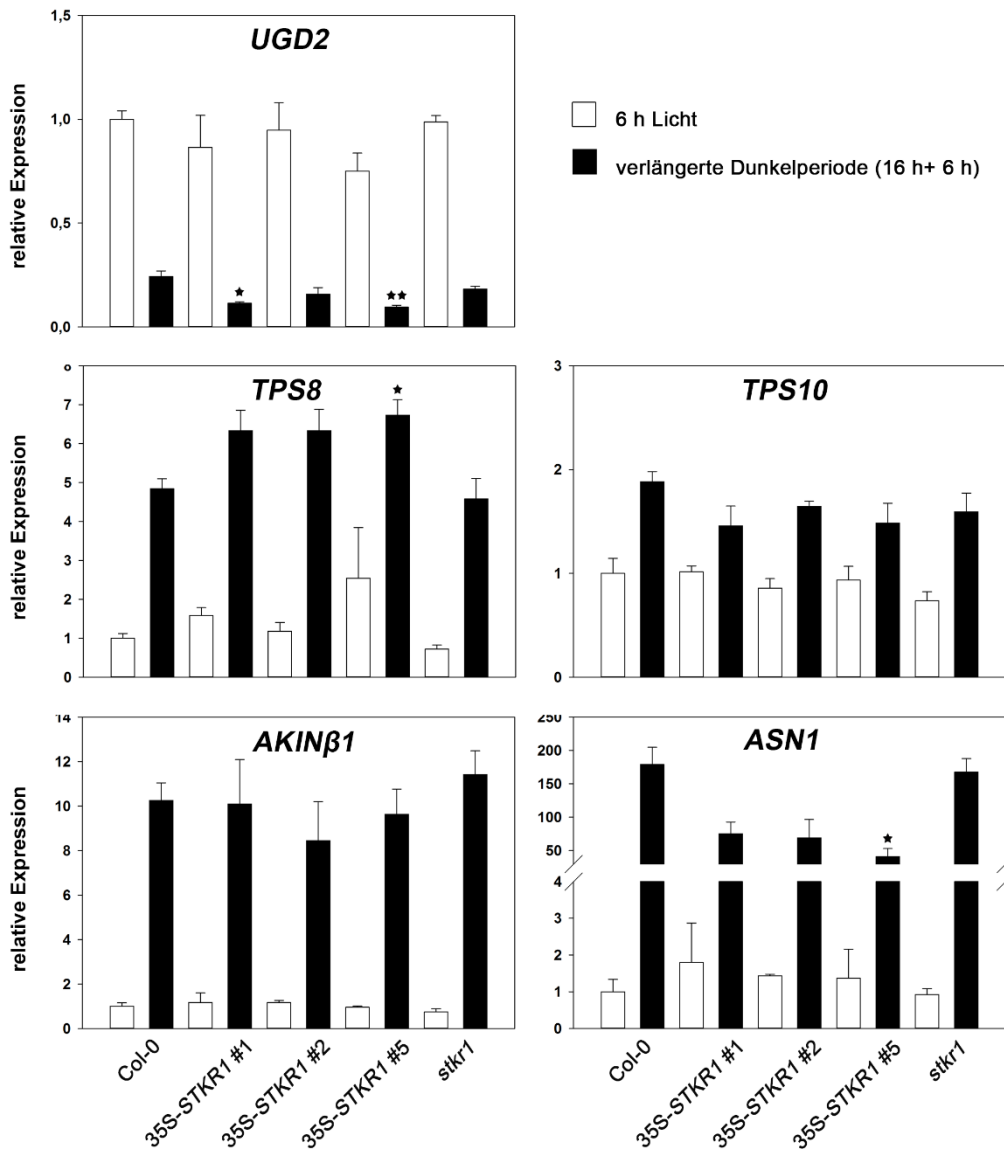


Abbildung 3.42: Analyse der Genexpression von SnRK1-Markergenen in *A. thaliana* Col-0, 35S-STKR1-Linien und *stkr1*. Die Expression der SnRK1-Markergene *UDP-Glucose-6-Dehydrogenase 2 (UGD2)*, *Trehalose-Phosphat-Synthase (TPS8)*, *Trehalose-Phosphat-Synthase (TPS10)*, *AKINβ1* und *Glutamin-abhängige Asparagin-Synthetase (ASN1)* wurde durch qRT-PCR analysiert. Dazu wurde 4,5 Wochen nach dem Pikieren Gesamt-RNA aus Blättern von Pflanzen isoliert. Die Proben wurden 6 Stunden nach Beginn der Lichtphase (weiße Balken) beziehungsweise nach 6 Stunden verlängerter Dunkelphase (16+6 h; schwarze Balken) genommen. Die Normalisierung erfolgte gegen die Expression von *UBC9*. Der Wildtyp Col-0, dessen Wert der Lichtprobe auf 1 gesetzt wurde, diente als Kalibrator, Signifikante Unterschiede zu Col-0 zum jeweiligen Zeitpunkt wurden mittels „*student's t-test*“ kalkuliert und sind durch * ($p \leq 0,05$) und ** ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler ($n = 3$) an. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen bei $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ergebnisse

Die Auswertung ergab, dass die verlängerte Dunkelperiode ein deutliches SnRK1-Aktivitätssignal hervorrief. So waren *TPS8*, *TPS10*, *AKINβ1* und *ASN1* nach verlängerter Dunkelperiode im Vergleich zur Lichtphase im Wildtyp induziert, während *UGD2* reprimiert war (Abbildung 3.42). Die belichteten Proben der Linien 35S-*STKR1* sowie der *stkr1*-Mutante zeigten für keines der getesteten Markergene Differenzen im Expressionsniveau verglichen mit dem Wildtyp. Dies traf für *TPS10* und *AKINβ1* auch bei verlängerter Dunkelperiode zu. *UGD2* war in den Dunkelproben in zwei der drei *STKR1* überexprimierenden Linien signifikant herunterreguliert, was einem verstärkten SnRK1-Aktivitätssignal entsprach. Für *TPS8* wurde eine tendenziell stärkere Expression in Proben der 35S-*STKR1*-Linien ermittelt, wobei diese allerdings nur in einer Linie signifikant war. *ASN1*, deren Expression durch SnRK1 induziert wird, war in 35S-*STKR1*-Pflanzen verglichen mit dem Wildtyp reprimiert, wobei diese auch für diesen Marker nur in einer der Linien signifikant war.

Die Expression der getesteten SnRK1-Markergene in der *stkr1*-Mutante entsprach jeweils dem Wildtyp-Niveau (Abbildung 3.42). Eine zum Wildtyp eindeutige differentielle Regulierung der hier untersuchten Markergene in Abhängigkeit der *STKR1*-Expression konnte jedoch nicht ermittelt werden.

3.4.3.6 Transkriptomanalyse von *STKR1*-überexprimierenden Arabidopsis-Linien

Im Hinblick auf den ausgeprägten Phänotyp der 35S-*STKR1*-Linien, wurde der Fokus auf die Analyse fundamentaler Unterschiede in der Genexpression dieser Linien gelegt. Hierfür wurde eine Microarray-Analyse mit den Linien Col-0 sowie 35S-*STKR1* #1, #2 und #5 durchgeführt, wobei auch hier ein Probenaset in der Lichtphase (6 Stunden Licht) und eines nach verlängerter Dunkelperiode (22 Stunden Dunkelheit) betrachtet wurden. Die Identifikation differentiell regulierter Gene (≥ 2.0 -fache Änderung und $p \leq 0.05$) zwischen den Genotypen beider Probenzeitpunkte erfolgte durch eine Filterung des Datensatzes mittels ungepaarten T-Tests und Benjamini Hochberg-Korrektur. Die Datenanalyse des Probensets der Lichtperiode ergab 116 Gene, die in allen drei 35S-*STKR1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert vorlagen, wobei 30 Transkripte hoch- und 86 herunterreguliert waren (Tabelle 6.2). Eine deutlich höhere Anzahl von Transkripten war im Datensatz des Probenmaterials der verlängerten Dunkelphase im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert. Insgesamt ergab sich für 907 Gene eine Deregulierung, wobei 644 Transkripte hochreguliert waren (Tabelle 6.3). Eine verminderte Expression als der Wildtyp konnte für 263 Gene erfasst werden. Der Befund, dass im Probenaset der verlängerten Dunkelphase deutlich mehr Transkripte als im Probenaset der Lichtperiode differentiell reguliert vorlagen, deutet daraufhin hin, dass die Überexpression von *STKR1* einen Einfluss auf die Genregulation in der verlängerten Dunkelphase hat und somit zu einem Zeitpunkt, wo auch die transkriptionelle Regulation durch SnRK1 eine Rolle spielt.

Ergebnisse

Eine GO-Anreicherungsanalyse (Gene Ontology Consortium „PANTHER GO-slim“, (Ashburner et al., 2000)) induzierter Transkripte des Dunkelprobensets zeigte, dass Gene Stress-assoziiierter Prozesse wie der systemisch erworbenen Abwehr oder der Hypoxie-Stressantwort in den 35S-STKR1-Linien überrepräsentiert waren (Tabelle 6.1). Im Gegensatz dazu konnte weder bei Einspeisung der reprimierten Transkripte des Probenatzes der verlängerten Dunkelphase noch für deregulierte Transkripte der Lichtphase eine signifikante Anreicherung innerhalb bestimmter biologischer Prozesse ermittelt werden. Auch die mittels MapMan (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>) durchgeführte Analyse des Dunkelprobensets zeigte, dass die am stärksten deregulierte Kategorie in den 35S-STKR1-Linien Abwehr-assoziiierter Transkripte darstellten (Abbildung 3.43). So konnten 286 (32%) von 907 Transkripten zu Abwehr-involvierten Prozessen zugeordnet werden, wobei von diesen 286 Transkripten 218 (76%) hochreguliert waren.

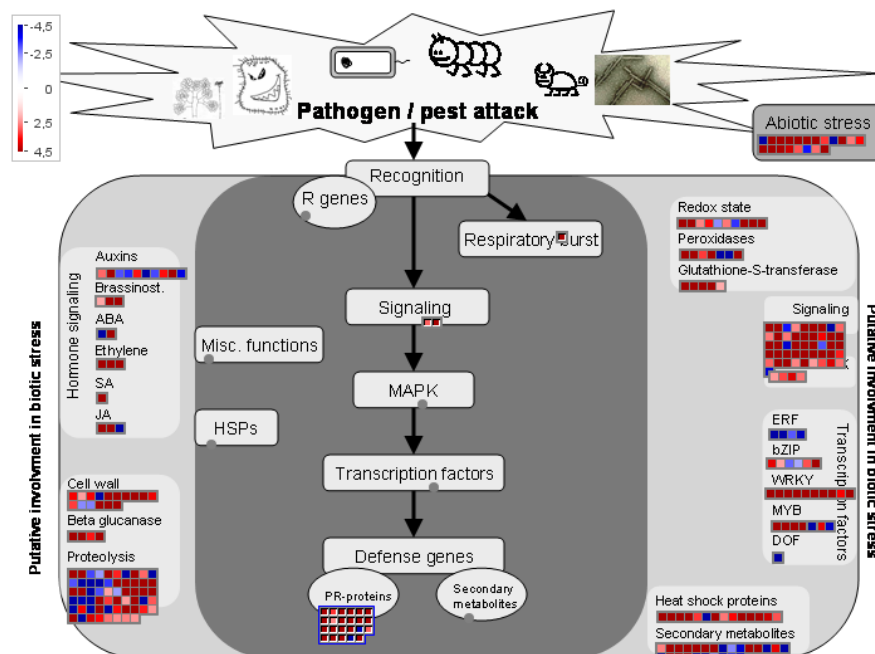


Abbildung 3.43: Zuordnung deregulierter, biotischer Stress-assoziiierter Transkripte der 35S-STKR1-Linien verglichen mit Col-0 während der verlängerten Dunkelphase. Die Zuordnung erfolgte nach Einspeisung des Datensatzes der verlängerten Dunkelphase unter Verwendung der MAPMAN bins (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>). Hierfür wurden signifikant regulierte Transkripte spezifischen funktionellen Gruppen innerhalb der biotischen Stressantwort zugeordnet.

Das am stärksten deregulierte Transkript nach verlängerter Dunkelphase war mit einer 7560-fachen transkriptionellen Induktion *PR1* (*PATHOGENESIS RELATED GENE1*) (Tabelle 3.5), ein in der systemisch erworbenen Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*) involviertes Gen. Die SAR ist ein Mechanismus der pflanzlichen Abwehr auf erfolgten Pathogenbefall und vermittelt eine aktivierte Abwehr in systemischen, nicht-infizierten Geweben auf potentiellen Befall, wobei Salicylsäure und Jasmonat als wichtige Signalmoleküle agieren (Fu und Dong, 2013). Neben *PR1* war in den Linien 35S-STKR1

Ergebnisse

auch die Expression weiterer SAR Gene wie *FMO1* (*FLAVIN CONTAINING MONOOXYGENASE 1*) und *ALD1* (*AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1*) stark induziert (Návarová et al., 2012) (Tabelle 3.5).

Gename	AGI Code	Regulation
<i>PR1</i>	AT2G14610	7566,67
<i>FMO1</i>	AT1G19250	379,33
<i>CYP71A13</i>	AT2G30770	170,63
<i>ALD1</i>	AT2G13810	133,27
<i>WRKY51</i>	AT5G64810	121,43
<i>PR2/BGL2</i>	AT3G57260	113,33
<i>ABCG40</i>	AT1G15520	107,23
<i>PBS3</i>	AT5G13320	86,63
<i>JRG21</i>	AT3G55970	56,37
<i>UGT73D1</i>	AT3G53150	50,47
<i>LHT7</i>	AT4G35180	40,73
<i>SARD1</i>	AT1G73805	38,63
<i>WRKY46</i>	AT2G46400	38,53
<i>NIMIN1</i>	AT1G02450	37,47
<i>SAG13</i>	AT2G29350	19,47
<i>ANAC042</i>	AT2G43000	17,20
<i>NUDT6</i>	AT2G04450	13,93
<i>PAD4</i>	AT3G52430	11,36
<i>JAZ5</i>	AT1G17380	10,49
<i>GRX480</i>	AT1G28480	10,20
<i>WRKY8</i>	AT5G46350	9,24
<i>WRKY70</i>	AT3G56400	8,37
<i>CBP60G</i>	AT5G26920	5,22
<i>MPK11</i>	AT1G01560	3,99
<i>WRKY33</i>	AT2G38470	3,67
<i>SYP122</i>	AT3G52400	3,27
<i>AIG2</i>	AT3G28930	2,86
<i>MKK2</i>	AT4G29810	2,69
<i>NPR3</i>	AT5G45110	2,49

Tabelle 3.5: Auswahl induzierter SAR-assoziierter Transkripte in 35S-STKR1-Linien verglichen mit Col-0 während der verlängerten Dunkelphase. Die Transkriptdaten der Microarray-Analyse wurden von Pflanzen der Linien 35S-STKR1 #1, #2, #5 und des Wildtyps Col-0 nach einer verlängerten Dunkelphase generiert. Die dargestellten Daten repräsentieren eine lineare Darstellung der x-fachen Veränderung aus einer vergleichenden Transkript-Analyse von 35-STKR1-Linien und Col-0 Kontrollpflanzen und repräsentieren den Mittelwert der drei 35S-STKR1-Linien mit je drei biologischen Replikaten. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für 5 Wochen nach dem Pikieren unter Kurztagbedingungen bei 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ebenfalls lagen verstärkt Mitglieder der Genfamilien der NAC- und WRKY-Transkriptionsfaktoren differentiell reguliert vor. NAC-Transkriptionsfaktoren sind in pflanzliche Entwicklungsprozesse, unter anderem während der Blattseneszenz, und abiotische Stressantworten involviert (Nakashima et al., 2012; Puranik et al., 2012). WRKY-Transkriptionsfaktoren sind beispielsweise in Keimungsprozesse und die Reaktion auf (a)biotischen Stress beteiligt (Ülker und Somssich, 2004; Banerjee und Roychoudhury,

Ergebnisse

2015). Der am stärksten regulierte Kandidat der WRKY-Familie war mit einer 124-fachen Induktion *WRKY51* (Tabelle 3.6), welcher für die SA-abhängige Repression der JA-Signalweiterleitung während der Abwehrantwort eine wichtige Rolle spielt (Gao et al., 2010). Eine Deregulierung charakteristischer SnRK1-Markergene wie *TPS5*, *TPS8*, *TPS10*, *ASN1*, *bZIP11* oder *UDGD2* (Baena-Gonzalez et al., 2007) in den 35S-*STKR1*-Linien konnte in keinem der beiden Probenzeitpunkten detektiert werden (Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3).

Genname	AGI Code	Regulation
<i>ANAC087</i>	AT5G18270	74,16
<i>NAC042</i>	AT2G43000	17,5
<i>NAC004</i>	AT1G02230	16,5
<i>NAC016</i>	AT1G34180	8,85
<i>NAC103</i>	AT5G64060	6,72
<i>NAC1</i>	AT1G56010	3,66
<i>NAC062</i>	AT3G49530	2,43
<i>WRKY51</i>	AT5G64810	124,5
<i>WRKY50</i>	AT5G26170	94,73
<i>WRKY61</i>	AT1G18860	52,9
<i>WRKY46</i>	AT2G46400	39,53
<i>WRKY54</i>	AT2G40750	34,93
<i>WRKY41</i>	AT4G11070	28,43
<i>WRKY45</i>	AT3G01970	12,62
<i>WRKY8</i>	AT5G46350	9,45
<i>WRKY70</i>	AT3G56400	8,44
<i>WRKY33</i>	AT2G38470	3,69

Tabelle 3.6: Heraufregulierte ANAC- und WRKY-Transkriptionsfaktoren in 35S-*STKR1*-Linien verglichen mit Col-0 während der verlängerten Dunkelphase. Die Transkriptdaten der Microarray-Analyse wurden von Pflanzen der Linien 35S-*STKR1* #1, #2, #5 und des Wildtyps Col-0 nach einer verlängerten Dunkelphase generiert. Die dargestellten Daten repräsentieren eine lineare Darstellung der x-fachen Veränderung aus einer vergleichenden Transkript-Analyse von 35-*STKR1*-Linien und Col-0 Kontrollpflanzen und repräsentieren den Mittelwert der drei 35S-*STKR1*-Linien mit je drei biologischer Replikate. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für 5 Wochen nach dem Pikieren unter Kurztagbedingungen bei 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Die differentielle Regulierung von SAR-Genen (*ALD1*, *FMO1*, *PR1*) in den 35S-*STKR1*-Linien wurde in einem weiteren Probenset über qRT-PCR verifiziert, wobei auch die Expression in der *stkr1*-Mutante quantifiziert wurde (Abbildung 3.44). Die Expression von *ALD1*, *FMO1* sowie *PR1* war in allen drei *STKR1*-überexprimierenden Linien stark erhöht, wohingegen sich die Expressionslevel in der *stkr1*-Mutante nicht von Col-0 unterschieden. Wie auch in der Microarray-Analyse erwies sich *PR1* als am stärksten induziert (756 - 1284-fache Induktion), auch die Expression von *FMO1* war signifikant hochreguliert (183 – 217-fache Induktion). Für *ALD1* konnte eine 15 – 24-fach erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (Abbildung 3.44). Durch die qRT-PCR-Analyse konnten die differentielle Regulierung von SAR-Genen in *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen bestätigt werden.

Ergebnisse

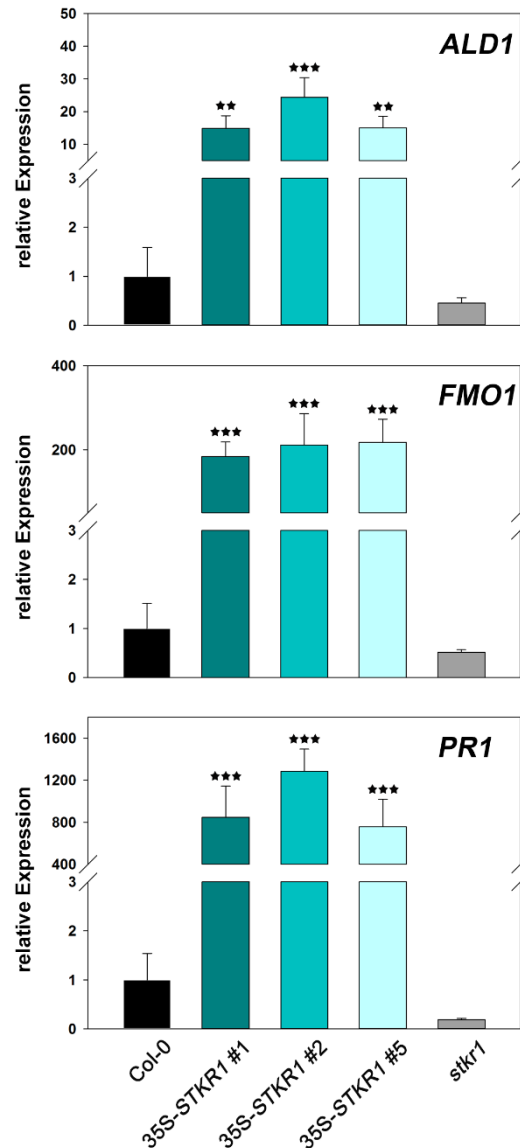


Abbildung 3.44: Eine gesteigerte Expression von *STKR1* induziert die Expression von *SAR*-assoziierten Genen. Die Expression von *ALD1*, *FMO1* und *PR1* wurde mittels qRT-PCR analysiert. Gesamt-RNA aus Blättern von Pflanzen der Linien 35S-*STKR1* #1, #2, #5, *stkr1* und des Wildtyps Col-0 wurde nach 6 Stunden verlängerter Dunkelphase (16+6 h) isoliert und in cDNA transkribiert. Zur Normalisierung wurde die Expression von *UBC9* verwendet. Der Wildtyp Col-0, dessen Wert auf 1 gesetzt wurde, diente als Kalibrator. Signifikante Unterschiede wurden mittels „*student's t-test*“ kalkuliert und sind durch ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler ($n = 6$) an. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte nach dem Pikieren für 5 Wochen unter Kurztagbedingungen bei $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Nachdem bereits die Induktion von *SAR*-assoziierten Genen mittels qRT-PCR bestätigt werden konnte, sollte auch die Heraufregulierung der ANAC-Transkriptionsfaktoren verifiziert werden. Hierfür wurden zwei der im Microarray identifizierte ANAC-Transkriptionsfaktoren, *ANAC016* und *ANAC087*, mittels qRT-PCR in einem weiteren Probenet analysiert (Abbildung 3.45). Auch für diese Gruppe konnten die Daten des Microarrays bestätigt werden. In allen drei 35S-*STKR1*-Linien wurde eine signifikant erhöhte Expression der

Ergebnisse

beiden Transkriptionsfaktoren detektiert. Für *ANAC016* lag eine 3,5- bis 4-fach höhere Expression im Vergleich zum Wildtyp vor. Im Falle von *ANAC87* konnte eine 11- bis 32-fach gesteigerte Expression gemessen werden. Die *stkr1*-T-DNA-Insertionsmutante zeigte hingegen keine zum Wildtyp veränderte Expression der beiden *ANAC*-Transkriptionsfaktoren.

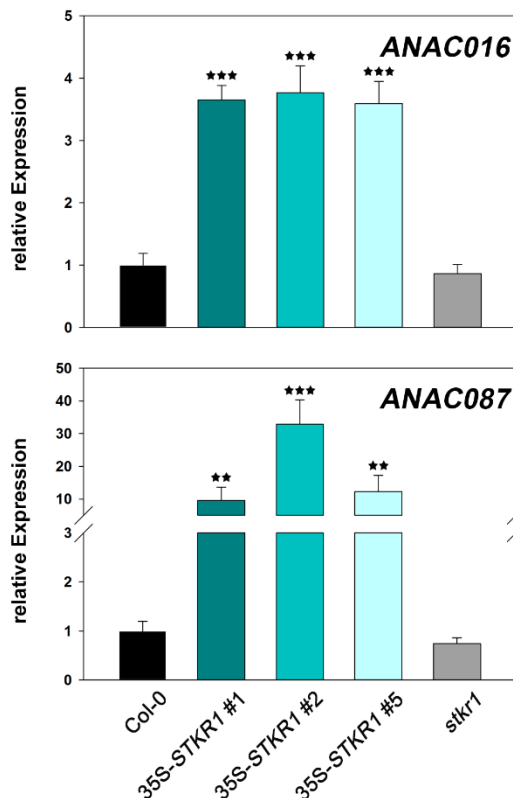


Abbildung 3.45: Die erhöhte Expression von *STKR1* führt zur Hochregulierung von *ANAC016* und *ANAC087*. Die Expression von *ANAC016* und *ANAC087* wurde durch qRT-PCR analysiert. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Blättern von Pflanzen der Linien 35S-*STKR1* #1, #2, #5, *stkr1* und des Wildtyps Col-0 nach 6 Stunden verlängerter Dunkelperiode (16+6 h) isoliert. Die Expression von *UBC9* wurde zur Normalisierung verwendet. Als Kalibrator diente der Wildtyp Col-0, dessen Wert auf 1 gesetzt wurde. Die signifikanten Unterschiede wurden mittels „student's *t*-test“ kalkuliert und sind durch ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler ($n = 6$) an. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte nach dem Pikieren für 5 Wochen unter Kurztagbedingungen bei $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Die Resultate der durchgeführten qRT-PCR Analysen bestätigten die Ergebnisse des Microarrays und somit eine signifikante Induktion von SAR-assoziierten Genen sowie *ANAC*-Transkriptionsfaktoren. Die differentielle Regulierung dieser Gengruppen könnte unter anderem den verminderten Wachstumsphänotyp der 35S-*STKR1*-Linien erklären. So könnten in diesen Linien Assimilate, die normalerweise für das Wachstum der Pflanzen genutzt werden, verstärkt in energiereiche Abwehrprozesse umgeleitet werden (Bolton, 2009; Chandran et al., 2014).

4 Diskussion

Die Proteinkinase SnRK1 spielt eine zentrale Rolle bei der Koordination von metabolischen und hormonellen Signalen mit Wachstums- und Entwicklungsprozessen in Pflanzen (Baena-González und Sheen, 2008; Tsai und Gazzarrini, 2014). Die Aktivierung von SnRK1, durch z.B. Energiemangelbedingungen in der Zelle, führt zu einer massiven transkriptionellen Umprogrammierung, welche in *Arabidopsis thaliana* die Expression von mehr als 1000 Genen beeinflusst (Baena-Gonzalez et al., 2007). Grundsätzlich kommt es dabei zu einer Unterdrückung energieverbrauchender Prozesse sowie der Induktion alternativer energiegenerierender Stoffwechselwege (Baena-Gonzalez et al., 2007; Baena-González und Sheen, 2008; Zhang et al., 2009). Es wird vermutet, dass eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren in die Weiterleitung des SnRK1-Aktivitätssignals involviert ist. Allerdings konnte bisher nur für wenige Transkriptionsfaktoren eine Interaktion mit sowie die Phosphorylierung durch SnRK1 nachgewiesen werden (Tsai und Gazzarrini, 2012; Jeong et al., 2015; Mair et al., 2015).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung von Interaktionspartnern des SnRK1-Kinasekomplexes, einem zentralen Regulator der Energie- und Stress-Signalweiterleitung in Pflanzen, sowie der Charakterisierung ausgewählter Interaktoren. In dem in dieser Arbeit etabliertem Protein-Protein-Netzwerk konnten weitere Transkriptionsfaktoren als SnRK1-Interaktionspartner identifiziert werden, wobei keiner der bereits beschriebenen SnRK1-interagierenden Transkriptionsfaktoren gefunden wurde.

4.1 Identifizierung neuer SnRK1-interagierender Proteine als mögliche Komponenten der SnRK1-Signaltransduktion

Um Protein-Protein-Wechselwirkungen aufzudecken, ist das Hefe-Zwei-Hybrid-System eine geeignete Methode. Daher wurde dieses Werkzeug zur Auffindung neuer SnRK1-Interaktionspartner angewandt. Durch die Interaktionsstudien in Hefe konnte der bZIP-Transkriptionsfaktor VIP1 als AKIN10- und AKIN11-interagierendes Protein identifiziert werden. VIP1 ist an der *Agrobacterium tumefaciens*-Infektion von *Arabidopsis* beteiligt (Tzfira et al., 2001; Li et al., 2005) und reguliert die Expression von *Agrobacterium*-Infektions-assoziierten Genen (Djamei et al., 2007; Pitzschke et al., 2009). VIP1 kann durch die MAP-Kinase MPK3 an einem Serin an Position 79 (S79) phosphoryliert werden, wodurch der Import von VIP1 in den Zellkern begünstigt und die Expression von *PR1* induziert wird (Djamei et al., 2007). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass ein gesteigerter Turgordruck als Folge von Rehydrierung ebenfalls in einer Akkumulation von VIP1 im Nucleus resultiert, wobei vermutet wird, dass diese MPK3 unabhängig ist (Tsugama et al., 2012). Unter diesen Bedingungen bindet VIP1 an die Promotoren von *CYP707A1* und

Diskussion

CYP707A3, welche für ABA-inaktivierende Enzyme kodieren, und aktiviert deren Transkription. Die Autoren vermuteten, dass VIP1 eine regulatorische Funktion in dem osmosensorischen Signalweg hat und dass unter diesen Bedingungen VIP1 durch eine andere Kinase als MPK3 phosphoryliert und somit in den Zellkern transloziert wird (Tsunami et al., 2012, 2014). Durch die hier gezeigte direkte Interaktion von VIP1 mit AKIN10 könnte unter sich ändernden Turgordruck SnRK1 die Phosphorylierung von VIP1 vermitteln.

Ein AIG2-ähnliches Protein wurde ebenfalls als SnRK1-Interaktionspartner gefunden. *AIG2* wird während der frühen Antwort bei Infektion des bakteriellen Pathogens *Pseudomonas syringae* induziert, die Funktion von *AIG2* sowie AIG2-ähnlichen Protein ist bisher nicht bekannt (Reuber und Ausubel, 1996). Allerdings kann eine Beteiligung von AIG2-ähnlichen Proteinen in Zuckersignalwegen vermutet werden. So konnte durch Cluster-Analysen von Microarraydaten eine positive Korrelation von Genen der biotischen Stressantwort, inklusive eines AIG2-ähnlichen Proteins, mit T6P-Gehalten in Arabidopsis-Keimlingen gezeigt werden (Schlupmann et al., 2004).

Die CYCLIN-ABHÄNGIGE KINASE F;1 konnte in dieser Arbeit als Interaktionspartner beider Arabidopsis SnRK1 α -Untereinheiten identifiziert werden. Die pflanzenspezifische CDK-aktivierende Kinase CDKF;1 phosphoryliert mehrere CDKs innerhalb ihres *T-Loops*. CDKs sind Hauptkomponenten des eukaryotischen Zellzyklus und CDKF;1-Verlustmutanten weisen daher schwere Defekte der Zellteilung und –elongation auf (Takatsuka et al., 2009). Interessanterweise konnte für die SNF1, dem SnRK1-Homolog der Hefe, eine Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus gezeigt werden (Thompson-Jaeger et al., 1991; Aon und Cortassa, 1999). Außerdem bedingte die Überexpression der *SnRK1* aus Reis in *snf1*-Hefemutanten eine starke Reduktion der Zellgröße während des Wachstums auf Minimalmedium, der wahrscheinlich auf eine Arretierung des Zellzyklus unter Nährstoffmangelbedingungen zurückzuführen ist (Dickinson et al., 1999). Die Interaktion von SnRK1 mit CDKF;1 lässt eine weitere Ebene der Verbindung des Energiesignalweges mit der Kontrolle des Zellzyklus vermuten. Bereits in einer früheren Studie konnte eine Involvierung der SnRK1 in die Zellproliferation durch die SnRK1-vermittelte Phosphorylierung der p27^{KIP1}-Homologe aus Arabidopsis KRP6/KRP7, zwei Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren, gezeigt werden (Guerinier et al., 2013).

In Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen konnte für zwei SKIN-ähnliche Proteine aus Arabidopsis die Interaktion mit AKIN10 und AKIN11 nachgewiesen werden. Im Jahr 2014 wurden die zwei negativen Regulatoren der SnRK1 in Reis (*Oryza sativa*) OsSKIN1 und OsSKIN2 identifiziert (Lin et al., 2014). Diese Proteine wirken antagonistisch zum SnRK1-Aktivitätssignal, wobei sie den Import von SnRK1A in den Zellkern unter SnRK1-aktivierenden Bedingungen, wie abiotischen Stress, verhindern. So bedingt die Anwesenheit von ABA eine Translokation von SKINs aus dem Nucleus ins Cytoplasma, wodurch nach

Diskussion

Bindung an SnRK1A deren Zellkernimport inhibiert wird (Lin et al., 2014). Auf diese Weise reprimieren SKINs unter Stress in „Sink“-Gewebe (Embryo, Keimling) SnRK1-abhängige Zuckermangelsignale, die zur Expression von Hydrolasen für die Nährstoffmobilisierung im „Source“-Gewebe (Endosperm) führen und somit an der „Source-Sink“-Kommunikation beteiligt sind (Lin et al., 2014). Ob die in dieser Arbeit gefundenen SnRK1-interagierenden SKIN-ähnlichen Proteine ebenfalls negative Regulatoren der SnRK1 wie ihre Orthologe aus Reis darstellen, muss durch weitere Experimente überprüft werden.

4.1.1 SnRK1-Untereinheiten interagieren mit DUF581-Proteinen

Die molekularen Ursachen der stimulus- und gewebespezifischen Unterschiede der SnRK1-Signalweiterleitung sind bisher nicht ausreichend erklärt. Die Zusammensetzung der Untereinheiten des SnRK1-Komplexes scheint eine Ebene zur Vermittlung der Spezifität darzustellen, da die SnRK1-Untereinheiten variable gewebs- und stimulispezifische Expressionsmuster aufweisen (Buitink et al., 2004; Fragoso et al., 2009; Williams et al., 2014). Andererseits könnte die stimuli-, gewebe- oder entwicklungsspezifische Expression von Genen, die für SnRK1-Zielproteine codieren, Auswirkungen auf das SnRK1-Signal haben. Neben den α -, β -, γ - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten könnten zusätzliche Proteine bei der SnRK1-Substratbindung involviert sein. Solche Hilfsproteine würden beispielsweise unter bestimmten Bedingungen SnRK1-Substrate binden, als Gerüst agieren und die Bindung von SnRK1 mit deren Zielproteinen stabilisieren. Eine Proteinfamilie, der solch eine Funktion in der SnRK1-Substratvermittlung zukommen könnte, wurde in dieser Arbeit identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass Proteine, die eine Domäne unbekannter Funktion 581 (DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION, DUF581) enthalten mit den Arabidopsis SnRK1 α -Untereinheiten AKIN10 und AKIN11 in Hefe und *in planta* wechselwirken. Im Test auf direkte Interaktion in Hefe konnte mit Ausnahme von *At*DUF581-3, -7 und -15 eine Interaktion von *At*DUF581-Proteinen mit den GAL4-Bindedomäne (BD) fusionierten SnRK1 α -Untereinheiten aus Arabidopsis nachgewiesen werden. Durch die Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung einer mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusionierten Arabidopsis-Infloreszenz cDNA-Bank mit BD-*At*DUF581-3 als Köderplasmid konnten für AKIN10-codierende Beuteplasmide isoliert werden, wodurch auch für diese Kombination eine Interaktion gezeigt wurde. Außerdem scheint für die SnRK1 α -DUF581-Protein-Wechselwirkung die Orientierung von BD-/AD-fusionierten Proteinen einen Einfluss auf die Interaktion in Hefe zu haben. Nur für *At*DUF581-7 und -15 konnte in keinem der Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen eine Interaktion mit AKIN10 oder AKIN11 detektiert werden. Im Falle von DUF581-7 könnte dies dem Verlust der in den restlichen DUF581-Proteinen konservierten Cysteinpaare geschuldet sein. Die nicht nachweisbare Interaktion von *At*DUF581-15 mit SnRK1 α -Untereinheiten ist vermutlich auf technische Limitierungen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems oder einer nicht-funktionalen

Diskussion

Expression in Hefe zurückzuführen. Die Expression könnte durch Klonierung von *AtDUF581-15* in einen Hefe-Expressionsvektor, welcher das DUF581-Protein mit einem durch Antikörper nachweisbarem *tag* fusioniert, in einem Western Blot überprüft werden. Allerdings würde selbst der Expressionsnachweis keinen Aufschluss über ein funktionales Protein darstellen. Eventuell resultiert im Fall von DUF581-15 die aminoterminal Fusion mit der GAL4-BD bzw. -AD in einer Störung der Interaktion mit AKIN10/AKIN11. Dies ließe sich durch eine carboxyterminale Fusion mit der GAL4-BD bzw. -AD und dem erneuten Test auf Interaktion mit SnRK1 α -Untereinheiten in Hefe überprüfen. Die DUF581-Domäne selbst ist sowohl nötig als auch ausreichend für die Wechselwirkung mit SnRK1 α -Untereinheiten. Während die DUF581-Domäne von DUF581-1 eine Interaktion mit AKIN10 zeigte, führte die Substitution eines Cysteins durch ein Serin an Position 47 der Aminosäuresequenz von DUF581-9 sowie die des Cysteins an Position 88 innerhalb des DUF581-18-Proteins zu einem Verlust der Wechselwirkung mit AKIN10. Dies lässt vermuten, dass diese innerhalb der DUF581-Domäne lokalisierten konservierten Cysteine essentiell für die Interaktion mit AKIN10 sind. Somit dient die DUF581-Domäne dieser Proteinfamilie als SnRK1-Adaptor. Für die vier konservierten Cysteine innerhalb der DUF581-Domäne wird vermutet, dass sie Zink binden können (He und Gan, 2004) und somit als pflanzenspezifische C4-Zinkfinger-Proteine/Domäne agieren. Die DUF581-Domäne weist Ähnlichkeiten zu Zinkfingern mit einem FCS-Motiv (ZF-FCS) auf, die sowohl in Protein-Nucleinsäure- als auch Protein-Protein-Interaktionen involviert sind (Jamsheer und Laxmi, 2014).

Da auch eine SnRK1 α -Untereinheit aus *Solanum tuberosum*, genannt *StubSNF1*, mit einem DUF581-Protein aus Kartoffel, welches Ähnlichkeiten zu *AtDUF581-6* aufweist, zur Interaktion in der Lage ist, scheint diese Interaktion von DUF581-Proteinen mit SnRK1 α -Untereinheiten spezieübergreifend zu sein. Die DUF581-Domäne ist evolutionär hochkonserviert und *DUF581*-Gene weisen eine starke evolutionäre Expansion auf. Während im Genom von Algen keine DUF581-codierenden Gene nachweisbar sind, existieren im Moos *Physcomitrella patens* 2 *DUF581*-Gene, was auf einen bryophytischen Ursprung dieser Gene schließen lässt (Jamsheer und Laxmi, 2014). In den Dikotyledonen *Ricinus communis*, *Vitis vinifera* und *Brassica rapa* codieren 12, 14 beziehungsweise 34 Gene für DUF581-Proteine. In monokotyledonen Pflanzen wie *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Zea mays* und *Panicum virgatum* sind es 16, 29, 47 und 48 (Jamsheer et al., 2015) Diese Expansion der DUF581-Proteine in höheren Pflanzen scheint dabei hauptsächlich auf Blockduplikationen zurückzugehen (Jamsheer et al., 2015). Die Expression von Genen, die für DUF581-Proteine codieren, wird stark durch Hormone und Umweltreize sowie entwicklungs- und gewebespezifisch bestimmt. Während für einige Mitglieder dieser Proteinfamilie teilweise eine überlappende Expression, der eventuell redundante Funktionen zugrunde liegen, beobachtet wurden, konnte für andere DUF581-Proteine eine spezifische

Diskussion

Induktion oder Repression unter bestimmten Bedingungen gezeigt werden. Die Mehrzahl der Mitglieder dieser Proteinfamilie wird besonders in reproduktiven Organen sowie während des Übergangs von der vegetativen zur reproduktiven Phase, einem intensiv mit der Zuckersignalweiterleitung assoziiertem Entwicklungsschritt, stark exprimiert (Jamsheer et al., 2015). Die SnRK1-vermittelte transkriptionelle Umprogrammierung erfolgt wahrscheinlich durch Interaktionen mit Regulatoren der Transkription oder weiteren Komponenten der Transkriptionsmaschinerie im Nucleus (Cho et al., 2012). Bisher sind allerdings nur wenige zellkernlokalisierte SnRK1-Zielproteine bekannt, die an der Weiterleitung des Signals involviert sind (Baena-Gonzalez et al., 2007; Kleinow et al., 2009; Tsai und Gazzarrini, 2012; Chen et al., 2013; Mair et al., 2015). Die subzelluläre Lokalisierung von AKIN10-mCherry ergab übereinstimmend mit früheren Studien (Bitrian et al., 2011; Cho et al., 2012) eine nucleo-cytoplasmatische Verteilung ähnlich wie sie auch für die Mehrzahl der analysierten GFP-markierte DUF581-Proteine auftrat. In Ko-Expressionsanalysen von AKIN10-mCherry in Kombination mit GFP-markierten DUF581-Proteinen konnte Fluoreszenz nahezu ausschließlich im Zellkern detektiert werden, was auf eine aktive Lokalisationsänderung sowohl von AKIN10 als auch der untersuchten DUF581-Proteine schließen lässt. Die Fluoreszenzsignale waren dabei hauptsächlich in definierten Bereichen im Zellkern zu erkennen, wobei der Nucleolus ausgespart war. BiFC-Analysen *in planta* bestätigten eine zellkernspezifische Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit DUF581-Proteinen in subnuclearen *Foci*, wobei nicht bekannt ist um welche Strukturen es sich bei diesen Aggregaten handelt. Die detektierten definierten Strukturen könnten Bereiche darstellen in denen SnRK1, DUF581-Proteine und mögliche weitere Signalkomponenten wie Transkriptionsfaktoren durch Umsteuerung der Genexpression die Aktivität bestimmter Stoffwechselwege modulieren. Dies könnte etwa durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren oder anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie erfolgen und damit deren Stabilität oder Aktivität beeinflussen. In tierischen Zellen gehen subnucleare *Foci* auf unterschiedliche Strukturen zurück etwa zellkernspezifische Stresskörper, Polycombkörper oder *Histon Locus Bodies*, Formationen in denen auch Transkriptionsfaktoren zu finden sind (Mao et al., 2011). Es ist daher wahrscheinlicher, dass diese Strukturen als Orte der Regulation agieren als dass es sich um Aggregate nicht-funktionaler Proteine handelt. Aufschluss über die beobachteten subnuclearen *Foci* könnte die Analyse der Ko-Expression mit bekannten zellkernspezifischen Fluorophor-markierten Markern liefern (Geilen und Bohmer, 2015). Da DUF581-Proteine mit der Proteinkinase SnRK1 interagieren, könnten sie als Substrate für eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung oder als Gerüstproteine dienen, die die Bindung von SnRK1 an spezifische Substrate unterstützen. Allerdings weist die DUF581-Domäne keine SnRK1-Phosphorylierungsstelle auf und auch in den variablen Bereichen der DUF581-Proteine sind nur in Einzelfällen mögliche SnRK1-Zielmotive zu finden. Deshalb kann

Diskussion

angenommen werden, dass die DUF581-Proteine möglicherweise als Adaptorproteine fungieren. Hierbei würden DUF581-Proteine mit ihrer variablen Domäne dritte Interaktionspartner binden und durch gleichzeitige Bindung von SnRK1 an die DUF581-Domäne, diese möglichen Substrate in unmittelbare Nähe der SnRK1 bringen um eine Phosphorylierung zu ermöglichen (Abbildung 4.1). Dies wäre insbesondere sinnvoll, wenn die potentiellen Substrate nicht selbst von SnRK1 erkannt werden oder nur eine schwache Bindung mit der Kinase vorliegt.

Bisher wurde die DUF581-Proteinfamilie nur in einigen Fällen näher charakterisiert. So resultiert in Arabidopsis die T-DNA-Insertion innerhalb der Promotorregion von *DUF581-19/MARD1 (MEDIATOR OF ABA-REGULATED DORMANCY1)*, dessen Expression stark durch ABA induziert wird, in Samen, die nicht mehr in der Lage sind auf ABA zu reagieren (He und Gan, 2004). Diese Samen sind weniger dormant und weisen eine lichtunabhängige Keimung auf, ähnlich den Samen der SnRK1 *antisense*-reprimierten Erbsen, welche phänotypische Auffälligkeiten zeigen, die denen von ABA-insensitiven Mutanten vergleichbar sind (Radchuk et al., 2006). Daher könnte eine Störung des ABA-vermittelten SnRK1-Signalweges die Erklärung für die ABA-Insensitivität und die lichtunabhängige Keimung der *duf581-19/mard1* Samen sein. Ein DUF581-Protein aus Weizen wird durch Salzstress induziert und die Überexpression von diesem Protein in transgenen Arabidopsis-Pflanzen steigerte deren abiotische Stresstoleranz gegenüber erhöhter Bodenversalzung und Trockenheit (Hou et al., 2013). Die Samen dieser Pflanzen reagieren hypersensitiv auf ABA-Zugabe und weisen eine starke, durch ABA-bedingte Inhibierung des Wurzelwachstums auf. Dies könnte einem unkontrollierten, konstitutiven SnRK1-Aktivitätssignals geschuldet sein, als Folge der konstitutiven Expression des DUF581-Proteins aus Weizen. In Arabidopsis konnte eine gesteigerte Resistenz gegenüber Blattläusen beobachtet werden, wenn DUF581-18 überexprimiert wurde, wohingegen der Verlust desselben Gens den Blattlausbefall begünstigte (Chen et al., 2013). Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Beobachtung konnte allerdings nicht gezeigt werden. Die Überexpression von *DUF581-18* resultierte in Pflanzen mit kleineren Rosettenblättern, einer verzögerten Blühinduktion sowie kleineren Blüten und suggeriert neben der Beteiligung von DUF581-18 in Abwehrprozesse die Involvierung in Wachstums- und Entwicklungsprozesse (Chen et al., 2013).

Zusammenfassend ergeben sich starke Hinweise für eine Funktion von DUF581-Proteinen als Komponenten der SnRK1-Signalweiterleitung in Pflanzen, wobei sie als SnRK1-Adaptorproteine agieren könnten und eine erhöhte Spezifität der SnRK1-Substraterkennung hinsichtlich ihrer stimulus-, gewebe- und entwicklungsbedingten Expression vermitteln könnten. Dies würde eine weitere Möglichkeit der Kontrolle der SnRK1-Aktivität darstellen, die in Abhängigkeit von hormonellen und umweltbedingten Reizen unterschiedliche Auswirkung aufweist. Die detaillierte physiologische sowie zell- und

Diskussion

molekularbiologische Analyse von DUF581-Protein überexprimierenden Pflanzen sowie Verlustmutanten ist essentiell um einen Einblick in ihre Funktion innerhalb der SnRK1-Signaltransduktion zu erlangen. Um erste Hinweise auf die Funktion von DUF581-Proteinen in Pflanzen zu erhalten, ist es sinnvoll Interaktionspartner und somit Stoffwechselwege an denen DUF581-Proteine beteiligt sind zu identifizieren. Daher wurden weiterführende Interaktionsstudien mit den Mitgliedern der DUF581-Proteinfamilie durchgeführt.

4.2 Identifizierung von Interaktionspartnern der DUF581-Proteine

In den Hefe-basierten-Interaktionsstudien konnten für sechs DUF581-Proteine (DUF581-1, -5, -6, -12, -13, -17), abgesehen von SnRK1, keine weiteren Interaktoren identifiziert werden. Im Falle von DUF581-1 ist dies auf die Selbstaktivierung des für die Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung verwendeten Köderplasmids zurückzuführen, wodurch keine verlässliche Suche nach Interaktionspartnern mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System möglich war. Für die übrigen Proteine könnte dies dem Fehlen möglicher Interaktionspartner innerhalb der verwendeten Infloreszenz-cDNA-Bank geschuldet sein. Jedoch ist ebenfalls ein Funktionsverlust der Bindungspartner in den Hefe-Analysen nicht auszuschließen, da sie beispielsweise als Membranproteine nicht im Zellkern lokalisieren.

Bis auf eine Ausnahme konnten die DUF581-interagierenden Proteine, exklusive der SnRK1 α -Untereinheiten, nur in je einer Durchmusterung gefunden werden. Die besagte Ausnahme stellte dabei ATHB21/ZHD3 dar, das sowohl im „*Screening*“ mit DUF581-9 als auch mit DUF581-10 als interagierendes Protein gefunden werden konnte. ATHB/ZHD-Proteine gehören zu einer pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktorfamilie, der in Arabidopsis 14 Mitglieder zugeordnet werden. Diese werden hauptsächlich in Blüten und Blättern exprimiert und sind vermutlich an der Infloreszenz- sowie Blattentwicklung beteiligt (Tan und Irish, 2006; Street et al., 2008; Gonzalez et al., 2012). Für diese Proteine ist bekannt, dass sie Homo- und Heterodimere bilden, welche wahrscheinlich eine erhöhte Selektivität der DNA-Bindung ermöglicht (Tan und Irish, 2006). Die Mehrheit dieser Proteine weist keine intrinsische Aktivierungsdomäne auf, wodurch vermutlich die Interaktion mit weiteren Faktoren für die transkriptionelle Aktivierung nötig ist. Tan und Irish (2006) vermuteten teilweise redundante Funktionen dieser Transkriptionsregulatoren in der Blütenentwicklung (Tan und Irish, 2006). Für einige der ZHD-Mitglieder wurde eine Regulierung der ZHD-Aktivität durch MINI ZINC FINGER1 (MIF1) gezeigt. Dabei blockiert die Bindung des kompetitiven Inhibitors MIF1 an ZHDs den Import in den Nucleus (Hong et al., 2011). Die Autoren mutmaßten, dass die ZHD/MIF-Interaktion durch Phosphorylierung reguliert wird. Für ATHB25/ZHD1 wurde die Induktion von GA3OX2, einem Gibberellinsäure (GA; *gibberellic acid*) -Biosyntheseenzyme, gezeigt. Die gesteigerte Expression resultiert in erhöhten Gehalten von bioaktivem GA, was wiederum einen positiven Effekt auf die

Diskussion

Langlebigkeit von Samen nach sich zieht (Bueso et al., 2014). Neben ihrer Involvierung in pflanzliche Entwicklungsprozesse konnte auch eine Beteiligung der ZHDs in Stressreaktionen gezeigt werden. Das durch stressinduzierte Protein ATHB29/ZHD11 bindet an die Promotorregion von *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1 (ERD1)* und induziert in Kooperation mit NAC-Transkriptionsfaktoren dessen Expression. Die Überexpression dieses ZHD-Proteins in Arabidopsis steigert die Toleranz gegenüber Trockenstress (Tran et al., 2007). In Transaktivierungsassays in Arabidopsis-Protoplasten wurde für ZHD-Transkriptionsfaktoren aus Reis die Bindung an die Promotorregion des *OsDREB1B (DROUGHT RESPONSE ELEMENT BINDING 1)* gezeigt, die eine Repression des Gens zur Folge hatte (Figueiredo et al., 2012). DREB1-Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulatoren der pflanzlichen Antwort auf unterschiedliche abiotische Stressfaktoren. ATHB/ZHD-Transkriptionsfaktoren sind als Regulatoren der Transkription sowohl in Entwicklungsprozesse als auch in die Adaption hinsichtlich sich ändernden Umweltbedingungen involviert, wodurch sie zumindest theoretisch als geeignete SnRK1-Signaltransduktionskomponenten agieren könnten.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die als DUF581-interagierende Proteine identifiziert werden konnte, sind Mitglieder der pflanzenspezifischen bHLH (*basic helix-loop-helix*) -Motiv enthaltenden TCP-Familie. So wurden TCP3 und TCP13 zunächst als DUF581-9-Interaktionspartner gefunden. Die Beteiligung von TCP-Transkriptionsfaktoren konnte bisher schon für zahlreiche Prozesse der pflanzlichen Entwicklung gezeigt werden, beispielsweise sind sie an der Regulierung des Wachstums und der Zellproliferation beteiligt (Cubas et al., 1999). Wie auch die ATHBs sind TCPs in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden (Kosugi und Ohashi, 2002). CINCINNATA (CIN) -ähnliche Proteine wie TCP3 und TCP13 modulieren die Expression von NAC-Domänen enthaltenden *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* -Genen. Dies erfolgt durch die transkriptionelle Regulation von *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, *INDOLE-3-ACETIC ACID3/SHORT HYPOCOTYL2 (IAA3/SHY2)* sowie miR164, negativen Regulatoren von *CUC*, wodurch diese TCPs eine wichtige Funktion als Regulatoren der Blattenwicklung innehaben (Koyama et al., 2007; Koyama et al., 2010). Für TCP3 wurde eine redundante Funktion mit anderen TCPs in der Regulierung der Expression von Genen gezeigt, die für zelluläre Komponenten des Energiemetabolismus codieren insbesondere derer, die in Mitochondrien agieren (Giraud et al., 2010). Im Fall von TCP13 wurde sowohl eine Lokalisierung in Chloroplasten als auch im Zellkern gezeigt, wodurch vermutet wird das es beide Kompartimente ansteuern kann (Baba et al., 2001; Suzuki et al., 2001). TCP13 aktiviert die lichtabhängige Transkription von *PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER PROTEIN D (PSBD)* in Chloroplasten (Baba et al., 2001). Bisher wurde noch keine Phosphorylierung von TCPs durch SnRK1 gezeigt, allerdings weist TCP13 mögliche

Diskussion

Phosphorylierungsstellen auf und Baba et al. (2001) spekulieren in ihrer Publikation über eine lichtabhängige, posttranslationale Modifikation von TCP13 (Baba et al., 2001).

Neben Komponenten der Transkriptionsmaschinerie wurde auch ein DUF581-interagierendes Protein, welches in die Translation involviert ist, identifiziert. Das mit DUF581-3 interagierende EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 2B (eIF2B) Familienprotein AT1G72340 ist vermutlich eine Komponente des GTP-hydrolysierenden eIF2B-Komplex. Für einige Mitglieder dieses Komplexes ist eine Regulierung von Proteininteraktionen und der Aktivität der Translationsinitiierung durch Phosphorylierung bekannt (Muench et al., 2012; Boex-Fontvieille et al., 2013). Eine durch DUF581-3-vermittelte Phosphorylierung via SnRK1 könnte daher unter SnRK1-aktivierenden Bedingungen, etwa unter geringer Nährstoffverfügbarkeit, die Translation modulieren, ähnlich wie dies durch die TOR-vermittelte Phosphorylierung der S6-Kinase (S6K) bereits gezeigt wurde (Mahfouz et al., 2006).

Das hochkonservierte eukaryotische COP9-Signalosom (CSN) ist ein Proteinkomplex, der als Repressor des lichtabhängigen Wachstums beschrieben ist (Wei et al., 1994; Deng et al., 2000). CSN ist an der Regulierung des Proteinabbaus beteiligt, wobei das Signalosom die Aktivität der Cullin-RING E3-Ligasen (CRL) durch Entfernung des Ubiquitin-ähnlichen Proteins Nedd8 reguliert. CRLs markieren Proteine für den proteasomalen Abbau durch Ubiquitinierung (Stratmann und Gusmaroli, 2012). Aufgrund der Regulierung von CRL ist CSN in zahlreiche Prozesse wie beispielsweise in die Regulation des Wachstums, der Entwicklung und von Abwehrprozessen involviert. So ist die CRL CUL4 am proteasomalen Abbau von AKIN10 beteiligt und *cul4*-Mutanten weisen erhöhte Proteingehalte von AKIN10 auf (Lee et al., 2008). Daher könnte die Interaktion von DUF581-9 mit CSN5B einerseits eine weitere Ebene der Regulation der AKIN10-Proteinstabilität ermöglichen. Andererseits könnte diese Interaktion zur Assoziation von SnRK1 mit CSN führen, wodurch eine Regulierung der Stabilität von SnRK1-Zielproteinen nach erfolgter Phosphorylierung durch CSN ermöglicht würde.

Weitere wichtige Komponenten, die an der Regulation von Proteinen beteiligt sind, stellen die Mitglieder der Gruppe der 14-3-3-Proteine dar, die die Funktion von Bindungspartnern nach phosphorylierungsabhängiger Assoziation modulieren (Oecking und Jaspert, 2009). In Arabidopsis werden 13 der 15 für 14-3-3-Isoformen codierende Gene exprimiert. Einige metabolisch aktive Enzyme werden durch Phosphorylierung gefolgt von der Bindung von 14-3-3-Proteinen in ihrer Aktivität reguliert. Diese 14-3-3-abhängige Form der Regulierung ist etwa für die Nitrat-Reduktase und die Saccharose-Phosphate-Synthase (SPS) bekannt, beides beschriebene SnRK1-Substrate (Halford und Hey, 2009). Auch 14-3-3-Proteine selbst scheinen an mehreren Stellen Ziel von Phosphorylierungen zu sein, wobei die biologische Relevanz dieser posttranslationalen Modifikation noch nicht bekannt ist und nur wenige 14-3-

Diskussion

3-phosphorylierende Kinasen beschrieben sind (Rienties et al., 2005; Swatek et al., 2014). Für die 14-3-3-Isoform λ /GRF6, die als DUF581-8-Interaktionspartner gefunden wurden, konnte die Phosphorylierung durch die SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1 (*AtSERK1*) gezeigt werden (Rienties et al., 2005). Da DUF581-8 kein vorhergesagtes 14-3-3-Bindemotiv enthält, lässt die Interaktion eher auf eine Gerüstfunktion in der Vermittlung der Interaktion von GRF6 mit SnRK1 schließen. Dadurch könnte GRF6 direkt als SnRK1-Substrat für Phosphorylierung dienen oder aber 14-3-3-Zielproteine könnten nach erfolgter Phosphorylierung via SnRK1 an GRF6 weitergeleitet werden. Eine ähnliche Regulierung konnte bereits für den Transkriptionsfaktor REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG) gezeigt werden. Die Phosphorylierung von RSG durch die *Nicotiana tabacum* Ca^{2+} -DEPENDENT PROTEIN KINASE 1 (*NtCDPK1*) kreiert eine 14-3-3-Bindestelle (Igarashi et al., 2001). Zusätzlich bindet *NtCDPK1* ein 14-3-3-Protein, welches nach der RSG-Phosphorylierung auf RSG übertragen wird. Dadurch agiert die Kinase *NtCDPK1* als eine Art Gerüst, dass die Spezifität und Effizienz der Signalweiterleitung durch die Kopplung von Katalyse mit Interaktionsvermittlung eines Proteins moduliert (Ito et al., 2014).

Das als DUF581-14-Interaktionspartner gefundene Protein SPD1 (SEEDLING PLASTID DEVELOPMENT1) ist ein Mitglied der AAA⁺ ATPase-Superfamilie, das in die Entwicklung von Plastiden während des frühen Wachstums von Keimlingen involviert ist (Ruppel et al., 2011). Ob diese Interaktion ebenfalls *in planta* stattfindet ist jedoch fraglich, da SPD1 in der Chloroplastenhüllmembran lokalisiert ist (Ruppel et al., 2011), während DUF581-Proteine eine nucleo-cytoplasmatische Lokalisierung aufweisen.

In Hefe ist DUF581-16 nicht nur in der Lage mit SnRK1 α -Untereinheiten zu interagieren, sondern zeigte auch Wechselwirkungen mit der Proteinkinase WITH NO LYSINE KINASE (WNK8), die an zahlreichen Prozessen der pflanzlichen Entwicklung beteiligt ist und als negativer Regulator der Salzstresstoleranz agiert (Tsuchiya und Eulgem, 2010; Zhang et al., 2013). Eine wichtige Rolle kommt der WNK8 durch die Involvierung an der Glucose-Signalweiterleitung durch den G-Protein-gekoppelten Signalweg zu. In Anwesenheit von Glucose wird RGS1, ein negativer Regulator dieses Signalwegs, durch WNK8 phosphoryliert und in Folge dessen durch Endocytose von der Plasmamembran entfernt, wodurch die Glucose-Signalweiterleitung ermöglicht wird (Urano et al., 2012). Als positiver Regulator der Glucose-Signalweiterleitung wirkt WNK8 als Antagonist der durch Glucosemangel induzierten SnRK1-Aktivierung. Wie in Abbildung 3.7 ersichtlich induzieren Stimuli wie Glucose und abiotischer Stress die Expression von *DUF581-16*. Sowohl die Hefe- als auch die Expressionsdaten lassen eine Beteiligung von DUF581-16 an Signalwegen an denen SnRK1 und WNK8 involviert sind, vermuten, wodurch über DUF581-16 ein *Crosstalk* der beiden Signalwege ermöglicht werden könnte.

Diskussion

Neben den Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterungen erfolgte auch eine Datenbankanalyse um Protein-Protein-Interaktionen von DUF581-Proteinen zu identifizieren. Auf diese Weise konnten 2 der 5 DELLA-Proteine aus Arabidopsis als Interaktionspartner von DUF581-2 nachgewiesen werden. Sowohl GAI (GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE) als auch RGA (REPRESSOR OF GA1-3) interagierten mit DUF581-2 in Hefe sowie im Zellkern in *in planta*-Studien, während keine Interaktion mit einem anderen Mitglied der DUF581-Familie (DUF581-19) nachgewiesen werden konnte. Da ebenfalls keine Interaktion von DUF581-2 mit den 3 übrigen DELLA-Proteinen RGL1/RGL2/RGL3 (RGA-LIKE) detektiert werden konnte, scheint die Interaktion dieses DUF581-Proteins spezifisch für GAI und RGA zu sein. GAI und RGA sind wichtige Regulatoren der Elongation des Stängels und RGA ist zusammen mit RGL1 und RGL2 in die Blütenentwicklung involviert (Achard und Genschik, 2009). Gibberelline (GA) sind Pflanzenhormone, die über den gesamten Lebenszyklus das Wachstum und die Entwicklung regulieren, wobei sie auch Umweltreize integrieren (Fleet und Sun, 2005). In Abwesenheit eines GA-Stimulus inhibieren DELLA-Protein im Zellkern in Kombination mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Transkription GA-abhängiger Gene. DELLA-Proteine, die als negative Regulatoren des GA-Signalweges agieren, werden nach Bindung von GA am Rezeptor GID1, dem die Bindung von GA/GID1 an DELLA-Protein folgt, proteasomal abgebaut. Dadurch kann die Transkription von GA-abhängigen Genen und eine positive Regulation des Wachstums erfolgen. Weiterhin scheint die Stabilität von DELLA-Proteinen durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung reguliert zu werden (Wang et al., 2009; Dai und Xue, 2010). So werden in Arabidopsis GAI und RGA von der Protein-Phosphatase TOPP4 dephosphoryliert, wodurch ihr GA-induzierter Abbau begünstigt wird (Qin et al., 2014). Zwar ist die Kinase, welche in Arabidopsis die Phosphorylierung dieser DELLA-Proteine vermittelt, nicht bekannt, aber in Reis konnte für EARLY FLOWERING1 (EL1), eine Caseinkinase I, die Stabilisierung des DELLA-Proteins SLENDER RICE 1 (SLR1) durch Phosphorylierung gezeigt werden (Dai und Xue, 2010). Da in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen keine direkte Interaktion von DELLA-Proteinen mit SnRK1 α -Untereinheiten detektiert werden konnte, könnte DUF581-2 möglicherweise die Interaktion von SnRK1 mit DELLA-Proteinen vermitteln. Dabei würde die SnRK1-vermittelte Phosphorylierung von GAI und RGA deren Stabilität erhöhen und GA-bedingte Wachstumsprozesse unter SnRK1-aktivierenden Konditionen unterdrücken. Eine Beteiligung von SnRK1 in GA-regulierte Wachstumsprozesse wird stark durch die Tatsache unterstützt, dass SnRK1 ein negativer Regulator des Wachstums ist. Weiterhin überlappen 29,6% der RGA-hochregulierten Gene mit AKIN10-induzierten Genen, wodurch eventuell RGA und AKIN10 in der Regulierung der Expression dieser Gene zusammenagieren um die Blütenentwicklung mit der Antwort auf Stressbedingungen zu koordinieren (Hou et al., 2008).

Diskussion

Durch die Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnten bereits Transkriptionsfaktoren und -regulatoren als DUF581-Interaktionspartnern gefunden werden. Ein weiterer potentieller Transkriptionsregulator ist STKR1 (STOREKEEPER RELATED 1), das als ein Interaktionspartner von DUF581-18 in Hefe identifiziert werden konnte. In Kartoffelknollen wurde ein Homolog dieses vermeintlichen Transkriptionsfaktors, genannt STOREKEEPER (STK), als Regulator der Saccharose-induzierten Expression von Patatin beschrieben (Zourelidou et al., 2002). Die Überexpression eines Arabidopsis STOREKEEPER-Proteins in Tabak bedingte eine verlängerte vegetative Wachstumsphase und eine verzögerte Blühinduktion, was eine Beteiligung dieser Proteine in die Wachstums- und Entwicklungsregulation impliziert (Bömer et al., 2011).

Die Untersuchung der Spezifität der Bindung von DUF581-Proteinen mit identifizierten Interaktoren zeigte, dass etwa die als DUF581-9 gefundenen Interaktionspartner TCP3 und CSN5B nicht mit DUF581-6, -18 und -19 wechselwirken. Ebenso ist die Bindung von STKR1 spezifisch für DUF581-18, da für STKR1 keine Interaktion mit den übrigen DUF581-Proteinen detektiert werden konnte. Andere Interaktoren etwa TCP13 und ATHB21 sind hingegen in der Lage mit mehreren DUF581-Proteinen zu interagieren. So konnte in Hefeinteraktionsstudien die Bindung von TCP13 sowohl mit DUF581-9 als auch mit DUF581-19 und im Falle von ATHB21 Wechselwirkungen mit DUF581-9 und -10 detektiert werden. Hierbei konnten allerdings Unterschiede in der Stärke der Interaktion beobachtet werden. Diese Daten lassen vermuten, dass die Interaktion von DUF581-Proteinen mit Interaktoren abseits von SnRK1 eine hohe Spezifität hinsichtlich einzelner DUF581-Proteine aufweist, da nur einige Proteine mit mehr als einem DUF581-Protein interagieren. Durch die Kombination von Hefe- und *in silico*-Analysen konnten Kandidatenproteine identifiziert werden, die in Zusammenarbeit mit DUF581-Proteinen in die SnRK1-Signaltransduktion involviert sein könnten. Dabei könnten DUF581-Protein als entwicklungs-, gewebe- oder stimulispezifische Mediatoren agieren, die die Bindung von SnRK1 an Substrate modifizieren könnten. Um zu überprüfen ob SnRK1 α -Untereinheiten auch direkt mit DUF581-interagierenden Proteinen wechselwirken, wurde durch Tests auf direkte Interaktion ausgewählter Interaktoren mit AKIN10/AKIN11 überprüft.

4.3 AKIN10 und DUF581-Protein haben gemeinsame Interaktionspartner

Für WNK8 konnte in Hefe keine Interaktion mit AKIN10 oder AKIN11 festgestellt werden. Der Transkriptionsfaktor ATHB21 hingegen interagiert nicht nur mit DUF581-Proteinen, sondern auch direkt mit AKIN10 und AKIN11. Im Gegensatz dazu ist ein anderes Mitglied der ATHB-Familie, ATHB23, nur in der Lage mit den SnRK1 α -Untereinheiten nicht aber mit DUF581-Proteinen zu interagieren. Ob auch die übrigen 12 ATHB-Proteine

Diskussion

Wechselwirkungen mit SnRK1-Untereinheiten aufweisen, bedarf weiterer Studien. Möglich wäre eine Regulation der ATHB-Mitglieder durch SnRK1-vermittelte Phosphorylierung um das Wachstum, die Entwicklung sowie Stressantworten zu regulieren, Prozesse an denen sowohl ATHB-Transkriptionsfaktoren als auch SnRK1 involviert sind. Auch TCP3 und TCP13 zeigten Wechselwirkungen mit AKIN10 und AKIN11 in Hefeinteraktionsstudien. Ob diese Transkriptionsfaktoren als SnRK1-Substrate dienen, muss in Phosphorylierungsstudien überprüft und anschließend die physiologische Relevanz analysiert werden. Eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung könnte einen Einfluss auf die DNA-Bindeaffinität, Proteinstabilität, die subzelluläre Lokalisierung oder wie für den bZIP63 gezeigt, einen Einfluss auf die Assoziation mit weiteren Transkriptionsregulatoren haben, wodurch eine Umprogrammierung der Transkription erfolgt (Mair et al., 2015). Die Tatsache, dass SnRK1 α und DUF581-Proteine gemeinsame Interaktionspartner aufweisen, unterstützt die Vermutung, dass DUF581-Proteine als Adaptorproteine wirken könnten (Abbildung 4.1). In dieser Funktion könnten sie die Interaktion von SnRK1 mit SnRK1-Zielproteinen modifizieren beispielsweise indem sie die Interaktion während der SnRK1-vermittelten Phosphorylierung stabilisieren.

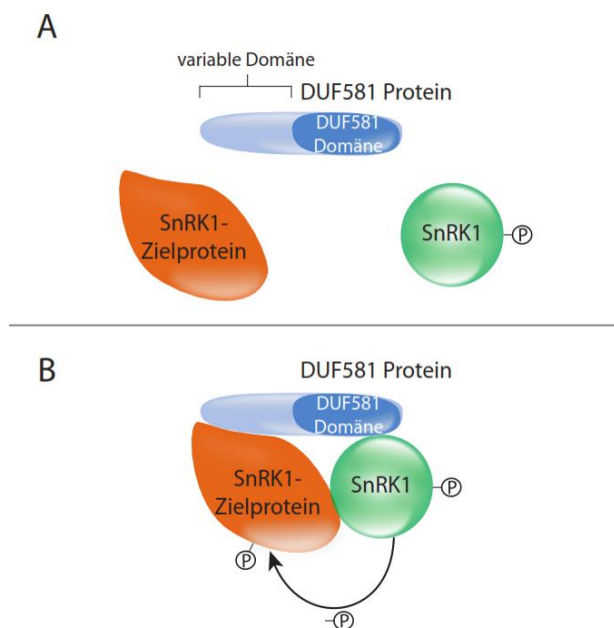


Abbildung 4.1: Model der Adaptorfunktion von DUF581-Proteinen in der SnRK1-Substratvermittlung.

A: Die Bindeaffinität von SnRK1 zu einigen Zielproteinen ist zur geringen Phosphorylierung ausreichende Stabilität zu ermöglichen. B: Gewebe-, entwicklungs- oder stimuluspezifische exprimierte DUF581-Proteine können SnRK1 über die DUF581-Domäne binden, während ein SnRK1-Zielprotein mit der variablen Domäne des DUF581-Proteins assoziiert. Aufgrund der räumlichen Nähe und Stabilisierung der Interaktion kann die SnRK1-vermittelte Phosphorylierung des Zielproteins erfolgen. Diese Phosphorylierung könnte zu einer Aktivitätsänderung des Zielproteins führen, die im Falle von Transkriptionsfaktoren in Änderungen der Genexpression resultiert.

Sowohl in Hefe- als auch in *in planta*-Interaktionsstudien ist SnRK1 in der Lage mit STKR1 unabhängig von einer DUF581-18-Anwesenheit zu interagieren, wodurch eine interaktionsvermittelnde Funktion von DUF581-18 in diesem Fall nicht nötig zu sein scheint. In nachfolgenden Experimenten müsste geklärt werden, ob eine Komplexbildung dieser drei Proteine stattfindet und ob DUF581-18 in der Lage ist die Interaktion von STKR1 mit SnRK1 zu modifizieren. Hierfür könnten zunächst Methoden wie beispielsweise Hefe-Drei-Hybrid

Diskussion

und *multicolor*-BiFC-Analysen erste Hinweise liefern. Keines der Proteine, die primär als DUF581-Interaktoren identifiziert wurden und ebenfalls zu Wechselwirkungen mit den Arabidopsis SnRK1 α -Untereinheiten fähig waren, tauchte in den Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterungen mit AKIN10 und AKIN11 auf.

4.4 STKR1, ein gemeinsamer Interaktionspartner von DUF581-18 und SnRK1 α -Untereinheiten in Arabidopsis

In Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen konnte STKR1 als Interaktionspartner sowohl des DUF581-18-Proteins als auch von AKIN10/AKIN11 identifiziert werden. Da STKR1 in Hefe nur mit DUF581-18 interagiert nicht aber mit den übrigen DUF581-Proteinen, scheint hier eine für DUF581-18-spezifische Interaktion vorzuliegen. Die DUF581-18-spezifische STKR1-Interaktion deutete zunächst darauf hin, dass diese Wechselwirkung nicht über die DUF581-Domäne stattfindet. Allerdings führte sowohl die Deletion der gesamten DUF581-Domäne als auch die Substitution eines konservierten Cysteins innerhalb der DUF581-Domäne von DUF581-18 zu einem Verlust der Interaktion mit STKR1. Somit ist eine funktionale DUF581-Domäne von DUF581-18 für die Interaktion mit STKR1 essentiell. Die Verifizierung der Interaktion von AKIN10 mit STKR1 *in planta* erfolgte über BiFC und Ko-IP, wodurch die Annahme einer biologischen Relevanz der Interaktion unterstützt wurde.

Die Klasse der STOREKEEPER (STK) Transkriptionsregulatoren wurde zunächst in *S. tuberosum* beschrieben. In Kartoffelknollen erkennt das DNA-bindende Protein STOREKEEPER B-Box-Motive um die Saccharose-induzierte Patatinexpression zu kontrollieren (Zourelidou et al., 2002). Ob STOREKEEPER-RELATED (STKR) -Proteine aus Arabidopsis ebenfalls B-Box-Motive binden, ist nicht bekannt. In Arabidopsis wurde STKR1 zuerst als *GL1* (*GLABROUS1*) ENHANCER BINDING PROTEIN (GEBP) beschrieben, wobei allerdings Arabidopsis-Pflanzen mit veränderter *GEBP/STKR1*-Expression (im Folgenden nur STKR1 genannt) keinen Effekt auf die Transkription von *GL1* zeigten (Curaba et al., 2003). In Arabidopsis existieren 21 Gene, die für Proteine der GEBP/STKR1-Familie kodieren können, wobei drei dieser Proteine starke Aminosäuresequenzähnlichkeit zu STKR1 aufweisen, genannt GPL (GEBP-LIKE) 1, GPL2 und GPL3 (Chevalier et al., 2008). Diese potentiellen Transkriptionsfaktoren besitzen eine zentrale DNA-bindende Domäne und eine carboxyterminale Domäne, die ein nichtkanonisches Leucin-Zipper-Motiv enthält und die Homo- sowie Heterodimerisierung von STKR1 und den GPLs ermöglicht (Curaba et al., 2003; Chevalier et al., 2008). STKR1 und die GPLs enthalten eine basische Domäne, die der Leucin-Zipper-Domäne vorgelagert ist, wodurch sie den bZIP-Transkriptionsfaktoren strukturell ähnlich sind (Curaba et al., 2003). In Reporter-GUS-Studien konnte eine verstärkte Expression von *STKR1* und den *GPLs* in vegetative Meristemen, Blattprimordien und vaskulären Geweben gezeigt werden (Chevalier et al., 2008). Laut eFP Browser 2.0

Diskussion

(http://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html) ist *STKR1* ebenfalls in Samen, Knospen und seneszierenden Blättern induziert. In einer früheren Studie wurde eine redundante Funktion von *STKR1* und zumindest zweien (*GPL1*, *GPL2*) der drei *GPL*-Proteinen in der Reaktion auf das Phytohormon Cytokinin angenommen (Chevalier et al., 2008). Die Basis dieser Schlussfolgerung ist deren überlappende Expression, ihre Fähigkeit miteinander auf Proteinebene zu interagieren sowie ihr negativer Effekt auf die Expression von Typ-A *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR)* Genen, wodurch sie negative Regulatoren der Cytokinin-Signaltransduktion darstellen.

In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray wurden allerdings keine *ARR*-Gene identifiziert, die in den *35S-STKR1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert waren. Auch der Befund, dass nur *STKR1* in der Lage ist mit *DUF581-18* und den beiden *SnRK1 α* -Untereinheiten zu interagieren, spricht gegen eine komplett redundante Funktion von *STKR1* und dessen Homologen in *Arabidopsis*. Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass durch diese *SnRK1*-spezifische Interaktion der Effekt der *STKR1/GPL*-Expressionsregulation unter *SnRK1*-aktivierenden Konditionen über Phosphorylierung von *STKR1* moduliert werden kann. Eine teilweise redundante Funktion von *STKR1* und *GPL*-Proteinen kann vermutet werden, da der Verlust von *STKR1* in mehreren Analysen keinen Effekt hatte. So konnten bei den Chlorophyll-, Carotinoid-, Anthocyan-, Saccharose- und Stärkegehalten sowie der *PAP1*, *ANAC* und *SAR*-assoziierten Genexpression keine Differenzen zwischen der *stkr1*-Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Wahrscheinlich kann der Verlust von *STKR1* in der *stkr1*-Mutante in einigen Prozessen durch *GPL*-Proteine kompensiert werden.

4.4.1 *STKR1* ist ein Phosphoprotein mit potentiellen *SnRK1*-Zielmotiven

Durch phosphorylierungsspezifische Anfärbung in Proteingelen wurde nachgewiesen, dass *STKR1* ein Phosphoprotein darstellt. In den Phosphorylierungsassays, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte zwar die *AKIN10*-vermittelte Phosphorylierung des *SAMS*-Peptids, welches als Positivkontrolle mitgeführt wurde, nicht aber die von rekombinantem *STKR1* bestätigt werden. Eventuell ist eine im Vergleich zum *SAMS*-Peptid zu geringe Proteinmenge an *STKR1*, deren Phosphorylierungsstatus unterhalb der Nachweisgrenze der Phosphoproteinfärbung liegt, ursächlich für die Abwesenheit eines Phosphorylierungssignals. In weiteren Experimenten sollte eine Verbesserung der Aufreinigung mit deutlich weniger Abbauprodukten angestrebt und der Phosphorylierungsassay erneut durchgeführt werden. Es ist ebenfalls denkbar, dass die Anwesenheit eines Ko-Faktors beispielsweise *DUF581-18* für eine erfolgreiche Phosphorylierung von *STKR1* durch *SnRK1* benötigt wird. Diese Vermutung kann in

Diskussion

Phosphorylierungsassays bei denen neben AKIN10 und STKR1 auch DUF581-18 in den Reaktionsansatz eingesetzt wird, überprüft werden.

Um als potentielles Substrat für eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung zu dienen, ist die Anwesenheit möglicher Phosphorylierungsstellen, die ein geeignetes SnRK1-Zielmotiv aufweisen, essentiell. Das Serin an Position 27 der STKR1-Aminosäuresequenz liegt innerhalb eines passenden SnRK1-Zielmotivs und weist eine hohe Phosphorylierungswahrscheinlichkeit auf, womit dieses Serin ein exzellentes potentielles Ziel für eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung darstellt (Durek et al., 2009). Ein weiteres Serin an Position 184, dessen Phosphorylierung bereits experimentell gezeigt wurde, liegt innerhalb einer Aminosäuresequenz, die mit Ausnahme einer Aminosäure ebenfalls ein mögliches SnRK1-Zielmotiv darstellt. Die Substitution beider Serine durch nicht-phosphorylierbare Alanine resultierte in einem verminderten Phosphorylierungsstatus von STKR1, was auf einen Verlust der Phosphorylierung dieser innerhalb von potentiellen SnRK1-Zielmotiven lokalisierten Serinen hindeutet.

Massenspektrometrische Analysen sowie Phosphorylierungsassays mit STKR1-Varianten, deren potentiell phosphorylierbare Serin-/Threoninreste durch nicht-phosphorylierbare Alanine substituiert wurden, sollten in zukünftigen Studien Aufschluss über die STKR1-Phosphorylierungsstellen geben. Der Nachweis, dass AKIN10, nicht aber die kinaseinaktive Variante AKIN10_{K48R}, in der Lage ist rekombinantes STKR1 zu phosphorylieren, würde STKR1 als direktes SnRK1-Substrat ausweisen.

Eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung kann vielfältige Auswirkungen auf das Zielprotein haben. So kann die Phosphorylierung, wie im Falle von FUS3, einen positiven Einfluss auf die Proteinstabilität nach sich ziehen (Tsai und Gazzarrini, 2012). Die Autoren dieser Studie zeigten, dass FUS3 an mehreren Stellen von AKIN10 phosphoryliert werden kann und eine Überexpression von *AKIN10* in einem zellfreien Extrakt den Abbau von rekombinantem FUS3 verzögert. Weiterhin wurde dargelegt, dass beide Proteine interagieren um Prozesse wie Samenreifung und Dormanz zu unterstützen bzw. um entwicklungsbedingte Phasenübergänge zu inhibieren (Tsai und Gazzarrini, 2012). Der FUS3-Proteinabbau erfolgt dabei über das 26S Proteasom, wobei nicht geklärt ist ob der positive Einfluss von AKIN10 auf die Proteinstabilität direkt oder indirekt erfolgt (Lu et al., 2010; Tsai und Gazzarrini, 2012). Ein stabilisierender Effekt konnte ebenfalls durch die AMPK-vermittelte Phosphorylierung des Zellzyklus-Regulators p27^{KIP1} gezeigt werden, was außerdem dessen Translokation ins Cytoplasma bedingt sowie die Arretierung des Zellzyklus und von Autophagieprozessen induziert (Liang et al., 2007; Short et al., 2008; Short et al., 2010). Auch der gegenteilige Effekt auf die Proteinstabilität konnte in einer früheren Studie bereits demonstriert werden. So hat AKIN10, induziert durch Hypoxie, einen negativen Einfluss auf den Proteingehalt des Salz-/ABA-induzierbaren Transkriptionsfaktors

Diskussion

AfMYC2. Die Autoren zeigten, dass die Anwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 den AKIN10-vermittelten *AfMYC2*-Proteinabbau beeinträchtigt, wodurch sie eine Beteiligung des Proteasoms an dem *AfMYC2*-Abbau suggerierten. Die AKIN10-vermittelte Phosphorylierung von *AfMYC2* resultiert in der verminderten Induktion *AfMYC2*-abhängiger Gene und damit zu einer Beeinträchtigung der Salzstresstoleranz (Im et al., 2014). Die beschriebene Interaktion lässt auf einen *Crosstalk* zwischen der Salz- und Hypoxie-Stressantwort bei Salzwasserüberflutung schließen (Im et al., 2014).

Ähnlich wie für FUS3 konnte auch für STKR1, nach transienter Ko-Expression mit AKIN10 ein stabilisierender Effekt auf die Proteinakkumulation bei AKIN10-Anwesenheit beobachtet werden. Weiterhin deuten erste Ergebnisse mit zellfreien Extrakten von transient *STKR1*-überexprimierenden Blättern darauf hin, dass auch STKR1 durch MG132 stabilisiert wird, womit ein Abbau von STKR1 über das 26S Proteasom vermutet werden kann. Die Aufreinigung von transient exprimiertem STKR1, welches mit bzw. ohne MG132 und AKIN10 inkubiert wurde, und die anschließende Western Blot-Analyse mit ubiquitinspezifischen Antikörpern könnte verdeutlichen unter welchen Bedingungen STKR1 ubiquitiniert wird, was wiederum eine Voraussetzung für den Abbau über das 26S Proteasom ist. Ob der positive Effekt von AKIN10 auf die STKR1-Akkumulation ein indirekter oder direkter, etwa durch Phosphorylierung, ist, muss ebenfalls durch weiterführende Experimente geklärt werden. Zudem könnte durch Western Blot-Analysen überprüft werden, ob die in dieser Arbeit generierten 35S-*STKR1*-Pflanzen in der Dunkelphase höhere Gehalte an STKR1 aufweisen als in der Lichtperiode. Sollte dies der Fall sein, spricht das zusätzlich für eine Stabilisierung der STKR1-Proteingehalte unter SnRK1-aktivierenden Bedingungen und liefert ein weiteres Indiz für eine posttranslationale SnRK1-vermittelte Modifikation. Der Phosphorylierungsstatus von STKR1 könnte auch Einfluss auf dessen subzelluläre Lokalisierung haben. Phosphorylierung von Proteinen kann beispielsweise deren Import in den Zellkern positiv sowie negativ beeinflussen. Dabei kann eine Phosphorylierung das NLS (*nuclear localization signal*) maskieren oder aktivieren oder aber Protein-Protein-Interaktionen begünstigen oder verhindern (Nardozi et al., 2010). Die Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von GFP-markiertem STKR1 ergab, in Übereinstimmung mit den Daten von Curaba et al. (2003), eine Lokalisierung des Fusionsproteins im Zellkern, wobei diese keine homogene Verteilung aufwies. Vielmehr konnten viele, kleine punktförmige *Foci* sowie größere Proteinakkumulationen, die eventuell Nucleoli darstellen, detektiert werden. Um welche Strukturen es sich bei den beobachteten *Foci* handelt, sollte weiterführend durch Ko-Expressionsanalysen von STKR1 mit Zellkernmarkern, die in verschiedenen Arealen des Nucleus lokalisieren, geklärt werden. Um den Einfluss einer möglichen Phosphorylierung von STKR1 auf die subzelluläre Lokalisierung zu untersuchen, wurde die Lokalisierung von STKR1-Substitutionvarianten überprüft, deren potentielle Phosphoserinreste durch Alanin

Diskussion

ersetzt waren. Der Verlust dieser vermeintlichen Phosphorylierungsstellen hatte zwar keinen Effekt auf den Import von STKR1 in den Zellkern, wohl aber auf dessen Verteilung in diesem. So konzentrierte sich die Fluoreszenz von STKR1_{S27A}, STKR1_{S184A} und STKR1_{S27A/S184A} in vermeintlichen Nucleoli sowie wenigen definierten, kleineren punktförmigen Aggregaten, bei denen es sich um *Cajal bodies* handeln könnte. Die bei STKR1 beobachteten zahlreichen, sehr kleinen *Foci* waren bei den STKR1-Substitutionsmutanten deutlich reduziert. Der Verlust der möglichen Phosphorylierung scheint daher einen Einfluss auf die Lokalisierung von STKR1 im Zellkern zu haben. Eventuell wird STKR1 als inaktive Form im Nucleolus zurückgehalten und verteilt sich nach einem Stimulus, der zur Phosphorylierung führt, im Zellkern um die Transkription von Zielgenen zu regulieren. Dies wäre eine Möglichkeit wie eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung die Aktivität von STKR1 regulieren könnte. Neben Effekten auf die Lokalisierung kann die Phosphorylierung auch Einfluss auf die Fähigkeit zur Oligomerisierung von Protein haben. In einer aktuellen Studie wurde für ein Mitglied der bZIP-Transkriptionsfaktorfamilie eine veränderte Dimerisierungspräferenz nach erfolgter SnRK1-vermittelter Phosphorylierung gezeigt (Mair et al., 2015). Die Phosphorylierung steigert die Präferenz von bZIP63 zur Homo- bzw. Heterodimerisierung mit anderen bZIP-Proteinen und dadurch die bZIP63-Aktivität, was in Änderungen der Genexpression resultiert (Mair et al., 2015). Gene, deren transkriptionelle Induktion in Abhängigkeit der Phosphorylierung von bZIP63 erfolgt, sind etwa *ASN1* und *ProDH*, beschriebene mit dem Aminosäuremetabolismus assoziierte SnRK1-Markergene (Baena-Gonzalez et al., 2007; Mair et al., 2015). In ihrer Studie zeigten Mair et al. (2015), dass bZIP63 in Kombination mit zusätzlichen bZIPs unter Mangelbedingungen ein wichtiger Regulator des Metabolismus ist, indem er als Komponente der SnRK1-Signaltransduktion das SnRK1-Aktivitätssignal in transkriptionelle Änderungen überführt (Mair et al., 2015). Da STKR1 den bZIP-Transkriptionsfaktoren strukturell ähnlich ist, ebenfalls Homo- und Heterodimere bildet und mit SnRK1 interagiert, wurde in Hefeinteraktionsstudien überprüft ob auch der Verlust möglicher SnRK1-Phosphorylierungsstellen die Homo- oder Heterodimerisierung von STKR1 beeinflusst. Die Befunde der Hefeinteraktionsstudien der hier vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass ein Verlust der Phosphorylierungsstelle (S184A) sowohl die Interaktion von STKR1 mit sich selbst als auch mit GPL1 und GPL3 beeinträchtigt. Welchen Effekt die Phosphorylierung einzelner potentiellen Phosphorylierungsstellen von STKR1 hat, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Um mögliche Effekte auf die transkriptionelle Aktivität von STKR1 aufzudecken, wären protoplastenbasierte Reporterassays eine geeignete Methode. Allerdings ist dazu die Identifizierung von STKR1-Zielgenen essentiell.

4.4.2 STKR1 beeinflusst das Wachstum und die Entwicklung in *A. thaliana*

4.4.2.1 Die *STKR1*-Überexpression resultiert in vermindertem Wachstum und verzögertem Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum

Die eingehende Analyse von *A. thaliana*-Pflanzen mit veränderter *STKR1*-Expression sollte Aufschluss darüber liefern ob *STKR1* in die Weiterleitung des SnRK1-Aktivitätssignals involviert sein könnte. Die phänotypische Analyse zeigte, dass Veränderungen der *STKR1*-Gehalte in Auffälligkeiten bei Wachstum und Entwicklung resultierten, was widersprüchlich zu den Daten von Curaba et al. (2003) ist. Die Autoren dieser Studie geben an, dass sie weder im Falle eines Verlusts noch der Überexpression von *STKR1* einen Unterschied zum Wildtyp im Wachstum erkennen konnten (Curaba et al., 2003). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wiesen transgene Arabidopsis-Pflanzen, die *STKR1* konstitutiv überexprimierten, ein zum Wildtyp deutlich vermindertes Wachstum auf, während der Verlust von *STKR1* das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle begünstigte. Die abweichenden phänotypischen Beobachtungen von *A. thaliana*-Pflanzen mit veränderter *STKR1*-Expression zwischen Curaba et al. (2003) und der vorliegenden Arbeit könnten im Falle der *STKR1*-Überexpression auf unterschiedliche Proteingehalte zurückgehen. Hinsichtlich der *stkr1*-Mutanten könnte die Verwendung von unterschiedlichen T-DNA-Insertionsmutanten ursächlich sein, auch wenn theoretisch ein identischer Phänotyp zu erwarten wäre. Die Wachstumsverzögerung der *STKR1*-Überexpressionspflanzen könnte das Resultat der Weiterleitung eines permanent aktiven SnRK1-Signals durch die konstitutive *STKR1*-Expression sein. Allerdings konnte in qRT-PCR-Analysen keine eindeutige differentielle Expression beschriebener, ausgewählter SnRK1-Markergene detektiert werden.

Im Übergang vom vegetativen zu reproduktivem Wachstum konnten ebenfalls Effekte der *STKR1*-Expression festgestellt werden. So begannen die Pflanzen der *stkr1*-Linie früher mit der Ausbildung von Stängel und Infloreszenzen als der Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigten die Linien, welche *STKR1* überexprimierten eine Verzögerung der Blühinduktion, welche ebenso bei *AKIN10*-Überexpression auftritt (Jeong et al., 2015). Diese phänotypischen Ähnlichkeiten unterstützten die Annahme, dass *STKR1* als SnRK1-Zielprotein dient. Auch korrelieren die Wachstumsphänotypen von Pflanzen, die *STKR1* oder dessen weiteren Interaktionspartner DUF581-18 überexprimieren. So wird die verbesserte Resistenz von DUF581-18-überexprimierenden *A. thaliana*-Pflanzen gegenüber dem Befall mit *M. persicae* von einem verminderten Wuchs der Pflanzen begleitet (Chen et al., 2013). Eventuell regulieren DUF581-18, *STKR1* und SnRK1 kooperativ Wachstumsprozesse während biotischer Stresssituationen.

4.4.2.2 Die *STKR1*-Überexpression in *Arabidopsis* reflektiert den Seneszenzphänotyp *AKIN10*-überexprimierender Pflanzen

Neben den Chlorophyllgehalten waren auch andere Pflanzenpigmente wie Carotinoide und Anthocyane durch eine veränderte *STKR1*-Expression in ihrer Abundanz betroffen. Im Falle der Anthocyane scheint diese Verminderung auf die transkriptionelle Repression des myb-Domänen-Transkriptionsfaktors PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1 (*PAP1*) zurückzugehen, einem Schlüsselregulator der Anthocyanbiosynthese. Interessanterweise wird *PAP1* auch negativ durch *AKIN10*-Aktivität reguliert (Baena-Gonzalez et al., 2007). Die Überexpression von *AKIN10* führt zu einer verzögerten Blüte und Seneszenz, während eine reduzierte *SnRK1α*-Expression (*AKIN10/AKIN11*) eine beschleunigte Seneszenz sowie gesteigerte Anthocyanengehalte begünstigt (Baena-Gonzalez et al., 2007). Eine Verzögerung der Seneszenz konnte, wie im Falle der *AKIN10*-überexprimierenden Pflanzen bereits gezeigt, auch für 35S-*STKR1*-Linien bestätigt werden, da die Analyse der Genexpression des Seneszenzmarkers *SAG12* in sieben Wochen alten 35S-*STKR1*-Pflanzen, eine signifikante Reduktion in zwei von drei Linien im Vergleich zum Wildtyp und *stkr1*-Pflanzen zur Folge hatte. Da die Expressionsanalyse des Seneszenzmarkers *SAG12* allerdings nur zu einem Zeitpunkt stattfand, sollte in einem weiteren Experiment eine Kinetik der *SAG12*-Expression mit fortschreitender Seneszenz erfolgen. Um eine verlässliche Aussage über den Effekt einer veränderten *STKR1*-Expression zu treffen, sollten außerdem weitere Seneszenz-induzierte (*PAP2*, *GLN1;4*, *NTR2.5*) sowie -reprimierte (*LHCB1;4*, *FBP aldolase*) Gene in die Analyse miteinbezogen werden, die über das Fortschreiten des Seneszenzprozesses auf transkriptioneller Ebene Auskunft geben (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Pourtau et al., 2006; Wingler et al., 2012). Sollte eine verzögerte Seneszenz der *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen vorliegen, würde eine spätere Induktion der Seneszenz-assoziierten Gene nachweisbar sein. Eine detaillierte Analyse des Expressionsprofils Seneszenz-assoziiierter Gene könnte auch belegen, ob Pflanzen der *stkr1*-Linie eine vorzeitige Seneszenz aufweisen, was durch eine verfrühte Induktion von Seneszenzmarkergenen erkennbar sein sollte. In einem durch Dunkelheit-induzierten Blattseneszenzassay lag der Fokus auf Unterschieden in der durch den progressiven Chlorophyllabbau fortschreitenden Gelbfärbung der Blätter der analysierten Linien. Es konnte beobachtet werden, dass sich Blätter von *stkr1*-Mutanten deutlich schneller gelb färbten und somit Chlorophyll abbauten als Blätter des Wildtyps und der 35S-*STKR1*-Linien, was für eine beschleunigte Seneszenz spricht. Hingegen entsprach die Gelbfärbung der Blätter der 35S-*STKR1*-Linien zu jedem Zeitpunkt in etwa der des Wildtyps. Die beobachteten Unterschiede in beiden Seneszenz-Experimenten könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Dunkelheit-induzierte Seneszenz abgetrennter Blätter im Gegensatz zur Seneszenz der gesamten Pflanze nicht der Alterung, sondern dem Mangel an

Diskussion

Nährstoffen geschuldet ist (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Wingler et al., 2009). Zusammenfassend scheint die verstärkte Expression von *STKR1* die Seneszenz zu verzögern, während der *STKR1*-Verlust eine beschleunigte Seneszenz bedingt.

Wie im Falle des Anthocyanlevels hatte der Verlust von *STKR1* auch auf den Chlorophyllgehalt keinen Einfluss. Die Überexpression von *STKR1* hingegen resultierte in verminderten Leveln an Chlorophyll a und b, wobei das Chlorophyllverhältnis über die Linien nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp verändert war. Reduzierte Chlorophyllgehalte lassen eine Beeinträchtigung der Photosynthese vermuten. Die für *AKIN10*-überexprimierende Arabidopsis-Pflanzen beschriebenen Beobachtungen hinsichtlich der Seneszenz sowie der Anthocyangehalte (Baena-Gonzalez et al., 2007) spiegeln die phänotypischen Auffälligkeiten der 35S-*STKR1*-Linien wieder und unterstützen die Annahme einer Beteiligung von *STKR1* in die SnRK1-Signalweiterleitung während entwicklungspezifischer Prozesse. Für die *stkr1*-Mutante konnte hingegen nur eine leicht beschleunigte Blühinduktion nicht aber Differenzen im Gehalt an Pflanzenpigmenten oder der Expression von *SAG12* beobachtet werden. Dies suggeriert auf eine Kompensation des *STKR1*-Verlusts durch beispielsweise GPL-Proteine.

4.4.3 Mögliche Korrelation des Wachstumsphänotyps durch *STKR1*-Überexpression mit dem Kohlenhydratmetabolismus

Verschiedene Analysen haben gezeigt, dass das pflanzliche Wachstum wesentlich von diurnalen Zucker-Stärke-Zyklen und einer entsprechenden Verteilung assimilierter Kohlenstoffe abhängt (Rasse und Tocquin, 2006; Smith und Stitt, 2007; Kölling et al., 2015; Weraduwage et al., 2015). Aufgrund des reduzierten Wachstums der 35S-*STKR1*-Linien wurden Beeinträchtigungen im Kohlenhydratstoffwechsel etwa in der Stärkebiosynthese bzw. der Stärkemobilisierung vermutet. Die Quantifizierung der Stärke verdeutlichte allerdings, dass die Linien keine Probleme in der Stärkebiosynthese sowie in der Mobilisierung der transitorischen Stärke während der Nacht aufwiesen, sondern ergaben einen erhöhten Stärkeumsatz der 35S-*STKR1*-Linien. Da die Pflanzen dieser Linien am Ende der Lichtphase ähnliche Stärkegehalte wie der Wildtyp aufwiesen, aber am Ende der Dunkelphase signifikant geringere Stärkelevel gemessen wurden, verbrauchen die Linien nachts mehr Stärke im Vergleich zum Wildtyp. Um das Wildtyp-Niveau zu erreichen, müssen die Pflanzen daher am Tag mehr Stärke akkumulieren. Da die Pflanzen scheinbar keine Beeinträchtigungen in der Biosynthese der quantifizierten, essentiellen löslichen Zucker sowie der Stärke aufwiesen, wäre eine Erklärung für das verminderte Wachstum der 35S-*STKR1*-Linien eine Kombination aus verminderter Kapazität der Kohlenstoffassimilation durch reduzierte Chlorophyllgehalte und erhöhten nächtlichen Verbrauch. Dabei würde im Licht assimilierter Kohlenstoff vorrangig in transitorische Stärke zur Versorgung nächtlicher Erhaltungsprozesse als in lösliche Transportzucker investiert werden. Damit stünden der

Diskussion

Pflanze weniger Kohlenstoffe für Wachstumsprozesse zur Verfügung. Zudem deuten die Transkriptomdaten auf eine Umleitung energiereicher Kohlenstoffverbindungen in energieaufwendige Prozesse wie der biotischen oder abiotischen Stressadaptation (Abbildung 3.43) hin (Bolton, 2009). Trotz eines höheren nächtlichen Stärkeumsatzes akkumulieren die überexprimierenden *STKR1*-Pflanzen nicht mehr Stärke zur Kompensation im Vergleich zum Wildtyp. So waren auch unter einer höheren Lichtintensität, die eine verstärkte Stärkeakkumulation begünstigt, die 35S-*STKR1*-Pflanzen nicht in der Lage mehr Stärke einzulagern als der Wildtyp. Eventuell ist der reduzierte Chlorophyllgehalt der limitierende Faktor, der einer Kompensation des erhöhten Stärkeverbrauchs der *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen im Wege steht. Die Messung der Stärke von Linien unter Langtagbedingungen, könnte weitere Hinweise über die Unterschiede der Stärkeakkumulation bzw. des Stärkeverbrauchs liefern. Unter diesen Bedingungen würde der Wildtyp aufgrund der verkürzten Dunkelperiode weniger Stärke einlagern als unter Kurztagbedingungen und überschüssige Zucker beispielsweise in Wachstum umleiten. Der phänotypische Vergleich von Pflanzen, die nach dem Pikieren 3 Wochen lang unter Kurztag- (niedrige/hohe Lichtintensität) bzw. Langtagbedingungen anzogen wurden, zeigte, dass sich sowohl eine erhöhte Lichtintensität als auch eine verlängerte Lichtphase positiv auf das Wachstum aller Linien auswirkt (Abbildung 6.3). Allerdings waren unter allen drei Bedingungen die 35S-*STKR1*-Pflanzen deutlich kleiner als der Wildtyp und die *stkr1*-Mutante. So reichen weder eine erhöhte Bestrahlung noch eine verkürzte Dunkelphase aus um die durch die *STKR1*-Überexpression bedingten Wachstumseffekte auszugleichen. In diesem Zusammenhang wäre interessant, ob eine Anzucht unter durchgängiger Belichtung einen kompensierenden Effekt auf das Wachstum der *STKR1*-überexprimierenden Linien hat. Weiterhin könnte in *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen eine veränderte Signaltransduktion vorliegen, welche einen anderen Kohlenhydratstatus vorgibt als aktuell vorliegt und damit die Expression von Genen und Prozessen der Photosynthese beeinflussen. Da die Saccharosegehalte mit der Menge des SnRK1-inhibierenden Signalmoleküls T6P korrelieren, sollte die Messung dieses Metaboliten Aufschluss über Abnormitäten der T6P-vermittelten Saccharose-Signalweiterleitung geben (Lunn et al., 2006). So könnten reduzierte T6P-Gehalte eine verstärkte SnRK1-Aktivität und eine Hemmung von Wachstumsprozessen bewirken. Die Messung der T6P-Gehalte sowie die Bestimmung der SnRK1-Aktivität der 35S-*STKR1*-Pflanzen könnte daher ebenfalls einen erklärenden Beitrag für die phänotypischen und physiologischen Auffälligkeiten liefern. Durch eine Metabolomanalyse könnten Unterschiede im Metabolitprofil der Pflanzen mit veränderter *STKR1*-Expression aufgedeckt werden und aufgrund von Verschiebungen könnten in Abhängigkeit von *STKR1* präferierte und vernachlässigte Stoffwechselwege identifiziert werden.

4.4.4 Transkriptionelle Analyse von *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen

Eine Regulation von SnRK1-Markergenen wie sie auch durch SnRK1 erfolgt, etwa die Inhibierung SnRK1-reprimierter Gene beziehungsweise die Aktivierung SnRK1-induzierter Gene, würde auf eine Rolle von *STKR1* als positiver Regulator des SnRK1-Signals hindeuten. Die transkriptionelle Analyse ausgewählter SnRK1-Markergene während der Lichtphase (SnRK1-inaktiv) sowie nach verlängerter Dunkelphase (SnRK1-aktiv) lieferte keinen eindeutigen Hinweis auf eine Involvierung von *STKR1* in die SnRK1-vermittelte Regulation dieser Gene. Während in der transkriptionellen Regulation der Gene in den Proben der Lichtphase keinerlei Unterschiede zwischen den Linien beobachtet wurden, zeigten in den Dunkelproben die 35S-*STKR1*-Linien eine differentielle Regulation von zwei der fünf analysierten SnRK1-Markergenen. Die Expression eines durch SnRK1-reprimierten Gens (*UGD2*) wurde unter SnRK1-aktiven Bedingungen in den 35S-*STKR1*-Linien stärker inhibiert als im Wildtyp. Im Gegensatz dazu war das SnRK1-induzierte Gen *ASN1* in den 35S-*STKR1*-Linien weniger stark induziert als im Wildtyp. Ein eindeutiges Ergebnis konnte durch die Analyse der SnRK1-Markergenexpression nicht erlangt werden.

Da *STKR1* konstitutiv exprimiert wird, spricht der beobachtete Effekt der *STKR1*-Expression auf die SnRK1-Markergenexpression für eine Interferenz von *STKR1* mit einem Prozess, der in der verlängerten Dunkelphase aktiviert wird. So wird *STKR1* im Licht zwar exprimiert, könnte aber erst durch posttranslationale Modifikation während der verlängerten Dunkelphase aktiviert werden. Eine während der Dunkelphase stark aktive Kinase ist SnRK1. Aufgrund der physischen Interaktion des Phosphoproteins *STKR1* mit SnRK1 α -Untereinheiten sowie dem Vorhandensein von SnRK1-Zielmotiven ist eine Modifizierung der Aktivität von *STKR1* durch eine SnRK1-vermittelte Phosphorylierung möglich. Die Beobachtung, dass die SnRK1-Markergenexpression teilweise durch *STKR1*-Expression betroffen ist sowie die Feststellung, dass diese Differenzen erst unter SnRK1-aktivierenden Konditionen zu beobachten sind, lassen eine Involvierung von *STKR1* in die Regulierung einiger SnRK1-Markergene, eventuell nach erfolgter posttranslationaler Modifikation, vermuten. Da hier nur fünf der über 1000 SnRK1-Markergene analysiert wurden, ist es möglich, dass *STKR1* im Falle einer Beteiligung an der SnRK1-Signaltransduktion in die Regulation einer Gruppe von SnRK1-Zielgenen involviert ist, die sich nicht mit den hier getesteten Markergenen deckt. Um zu überprüfen ob das Expressionsprofil von *STKR1* starke Überlappungen mit dem des SnRK1-Aktivitätssignals aufweist, wurde eine globale Transkriptomanalyse der *STKR1*-überexprimierenden Linien mittels Microarrays durchgeführt.

4.4.4.1 *STKR1*-Überexpression induziert Abwehrprozesse in *A. thaliana*

Die globale Analyse der differentiellen Genexpression in *STKR1*-überexpimierenden Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zeigte eine Anreicherung solcher Gene, die in abiotische, aber besonders biotische Abwehrprozesse involviert sind. Die in 35S-*STKR1* am stärksten induzierten Gene lassen sich mit der Salicylsäure-vermittelten Immunantwort und der systemischen Abwehr (SAR) in Verbindung bringen. Darunter sind *PR1*, *FMO1* und *ALD1* als zentrale Komponenten der systemischen Immunität (Shah und Zeier, 2014). Die SA- und Pipecolinsäure (Pip) -Synthese, die verstärkt bei der Abwehr biotropher und hemibiotropher Pathogene in der PTI oder ETI erfolgen, haben eine entscheidende Funktion in der Ausbildung der systemisch erworbenen Resistenz (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) (Glatzebrook, 2015; Bernsdorff et al., 2016). Durch die SAR, die nach Erkennung eines Pathogens über die PTI oder ETI ausgelöst werden kann, ist die Pflanze in der Lage auch in nicht-infizierten Geweben eine verstärkte Bereitschaft zur Abwehr potentieller Eindringlinge zu aktivieren (Pieterse et al., 2012). Daher lässt die Induktion biotischer Stress-assoziiertes Gene auf eine aktivierte Abwehr insbesondere der SAR in den 35S-*STKR1*-Linien während der Dunkelheit schließen.

Die SAR-bedingte transkriptionelle Umprogrammierung resultiert in der verstärkten Expression von speziellen Transkriptionsfaktoren, Komponenten der Abwehrsignalweiterleitung sowie der Repression photosynthetischer und Wachstums-assoziiertes Gene (Bernsdorff et al., 2016). Die einmal etablierte SAR bewirkt ein *Priming* der Pflanzen, was ihnen eine schnelle, effektive Abwehrantwort bei zukünftigem Pathogenbefall ermöglicht. Eine wichtige Funktion in der Weiterleitung des SA-Signals ist von dem transkriptionellen Ko-Aktivator NON-EXPRESSION OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 (NPR1) abhängig, der als zentraler Regulator der SAR agiert (Fu und Dong, 2013). Die Aktivierung von NPR1, das in nicht-infizierten Pflanzen als Oligomer im Zytoplasma akkumuliert, wird durch ansteigende, intrazelluläre SA-Konzentrationen aufgrund eines Pathogenbefalls vermittelt. Erhöhte SA-Gehalte begünstigen die Monomerisierung von NPR1, wodurch es in den Zellkern transloziert werden und mit TGA-Transkriptionsfaktoren interagieren kann (Tada et al., 2008; Cheng et al., 2009; Despres et al., 2000; Fan und Dong, 2002). Dies ermöglicht die Aktivierung von SA-reagierenden Genen wie PR (*Pathogenesis-related*) -Genen oder WRKY-Transkriptionsfaktoren (Dong, 2004; Moore et al., 2011; Rushton et al., 2010). PR-Gene kodieren häufig für Proteine mit antimikrobieller Funktion und *PR1* hat sich als Marker für SA-abhängige Genexpression etabliert (Van Loon et al., 2006). WRKY Transkriptionsfaktoren können die SA-Antwort sowohl unterstützen als auch reprimieren (Wang et al., 2006; Rushton et al., 2010). Der Abbau von NPR1 findet über das 26S Proteasom nach erfolgter Phosphorylierung und Ubiquitinierung statt, wobei den NPR1-Paralogen NPR3 und NPR4 als Adaptoren der NPR1-ubiquitinierenden E3-Ligase

Diskussion

eine zentrale Rolle zukommt (Fu et al., 2012). Die konstitutive Synthese sowie der Abbau von NPR1 sind für die SAR-Etablierung essentiell, da vermutlich nur die stetige Translokation von NPR1 in den Zellkern zur Re-Initiation des Transkriptions-Zyklus in der Lage ist (Spoel et al., 2009). Neben SA und NPR1 sind auch die FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE1 (FMO1) und das AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1 (ALD1) essentielle Komponenten der SAR (Song et al., 2004; Mishina und Zeier, 2006). Das sowohl in lokal inokulierten als auch distalen Blattgeweben hochregulierte ALD1 besitzt Aminotransferaseaktivität mit einer Substratpräferenz für Lysin und ist mutmaßlich in die Pip Biosynthese involviert (Song et al., 2004; Návarová et al., 2012). FMO1 agiert im Signalweg nach Pip und vor SA, wobei es für die systemische Akkumulation von SA während der SAR benötigt wird (Mishina und Zeier, 2006; Návarová et al., 2012; Bernsdorff et al., 2016).

Zwar zeigte die Auswertung der Microarraydaten keine Induktion von dem primär posttranslational reguliertem NPR1, aber eine von NPR3, welches in die Aufrechterhaltung der SAR involviert ist (Saleh et al., 2015). Pflanzen, deren Abwehr konstitutiv aktiv ist, zeigen deutliche morphologische Auffälligkeiten wie vermindertes Wachstum und eine veränderte Blattform ähnlich denen der *STKR1*-Überexpressionlinien (Allahverdiyeva et al., 2015). Daher scheint der durch *STKR1*-Überexpression bedingte Phänotyp auf eine konstitutiv-aktive Abwehr der Pflanzen zurückzugehen, welche einerseits die Photosynthese und das Wachstum hemmen könnte sowie andererseits einen stark gesteigerten Energieverbrauch verursacht, welcher besonders in der Dunkelphase ausgeprägt ist. Dies würde auch mit den signifikant verminderten Gehalten an Saccharose und Stärke korrelieren. Weiterhin wäre die Induktion der Abwehr eine passende Erklärung für die geringeren Chlorophyllgehalte der Pflanzen, wobei die Transkriptom-Analyse keine eindeutigen Hinweise auf eine veränderte Expression von Photosynthesegenen ergab (Bernsdorff et al., 2016). Es ist zu erwarten, dass die *STKR1*-Überexpressionlinien erhöhte Gehalte an SA und ROS (*reactive oxygen species*) aufweisen, da einerseits SA-abhängige Gene sowie die RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D (RBOHD) -NADPH-Oxidase, die an der Produktion von ROS (H_2O_2 , O_2^-) beteiligt ist (Miller et al., 2009; Miller et al., 2010), induziert waren. ROS aktiviert MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE-(MAPK) -Signalkaskaden, die in der Regulierung von Abwehrsignalwegen agieren (McCubrey et al., 2006). Eventuell weisen MAPKs in den *STKR1*-überexprimierenden Linien einen erhöhten Phosphorylierungsstatus auf, wobei auf transkriptioneller Ebene nur eine Induktion von *MPK11* vorlag. Ob die H_2O_2 -Produktion und Zelltod in diesen Pflanzen induziert ist, müsste mit DAB- beziehungsweise Trypanblau-Färbung untersucht werden. Dies ist wegen der RBOHD-Induktion und dem durch ROS-induzierten Zelltod wahrscheinlich. Es wäre daher zu erwarten, dass 35S-*STKR1*-Pflanzen aufgrund von *Priming* eine gesteigerte Resistenz gegenüber (hemi)biotrophen Phytopathogenen, wie *Pseudomonas syringae*, aufweisen. Aufgrund der in dieser Arbeit

Diskussion

gezeigten Daten ist für *STKR1* in *Arabidopsis* eine Rolle innerhalb der Abwehr sehr wahrscheinlich. Hinweise, dass der SnRK1-Komplex in die Adaption auf biotischen Stress involviert ist, konnten bereits durch mehrere Studien erhalten werden (Hao et al., 2003; Schwachtje et al., 2006; Shen et al., 2011; Son et al., 2014). So bedingt die *SnRK1*-Überexpression eine erhöhte Resistenz gegenüber Geminiviren, während die *SnRK1*-Stilllegung in der erhöhten Akkumulation von viraler DNA verglichen mit dem Wildtyp resultiert. (Hao et al., 2003; Shen et al., 2011).

Während Seneszenz- und Abwehrprozessen von Pflanzen erfolgt eine weitreichende transkriptionelle Umprogrammierung, die durch ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird, wobei NAC, WRKY, MYB, C2-H2 Zinkfingern, bZIP und AP-EREBP Transkriptionsfaktoren eine vorrangige Rolle zukommt (Häffner et al., 2015). Die Microarray-Analyse offenbarte eine Heraufregulierung von NAC und WRKY Transkriptionsfaktoren in den *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen. Die am stärksten induzierten WRKY-Transkriptionsfaktoren waren WRKY50 und WRKY51. Beide WRKY-Proteine sind in die SA- und Oleinsäure-abhängige Repression der JA-Signalweiterleitung involviert, die zu einer verbesserten Resistenz gegenüber biotrophen, aber einer gesteigerten Suszeptibilität hinsichtlich nekrotropher Pathogene wie *Botrytis cinerea* führt (Gao et al., 2011). Für die ebenfalls induzierten Transkriptionsfaktoren WRKY54 und WRKY70 wird eine teilweise redundante Funktion als negative Regulatoren der Seneszenz vermutet, was mit dem Seneszenzphänotyp der *STKR1*-überexprimierenden Pflanzen korreliert (Besseau et al., 2012). Der durch SA-induzierte WRKY46 ist zusammen mit WRKY70 und WRKY53 in basale Abwehrprozesse bei *Pseudomonas syringae* Infektion involviert, wobei diese WRKYs einen positiven Effekt auf die Resistenz gegenüber diesem biotrophen Pathogen haben (Hu et al., 2012). Die Expression von *WRKY70* während Abwehrreaktionen wird durch SA induziert und unterstützt Abwehrprozesse (Li et al., 2004; Li et al., 2006). Die stärkste Induktion der NAC-Transkriptionsfaktoren zeigten ANAC087 und JUNGBRUNNEN1 (*JUB1/ANAC042*), wobei Letzterer ein negativer Regulator der Seneszenz ist (Wu et al., 2012). Die verzögerte Seneszenz der 35S-*STKR1*-Pflanzen scheint daher auf die Induktion von NAC und WRKY Transkriptionsfaktoren zurückzuführen zu sein, die einen negativen Effekt auf den Seneszenzverlauf ausüben. Die Überexpression von *JUB1* resultierte in einer Verzögerung der Seneszenz, verminderten H₂O₂-Gehalten und einer verbesserten abiotischen Stresstoleranz hinsichtlich Hitze und Salz, wobei dies wahrscheinlich auf die Akkumulation von Trehalose und Prolin in diesen Pflanzen zurückzuführen ist. Die *JUB1*-Expression wird durch H₂O₂ induziert und könnte ein Resultat der verstärkten Expression von *RHOB1* sein, welche in die Bildung von H₂O₂ involviert ist (Wu et al., 2012). Daher ist es möglich, dass die *JUB1*-Induktion ein sekundärer Effekt ist, der durch erhöhte Gehalte an H₂O₂ in den 35S-*STKR1*-Linien bedingt sein könnte. Für ANAC087 wird eine Funktion in der

Diskussion

Regulierung der pflanzlichen Abwehr vermutet, während eine Modulierung des Seneszenzprozesses nicht gezeigt werden konnte (Dissertation K. Mahmood, 2014). Der Transkriptionsfaktor ANAC016 ist ein positiver Regulator der Seneszenz, der die Expression von *STAYGREEN1* (*SGR1*) aktiviert, wodurch der Chlorophyllabbau während der Seneszenz begünstigt wird (Kim et al., 2013; Sakuraba et al., 2016). Eventuell bedingt eine ANAC016-vermittelte Induktion von *SGR1* den verminderten Chlorophyllgehalt der 35S-*STKR1*-Linien. Eine Verbindung zwischen NAC-Transkriptionsfaktoren und der Energie-/Kohlenstoffmangelantwort konnte bereits durch die direkte Protein-Protein-Interaktion von ATAF1 mit SnRK1 α -Untereinheiten und der ATAF1-vermittelten Induktion von *TREHALASE1* (*TRE1*) gezeigt werden (Kleinow et al., 2009; Garapati et al., 2015). Die verzögerte Seneszenz der *STKR1*-Überexpressionslinien könnte in einen dominanten Effekt der induzierten negativen Seneszenz- gegenüber den induzierten positiven Seneszenzregulatoren begründet sein. So kann der Effekt von JUB1, WRKY54 und WRKY70 auf den Seneszenzverlauf stärker sein als der von positiven Regulatoren der Seneszenz, wie ANAC016. Um direkt durch *STKR1*-regulierte Gene zu identifizieren, sollten eine Chromatin Immunpräzipitation-Analyse mit den 35S-*STKR1*-Linien durchgeführt werden. Durch die mittels Microarray identifizierten potentiellen *STKR1*-Zielgene lassen sich die phänotypischen und physiologischen Auffälligkeiten der *STKR1*-überexprimierenden Linien erklären. So scheinen diese Pflanzen ihre energiereichen Assimilate primär in Abwehr- als in Wachstumsprozesse zu investieren. Dies macht eine Rolle von *STKR1* als negativen Wachstumsregulator, der primär in Abwehrprozesse involviert ist und durch AKIN10 reguliert wird, wahrscheinlich.

Auch wenn keine große Überlappung von *STKR1*-regulierten Genen mit SnRK1-Markergenen festgestellt werden konnte, spricht das nicht gegen eine Rolle von *STKR1* in der SnRK1-Signalweiterleitung. Die Tatsache, dass unter Mangelbedingungen (verlängerte Dunkelperiode) in den 35S-*STKR1*-Pflanzen mehr Gene als differentiell reguliert identifiziert wurden als unter Lichtbedingungen, untermauert die Annahme, dass *STKR1* während der Dunkelphase aktiviert wird. Die physische Interaktion mit der unter Mangelbedingungen aktivierten AKIN10 liefert dabei ein Indiz, dass die *STKR1*-Aktivierung sehr wahrscheinlich durch AKIN10 stattfindet. Es ist gut möglich, dass SnRK1 während biotischer Stresssituationen weitere bisher nicht als SnRK1-Markergene annotierte Gene reguliert.

5 Literaturverzeichnis

- Achard P, Genschik P** (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* **60**: 1085-1092
- Ahn CS, Han J-A, Lee H-S, Lee S, Pai H-S** (2011) The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *The Plant Cell* **23**: 185-209
- Allahverdiyeva Y, Battchikova N, Brosché M, Fujii H, Kangasjärvi S, Mulo P, Mähönen AP, Nieminen K, Overmyer K, Salojärvi J** (2015) Integration of photosynthesis, development and stress as an opportunity for plant biology. *New Phytologist* **208**: 647-655
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Amodeo GA, Rudolph MJ, Tong L** (2007) Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* **449**: 492-495
- Aon MA, Cortassa S** (1999) Quantitation of the effects of disruption of catabolite (de) repression genes on the cell cycle behavior of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current microbiology* **38**: 57-60
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT** (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* **25**: 25-29
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Iturriaga G** (2004) The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* **136**: 3649-3659
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G** (2006) Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC evolutionary biology* **6**: 109
- Baba K, Nakano T, Yamagishi K, Yoshida S** (2001) Involvement of a Nuclear-Encoded Basic Helix-Loop-Helix Protein in Transcription of the Light-Responsive Promoter *ofpsbD*. *Plant physiology* **125**: 595-603
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938-942
- Baena-González E, Sheen J** (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science* **13**: 474-482
- Banerjee A, Roychoudhury A** (2015) WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *The Scientific World Journal* **2015**
- Bartetzko V, Sonnewald S, Vogel F, Hartner K, Stadler R, Hammes UZ, Börnke F** (2009) The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 655-664
- Bateman A** (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in biochemical sciences* **22**: 12-13
- Bergmeyer HU, Gawehn K** (1970) Methoden der enzymatischen Analyse, Vol 432. Verlag Chemie Weinheim
- Bernsdorff F, Doring AC, Gruner K, Schuck S, Brautigam A, Zeier J** (2016) Pipecolic Acid Orchestrates Plant Systemic Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways. *Plant Cell* **28**: 102-129
- Besseau S, Li J, Palva ET** (2012) WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* **63**: 2667-2679
- Beugnet A, Wang X, Proud CG** (2003) Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 40717-40722

- Bhalerao RP, Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C** (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5322-5327
- Bitrian M, Roodbarkelari F, Horvath M, Koncz C** (2011) BAC-recombineering for studying plant gene regulation: developmental control and cellular localization of SnRK1 kinase subunits. *Plant J* **65**: 829-842
- Blazquez MA, Santos E, Flores CI, Martínez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C** (1998) Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant Journal* **13**: 685-689
- Boex-Fontvieille E, Daventure M, Jossier M, Zivy M, Hodges M, Tcherkez G** (2013) Photosynthetic control of Arabidopsis leaf cytoplasmic translation initiation by protein phosphorylation. *PLoS one* **8**: e70692
- Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS** (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 23977-23980
- Bolton MD** (2009) Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 487-497
- Bömer M, Uhrig J, Jach G, Müller K** (2011) Increased vegetative development and sturdiness of storekeeper-transgenic tobacco. *Open Life Sciences* **6**
- Booker KS, Schwarz J, Garrett MB, Jones AM** (2010) Glucose attenuation of auxin-mediated bimodality in lateral root formation is partly coupled by the heterotrimeric G protein complex. *PLoS One* **5**: e12833
- Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C** (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* **12**: 2383-2393
- Bradford KJ, Downie AB, Gee OH, Alvarado V, Yang H, Dahal P** (2003) Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiology* **132**: 1560-1576
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal* **42**: 567-585
- Bueso E, Munoz-Bertomeu J, Campos F, Brunaud V, Martinez L, Sayas E, Ballester P, Yenush L, Serrano R** (2014) ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN25 uncovers a role for Gibberellins in seed longevity. *Plant Physiol* **164**: 999-1010
- Buitink J, Thomas M, Gissot L, Leprince O** (2004) Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory β and γ subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment* **27**: 55-67
- Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG** (1989) Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry* **186**: 129-136
- Carling D, Thornton C, Woods A, Sanders MJ** (2012) AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *Biochemical Journal* **445**: 11-27
- Castermans D, Somers I, Kriel J, Louwet W, Wera S, Versele M, Janssens V, Thevelein JM** (2012) Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell research* **22**: 1058-1077
- Castro PH, Tavares RM, Bejarano ER, Azevedo H** (2012) SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**: 3269-3283

- Castro PH, Verde N, Lourenco T, Magalhaes AP, Tavares RM, Bejarano ER, Azevedo H** (2015) SIZ1-Dependent Post-Translational Modification by SUMO Modulates Sugar Signaling and Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **56**: 2297-2311
- Chandran D, Rickert J, Huang Y, Steinwand MA, Marr SK, Wildermuth MC** (2014) Atypical E2F transcriptional repressor DEL1 acts at the intersection of plant growth and immunity by controlling the hormone salicylic acid. *Cell host & microbe* **15**: 506-513
- Chandrashekarappa DG, McCartney RR, Schmidt MC** (2011) Subunit and domain requirements for adenylate-mediated protection of Snf1 kinase activation loop from dephosphorylation. *J Biol Chem* **286**: 44532-44541
- Chandrashekarappa DG, McCartney RR, Schmidt MC** (2013) Ligand binding to the AMP-activated protein kinase active site mediates protection of the activation loop from dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 89-98
- Chen J-G, Gao Y, Jones AM** (2006) Differential roles of Arabidopsis heterotrimeric G-protein subunits in modulating cell division in roots. *Plant Physiology* **141**: 887-897
- Chen J-G, Jones AM** (2004) AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods in enzymology* **389**: 338-350
- Chen L, Jiao Z-H, Zheng L-S, Zhang Y-Y, Xie S-T, Wang Z-X, Wu J-W** (2009) Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature* **459**: 1146-1149
- Chen L, Liao B, Qi H, Xie L-J, Huang L, Tan W-J, Zhai N, Yuan L-B, Zhou Y, Yu L-J** (2015) Autophagy contributes to regulation of the hypoxia response during submergence in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*: 00-00
- Chen L, Wang J, Zhang Y-Y, Yan SF, Neumann D, Schlattner U, Wang Z-X, Wu J-W** (2012) AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes. *Nature structural & molecular biology* **19**: 716-718
- Chen P-W, Chiang C-M, Tseng T-H, Yu S-M** (2006) Interaction between rice MYBGA and the gibberellin response element controls tissue-specific sugar sensitivity of α -amylase genes. *The Plant Cell* **18**: 2326-2340
- Chen X, Zhang Z, Visser RG, Broekgaarden C, Vosman B** (2013) Overexpression of *IRM1* enhances resistance to aphids in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **8**: e70914
- Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J** (2006) Overexpression of the regulator of G-protein signalling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **57**: 2101-2110
- Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J, Zhang J** (2006) The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiology* **140**: 302-310
- Chen Z, Huang J, Muttucumaru N, Powers SJ, Halford NG** (2013) Expression analysis of abscisic acid (ABA) and metabolic signalling factors in developing endosperm and embryo of barley. *Journal of cereal science* **58**: 255-262
- Cheng SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR** (2004) Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 15719-15722
- Chevalier F, Perazza D, Laporte F, Le Henanff G, Hornitschek P, Bonneville JM, Herzog M, Vachon G** (2008) GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**: 1142-1154
- Cho Y-H, Yoo S-D, Sheen J** (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* **127**: 579-589
- Cho YH, Hong JW, Kim EC, Yoo SD** (2012) Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiol* **158**: 1955-1964
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal* **16**: 735-743

- Coello P, Hirano E, Hey SJ, Muttucumaru N, Martinez-Barajas E, Parry MA, Halford NG** (2012) Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *J Exp Bot* **63**: 913-924
- Colaneri AC, Tunc-Ozdemir M, Huang JP, Jones AM** (2014) Growth attenuation under saline stress is mediated by the heterotrimeric G protein complex. *BMC Plant Biol* **14**: 129
- Cole C, Barber JD, Barton GJ** (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic acids research* **36**: W197-W201
- Confraria A, Martinho C, Elias A, Rubio-Somoza I, Baena-Gonzalez E** (2013) miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **4**: 197
- Coruzzi G, Bush DR** (2001) Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiology* **125**: 61-64
- Coruzzi GM, Zhou L** (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 247-253
- Crozet P, Jammes F, Valot B, Ambard-Bretteville F, Nessler S, Hodges M, Vidal J, Thomas M** (2010) Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 12071-12077
- Crozet P, Margalha L, Butowt R, Fernandes N, Elias CA, Orosa B, Tomanov K, Teige M, Bachmair A, Sadanandom A** (2016) SUMOylation represses SnRK1 signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal* **85**: 120-133
- Crozet P, Margalha L, Confraria A, Rodrigues Ar, Martinho Cu, Adamo M, Elias CA, Baena-González E** (2014) Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in Plant Science* **5**
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E** (1999) The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J* **18**: 215-222
- Curaba J, Herzog M, Vachon G** (2003) GeBP, the first member of a new gene family in Arabidopsis, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by KNAT1. *Plant J* **33**: 305-317
- Dai C, Xue HW** (2010) Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *The EMBO Journal* **29**: 1916-1927
- Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG** (1995) 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C α and native bovine protein phosphatase-2A C. *FEBS letters* **377**: 421-425
- Debast S, Nunes-Nesi A, Hajirezaei MR, Hofmann J, Sonnewald U, Fernie AR, Bornke F** (2011) Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiol* **156**: 1754-1771
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research* **13**: 4777-4788
- Delatte TL, Sedijani P, Kondou Y, Matsui M, de Jong GJ, Somsen GW, Wiese-Klinkenberg A, Primavesi LF, Paul MJ, Schluempmann H** (2011) Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiol* **157**: 160-174
- Delorge I, Figueroa CM, Feil R, Lunn JE, Van Dijck P** (2015) Trehalose-6-phosphate synthase 1 is not the only active TPS in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **466**: 283-290
- Deng X-W, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K, Colicelli J, Kato J-y, Naumann M, Segal D, Seeger M** (2000) Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends in Genetics* **16**: 202-203

- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolaï M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C** (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO reports* **8**: 864-870
- Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL** (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**: 851-865
- Dickinson JR, Cole D, Halford NG** (1999) A cell cycle role for a plant sucrose nonfermenting-1-related protein kinase (SnRK1) is indicated by expression in yeast. *Plant growth regulation* **28**: 169-174
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H** (2007) Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**: 453-456
- Dobrenel T, Marchive C, Sormani R, Moreau M, Mozzo M, Montané M-H, Menand B, Robaglia C, Meyer C** (2011) Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. *Biochemical Society Transactions* **39**: 477-481
- Durek P, Schmidt R, Heazlewood JL, Jones A, MacLean D, Nagel A, Kersten B, Schulze WX** (2009) PhosPhAt: the *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. *Nucleic acids research: gkp810*
- Eastmond PJ, Van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JD, Smeekens SC, Graham IA** (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *The Plant Journal* **29**: 225-235
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* **19**: 1349
- Elbein AD, Pan Y, Pastuszak I, Carroll D** (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**: 17R-27R
- Ellis C, Turner JG, Devoto A** (2002) Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Molecular Biology* **50**: 971-980
- Elrouby N, Coupland G** (2010) Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 17415-17420
- Emanuelle S, Hossain MI, Moller IE, Pedersen HL, Meene AM, Doblin MS, Koay A, Oakhill JS, Scott JW, Willats WG** (2015) SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *The Plant Journal* **82**: 183-192
- Eveland AL, Jackson DP** (2012) Sugars, signalling, and plant development. *J Exp Bot* **63**: 3367-3377
- Fan HY, Hu Y, Tudor M, Ma H** (1997) Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *The Plant Journal* **12**: 999-1010
- Farras R, Ferrando A, Jasik J, Kleinow T, Okresz L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C** (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J* **20**: 2742-2756
- Fields S, Song O-k** (1989) A novel genetic system to detect protein protein interactions.
- Figueiredo DD, Barros PM, Cordeiro AM, Serra TS, Lourenco T, Chander S, Oliveira MM, Saibo NJ** (2012) Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene *OsDREB1B*. *J Exp Bot* **63**: 3643-3656
- Fleet CM, Sun T-p** (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current opinion in plant biology* **8**: 77-85
- Flick JS, Johnston M** (1990) Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 4757-4769
- Fragoso S, Espindola L, Paez-Valencia J, Gamboa A, Camacho Y, Martinez-Barajas E, Coello P** (2009) SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in Arabidopsis plants under phosphate starvation. *Plant Physiol* **149**: 1906-1916
- Fu Y, Lim S, Urano D, Tunc-Ozdemir M, Phan NG, Elston TC, Jones AM** (2014) Reciprocal encoding of signal intensity and duration in a glucose-sensing circuit. *Cell* **156**: 1084-1095

- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. Annual review of plant biology **64**: 839-863
- Gao Q-M, Venugopal S, Navarre D, Kachroo A** (2011) Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. Plant physiology **155**: 464-476
- Gao QM, Venugopal S, Navarre D, Kachroo A** (2010) Low Oleic Acid-Derived Repression of Jasmonic Acid-Inducible Defense Responses Requires the WRKY50 and WRKY51 Proteins. Plant Physiology **155**: 464-476
- Garapati P, Xue GP, Munne-Bosch S, Balazadeh S** (2015) Transcription Factor ATAF1 in Arabidopsis Promotes Senescence by Direct Regulation of Key Chloroplast Maintenance and Senescence Transcriptional Cascades. Plant Physiol **168**: 1122-1139
- Garcia-Haro L, Garcia-Gimeno MA, Neumann D, Beullens M, Bollen M, Sanz P** (2010) The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 β cells. The FASEB Journal **24**: 5080-5091
- Gazzarrini S, McCourt P** (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology **4**: 387-391
- Geilen K, Bohmer M** (2015) Dynamic subnuclear relocalisation of WRKY40 in response to Abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. Sci Rep **5**: 13369
- Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J** (2011) The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. FEBS J **278**: 3978-3990
- Gibson SI** (2004) Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. Journal of experimental botany **55**: 253-264
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic acids research **20**: 1425
- Giraud E, Ng S, Carrie C, Duncan O, Low J, Lee CP, Van Aken O, Millar AH, Murcha M, Whelan J** (2010) TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell **22**: 3921-3934
- Gissot L, Polge C, Bouly J-P, Lemaitre T, Kreis M, Thomas M** (2004) AKIN β 3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic β -subunits. Plant molecular biology **56**: 747-759
- Gomez LD, Gilday A, Feil R, Lunn JE, Graham IA** (2010) AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. Plant J **64**: 1-13
- Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM** (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. The Plant Journal **53**: 814-827
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inze D** (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. Trends Plant Sci **17**: 332-340
- Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG** (2013) AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. Cell Metab **18**: 556-566
- Guerinier T, Millan L, Crozet P, Oury C, Rey F, Valot B, Mathieu C, Vidal J, Hodges M, Thomas M, Glab N** (2013) Phosphorylation of p27(KIP1) homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. Plant J **75**: 515-525
- Guo Y, Gan S** (2005) Leaf senescence: signals, execution, and regulation. Current topics in developmental biology **71**: 83-112
- Häffner E, Konietzki S, Diederichsen E** (2015) Keeping Control: The Role of Senescence and Development in Plant Pathogenesis and Defense. Plants **4**: 449-488
- Halford NG, Hey SJ** (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. Biochem J **419**: 247-259

- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MM, Smeekens S** (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *The Plant Journal* **53**: 935-949
- Hao L, Wang H, Sunter G, Bisaro DM** (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *The Plant Cell* **15**: 1034-1048
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K-i, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K** (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**: 177-189
- Hardie DG** (2007) AMPK and SNF1: snuffing out stress. *Cell metabolism* **6**: 339-340
- Hardie DG** (2011) AMPK and autophagy get connected. *The EMBO journal* **30**: 634-635
- Hardie DG** (2011) Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *The American journal of clinical nutrition* **93**: 891S-896S
- Hardie DG, Ashford ML** (2014) AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology* **29**: 99-107
- Hardie DG, Sakamoto K** (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology* **21**: 48-60
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ** (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816
- Harthill JE, Meek SE, Morrice N, Peggie MW, Borch J, Wong BH, Mackintosh C** (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J* **47**: 211-223
- Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR, Hardie DG** (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADA α / β and MO25 α / β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of biology* **2**: 28
- Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG** (1995) 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 27186-27191
- He Y, Gan S** (2004) A novel zinc-finger protein with a proline-rich domain mediates ABA-regulated seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **54**: 1-9
- Hedbacker K, Carlson M** (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **13**: 2408
- Hedbacker K, Townley R, Carlson M** (2004) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Molecular and cellular biology* **24**: 1836-1843
- Heitman J, Movva NR, Hiestand PC, Hall MN** (1991) FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 1948-1952
- Hoffman CS, Winston F** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272
- Höfgen R, Willmitzer L** (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic acids research* **16**: 9877
- Hong S-P, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M** (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 8839-8843
- Hong SY, Kim OK, Kim SG, Yang MS, Park CM** (2011) Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in Arabidopsis. *J Biol Chem* **286**: 1659-1668
- Hou X, Hu WW, Shen L, Lee LY, Tao Z, Han JH, Yu H** (2008) Global identification of DELLA target genes during Arabidopsis flower development. *Plant Physiol* **147**: 1126-1142

- Hou X, Liang Y, He X, Shen Y, Huang Z** (2013) A Novel ABA-Responsive *TaSRHP* Gene from Wheat Contributes to Enhanced Resistance to Salt Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**: 791-801
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P** (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics* **2008**
- Hu Y, Dong Q, Yu D** (2012) *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Science* **185**: 288-297
- Huang JP, Tunc-Ozdemir M, Chang Y, Jones AM** (2015) Cooperative control between AtRGS1 and AtHXK1 in a WD40-repeat protein pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **6**: 851
- Igarashi D, Ishida S, Fukazawa J, Takahashi Y** (2001) 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *The Plant Cell* **13**: 2483-2497
- Im JH, Cho YH, Kim GD, Kang GH, Hong JW, Yoo SD** (2014) Inverse modulation of the energy sensor Snf1-related protein kinase 1 on hypoxia adaptation and salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **37**: 2303-2312
- Inoki K, Kim J, Guan K-L** (2012) AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* **52**: 381-400
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L** (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* **17**: 1829-1834
- Inoki K, Zhu T, Guan K-L** (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577-590
- Itani SI, Saha AK, Kurowski TG, Coffin HR, Tornheim K, Ruderman NB** (2003) Glucose Autoregulates Its Uptake in Skeletal Muscle Involvement of AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes* **52**: 1635-1640
- Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y** (2014) Scaffold function of Ca²⁺-dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. *Plant Physiology*: pp. 114.236448
- Jain M, Li QB, Chourey PS** (2008) Cloning and expression analyses of sucrose non-fermenting-1-related kinase 1 (SnRK1b) gene during development of sorghum and maize endosperm and its implicated role in sugar-to-starch metabolic transition. *Physiologia plantarum* **134**: 161-173
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436
- Jamsheer KM, Laxmi A** (2014) DUF581 is plant specific FCS-like zinc finger involved in protein-protein interaction. *PLoS One* **9**: e99074
- Jamsheer KM, Mannully CT, Gopan N, Laxmi A** (2015) Comprehensive Evolutionary and Expression Analysis of FCS-Like Zinc finger Gene Family Yields Insights into Their Origin, Expansion and Divergence. *PLoS One* **10**: e0134328
- Jeong EY, Seo PJ, Woo JC, Park CM** (2015) AKIN10 delays flowering by inactivating IDD8 transcription factor through protein phosphorylation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* **15**: 110
- Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M** (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **59**: 316-328
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science* **7**: 193-195
- Kim C-Y, Vo KTX, An G, Jeon J-S** (2015) A rice sucrose non-fermenting-1 related protein kinase 1, OSK35, plays an important role in fungal and bacterial disease resistance. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **58**: 669-675
- Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM** (2003) GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* **11**: 895-904

- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L** (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* **13**: 132-141
- Kim Y-S, Sakuraba Y, Han S-H, Yoo S-C, Paek N-C** (2013) Mutation of the Arabidopsis NAC016 transcription factor delays leaf senescence. *Plant and Cell Physiology* **54**: 1660-1672
- Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino Ki, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K** (2003) A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes to cells* **8**: 65-79
- Kleinow T, Bhalerao R, Breuer F, Umeda M, Salchert K, Koncz C** (2000) Functional identification of an Arabidopsis *snf4* ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of *snf4* deficiency in yeast. *The Plant Journal* **23**: 115-122
- Kleinow T, Himbert S, Krenz B, Jeske H, Koncz C** (2009) NAC domain transcription factor ATAF1 interacts with SNF1-related kinases and silencing of its subfamily causes severe developmental defects in Arabidopsis. *Plant Science* **177**: 360-370
- Klopotowski T, Wiater A** (1965) Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Archives of biochemistry and biophysics* **112**: 562-566
- Koch K** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 235-246
- Koch KE** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **47**: 509-540
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P** (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11118-11123
- Kölling K, Thalmann M, Müller A, Jenny C, Zeeman SC** (2015) Carbon partitioning in *Arabidopsis thaliana* is a dynamic process controlled by the plants metabolic status and its circadian clock. *Plant, cell & environment* **38**: 1965-1979
- Kosugi S, Ohashi Y** (2002) DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *The Plant Journal* **30**: 337-348
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, Ohme-Takagi M** (2007) TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**: 473-484
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M** (2010) TCP transcription factors regulate the activities of *ASYMMETRIC LEAVES1* and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 3574-3588
- Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T** (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell metabolism* **6**: 55-68
- Kulma A, Villadsen D, Campbell DG, Meek SE, E Harthill J, Nielsen TH, MacKintosh C** (2004) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase. *The Plant Journal* **37**: 654-667
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S** (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot* **65**: 799-807
- Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW** (2008) Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* **20**: 152-167
- León P, Sheen J** (2003) Sugar and hormone connections. *Trends in plant science* **8**: 110-116
- Leyman B, Avonce N, Ramon M, Van Dijck P, Iturriaga G, Thevelein JM** (2006) Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. *J Biotechnol* **121**: 309-317

- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM** (2001) An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in plant science* **6**: 510-513
- Li J, Brader G, Kariola T, Tapio Palva E** (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal* **46**: 477-491
- Li J, Brader G, Palva ET** (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell* **16**: 319-331
- Li J, Krichevsky A, Vaidya M, Tzfira T, Citovsky V** (2005) Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 5733-5738
- Liang J, Shao SH, Xu Z-X, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL** (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature cell biology* **9**: 218-224
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382
- Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H** (2007) Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 115-136
- Lin CR, Lee KW, Chen CY, Hong YF, Chen JL, Lu CA, Chen KT, Ho TH, Yu SM** (2014) SnRK1A-interacting negative regulators modulate the nutrient starvation signaling sensor SnRK1 in source-sink communication in cereal seedlings under abiotic stress. *Plant Cell* **26**: 808-827
- Lin SS, Manchester JK, Gordon JI** (2003) Sip2, an N-myristoylated β subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 13390-13397
- Liu Y, Bassham DC** (2010) TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **5**: e11883
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical biochemistry* **163**: 16-20
- Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM** (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**: 322-328
- Lu CA, Lin CC, Lee KW, Chen JL, Huang LF, Ho SL, Liu HJ, Hsing YI, Yu SM** (2007) The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *Plant Cell* **19**: 2484-2499
- Lu QS, Dela Paz J, Pathmanathan A, Chiu RS, Tsai AYL, Gazzarrini S** (2010) The C-terminal domain of FUSCA3 negatively regulates mRNA and protein levels, and mediates sensitivity to the hormones abscisic acid and gibberellic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **64**: 100-113
- Lumbreras V, Albà MM, Kleinow T, Koncz C, Pagès M** (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO reports* **2**: 55-60
- Lunn JE** (2007) Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Functional Plant Biology* **34**: 550-563
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck P, Stitt M** (2014) Trehalose metabolism in plants. *Plant J* **79**: 544-567
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JH, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W-R, Carillo P, Hajirezaei M-R, Stitt M** (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **397**: 139-148
- Ma J, Hanssen M, Lundgren K, Hernández L, Delatte T, Ehlert A, Liu CM, Schlupepmann H, Dröge-Laser W, Moritz T** (2011) The sucrose-regulated *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism. *New Phytologist* **191**: 733-745

- Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DP** (2006) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* **18**: 477-490
- Mahmood K** (2014) Arabidopsis NAC Transcription Factors: Roles in natural and stress-induced senescence. Dissertation
- Mair A, Pedrotti L, Wurzinger B, Anrather D, Simeunovic A, Weiste C, Valerio C, Dietrich K, Kirchler T, Nagele T, Vicente Carbajosa J, Hanson J, Baena-Gonzalez E, Chaban C, Weckwerth W, Droge-Laser W, Teige M** (2015) SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *Elife* **4**
- Mao YS, Zhang B, Spector DL** (2011) Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends in Genetics* **27**: 295-306
- Martinez-Barajas E, Delatte T, Schluempmann H, de Jong GJ, Somsen GW, Nunes C, Primavesi LF, Coello P, Mitchell RA, Paul MJ** (2011) Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiol* **156**: 373-381
- Martins MC, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh D, Figueroa CM, Ivakov A, Yadav UP, Piques M, Metzner D, Stitt M, Lunn JE** (2013) Feedback inhibition of starch degradation in Arabidopsis leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol* **163**: 1142-1163
- Mayer FV, Heath R, Underwood E, Sanders MJ, Carmena D, McCartney RR, Leiper FC, Xiao B, Jing C, Walker PA, Haire LF, Ogrodowicz R, Martin SR, Schmidt MC, Gamblin SJ, Carling D** (2011) ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **14**: 707-714
- McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG** (2009) The glycogen-binding domain on the AMPK β subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell metabolism* **9**: 23-34
- McCartney RR, Schmidt MC** (2001) Regulation of Snf1 Kinase activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 36460-36466
- McCubrey JA, LaHair MM, Franklin RA** (2006) Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling* **8**: 1775-1789
- McKibbin RS, Muttucumar N, Paul MJ, Powers SJ, Burrell MM, Coates S, Purcell PC, Tiessen A, Geigenberger P, Halford NG** (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol J* **4**: 409-418
- Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C** (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 6422-6427
- Menand B, Meyer C, Robaglia C** (2004) Plant growth and the TOR pathway. *In TOR*. Springer, pp 97-113
- Miller G, Suzuki N, CIFTCI-YILMAZ S, Mittler R** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment* **33**: 453-467
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim Y-B, Lee A, Xue B, Mu J, Fougelle F, Ferré P, Birnbaum MJ** (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**: 569-574
- Minokoshi Y, Kim Y-B, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB** (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**: 339-343
- Mitchelhill KI, Michell BJ, House CM, Stapleton D, Dyck J, Gamble J, Ullrich C, Witters LA, Kemp BE** (1997) Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase β 1 subunit. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 24475-24479

- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336
- Moreno D, Viana R, Sanz P** (2009) Two-hybrid analysis identifies PSMD11, a non-ATPase subunit of the proteasome, as a novel interaction partner of AMP-activated protein kinase. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 2431-2439
- Muench DG, Zhang C, Dahodwala M** (2012) Control of cytoplasmic translation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **3**: 178-194
- Mülhardt C** (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, Vol 5. Springer
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A** (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology* **20**: 87-90
- Nakamura S, Mano S, Tanaka Y, Ohnishi M, Nakamori C, Araki M, Niwa T, Nishimura M, Kaminaka H, Nakagawa T** (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **74**: 1315-1319
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1819**: 97-103
- Nakata M, Mitsuda N, Herde M, Koo AJ, Moreno JE, Suzuki K, Howe GA, Ohme-Takagi M** (2013) A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1641-1656
- Nardoizzi JD, Lott K, Cingolani G** (2010) Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Communication and Signaling* **8**: 1
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring A-C, Zeier J** (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell* **24**: 5123-5141
- Nemeth K, Salchert K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kalman Z, Stankovic-Stangeland B, Bako L, Mathur J, Okresz L, Stabel S, Geigenberger P, Stitt M, Redei GP, Schell J, Koncz C** (1998) Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Genes Dev* **12**: 3059-3073
- Nietzsche M, Schießl I, Börnke F** (2014) The complex becomes more complex: protein-protein interactions of SnRK1 with DUF581 family proteins provide a framework for cell- and stimulus type-specific SnRK1 signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* **5**:54
- Nietzsche M, Landgraf, R., Tohge, T., Börnke, F.** (2016) A protein-protein interaction network linking the energy-sensor kinase SnRK1 to multiple signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Current Plant Biology*. **5**:36-44
- Nunes C, O'Hara LE, Primavesi LF, Delatte TL, Schluepmann H, Somsen GW, Silva AB, Fevereiro PS, Wingler A, Paul MJ** (2013) The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiol* **162**: 1720-1732
- Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ** (2013) Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol Biochem* **63**: 89-98
- O'Brien M, Kaplan-Levy RN, Quon T, Sappl PG, Smyth DR** (2015) PETAL LOSS, a trihelix transcription factor that represses growth in *Arabidopsis thaliana*, binds the energy-sensing SnRK1 kinase AKIN10. *J Exp Bot* **66**: 2475-2485
- O'Hara LE, Paul MJ, Wingler A** (2013) How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Mol Plant* **6**: 261-274
- Oakhill JS, Chen Z-P, Scott JW, Steel R, Castelli LA, Ling N, Macaulay SL, Kemp BE** (2010) β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress

- sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). Proceedings of the National Academy of Sciences **107**: 19237-19241
- Oakhill JS, Steel R, Chen Z-P, Scott JW, Ling N, Tam S, Kemp BE** (2011) AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. Science **332**: 1433-1435
- Oecking C, Jaspert N** (2009) Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. Current opinion in plant biology **12**: 760-765
- Pang T, Zhang Z-S, Gu M, Qiu B-Y, Yu L-F, Cao P-R, Shao W, Su M-B, Li J-Y, Nan F-J** (2008) Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells. Journal of Biological Chemistry **283**: 16051-16060
- Paul MJ** (2008) Trehalose 6-phosphate: a signal of sucrose status. Biochem J **412**: e1-2
- Paul MJ, Jhurreea D, Zhang Y, Primavesi LF, Delatte T, Schlupepmann H, Wingler A** (2010) Up-regulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. Plant signaling & behavior **5**: 386-392
- Paul MJ, Pellny TK** (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. Journal of experimental botany **54**: 539-547
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurreea D, Zhang Y** (2008) Trehalose metabolism and signaling. Annu Rev Plant Biol **59**: 417-441
- Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL** (2010) Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant physiology **152**: 1874-1888
- Perochon A, Jianguang J, Kahla A, Arunachalam C, Scofield SR, Bowden S, Wallington E, Doohan FM** (2015) TaFROG encodes a Pooideae orphan protein that interacts with SnRK1 and enhances resistance to the mycotoxigenic fungus *Fusarium graminearum*. Plant Physiol
- Piattoni CV, Bustos DM, Guerrero SA, Iglesias AA** (2011) Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated in wheat endosperm at serine-404 by an SNF1-related protein kinase allosterically inhibited by ribose-5-phosphate. Plant Physiol **156**: 1337-1350
- Pierre M, Traverso JA, Boisson B, Domenichini S, Bouchez D, Giglione C, Meinel T** (2007) N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. Plant Cell **19**: 2804-2821
- Pitzschke A, Djamei A, Teige M, Hirt H** (2009) VIP1 response elements mediate mitogen-activated protein kinase 3-induced stress gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences **106**: 18414-18419
- Polge C, Thomas M** (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? Trends Plant Sci **12**: 20-28
- Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A** (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. Planta **224**: 556-568
- Puranik S, Sahu PP, Srivastava PS, Prasad M** (2012) NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. Trends in plant science **17**: 369-381
- Purcell PC, Smith AM, Halford NG** (1998) Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. The Plant Journal **14**: 195-202
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN** (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. Plant J **18**: 111-119
- Qin Q, Wang W, Guo X, Yue J, Huang Y, Xu X, Li J, Hou S** (2014) Arabidopsis DELLA protein degradation is controlled by a type-one protein phosphatase, TOPP4. PLoS Genet **10**: e1004464
- Radchuk R, Emery RJ, Weier D, Vigeolas H, Geigenberger P, Lunn JE, Feil R, Weschke W, Weber H** (2010) Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. Plant J **61**: 324-338

- Radchuk R, Radchuk V, Weschke W, Borisjuk L, Weber H** (2006) Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol* **140**: 263-278
- Ramon M, De Smet I, Vandesteene L, Naudts M, Leyman B, Van Dijck P, Rolland F, Beeckman T, Thevelein JM** (2009) Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the Class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **32**: 1015-1032
- Ramon M, Rolland F, Sheen J** (2008) Sugar sensing and signaling. *Arabidopsis Book* **6**: e0117
- Ramon M, Ruelens P, Li Y, Sheen J, Geuten K, Rolland F** (2013) The hybrid four-CBS-domain KINbetagamma subunit functions as the canonical gamma subunit of the plant energy sensor SnRK1. *Plant J* **75**: 11-25
- Rasse DP, Tocquin P** (2006) Leaf carbohydrate controls over *Arabidopsis* growth and response to elevated CO₂: an experimentally based model. *New Phytologist* **172**: 500-513
- Ravnskjaer K, Boergesen M, Dalgaard LT, Mandrup S** (2006) Glucose-induced repression of PPAR α gene expression in pancreatic β -cells involves PP2A activation and AMPK inactivation. *Journal of molecular endocrinology* **36**: 289-299
- Reuber TL, Ausubel FM** (1996) Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes. *The Plant Cell* **8**: 241-249
- Rienties IM, Vink J, Borst JW, Russinova E, de Vries SC** (2005) The *Arabidopsis* SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14 λ and the PP2C phosphatase KAPP. *Planta* **221**: 394-405
- Rieu I, Powers SJ** (2009) Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. *The Plant Cell* **21**: 1031-1033
- Robaglia C, Thomas M, Meyer C** (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 301-307
- Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi A, Lumberras V, Gonzalez-Guzman M, Antoni R, Rodriguez PL, Baena-Gonzalez E** (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 3871-3884
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675-709
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* **14 Suppl**: S185-205
- Rubio T, Vernia S, Sanz P** (2013) Sumoylation of AMPK β 2 subunit enhances AMP-activated protein kinase activity. *Molecular biology of the cell* **24**: 1801-1811
- Ruiz A, Xu X, Carlson M** (2011) Roles of two protein phosphatases, Reg1-Glc7 and Sit4, and glycogen synthesis in regulation of SNF1 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 6349-6354
- Ruiz A, Xu X, Carlson M** (2013) Ptc1 protein phosphatase 2C contributes to glucose regulation of SNF1/AMP-activated protein kinase (AMPK) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 31052-31058
- Ruppel NJ, Logsdon CA, Whippo CW, Inoue K, Hangarter RP** (2011) A mutation in *Arabidopsis* seedling plastid development1 affects plastid differentiation in embryo-derived tissues during seedling growth. *Plant Physiol* **155**: 342-353
- Sakuraba Y, Han S-H, Lee S-H, Hörtensteiner S, Paek N-C** (2016) *Arabidopsis* NAC016 promotes chlorophyll breakdown by directly upregulating *STAYGREEN1* transcription. *Plant cell reports* **35**: 155-166
- Saleh A, Withers J, Mohan R, Marqués J, Gu Y, Yan S, Zavaliev R, Nomoto M, Tada Y, Dong X** (2015) Posttranslational Modifications of the Master Transcriptional Regulator NPR1 Enable Dynamic but Tight Control of Plant Immune Responses. *Cell host & microbe* **18**: 169-182

- Schepetilnikov M, Kobayashi K, Geldreich A, Caranta C, Robaglia C, Keller M, Ryabova LA** (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J* **30**: 1343-1356
- Schiestl RH, Gietz RD** (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current genetics* **16**: 339-346
- Schluepmann H, Berke L, Sanchez-Perez GF** (2012) Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *J Exp Bot* **63**: 3379-3390
- Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M** (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 6849-6854
- Schluepmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M, Smeekens S** (2004) Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* **135**: 879-890
- Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT** (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12935-12940
- Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, Ntoukakis V, Sklenar J, Jones A, Zipfel C** (2011) Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genet* **7**: e1002046
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG** (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *The Journal of clinical investigation* **113**: 274-284
- Shah J, Zeier J** (2014) Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Induced plant responses to microbes and insects*: 23
- Sheen J** (2014) Master regulators in plant glucose signaling networks. *Journal of Plant Biology* **57**: 67-79
- Shen W, Reyes MI, Hanley-Bowdoin L** (2009) *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol* **150**: 996-1005
- Short JD, Dere R, Houston KD, Cai SL, Kim J, Bergeron JM, Shen J, Liang J, Bedford MT, Mills GB** (2010) AMPK-mediated phosphorylation of murine p27 at T197 promotes binding of 14-3-3 proteins and increases p27 stability. *Molecular carcinogenesis* **49**: 429-439
- Short JD, Houston KD, Dere R, Cai S-L, Kim J, Johnson CL, Broaddus RR, Shen J, Miyamoto S, Tamanoi F** (2008) AMP-activated protein kinase signaling results in cytoplasmic sequestration of p27. *Cancer research* **68**: 6496-6506
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009) The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli. *Science Signaling* **2(84)**: ra45
- Simpson-Lavy KJ, Johnston M** (2013) SUMOylation regulates the SNF1 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 17432-17437
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F** (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 274-279
- Smith AM, Stitt M** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, cell & environment* **30**: 1126-1149
- Stall R, Bartz J, Cook A** (1974) Decreased hypersensitivity to xanthomonads in pepper after inoculations with virulent cells of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* **64**: 731-735
- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D** (2000) The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochemical Journal* **345**: 437-443
- Stratmann JW, Gusmaroli G** (2012) Many jobs for one good cop—The COP9 signalosome guards development and defense. *Plant science* **185**: 50-64

- Street NR, Sjodin A, Bylesjo M, Gustafsson P, Trygg J, Jansson S** (2008) A cross-species transcriptomics approach to identify genes involved in leaf development. *BMC Genomics* **9**: 589
- Struhl K, Davis RW** (1977) Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia coli*: cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole-glycerolphosphate dehydratase (his3). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5255-5259
- Sugden C, Crawford RM, Halford NG, Hardie DG** (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *The Plant Journal* **19**: 433-439
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG** (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiology* **120**: 257-274
- Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D** (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 32207-32216
- Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD** (2011) The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**: 3761-3779
- Suzuki T, Sakurai K, Ueguchi C, Mizuno T** (2001) Two Types of Putative Nuclear Factors that physically Interact with Histidine-Containing Phosphotransfer (Hpt) Domains, Signaling Mediators in His-to-Asp Phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **42**: 37-45
- Swatek KN, Wilson RS, Ahsan N, Tritz RL, Thelen JJ** (2014) Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium-dependent protein kinases. *Biochemical Journal* **459**: 15-25
- Szczesny R, Buttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U** (2010) Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol* **187**: 1058-1074
- Takatsuka H, Ohno R, Umeda M** (2009) The Arabidopsis cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF; 1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *The Plant Journal* **59**: 475-487
- Tan QK, Irish VF** (2006) The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. *Plant Physiol* **140**: 1095-1108
- Temple BR, Jones AM** (2007) The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 249-266
- Thelander M, Olsson T, Ronne H** (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J* **23**: 1900-1910
- Thompson-Jaeger S, Francois J, Gaughran JP, Tatchell K** (1991) Deletion of SNF1 affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics* **129**: 697-706
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P** (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal* **35**: 490-500
- Toroser D, Plaut Z, Huber SC** (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiology* **123**: 403-412
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in Arabidopsis. *Plant J* **49**: 46-63

- Tsai AY, Gazzarrini S** (2012) AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. *Plant J* **69**: 809-821
- Tsai AY, Gazzarrini S** (2012) Overlapping and distinct roles of AKIN10 and FUSCA3 in ABA and sugar signaling during seed germination. *Plant Signal Behav* **7**: 1238-1242
- Tsai AY, Gazzarrini S** (2014) Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front Plant Sci* **5**: 119
- Tsuchiya T, Eulgem T** (2010) The Arabidopsis defense component EDM2 affects the floral transition in an FLC-dependent manner. *The Plant Journal* **62**: 518-528
- Tsugama D, Liu S, Takano T** (2012) A bZIP protein, VIP1, is a regulator of osmosensory signaling in Arabidopsis. *Plant physiology* **159**: 144-155
- Tsugama D, Liu S, Takano T** (2014) Analysis of functions of VIP1 and its close homologs in osmosensory responses of *Arabidopsis thaliana*. *PloS one* **9**: e103930
- Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V** (2001) VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with Agrobacterium VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and Agrobacterium infectivity. *The EMBO Journal* **20**: 3596-3607
- Ülker B, Somssich IE** (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current opinion in plant biology* **7**: 491-498
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA** (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* **35**: W71-W74
- Urano D, Phan N, Jones JC, Yang J, Huang J, Grigston J, Taylor JP, Jones AM** (2012) Endocytosis of the seven-transmembrane RGS1 protein activates G-protein-coupled signalling in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* **14**: 1079-1088
- Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H** (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* **26**: 663-674
- Üstün S, Bartetzko V, Börnke F** (2013) The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. *PLoS Pathog* **9**: e1003427
- van Dijken AJ, Schlupepmann H, Smeekens SC** (2004) Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol* **135**: 969-977
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort R, Schell J** (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**: 169-170
- Vandesteene L, Lopez-Galvis L, Vanneste K, Feil R, Maere S, Lammens W, Rolland F, Lunn JE, Avonce N, Beeckman T, Van Dijck P** (2012) Expansive evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* **160**: 884-896
- Villarejo MR, Zabin I** (1974) β -Galactosidase from termination and deletion mutant strains. *Journal of bacteriology* **120**: 466-474
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* **40**: 428-438
- Wang F, Zhu D, Huang X, Li S, Gong Y, Yao Q, Fu X, Fan L-M, Deng XW** (2009) Biochemical insights on degradation of Arabidopsis DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *The Plant Cell* **21**: 2378-2390
- Warden SM, Richardson C, O'DONNELL J, Stapleton D, WITTERS LA** (2001) Post-translational modifications of the β -1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochemical Journal* **354**: 275-283
- Wei N, Chamovitz DA, Deng X-W** (1994) Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* **78**: 117-124
- Weraduwage SM, Chen J, Anozie FC, Morales A, Weise SE, Sharkey TD** (2015) The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* **6**

- Wiatrowski HA, Van Denderen BJ, Berkey CD, Kemp BE, Stapleton D, Carlson M** (2004) Mutations in the Gal83 glycogen-binding domain activate the Snf1/Gal83 kinase pathway by a glycogen-independent mechanism. *Molecular and cellular biology* **24**: 352-361
- Williams SP, Rangarajan P, Donahue JL, Hess JE, Gillaspay GE** (2014) Regulation of Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **5**: 324
- Wilson MA, Koutelou E, Hirsch C, Akdemir K, Schibler A, Barton MC, Dent SY** (2011) Ubp8 and SAGA regulate Snf1 AMP kinase activity. *Mol Cell Biol* **31**: 3126-3135
- Wilson WA, Hawley SA, Hardie DG** (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP: ATP ratio. *Current Biology* **6**: 1426-1434
- Wingler A, Delatte TL, O'Hara LE, Primavesi LF, Jhurrea D, Paul MJ, Schluempmann H** (2012) Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiol* **158**: 1241-1251
- Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM** (2009) Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of experimental botany* **60**: 1063-1066
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D** (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology* **13**: 2004-2008
- Wu A, Allu AD, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanol M-I, Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S, Antonio C, Tohge T** (2012) JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 482-506
- Wu L, Birch RG** (2010) Physiological basis for enhanced sucrose accumulation in an engineered sugarcane cell line. *Functional Plant Biology* **37**: 1161-1174
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN** (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484
- Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT** (2007) Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* **449**: 496-500
- Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, Jing C, Walker PA, Eccleston JF, Haire LF** (2011) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **472**: 230-233
- Xiong Y, Sheen J** (2012) Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J Biol Chem* **287**: 2836-2842
- Xiong Y, Sheen J** (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol* **164**: 499-512
- Yadav UP, Ivakov A, Feil R, Duan GY, Walther D, Giavalisco P, Piques M, Carillo P, Hubberten HM, Stitt M, Lunn JE** (2014) The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *J Exp Bot* **65**: 1051-1068
- Yang HL, Liu YJ, Wang CL, Zeng QY** (2012) Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *PLoS One* **7**: e42438
- Yu S-M** (1999) Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiology* **121**: 687-693
- Yu S-M, Lee Y-C, Fang S-C, Chan M-T, Hwa S-F, Liu L-F** (1996) Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of α -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. *Plant molecular biology* **30**: 1277-1289
- Zhang B, Liu K, Zheng Y, Wang Y, Wang J, Liao H** (2013) Disruption of *AtWINK8* enhances tolerance of *Arabidopsis* to salt and osmotic stresses via modulating proline content and activities of catalase and peroxidase. *International journal of molecular sciences* **14**: 7032-7047

Literaturverzeichnis

- Zhang L, Wei Q, Wu W, Cheng Y, Hu G, Hu F, Sun Y, Zhu Y, Sakamoto W, Huang J** (2009) Activation of the heterotrimeric G protein α -subunit GPA1 suppresses the ftsh-mediated inhibition of chloroplast development in Arabidopsis. *The Plant Journal* **58**: 1041-1053
- Zhang Y-L, Guo H, Zhang C-S, Lin S-Y, Yin Z, Peng Y, Luo H, Shi Y, Lian G, Zhang C** (2013) AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell metabolism* **18**: 546-555
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RA, Powers SJ, Schluemann H, Delatte T, Winkler A, Paul MJ** (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol* **149**: 1860-1871
- Zhang Y, Shewry PR, Jones H, Barcelo P, Lazzeri PA, Halford NG** (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *The Plant Journal* **28**: 431-441
- Zourelidou M, Torres-Zabala D, Smith C, Bevan MW** (2002) Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *The Plant Journal* **30**: 489-497

6 Anhang

6.1 Oligonukleotide

Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen und T-DNA Verifizierung:

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
AKIN10 Fw	CACCAACAAAATGTTCAAACGAGTAGATGAGTTTA	AKIN10 (AT3G01090) mit ATG/ohne Stoppcodon
AKIN10 Rv	GAGGACTCGGAGCTGAGCAAGAAAAGC	
AKIN11 Fw	CACCAACAAAATGGATCATTATCAAAATAGATTTG	AKIN11 (AT3G29160) mit ATG/ohne Stoppcodon
AKIN11 Rv	GATCACACGAAGCTCTGTAAGAAACC	
MN119	CACCAACAAAGATCATTATC	AKIN11 (AT3G29160) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN120	TCAGATCACACGAAGCTC	
MN125	CACCAACAAAGAGATTGCAAGTC	ATHB21/ZHD3 (AT2G02540) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN126	CTAAGGATTAGTAGAAGC	
MN127	CACCAACAAAACCTCTACAATAAC	ATHB23/ZHD10 (AT5G39760) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN128	TCACGACGACGATGATCC	
MN134	CACCAACAAAGTACTCCGAAGC	STKR1 (AT4G00270) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN135	CTAACTATCATTAGCTGCCTC	
MN136	CACCAACAAAGCACCAGATAACG	TCP3 (AT1G53230) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN137	TTAATGGCGAGAATCGG	
MN150	CCCGGGAACAATGGTACTCCG	STKR1 (AT4G00270) mit ATG/ohne Stoppcodon (<i>Xma</i> I)
MN151	CCCGGGAACTATCATTAGC	
MN154	CACCAACAAATTTCTGTGATAGTTTTTTG	GRIK2/SNAK1 (AT5G60550) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN155	TTAGTTAGGATCTGAGGTTTCAGAGATCC	
MN156	CACCAACAAAAATATCGTCTCTTGG	TCP13 (AT3G02150) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN157	TCACATATGGTGATCACTTCCTCTA	
MN160	CACCAACAAATTCAAACGAGTAGATGAG	AKIN10 (AT3G01090) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN161	TCAGAGGACTCGGAGCTGAGCAAG	
MN162	CACCAACAAAGTACTCCGAAGCAG	GPL1 (AT2G25650) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN163	CTAACTATCATTAGCTGCCTCTGCA	
MN166	CACCAACAAAGTTGGTACGAAGAGAG	GPL3 (AT2G36340) ohne ATG/mit Stoppcodon
MN167	TCAAGGAGAACTCCTAAGTTTGC	
DUF581-1 Fw	CACCAACAAAATGGTGGTTCCAGGTAAAACTCC	AT1G19200 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-1 Rv	TATAAGGAATATCCGGGGGAGGCAAT	
DUF581-2 Fw	CACCAACAAAATGTTGCTAGGGAAGAGACAGAGA	AT1G22160 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-2 Rv	CACGGCGGCGGAAACTCTCTCTCCT	
DUF581-3 Fw	CACCAACAAAATGACTAAAATCTCTGTTGGATTG	AT1G53885 mit ATG / ohne Stoppcodon
DUF581-3 Rv	AGGAACTATAAATAATTGACGTCC	
DUF581-4 Fw	CACCAACAAAATGACTAAAATCTCTGTTGG	AT1G53903 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-4 Rv	AGGAACTATAAATAATTGACGTCC	
DUF581-5 Fw	CACCAACAAAATGATACTAAGCAAGAGACCT	AT1G74940 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-5 Rv	AAATACGAATACTCCGGCAGATAATC	
DUF581-6 Fw	CACCAACAAAATGTTGCTTGAAAGAGACAAC	AT1G78020 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-6 Rv	CACGGCGGCTGCAGCTCTCCCTTTG	

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
DUF581-7 Fw	CACCAACAAAATGGGTGAGGCAAGTGATTCAGA	AT1G79970 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-7 Rv	CGGGTTAAGAGGCATTGCCA	
DUF581-8 Fw	CACCAACAAAATGCTGAAGACAAGAGCAATG	AT2G25690 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-8 Rv	GAAGAGCTTCTTTAAAGATTCA	
DUF581-9 Fw	CACCAACAAAATGGCTTCGTATTACTCT	AT2G44670 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-9 Rv	AGCCACGACGAGAGTTCCTG	
DUF581-10 Fw	CACCAACAAAATGCTAAAGAAGAGATCAAG	AT3G22550 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-10 Rv	TTTAGTATCATTTTCCTCTG	
DUF581-11 Fw	CACCAACAAAATGGCGAATATAATGATTCC	AT3G63230 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-11 Rv	GAAAACACACTTGTACATCAAATTC	
DUF581-12 Fw	CACCAACAAAATGGAGTTTTCGATGAGAAAAG	AT4G17670 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-12 Rv	GGCAGCAGCAACAGTTCAGTG	
DUF581-13 Fw	CACCAACAAAATGTTGTTAGGGAATCGACC	AT4G39795 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-13 Rv	TTTTGAAGGTGATAGTACGAC	
DUF581-14 Fw	CACCAACAAAATGTCTCAGCATTCCAATATC	AT5G11460 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-14 Rv	GCCCACGGTGAAGAACACACC	
DUF581-15 Fw	CACCAACAAAATGCTTACTAAAAGAACCC	AT5G20700 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-15 Rv	AGTCACTAGAACTCCGGTGG	
DUF581-16 Fw	CACCAACAAAATGGAGCTTTCATCGAGAAAAG	AT5G47060 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-16 Rv	AGCAGCAGCAACAGTTCATTG	
DUF581-17 Fw	CACCAACAAAATGGTGGGACTAAGTATTGT	AT5G49120 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-17 Rv	GTAAGCGAAACCGCCTGCTTG	
DUF581-18 Fw	CACCAACAAAATGGTGTAGGAAAGCGTCA	AT5G65040 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-18 Rv	AATACGAATTGGTTTCTTCGATG	
DUF581-19 Fw	CACCAACAAAATGCTTAGAAACAAACC	AT3G63210 mit ATG/ ohne Stoppcodon
DUF581-19 Rv	GGTCTCCATTTGATCAAGAAGC	
DUF581_1 Domain Fw	CACCAACAAATTTCTAACTTCTTGTTGC	DUF581 Domäne von DUF581-1 (AT1G19200)
DUF581_1 Domain Rv	TCACTCTTTTAACTATCCTCC	
DUF581-18 _{ΔC} Rv	ACTAGCCATCACCACCATCGG	DUF581-18 (AT5G65040) ohne DUF581 Domäne
GAI/RGA2 Fw	CACCATGAAGAGAGATCATCATCA-	AT1G14920 mit ATG/ ohne Stoppcodon
GAI/RGA2 Rv	ATTGGTGGAGAGTTTCCAAGCCG	
RGA Fw	CACCATGAAGAGAGATCATCACCAATTCC	AT2G01570 mit ATG/ ohne Stoppcodon
RGA Rv	TCAGTACGCCGCCGTCGAGAGTTTCC	
RGL1 Fw	CACCATGAAGAGAGAGCACCAACCACC	AT1G66350 mit ATG/ ohne Stoppcodon
RGL1 Rv	TTATTCCACACGATTGATTCGCCACG	
RGL2 Fw	CACCATGAAGAGAGGATACGGAGAAAC	AT3G03450 mit ATG/ ohne Stoppcodon
RGL2 Rv	TCAGGCGAGTTTCCACGCCGAGGTTG	
RGL3 Fw	CACCATGAAACGAAGCCATCAAGAAACG	AT5G17490 mit ATG/ ohne Stoppcodon
RGL3 Rv	CTACCGCCGCAACTCCGCCGCTAG	
SAMS Fw	AATTCCACATGCGCAGTGCCATGAGCGGCCTGCATCTGG TTAAGCGTCGTTGAG	SAMS-Peptid über <i>EcoRI/SalI</i>
SAMS Rv	TCGACTCAACGACGCTTAACCAGATGCAGGCCGCTCATG GCACTGCCGATGTGG	
STKR1 LP	TTGAGAAAAGTATGGCCAAGTG	Linker genomischer Primer (AT4G00270)

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
STKR1 RP	AAGCTTGGCGGAAAATCTAAG	Rechter genomischer Primer (AT4G00270)
LBB1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Left Border Primer der SALK T-DNA Insertion
Ubi Fw	ATGCAGATYTTTGTGAAGAC	<i>Ubiquitin</i> für RT-PCR
Ubi Rv	ACCACCACGRAGACGGAG	(Expressionskontrolle)

Primer für Substitutionen durch ortsgerichtete Mutagenese:

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
MN168	GGAAAACCGGACTAACGAGGCAGGGGAGGAGATGTTGAAG	STKR1 _{S184A} (AT4G00270)
MN169	CTTCAACATCTCCTCCCCTGCCTCGTTAGTCCGGTTTTCC	
MN187	GGTACCCTCTCCCATCGAAGAGCTCCACGGAATATTCCTTCC	STKR1 _{S27A} (AT4G00270)
MN188	GGAAGGAATATCCGTGGAGCTCTTCGATGGGAGAGGGTACC	
DUF581-9 _{C47S} Fw	GACAAGGCTTTTTGTAGCAACGAGTCTAGAGAAGAACAGATTG AATCT	DUF581-9 _{C47S} (AT2G44670)
DUF581-9 _{C47S} Rv	AGATTCAATCTGTTCTTCTCTAGACTCGTTGCTACAAAAGCCT TGTC	
DUF581-18 _{C88S} Fw	AACAACGCATTTTGTAGCTTAGAATCCAGGGAGAAGCAAATTA GCTG	DUF581-18 _{C88S} (AT5G65040)
DUF581-18 _{C88S} Rv	CAGCTTAATTTGCTTCTCCCTGGATTCTAAGCTACAAAATGCGT TGTT	
MN181	GGACATAAGGTTGCTATCCGGATCCTCAATCGTCGCAAATC	AKIN10 _{K48R} (AT3G01090)
MN182	GATTTTGCACGATTGAGGATCCGGATAGCAACCTTATGTCC	

Verwendete Oligonukleotide für quantitative *Real-Time*-PCR:

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
MNq19	GCACAGTGACAAATCCGGAAC	TPS8 (AT1G70290)
MNq20	GCTTGGTTTTCTTCCAACCG	
MNq23	CCCTTTGTAGCAGACGAAGTTGGCA	<i>KINβ1</i> (AT5G21170)
MNq24	CAGGTGATGGTGGCGCCTCA	
MNq25	AAACCGAGCAAAGCCAAATACT	TPS10 (AT1G60140)
MNq26	CTTGAAGCAACTTCACCACGTC	
MNq27	TGATGTGCAACGCGGGGCAT	<i>ASN1</i> (AT3G47340)
MNq28	CCACGGTGGCACCTCCAGGA	
MNq29	AAACGCTTTCTTGGCTCAA	<i>UGD2</i> (AT3G29360)
MNq32	TTAGCAAGCTGACACCATCA	
MNq33	TGCTGGAAGATTACCTGGTCCG	<i>PAP1/MYB75</i> (AT1G56650)
MNq34	AGTGCCGGTGTGTAGGAATG	
MNq35	GGAGCTGTGACCCCTATCAA	<i>SAG12</i> (AT5G45890)
MNq36	TATCCATTAACCGCCTTCG	
MNq37	CATCGAAGATCTCCACGGAATAT	<i>STKR1</i> (AT4G00270)
MNq38	CCGAGGAAACTACAAAACGCA	
SUE400	TTCTTCCCTCGAAAGCTCAA	<i>PR1</i> (AT2G14610)
SUE401	CATGGGACCTACGCCTACC	
SUE402	GTGCAAGATCCTACCTTCCCAGC	<i>ALD1</i> (AT2G13810)
SUE403	CGGTCCTTGGGGTCATAGCCAGA	
SUE404	CTTTCCGAACTTGGCTTGAG	<i>FMO1</i> (AT1G19250)
SUE405	AAGTTGAGCTGCTTTGGAC	
ANAC016 fw	TCGATCCTTCTGAATTGCCTGGTC	<i>ANAC016</i>

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
ANAC016 rv	TCGCCTTCCAATAACCAGTTGCAG	(AT1G34180)
ANAC087 fw	AAATCTGCAAGGGACGAATGGG	ANAC087 (AT5G18270)
ANAC087 rv	TCGTCATTGGTTGGGTTGTGGTAG	
UBC9 fw	TGGATCGTGGGATTTTGGAAATGCC	UBC9 (At4g27960)
UBC9 rv	GCAACGGGTCCTGCGCTACAT	

6.2 Verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz in Bakterien	Verwendung	Hersteller/Referenz
pENTR™/D-TOPO®	Kan ^R	„Entry“-Vektor für Gateway®-Klonierung; Gateway (GW)	Invitrogen™, Karlsruhe
pCR-Blunt	Kan ^R	Klonierungsvektor	Invitrogen™, Karlsruhe
pGEM®-TEasy	Amp ^R	Klonierungsvektor	Promega GmbH, Mannheim
pMAL-c2	Amp ^R	N-terminaler MBP- <i>tag</i> ; Aufreinigung	Invitrogen™, Karlsruhe
pMAL-c2-GW	Amp ^R	N-terminaler MBP- <i>tag</i> ; Aufreinigung	Invitrogen™, Karlsruhe
pRB-35S-3xmyc	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor; C-terminaler 3-fach myc- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanzen	(Bartetzko et al., 2009)
pDEST15	Amp ^R	N-terminaler GST- <i>tag</i> ; Aufreinigung	Invitrogen™, Karlsruhe
pRB-35S-GW-3xmyc	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor; C-terminaler 3-fach myc- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanzen	(Bartetzko et al., 2009)
pRB-35S-GW-mCherry	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor; C-terminaler mCherry- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanzen	(Üstün et al., 2013)
pGWB614	Spec ^R	binärer Vektor; C-terminaler 3-fach HA- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanzen	(Nakamura et al., 2010)
pK7WGF2	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor; N-terminaler GFP- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanzen	(Karimi et al., 2002)
pK7FWG2	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor; C-terminaler GFP- <i>tag</i> ; konstitutive Expression in Pflanzen	(Karimi et al., 2002)
pRB-35S-N-VENUS ^{N173} -GW	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	(Nietzsche et al., 2014)
pRB-35S-N-VENUS ^{C155} -GW	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	(Nietzsche et al., 2014)
pRB-35S-GW-C-VENUS ^{N173}	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	(Nietzsche et al., 2014)
pRB-35S-GW-C-VENUS ^{C155}	Spec ^R , Strep ^R	binärer Vektor, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	(Nietzsche et al., 2014)
pGBT9	Amp ^R	N-terminale GAL4-Bindedomäne; Köderplasmid für Hefe-Zwei-Hybrid-System	Clontech, Mountain View, USA
pAD424	Amp ^R	N-terminale GAL4-Aktivierungsdomäne; Beuteplasmid für Hefe-Zwei-Hybrid-System	Clontech, Mountain View, USA
pGBT9-GW	Amp ^R	N-terminale GAL4-Bindedomäne; Köderplasmid für Hefe-Zwei-Hybrid-System	Clontech, Mountain View, USA
pAD424-GW	Amp ^R	N-terminale GAL4-Aktivierungsdomäne; Beuteplasmid für Hefe-Zwei-Hybrid-System	Clontech, Mountain View, USA

^R Antibiotikaresistenz

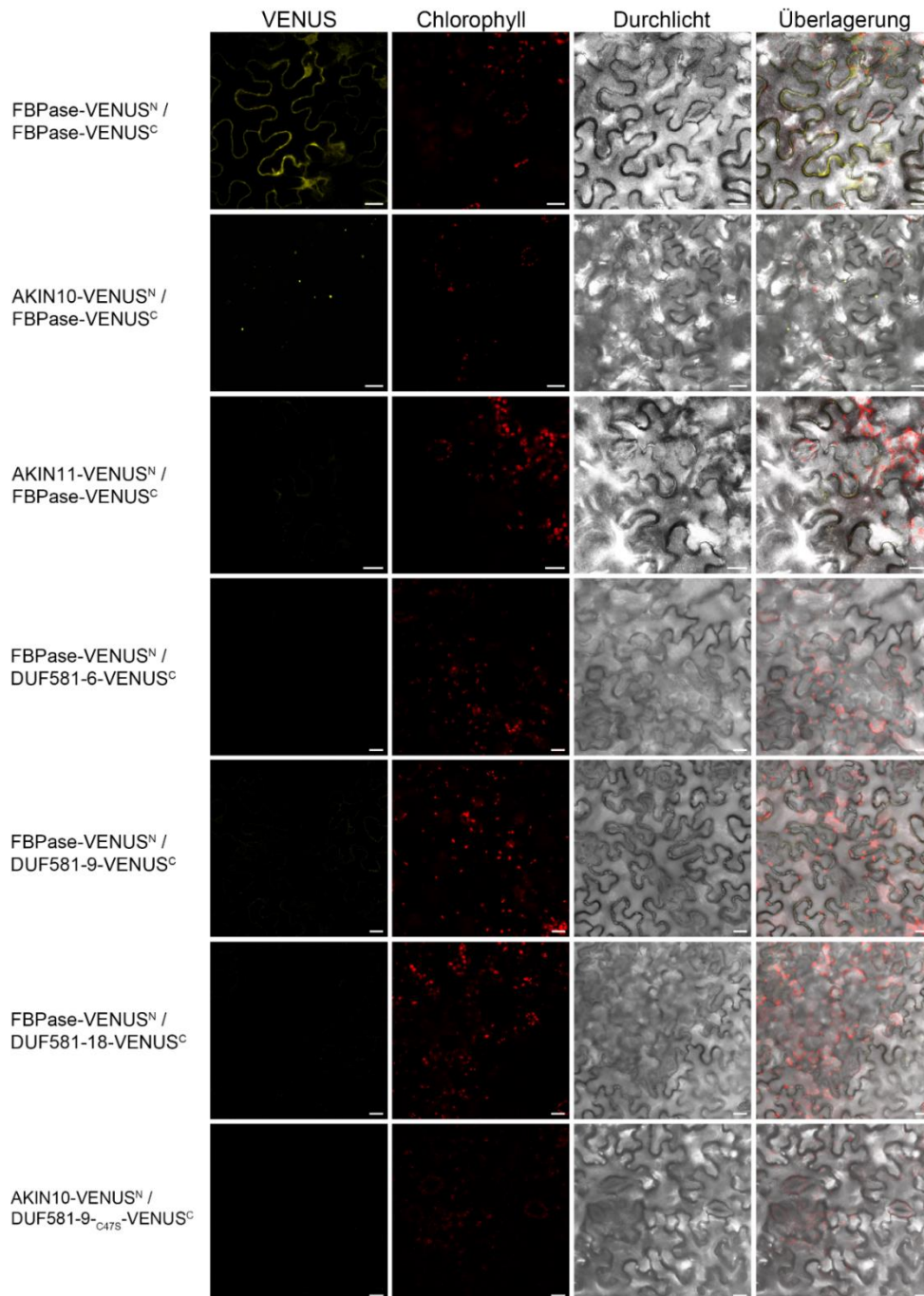


Abbildung 6.1: BiFC-Kontrollen zur Interaktion von AKIN10/AKIN11 mit DUF581-Proteinen. Gezeigt sind konfokale Mikroskopaufnahmen von *N. benthamiana* Blatt-Epidermiszellen, welche die angegebenen Konstruktkombinationen transient exprimieren. Die Kombination FBPase-VENUS^N und FBPase-VENUS^C wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die übrigen Kombinationen sind Negativkontrollen, die dem Ausschluss unspezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen. Gelb: Interaktion der beiden YFP-Hälften und somit der getesteten Proteine. Rot: Chlorophyll-Autofluoreszenz. Der Längenstandard entspricht 20 µm.

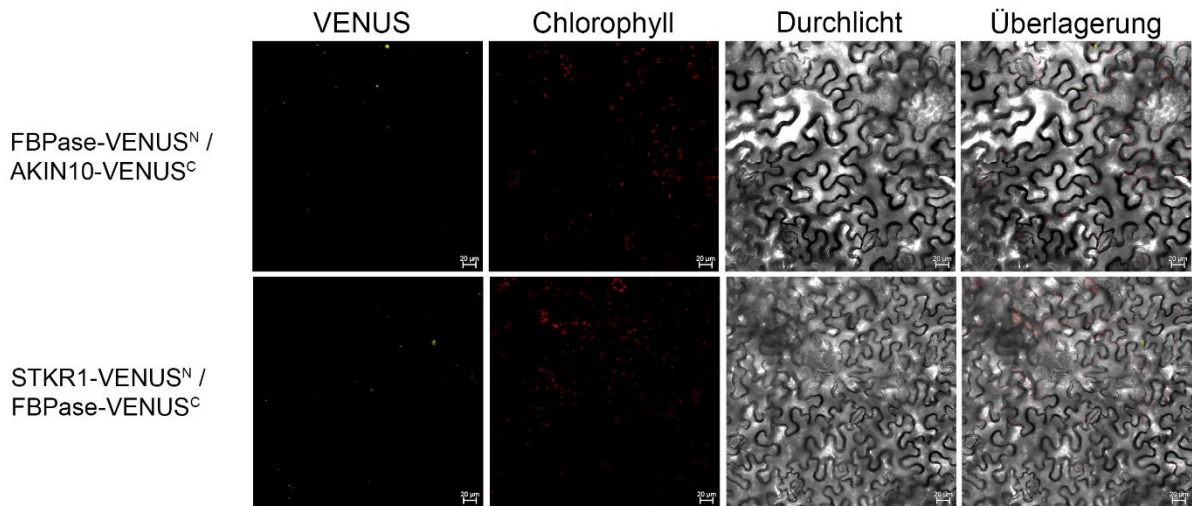


Abbildung 6.2: BiFC-Negativkontrollen zur Interaktion von AKIN10 mit STKR1. Konfokale Mikroskopaufnahmen von *N. benthamiana* Blatt-Epidermiszellen, welche die angegebenen Konstruktkombinationen transient exprimieren. Die Kontrollen dienen dem Ausschluss unspezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen. Gelb: Interaktion der beiden YFP-Hälften und somit der getesteten Proteine. Rot: Chlorophyll-Autofluoreszenz. Der Längensstandard entspricht 20 μm .

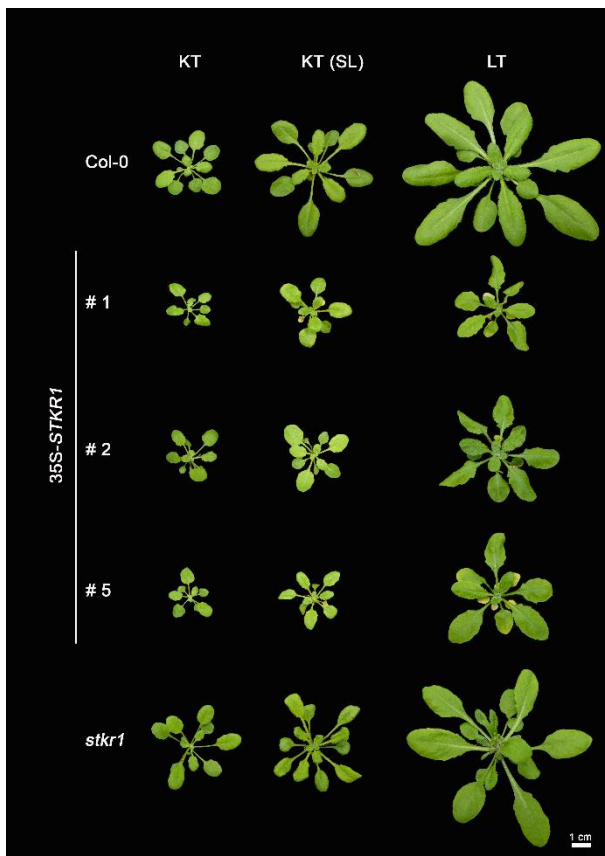


Abbildung 6.3: Phänotypischer Vergleich der Linien 35S-STKR1 #1/#2/#5 und stkr1 im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Das Wachstum von Pflanzen der Linien 35S-STKR1 #1, #2, #5 sowie des Wildtyps Col-0 und der stkr1-Mutante wurde über einen Zeitraum 3 Wochen nach dem Pikieren wöchentlich dokumentiert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde unter KT (Kurztagbedingungen, $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$), KT SL (Kurztagbedingungen, Starklicht, $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bzw. LT (Langtagbedingungen, Lichtintensität von $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Der Maßbalken entspricht 1 cm.

Tabelle 6.1: GO-Anreicherung signifikant hochregulierter Gene in den 35S-STKR1-Linien im Vergleich zum Wildtyp nach einer verlängerten Dunkelphase.

GO biologischer Prozess	-fache Anreicherung	p-Wert
induced systemic resistance	17.07	$4.90 \cdot 10^{-4}$
cellular response to hypoxia	13.17	$1.54 \cdot 10^{-2}$
cellular response to oxygen levels	11.45	$3.36 \cdot 10^{-2}$
cellular response to decreased oxygen levels	11.45	$3.36 \cdot 10^{-2}$
regulation of innate immune response	7.05	$1.41 \cdot 10^{-2}$
regulation of immune response	6.81	$1.86 \cdot 10^{-2}$
regulation of immune system process	6.55	$8.44 \cdot 10^{-3}$
immune response	6.42	$1.17 \cdot 10^{-9}$
defense response, incompatible interaction	6.34	$4.66 \cdot 10^{-4}$
innate immune response	6.27	$1.55 \cdot 10^{-8}$
response to chitin	6.14	$2.36 \cdot 10^{-4}$
immune system process	6.08	$4.87 \cdot 10^{-10}$
response to organonitrogen compound	5.53	$3.19 \cdot 10^{-4}$
response to salicylic acid	5.40	$1.71 \cdot 10^{-4}$
response to bacterium	4.67	$4.21 \cdot 10^{-6}$
response to jasmonic acid	4.64	$1.38 \cdot 10^{-2}$
response to nitrogen compound	4.39	$5.67 \cdot 10^{-4}$
defense response to bacterium	4.18	$4.72 \cdot 10^{-3}$
DNA repair	4.18	$4.72 \cdot 10^{-3}$
response to organic cyclic compound	3.97	$1.18 \cdot 10^{-3}$
regulation of response to stress	3.96	$3.51 \cdot 10^{-2}$
cellular response to DNA damage stimulus	3.90	$1.11 \cdot 10^{-2}$
cellular response to stress	3.83	$2.39 \cdot 10^{-9}$
DNA metabolic process	3.07	$2.69 \cdot 10^{-2}$
defense response to other organism	2.71	$2.56 \cdot 10^{-3}$
response to external biotic stimulus	2.68	$9.49 \cdot 10^{-5}$
response to other organism	2.68	$9.49 \cdot 10^{-5}$
response to inorganic substance	2.66	$8.36 \cdot 10^{-3}$
defense response	2.58	$1.24 \cdot 10^{-6}$
response to biotic stimulus	2.50	$5.24 \cdot 10^{-4}$
response to chemical	2.30	$2.86 \cdot 10^{-4}$
response to oxygen-containing compound	2.30	$2.28 \cdot 10^{-3}$
response to stress	2.28	$3.05 \cdot 10^{-11}$
cellular response to stimulus	2.15	$9.49 \cdot 10^{-7}$
multi-organism process	2.14	$5.52 \cdot 10^{-3}$
response to external stimulus	2.08	$2.84 \cdot 10^{-2}$
response to organic substance	1.98	$3.48 \cdot 10^{-2}$
response to stimulus	1.90	$8.87 \cdot 10^{-12}$
single-organism metabolic process	1.56	$3.52 \cdot 10^{-3}$
single-organism cellular process	1.43	$1.27 \cdot 10^{-2}$
single-organism process	1.34	$9.07 \cdot 10^{-3}$

Signifikant angereicherte GO-Kategorien (biologischer Prozess) innerhalb der 35S-STKR1-Linien nach verlängerter Dunkelphase sind absteigend nach ihrer x-fachen Anreicherung angeordnet. Die Analyse wurde mit dem Online-Werkzeug „PANTHER GO-slim“ (Gene Ontology Consortium, (Ashburner et al., 2000)) unter Verwendung der Bonferroni Multiplen Testkorrektur durchgeführt.

Tabelle 6.2: Deregulierte Gene der 35S-STKR1-Linien im Vergleich zu Col-0 während der Lichtphase.

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7231022	4,55	AT5G24240	AT5G24240.1	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase
ZA7252141	3,86	AT5G49520	WRKY48	WRKY DNA-binding protein 48
ZA7003624 ZA7003631	3,44	AT1G04600	XIA	myosin XI A
ZA7020023 ZA7020024	3,02	AT1G20350	TIM17-1	translocase inner membrane subunit 17-1
ZA7018868 ZA7018870 ZA7018871	2,88	AT1G19180	JAZ1	jasmonate-zim-domain protein 1
ZA7067877 ZA7067878	2,79	AT1G78206	MIR775A	MIR775a; miRNA
ZA7061643 ZA7061646	2,65	AT1G72060	AT1G72060.1	serine-type endopeptidase inhibitors
ZA7156729 ZA7156731 ZA7156732	2,60	AT3G52630	AT3G52630.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
ZA7253561	2,45	AT5G50930	AT5G50930.1	Histone superfamily protein
ZA7104455 ZA7104456	2,25	AT2G39420	AT2G39420.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7161037 ZA7161039	2,22	AT3G56870	AT3G56870.1	unknown protein
ZA7130153 ZA7130155	2,17	AT3G16720	ATL2	TOXICOS EN LEVADURA 2
ZA7188300 ZA7188303	1,94	AT4G20325	AT4G20325.1	unknown protein
ZA7089513 ZA7089514	1,93	AT2G24970	AT2G24970.1	unknown protein
ZA7056046 ZA7056047	1,88	AT1G66620	AT1G66620.1	Protein with RING/U-box and TRAF-like domains
ZA7025976 ZA7025977	1,84	AT1G26840	ORC6	origin recognition complex protein 6
ZA7026920 ZA7026922 ZA7026923	1,84	AT1G27770	ACA1	autoinhibited Ca ²⁺ -ATPase 1
ZA7105679 ZA7105680 ZA7105683	1,78	AT2G40520	AT2G40520.1	Nucleotidyltransferase family protein
ZA7255585	1,76	AT5G52950	AT5G52950.1	unknown protein
ZA7223980	1,74	AT5G16690	ORC3	origin recognition complex subunit 3
ZA7204057	1,65	AT4G35520	MLH3	MUTL protein homolog 3
ZA7105709 ZA7105710	1,56	AT2G40550	ETG1	E2F target gene 1
ZA7170163 ZA7170164 ZA7170167	1,53	AT4G02060	PRL	Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein
ZA7111495 ZA7111496	1,53	AT2G46040	AT2G46040.1	ARID/BRIGHT DNA-binding domain;ELM2 domain protein
ZA7088986 ZA7088987 ZA7088988	1,48	AT2G24490	RPA2	replicon protein A2
ZA7220196 ZA7220197 ZA7220199	1,48	AT5G12920	AT5G12920.2	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
ZA7251609 ZA7251610	1,41	AT5G49010	SLD5	DNA replication protein-related
ZA7231451 ZA7231453 ZA7231454	1,24	AT5G24630	BIN4	double-stranded DNA binding
ZA7000128 ZA7000130 ZA7000132	1,23	AT1G01140	CIPK9	CBL-interacting protein kinase 9
ZA7125208 ZA7125209 ZA7125211	1,18	AT3G12280	RBR1	retinoblastoma-related 1
ZA7141029 ZA7141030	-1,14	AT3G26819	MIR169N	MIR169N; miRNA
ZA7239014	-1,14	AT5G37055	SEF	HIT-type Zinc finger family protein
ZA7237437 ZA7237438 ZA7237439	-1,18	AT5G35330	MBD02	methyl-CPG-binding domain protein 02
ZA7079077 ZA7079078 ZA7079079	-1,18	AT2G14260	PIP	proline iminopeptidase
ZA7010461 ZA7010463	-1,19	AT1G11090	AT1G11090.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7163080 ZA7163081 ZA7163085	-1,19	AT3G58900	AT3G58900.4	F-box/RNI-like superfamily protein
ZA7028695 ZA7028696	-1,20	AT1G29730	AT1G29730.1	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
ZA7232661	-1,22	AT5G25890	IAA28	indole-3-acetic acid inducible 28
ZA7239232	-1,25	AT5G37310	AT5G37310.1	Endomembrane protein 70 protein family
ZA7143329 ZA7143330	-1,32	AT3G28960	AT3G28960.1	Transmembrane amino acid transporter family protein
ZA7147372	-1,33	AT3G43440	JAZ11	jasmonate-zim-domain protein 11
ZA7015955 ZA7015956	-1,37	AT1G16310	AT1G16310.1	Cation efflux family protein
ZA7078355 ZA7078356	-1,40	AT2G13290	AT2G13290.1	beta-1,4-N-

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7078357				acetylglucosaminyltransferase family protein
ZA7139536 ZA7139537 ZA7139538	-1,40	AT3G25560	NIK2	NSP-interacting kinase 2
ZA7074536 ZA7074537	-1,41	AT2G04940	AT2G04940.1	scramblase-related
ZA7093974 ZA7093975	-1,45	AT2G29320	AT2G29320.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
ZA7089471 ZA7089479 ZA7089480	-1,46	AT2G24940	MAPR2	membrane-associated progesterone binding protein 2
ZA7226179	-1,51	AT5G18850	AT5G18850.1	unknown protein
ZA7051900 ZA7051903	-1,56	AT1G62710	BETA-VPE	beta vacuolar processing enzyme
ZA7234554 ZA7234555 ZA7234556	-1,59	AT5G27930	AT5G27930.1	Protein phosphatase 2C family protein
ZA7176735 ZA7176739 ZA7176741	-1,61	AT4G09760	AT4G09760.2	Protein kinase superfamily protein
ZA7037767 ZA7037768	-1,61	AT1G46768	RAP2.1	related to AP2 1
ZA7054211 ZA7054213	-1,63	AT1G64890	AT1G64890.1	Major facilitator superfamily protein
ZA7133793 ZA7133798	-1,65	AT3G20110	CYP705A20	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 20
ZA7179494 ZA7179495 ZA7179497	-1,67	AT4G12460	ORP2B	OSBP(oxysterol binding protein)-related protein 2B
ZA7145028 ZA7145029	-1,68	AT3G30841	AT3G30841.1	Cofactor-independent phosphoglycerate mutase
ZA7261524	-1,73	AT5G58670	PLC1	phospholipase C1
ZA7252723	-1,74	AT5G50110	AT5G50110.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
ZA7191429 ZA7191434	-1,75	AT4G23400	PIP1;5	plasma membrane intrinsic protein 1;5
ZA7055420 ZA7055422 ZA7055425	-1,76	AT1G66040	VIM4	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
ZA7000409 ZA7000410	-1,79	AT1G01420	UGT72B3	UDP-glucosyl transferase 72B3
ZA7167807 ZA7167808	-1,84	AT4G00050	UNE10	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
ZA7077629 ZA7077630	-1,88	AT2G11520	CRCK3	calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 3
ZA7252715	-1,88	AT5G50100	AT5G50100.1	Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC
ZA7145920 ZA7145921	-1,90	AT3G32940	AT3G32940.1	RNA-binding KH domain-containing protein
ZA7091285 ZA7091286	-1,94	AT2G26690	AT2G26690.1	Major facilitator superfamily protein
ZA7247321	-1,95	AT5G44910	AT5G44910.1	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
ZA7189178 ZA7189179	-1,97	AT4G21326	SBT3.12	subtilase 3.12
ZA7174915 ZA7174922	-1,99	AT4G07950	AT4G07950.1	DNA-directed RNA polymerase, subunit M, archaeal
ZA7016059 ZA7016060	-1,99	AT1G16410	CYP79F1	cytochrome p450 79f1
ZA7193559 ZA7193560	-2,02	AT4G25470	CBF2	C-repeat/DRE binding factor 2
ZA7030384 ZA7030386	-2,04	AT1G31280	AGO2	Argonaute family protein
ZA7039480 ZA7039483	-2,12	AT1G48750	AT1G48750.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
ZA7007969 ZA7007971	-2,21	AT1G08730	XIC	Myosin family protein with Dil domain
ZA7014690 ZA7014693	-2,24	AT1G15050	IAA34	indole-3-acetic acid inducible 34
ZA7183342 ZA7183344	-2,26	AT4G15765	AT4G15765.1	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
ZA7200012	-2,28	AT4G31650	AT4G31650.1	Transcriptional factor B3 family protein
ZA7117874 ZA7117878 ZA7117880	-2,35	AT3G04960	AT3G04960.3	Domain of unknown function (DUF3444)
ZA7218070	-2,40	AT5G10410	AT5G10410.1	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
ZA7237293	-2,41	AT5G35120	AT5G35120.1	MADS-box family protein
ZA7086466	-2,46	AT2G21890	CAD3	cinnamyl alcohol dehydrogenase homolog 3

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7049050 ZA7049052 ZA7049053	-2,51	AT1G59920	AT1G59920.1	MADS-box family protein
ZA7049056 ZA7049058	-2,56	AT1G59930	AT1G59930.1	MADS-box family protein
ZA7051850 ZA7051851	-2,59	AT1G62660	AT1G62660.1	Glycosyl hydrolases family 32 protein
ZA7086461	-2,68	AT2G21880	RAB7A	RAB GTPase homolog 7A
ZA7052843 ZA7052844	-2,70	AT1G63580	AT1G63580.1	Receptor-like protein kinase-related family protein
ZA7044339 ZA7044340	-2,70	AT1G53633	AT1G53633.1	unknown protein
ZA7078207 ZA7078208	-2,72	AT2G13100	G3Pp5	Major facilitator superfamily protein
ZA7147695 ZA7147696	-2,73	AT3G43715	AT3G43715.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7191458 ZA7191459 ZA7191461	-2,93	AT4G23430	Tic32-IVa	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
ZA7036482 ZA7036485	-2,94	AT1G43650	AT1G43650.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
ZA7175103 ZA7175104	-2,99	AT4G08110	AT4G08110.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7077941 ZA7077943	-3,01	AT2G12400	AT2G12400.1	unknown protein
ZA7253431	-3,08	AT5G50800	SWEET13	Nodulin MtN3 family protein
ZA7230469 ZA7230470 ZA7230478	-3,17	AT5G23750	AT5G23750.1	Remorin family protein
ZA7152312 ZA7152314 ZA7152318	-3,22	AT3G48290	CYP71A24	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 24
ZA7182574 ZA7182576	-3,28	AT4G15093	AT4G15093.1	catalytic LigB subunit of aromatic ring-opening dioxygenase family
ZA7029171 ZA7029175 ZA7029180	-3,34	AT1G30160	AT1G30160.2	Protein of unknown function (DUF295)
ZA7133813 ZA7133814 ZA7133816	-3,38	AT3G20130	CYP705A22	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 22
ZA7163405 ZA7163406 ZA7163407	-3,40	AT3G59210	AT3G59210.1	F-box/RNI-like superfamily protein
ZA7237650	-3,43	AT5G35490	MRU1	mt0 1 responding up 1
ZA7174021 ZA7174024	-3,44	AT4G06534	AT4G06534.1	unknown protein
ZA7144321 ZA7144322	-3,60	AT3G29810	COBL2	COBRA-like protein 2 precursor
ZA7042668 ZA7042669	-3,68	AT1G52040	MBP1	myrosinase-binding protein 1
ZA7100079 ZA7100080	-3,69	AT2G35150	EXL7	EXORDIUM like 1
ZA7223235	-3,77	AT5G15960	KIN1	stress-responsive protein (KIN1) / stress-induced protein (KIN1)
ZA7133784 ZA7133788	-3,78	AT3G20100	CYP705A19	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 19
ZA7235729 ZA7235730 ZA7235732	-3,78	AT5G28910	AT5G28910.2	unknown protein
ZA7133802 ZA7133803 ZA7133807	-4,30	AT3G20120	CYP705A21	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 21
ZA7182246 ZA7182247	-4,40	AT4G14819	AT4G14819.1	Protein of unknown function (DUF1677)
ZA7230858	-4,53	AT5G24105	AGP41	arabinogalactan protein 41
ZA7077743 ZA7077744 ZA7077751	-4,59	AT2G11810	MGDC	monogalactosyldiacylglycerol synthase type C
ZA7163450 ZA7163451	-4,66	AT3G59250	AT3G59250.1	F-box/RNI-like superfamily protein
ZA7174186 ZA7174187	-4,99	AT4G06599	AT4G06599.1	ubiquitin family protein
ZA7174466 ZA7174467 ZA7174469	-5,00	AT4G06701	AT4G06701.1	other RNA other_rna
ZA7135797 ZA7135803	-5,11	AT3G21950	AT3G21950.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein

Die Transkriptdaten wurden aus RNA-Extrakten der drei 35S-STKR1-Linien sowie Col-0 mit je drei biologischen Replikaten aus vollständig expandierten Blättern generiert. Die Probennahme erfolgte in der Lichtphase (6 h Licht). Aufgelistet sind Gene, die in allen drei 35S-STKR1-Linien verglichen mit dem Wildtyp mindestens 2-fach differentiell reguliert waren ($p \leq 0,05$) und in mindestens einer Linie auch einen signifikanten korrigierten p-Wert ($p \leq 0,05$) aufwiesen. Dargestellt sind der Name des Array-Elementes (Oligo-Bezeichnung), die gemittelte Änderungsrate über die drei 35S-STKR1-Linien (*fold change*, FC Mittelwert), der AGI Code und der Genname und die Beschreibung annotierter Gene.

Tabelle 6.3: Deregulierte Gene der 35S-STKR1-Linien im Vergleich zu Col-0 während der verlängerten Dunkelphase.

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7079319 ZA7079326	7566,67	AT2G14610	PR1	pathogenesis-related gene 1
ZA7136550 ZA7136551	925,33	AT3G22600	AT3G22600.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
ZA7191745 ZA7191746	608,00	AT4G23700	CHX17	cation/H ⁺ exchanger 17
ZA7149195 ZA7149197	585,33	AT3G45130	LAS1	lanosterol synthase 1
ZA7025460 ZA7025462	543,33	AT1G26390	AT1G26390.1	FAD-binding Berberine family protein
ZA7109643 ZA7109646	482,33	AT2G44240	AT2G44240.1	Protein of Unknown Function (DUF239)
ZA7018942 ZA7018943	379,33	AT1G19250	FMO1	flavin-dependent monooxygenase 1
ZA7079305 ZA7079307	298,00	AT2G14580	PRB1	basic pathogenesis-related protein 1
ZA7150120 ZA7150121	266,33	AT3G46080	AT3G46080.1	C2H2-type zinc finger family protein
ZA7056126 ZA7056127 ZA7056129	238,00	AT1G66700	PXMT1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
ZA7219589	229,00	AT5G11920	cwINV6	6-&1-fructan exohydrolase
ZA7143667 ZA7143668 ZA7143675	185,63	AT3G29250	SDR4	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
ZA7095432 ZA7095436	170,63	AT2G30770	CYP71A13	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 13
ZA7020962	168,33	AT1G21240	WAK3	wall associated kinase 3
ZA7128941 ZA7128943	147,63	AT3G15536	AT3G15536.1	Unknown gene other_rna
ZA7078803 ZA7078805	133,27	AT2G13810	ALD1	AGD2-like defense response protein 1
ZA7267688	121,43	AT5G64810	WRKY51	WRKY DNA-binding protein 51
ZA7181987 ZA7181988	116,67	AT4G14630	GLP9	germin-like protein 9
ZA7095411 ZA7095412	114,67	AT2G30750	CYP71A12	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 12
ZA7161435 ZA7161437	113,33	AT3G57260	BGL2	beta-1,3-glucanase 2
ZA7122713 ZA7122714 ZA7122716	108,30	AT3G09940	MDHAR	monodehydroascorbate reductase
ZA7015184 ZA7015185	107,23	AT1G15520	ABCG40	pleiotropic drug resistance 12
ZA7021042 ZA7021046	104,17	AT1G21310	EXT3	extensin 3
ZA7186359 ZA7186361	102,57	AT4G18430	RABA1e	RAB GTPase homolog A1E
ZA7165611 ZA7165612	100,30	AT3G61390	AT3G61390.2	RING/U-box superfamily protein
ZA7126725 ZA7126726	99,03	AT3G13610	AT3G13610.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
ZA7142807 ZA7142815	96,73	AT3G28510	AT3G28510.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
ZA7266144	96,03	AT5G63225	AT5G63225.1	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
ZA7232918	94,97	AT5G26170	WRKY50	WRKY DNA-binding protein 50
ZA7196755 ZA7196756	93,90	AT4G28460	AT4G28460.1	unknown protein
ZA7064251 ZA7064252	89,37	AT1G74590	GSTU10	glutathione S-transferase TAU 10
ZA7126527 ZA7126529	86,90	AT3G13433	AT3G13433.1	unknown protein
ZA7220583	86,63	AT5G13320	PBS3	Auxin-responsive GH3 family protein
ZA7087819 ZA7087821	86,50	AT2G23270	AT2G23270.1	unknown proteinmatch
ZA7161067 ZA7161071	86,43	AT3G56891	AT3G56891.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
ZA6166956 ZA7168545	84,63	AT4G00700	AT4G00700.1	C2 calcium/lipid-binding plant

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
				phosphoribosyltransferase family protein
ZA7002678 ZA7002680	83,27	AT1G03660	AT1G03660.1	Ankyrin-repeat containing protein
ZA7111230 ZA7111231	82,83	AT2G45760	BAP2	BON association protein 2
ZA7247035	81,27	AT5G44610	MAP18	microtubule-associated protein 18
ZA7013392 ZA7013398	80,27	AT1G13830	AT1G13830.1	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
ZA7155918 ZA7155919	80,27	AT3G51860	CAX3	cation exchanger 3
ZA7265377	80,10	AT5G62480	GSTU9	glutathione S-transferase tau 9
ZA7143698 ZA7143700	80,07	AT3G29260	AT3G29260.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
ZA7059586 ZA7059588	78,77	AT1G69930	GSTU11	glutathione S-transferase TAU 11
ZA7240941	78,10	AT5G38900	AT5G38900.1	Thioredoxin superfamily protein
ZA7218861	77,03	AT5G11210	GLR2.5	glutamate receptor 2.5
ZA7103285 ZA7103286	75,27	AT2G38240	AT2G38240.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
ZA7255365	74,17	AT5G52720	AT5G52720.1	Copper transport protein family
ZA7150128 ZA7150132	73,00	AT3G46090	ZAT7	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
ZA7225553 ZA7225554 ZA7225555	72,10	AT5G18270	ANAC087	Arabidopsis NAC domain containing protein 87
ZA7083193 ZA7083194	70,17	AT2G18660	PNP-A	plant natriuretic peptide A
ZA7044320 ZA7044322	69,50	AT1G53620	AT1G53620.1	unknown protein
ZA7036968 ZA7036969	68,47	AT1G44130	AT1G44130.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein
ZA7148359 ZA7148367	65,20	AT3G44326	AT3G44326.1	F-box family protein
ZA7042573 ZA7042574	64,00	AT1G51920	AT1G51920.1	unknown protein
ZA7013020 ZA7013022	63,43	AT1G13480	AT1G13480.1	Protein of unknown function (DUF1262)
ZA7247413 ZA7247414	63,17	AT5G44990	AT5G44990.1	Glutathione S-transferase family protein
ZA7131788 ZA7131789	62,77	AT3G18250	AT3G18250.1	Putative membrane lipoprotein
ZA7210622 ZA7210623 ZA7210624	62,00	AT5G02780	GSTL1	glutathione transferase lambda 1
ZA7001319 ZA7001321	61,40	AT1G02310	MAN1	Glycosyl hydrolase superfamily protein
ZA7108477	60,97	AT2G43141	AT2G43141.1	snoRNA small_nucleolar_rna
ZA7153585	60,53	AT3G49580	LSU1	response to low sulfur 1
ZA7016066 ZA7016068	59,60	AT1G16420	MC8	metacaspase 8
ZA7262408	59,03	AT5G59530	AT5G59530.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
ZA7160143 ZA7160147	56,37	AT3G55970	JRG21	jasmonate-regulated gene 21
ZA7216901	55,73	AT5G09290	AT5G09290.1	Inositol monophosphatase family protein
ZA7100976 ZA7100981	54,97	AT2G35980	YLS9	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
ZA7018547 ZA7018548	53,17	AT1G18860	WRKY61	WRKY DNA-binding protein 61
ZA7120780 ZA7120781	53,13	AT3G07600	AT3G07600.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
ZA7233253	52,27	AT5G26690	AT5G26690.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
ZA7209503	51,53	AT5G01640	PRA1.B5	prenylated RAB acceptor 1.B5
ZA7056394 ZA7056399	51,33	AT1G66960	LUP5	Terpenoid cyclases family protein

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7157255 ZA7157257	50,47	AT3G53150	UGT73D1	UDP-glucosyl transferase 73D1
ZA7057535 ZA7057538 ZA7057542	49,20	AT1G67980	CCOAMT	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase
ZA7136169 ZA7136170	49,17	AT3G22235	AT3G22235.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: pathogen and circadian controlled 1
ZA7126531 ZA7126532	48,97	AT3G13435	AT3G13435.1	unknown protein
ZA7113821 ZA7113826	47,80	AT3G01175	AT3G01175.1	Protein of unknown function (DUF1666)
ZA7125412 ZA7125414	47,43	AT3G12500	HCHIB	basic chitinase
ZA7267675	47,43	AT5G64790	AT5G64790.1	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
ZA7241691	43,97	AT5G39670	AT5G39670.1	Calcium-binding EF-hand family protein
ZA7059808 ZA7059810	43,63	AT1G70170	MMP	matrix metalloproteinase
ZA7001444 ZA7001447	43,43	AT1G02430	ARFD1B	ADP-ribosylation factor D1B
ZA7171726 ZA7171731	42,20	AT4G03450	AT4G03450.1	Ankyrin repeat family protein
ZA7108863 ZA7108865	42,17	AT2G43510	TI1	trypsin inhibitor protein 1
ZA7201241	41,31	AT4G32810	CCD8	carotenoid cleavage dioxygenase 8
ZA7042564 ZA7042565	41,27	AT1G51913	AT1G51913.1	LOCATED IN: endomembrane system; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: cryptdin protein-related (TAIR:AT1G51915.1)
ZA7203733	40,73	AT4G35180	LHT7	LYS/HIS transporter 7
ZA7068073 ZA7068074	39,60	AT1G78410	AT1G78410.1	VQ motif-containing protein
ZA7178700 ZA7178702	39,27	AT4G11655	AT4G11655.1	Uncharacterised protein family (UPF0497)
ZA7137106 ZA7137108	39,17	AT3G23120	RLP38	receptor like protein 38
ZA7154816 ZA7154818	38,97	AT3G50770	CML41	calmodulin-like 41
ZA7223352	38,97	AT5G16080	CXE17	carboxyesterase 17
ZA7193077 ZA7193079	38,83	AT4G25000	AMY1	alpha-amylase-like
ZA7063414 ZA7063416	38,63	AT1G73805	SARD1	Calmodulin binding protein-like
ZA7111854 ZA7111855	38,53	AT2G46400	WRKY46	WRKY DNA-binding protein 46
ZA7054836 ZA7054837	38,20	AT1G65481	AT1G65481.1	unknown protein
ZA7178201 ZA7178203	37,63	AT4G11170	AT4G11170.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
ZA7001462 ZA7001465	37,47	AT1G02450	NIMIN1	NIM1-interacting 1
ZA7153124 ZA7153127	37,33	AT3G49130	AT3G49130.1	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp RNA-binding domain-containing protein
ZA7165412	36,70	AT3G61190	BAP1	BON association protein 1
ZA7269911	36,70	AT5G66890	AT5G66890.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
ZA7072978 ZA7072979 ZA7072984	36,03	AT2G03360	AT2G03360.2	Glycosyltransferase family 61 protein
ZA7025479 ZA7025483	35,73	AT1G26410	AT1G26410.1	FAD-binding Berberine family protein
ZA7126099 ZA7126104	34,27	AT3G13100	ABCC7	multidrug resistance-associated protein 7
ZA7105918 ZA7105920	33,97	AT2G40750	WRKY54	WRKY DNA-binding protein 54
ZA7032928 ZA7032931	33,10	AT1G33960	AIG1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
ZA7013613 ZA7013616	32,97	AT1G14080	FUT6	fucosyltransferase 6
ZA7248598	32,37	AT5G46090	AT5G46090.1	Protein of unknown function (DUF679)

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7046867 ZA7046868	31,67	AT1G56060	AT1G56060.1	unknown protein
ZA7156729 ZA7156731 ZA7156732	31,20	AT3G52630	AT3G52630.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
ZA7247505	30,93	AT5G45090	PP2-A7	phloem protein 2-A7
ZA7063716 ZA7063723	30,30	AT1G74080	MYB122	myb domain protein 122
ZA7173241 ZA7173242	30,17	AT4G05030	AT4G05030.1	Copper transport protein family
ZA7162718 ZA7162719	29,17	AT3G58540	AT3G58540.1	unknown protein
ZA7151476 ZA7151481	29,03	AT3G47480	AT3G47480.1	Calcium-binding EF-hand family protein
ZA7246821	28,97	AT5G44460	CML43	calmodulin like 43
ZA7178104 ZA7178105 ZA7178106	28,70	AT4G11070	WRKY41	WRKY family transcription factor
ZA7091088 ZA7091089	28,67	AT2G26480	UGT76D1	UDP-glucosyl transferase 76D1
ZA7265666	28,10	AT5G62770	AT5G62770.1	Protein of unknown function (DUF1645)
ZA7209612	28,07	AT5G01732	AT5G01732.1	other RNA other_rna
ZA7210291	27,77	AT5G02430	AT5G02430.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
ZA7213222	27,70	AT5G05340	PRX52	Peroxidase superfamily protein
ZA7248737	27,37	AT5G46230	AT5G46230.1	Protein of unknown function, DUF538
ZA7021265 ZA7021268	27,33	AT1G21525	AT1G21525.1	pseudogene of unknown protein pseudogene
ZA7136865 ZA7136870	27,30	AT3G22910	AT3G22910.1	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
ZA7208581	27,27	AT4G39950	CYP79B2	cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 2
ZA7264404	27,20	AT5G61490	AT5G61490.1	Uncharacterised conserved protein (UCP012943)
ZA7161037 ZA7161039	26,33	AT3G56870	AT3G56870.1	unknown protein
ZA7109704 ZA7109710	26,03	AT2G44290	AT2G44290.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
ZA7102797 ZA7102800	26,02	AT2G37750	AT2G37750.1	unknown protein
ZA9001792	25,97	AT3G28890	AT3G28890.2	receptor like protein
ZA7179760 ZA7179762	24,20	AT4G12735	AT4G12735.1	unknown protein
ZA7116481 ZA7116482	24,17	AT3G03650	EDA5	Exostosin family protein
ZA7151768 ZA7151771	24,10	AT3G47780	ABCA7	ABC2 homolog 6
ZA7154994 ZA7154995	24,00	AT3G50930	BCS1	cytochrome BC1 synthesis
ZA7214634	23,77	AT5G06730	AT5G06730.1	Peroxidase superfamily protein
ZA7043154 ZA7043155	23,73	AT1G52530	AT1G52530.1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Hus1-like protein (InterPro:IPR007150)
ZA7207644	23,23	AT4G39030	EDS5	MATE efflux family protein
ZA7259802	23,10	AT5G57010	AT5G57010.1	calmodulin-binding family protein
ZA7169322 ZA7169323	23,03	AT4G01360	BPS3	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Protein of unknown function (DUF793)
ZA7220196 ZA7220197 ZA7220199	22,57	AT5G12920	AT5G12920.2	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
ZA7136537 ZA7136538	21,93	AT3G22580	AT3G22580.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
ZA7029230 ZA7029231	21,77	AT1G30220	INT2	inositol transporter 2
ZA7218289	21,53	AT5G10625	AT5G10625.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: flowering promoting factor

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
				1 (TAIR:AT5G24860.1)
ZA7102594 ZA7102596 ZA7102600	21,47	AT2G37560	ORC2	origin recognition complex second largest subunit 2
ZA7123659 ZA7123660	21,43	AT3G10815	AT3G10815.1	RING/U-box superfamily protein
ZA7103016 ZA7103017	21,40	AT2G37980	AT2G37980.1	O-fucosyltransferase family protein
ZA7229189	21,03	AT5G22530	AT5G22530.1	unknown protein
ZA7243085	20,94	AT5G40990	GLIP1	GDSL lipase 1
ZA7245064	20,80	AT5G42830	AT5G42830.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein
ZA7218427	20,67	AT5G10760	AT5G10760.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein
ZA7164818 ZA7164819	20,30	AT3G60660	AT3G60660.1	unknown protein; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF1395 (InterPro:IPR009829)
ZA7186261 ZA7186262 ZA7186263	19,93	AT4G18360	AT4G18360.1	Aldolase-type TIM barrel family protein
ZA7079283 ZA7079287	19,77	AT2G14560	LURP1	Protein of unknown function (DUF567)
ZA7137263 ZA7137264 ZA7137265	19,63	AT3G23250	MYB15	myb domain protein 15
ZA7093996 ZA7094004 ZA7094005	19,47	AT2G29350	SAG13	senescence-associated gene 13
ZA7162131 ZA7162135	19,17	AT3G57950	AT3G57950.1	unknown protein
ZA7139036 ZA7139041	18,97	AT3G25010	RLP41	receptor like protein 41
ZA7104440 ZA7104441	18,39	AT2G39410	AT2G39410.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7031997 ZA7031999	18,37	AT1G32950	AT1G32950.1	Subtilase family protein
ZA7189758 ZA7189766 ZA7189767	18,33	AT4G21850	MSRB9	methionine sulfoxide reductase B9
ZA7107646 ZA7107648	18,13	AT2G42360	AT2G42360.1	RING/U-box superfamily protein
ZA7230979	17,99	AT5G24205	AT5G24205.1	other RNA other_rna
ZA7115645 ZA7115646	17,80	AT3G02840	AT3G02840.1	ARM repeat superfamily protein
ZA7090024 ZA7090028	17,77	AT2G25440	RLP20	receptor like protein 20
ZA7082539 ZA7082541	17,73	AT2G18000	TAF14	TBP-associated factor 14
ZA7005004 ZA7005006 ZA7005007	17,33	AT1G05880	ARI12	RING/U-box superfamily protein
ZA7206103	17,30	AT4G37490	CYCB1;1	CYCLIN B1;1
ZA7047690 ZA7047691	17,27	AT1G57630	AT1G57630.1	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
ZA7108317 ZA7108318	17,20	AT2G43000	NAC042	NAC domain containing protein 42
ZA7106595 ZA7106596	17,17	AT2G41380	AT2G41380.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
ZA7006781 ZA7006782	17,00	AT1G07620	ATOGBM	GTP-binding protein Obg/CgtA
ZA7122279 ZA7122280	16,97	AT3G09520	EXO70H4	exocyst subunit exo70 family protein H4
ZA7268527	16,63	AT5G65600	AT5G65600.1	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
ZA7001239 ZA7001240	16,60	AT1G02230	NAC004	NAC domain containing protein 4
ZA7234423	16,50	AT5G27845	AT5G27845.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7107620 ZA7107628	16,03	AT2G42340	AT2G42340.1	unknown protein
ZA7013092 ZA7013093	15,92	AT1G13550	AT1G13550.1	Protein of unknown function (DUF1262)
ZA7004026 ZA7004027	15,90	AT1G04980	PDIL2-2	PDI-like 2-2
ZA7188629 ZA7188632	15,63	AT4G20800	AT4G20800.1	FAD-binding Berberine family

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
				protein
ZA7013044 ZA7013049	15,55	AT1G13500	AT1G13500.1	Protein of unknown function (DUF1262)
ZA7037230	15,45	AT1G44900	MCM2	minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein
ZA7021260 ZA7021262	15,30	AT1G21520	AT1G21520.1	unknown protein
ZA7190667 ZA7190668	15,30	AT4G22680	MYB85	myb domain protein 85
ZA7028596 ZA7028598 ZA7028599	15,27	AT1G29630	AT1G29630.2	5'-3' exonuclease family protein
ZA7060125 ZA7060126	15,17	AT1G70500	AT1G70500.1	Pectin lyase-like superfamily protein
ZA7205565 ZA7205566 ZA7205568	15,07	AT4G36988	CPuORF49	conserved peptide upstream open reading frame 49
ZA7111592 ZA7111593	14,83	AT2G46150	AT2G46150.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
ZA7150115 ZA7150116	14,78	AT3G46070	AT3G46070.1	C2H2-type zinc finger family protein
ZA7066542 ZA7066543 ZA7066544	14,77	AT1G76930	EXT4	extensin 4
ZAB003134	14,70	AT4G33300	AT4G33300.2	ADR1-like 1
ZA7023900 ZA7023901	14,67	AT1G24140	AT1G24140.1	Matrixin family protein
ZA7009245 ZA7009246 ZA7009249	14,41	AT1G09932	AT1G09932.1	Phosphoglycerate mutase family protein
ZA7074094 ZA7074095	13,93	AT2G04450	NUDT6	nudix hydrolase homolog 6
ZA7064010 ZA7064013	13,83	AT1G74360	AT1G74360.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
ZA7145056 ZA7145057	13,30	AT3G30844	AT3G30844.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7185600 ZA7185601 ZA7185602	13,25	AT4G17760	AT4G17760.1	damaged DNA binding;exodeoxyribonuclease IIIs
ZA7023847 ZA7023850	13,20	AT1G24095	AT1G24095.1	Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC
ZA7260275	12,93	AT5G57480	AT5G57480.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
ZA7125089 ZA7125090	12,59	AT3G12170	AT3G12170.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
ZA7195209 ZA7195210	12,40	AT4G26990	AT4G26990.1	unknown protein
ZA7151007 ZA7151009	12,35	AT3G46940	DUT1	DUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1
ZA7114716 ZA7114718	12,34	AT3G01970	WRKY45	WRKY DNA-binding protein 45
ZA7103931 ZA7103932 ZA7103933	12,28	AT2G38860	YLS5	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
ZA7062107 ZA7062108	12,12	AT1G72520	LOX4	PLAT/LH2 domain-containing lipxygenase family protein
ZA7164597 ZA7164601 ZA7164604	11,90	AT3G60420	AT3G60420.2	Phosphoglycerate mutase family protein
ZA7203651 ZA7203652 ZA7203655	11,89	AT4G35110	AT4G35110.3	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARLI 4) family
ZA7158732 ZA7158733	11,80	AT3G54640	TSA1	tryptophan synthase alpha chain
ZA7233645	11,70	AT5G27060	RLP53	receptor like protein 53
ZA7056153 ZA7056154	11,67	AT1G66720	AT1G66720.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
ZA7156843 ZA7156844	11,59	AT3G52748	AT3G52748.1	other RNA other_rna
ZA7249744	11,58	AT5G47220	ERF2	ethylene responsive element binding factor 2
ZA7052516 ZA7052518	11,50	AT1G63245	CLE14	CLAVATA3/ESR-RELATED 14
ZAB001407 ZAB001408	11,45	AT2G21187	AT2G21187.2	other RNA other_rna

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7217206	11,44	AT5G09585	U2.5	U2.5; snRNA small_nuclear_rna
ZA7156506 ZA7156508	11,36	AT3G52430	PAD4	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7123880 ZA7123883	11,33	AT3G11010	RLP34	receptor like protein 34 -
ZA7056046 ZA7056047	11,23	AT1G66620	AT1G66620.1	
ZA7181078 ZA7181079	11,14	AT4G13920	RLP50	receptor like protein 50
ZA7070511 ZA7070519	11,14	AT1G80820	CCR2	cinnamoyl coa reductase
ZA7090902 ZA7090904 ZA7090905	11,08	AT2G26310	FAP2	Chalcone-flavanone isomerase family protein
ZA7139948 ZA7139949	10,96	AT3G25882	NIMIN-2	NIM1-interacting 2
ZA7069370 ZA7069371	10,88	AT1G79680	WAKL10	WALL ASSOCIATED KINASE (WAK)-LIKE 10
ZA7104254 ZA7104255	10,82	AT2G39220	PLP6	PATATIN-like protein 6
ZA7064628 ZA7064634	10,67	AT1G75000	AT1G75000.1	GNS1/SUR4 membrane protein family
ZA7060463 ZA7060464	10,64	AT1G70810	AT1G70810.1	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
ZA7209403	10,63	AT5G01550	LECRKA4.2	lectin receptor kinase a4.1
ZA7017067 ZA7017068	10,49	AT1G17380	JAZ5	jasmonate-zim-domain protein 5
ZA7117617 ZA7117618	10,47	AT3G04720	PR4	pathogenesis-related 4
ZA7244034	10,38	AT5G41880	POLA3	DNA primases;DNA primases
ZA7257353	10,34	AT5G54610	ANK	ankyrin
ZA7121748 ZA7121749	10,28	AT3G09010	AT3G09010.1	Protein kinase superfamily protein
ZA7150269 ZA7150274	10,21	AT3G46230	HSP17.4	heat shock protein 17.4
ZA7027664 ZA7027667	10,20	AT1G28480	GRX480	Thioredoxin superfamily protein
ZA7165997 ZA7166000	10,20	AT3G61760	DL1B	DYNAMIN-like 1B
ZA7164701 ZA7164703 ZA7164704	10,18	AT3G60540	AT3G60540.1	Preprotein translocase Sec, Sec61-beta subunit protein
ZA7029965 ZA7029966	10,16	AT1G30900	VSR6	VACUOLAR SORTING RECEPTOR 6
ZA7220164	10,13	AT5G12880	AT5G12880.1	proline-rich family protein
ZA7185271 ZA7185278	10,12	AT4G17500	ERF-1	ethylene responsive element binding factor 1
ZA7117104 ZA7117106	10,05	AT3G04220	AT3G04220.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
ZA7251414	10,04	AT5G48820	ICK6	inhibitor/interactor with cyclin-dependent kinase
ZA7136525 ZA7136532	9,99	AT3G22570	AT3G22570.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
ZA7126449 ZA7126452	9,98	AT3G13380	BRL3	BRI1-like 3
ZA7191036 ZA7191037	9,94	AT4G23030	AT4G23030.1	MATE efflux family protein
ZA7008289 ZA7008294 ZA7008296	9,89	AT1G09080	BIP3	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
ZA7108365 ZA7108367	9,82	AT2G43040	NPG1	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
ZA7042261 ZA7042266	9,80	AT1G51640	EXO70G2	exocyst subunit exo70 family protein G2
ZA7021513 ZA7021514	9,77	AT1G21740	AT1G21740.1	Protein of unknown function (DUF630 and DUF632)
ZA7153115 ZA7153117	9,68	AT3G49120	PRXCB	peroxidase CB
ZA7009362 ZA7009363 ZA7009364	9,48	AT1G10040	AT1G10040.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7257727	9,34	AT5G54970	AT5G54970.1	unknown protein
ZA7158239 ZA7158242	9,32	AT3G54150	AT3G54150.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7248867	9,24	AT5G46350	WRKY8	WRKY DNA-binding protein 8
ZA7247415	9,24	AT5G45000	AT5G45000.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
ZA6147194 ZA7148745	9,13	AT3G44720	ADT4	arogenate dehydratase 4
ZA7017095 ZA7017098	9,06	AT1G17420	LOX3	lipoygenase 3
ZA7142829	8,99	AT3G28540	AT3G28540.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
ZA7212657	8,97	AT5G04781	AT5G04781.1	Pseudogene of AT1G75170; SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein pseudogene
ZA7162382	8,75	AT3G58193	AT3G58193.1	snoRNA small_nucleolar_rna
ZA7033191 ZA7033192 ZA7033194	8,74	AT1G34180	NAC016	NAC domain containing protein 16
ZA7191663 ZA7191664	8,69	AT4G23610	AT4G23610.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
ZAB002627	8,69	AT3G61440	AT3G61440.3	cysteine synthase C1
ZA7118740 ZA7118745	8,69	AT3G05740	RECQ1	RECQ helicase I1
ZA7152604	8,60	AT3G48580	XTH11	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 11
ZA7064767 ZA7064768	8,58	AT1G75150	AT1G75150.1	unknown protein
ZA7123949 ZA7123950	8,57	AT3G11080	RLP35	receptor like protein 35
ZA7136073 ZA7136078	8,53	AT3G22160	AT3G22160.1	VQ motif-containing protein
ZA7126622 ZA7126624	8,48	AT3G13500	AT3G13500.1	unknown protein
ZA7080891 ZA7080895	8,42	AT2G16440	MCM4	Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein
ZA7160561 ZA7160562	8,37	AT3G56400	WRKY70	WRKY DNA-binding protein 70
ZA7269638 ZA7269640	8,35	AT5G66640	DAR3	DA1-related protein 3
ZAB003719	8,33	AT5G41750	AT5G41750.2	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
ZA7220208	8,22	AT5G12930	AT5G12930.1	unknown protein
ZA7126090 ZA7126094	8,06	AT3G13090	ABCC6	multidrug resistance-associated protein 8
ZA7198163 ZA7198169	8,02	AT4G29850	AT4G29850.1	Eukaryotic protein of unknown function (DUF872)
ZA7082258 ZA7082259	8,02	AT2G17740	AT2G17740.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
ZA7185485 ZA7185489	7,94	AT4G17660	AT4G17660.1	Protein kinase superfamily protein
ZA7214493	7,92	AT5G06590	AT5G06590.1	unknown protein
ZA7225767	7,91	AT5G18470	AT5G18470.1	Curculin-like (mannose-binding) lectin family protein
ZA7126079 ZA7126080 ZA7126081	7,83	AT3G13080	ABCC3	multidrug resistance-associated protein 3
ZA7003770 ZA7003771	7,80	AT1G04730	CTF18	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
ZAB002132 ZAB002133	7,70	AT3G13430	AT3G13430.2	RING/U-box superfamily protein
ZA7223980	7,63	AT5G16690	ORC3	origin recognition complex subunit 3
ZA7227623	7,63	AT5G20240	PI	K-box region and MADS-box transcription factor family protein
ZA7137772 ZA7137773	7,52	AT3G23740	AT3G23740.1	unknown protein
ZA7270113	7,51	AT5G67100	ICU2	DNA-directed DNA polymerases
ZA7215849	7,46	AT5G07880	SNAP29	synaptosomal-associated protein SNAP25-like 29

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7179640 ZA7179643	7,34	AT4G12610	RAP74	transcription activators;DNA binding;RNA polymerase II transcription factors;catalytics;transcription initiation factors
ZA7155401 ZA7155406	7,33	AT3G51330	AT3G51330.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein
ZA7194260 ZA7194262	7,32	AT4G26120	AT4G26120.1	Ankyrin repeat family protein / BTB/POZ domain-containing protein
ZA7270176	7,29	AT5G67160	EPS1	HXXXD-type acyl-transferase family protein
ZA7202710	7,25	AT4G34200	EDA9	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
ZA7246226 ZA7246228	7,23	AT5G43910	AT5G43910.2	pfkB-like carbohydrate kinase family protein
ZAB000356 ZAB000357	7,17	AT1G18700	AT1G18700.2	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
ZA7044522 ZA7044523 ZA7044529	7,08	AT1G53790	AT1G53790.2	F-box and associated interaction domains-containing protein
ZA7140560 ZA7140562 ZA7140563	7,05	AT3G26440	AT3G26440.1	Protein of unknown function (DUF707)
ZA7060769 ZA7060772	7,04	AT1G71100	RSW10	Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein
ZA7105709 ZA7105710	7,04	AT2G40550	ETG1	E2F target gene 1
ZA7228303	7,04	AT5G20960	AO1	aldehyde oxidase 1
ZA6098960 ZA7099911	7,01	AT2G35000	ATL9	RING/U-box superfamily protein
ZA7060342 ZA7060343	7,00	AT1G70690	HWI1	Receptor-like protein kinase-related family protein
ZAB001547 ZAB001548	6,98	AT2G29390	AT2G29390.3	sterol 4-alpha-methyl-oxidase 2-2
ZA7152519 ZA7152520	6,98	AT3G48490	AT3G48490.1	unknown protein
ZA7170503 ZA7170504	6,97	AT4G02390	PP	poly(ADP-ribose) polymerase
ZA7182069 ZA7182072	6,96	AT4G14700	ORC1A	origin recognition complex 1
ZA7017280 ZA7017282	6,95	AT1G17600	AT1G17600.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
ZA7096807 ZA7096809	6,89	AT2G32030	AT2G32030.1	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein
ZA7010509 ZA7010516	6,88	AT1G11125	AT1G11125.1	unknown protein
ZA7266934	6,88	AT5G64060	NAC103	NAC domain containing protein 103
ZA7020023 ZA7020024	6,84	AT1G20350	TIM17-1	translocase inner membrane subunit 17-1
ZA7076548	6,81	AT2G07714	AT2G07714.1	transcription factor-related
ZA7189864 ZA7189865	6,80	AT4G21920	AT4G21920.1	unknown protein
ZA7227520	6,80	AT5G20150	SPX1	SPX domain gene 1
ZA7060453 ZA7060461	6,79	AT1G70800	EHB1	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
ZA7067153 ZA7067154	6,77	AT1G77510	PDIL1-2	PDI-like 1-2
ZA7124078	6,76	AT3G11230	AT3G11230.2	Yippee family putative zinc-binding protein
ZA7271394 ZA7271395	6,73	ATMG00260	ORF101A	hypothetical protein
ZA7065222 ZA7065229	6,71	AT1G75610	AT1G75610.1	pseudogene, histone H3, identical to histone H3.2 from Medicago sativa GB:AAB36495 GI:488571, Histone H3.2, minor Lolium temulentum SPP11105
ZA7014499 ZA7014508	6,69	AT1G14870	PCR2	PLANT CADMIUM RESISTANCE 2
ZA6241688 ZA6241696 ZA7244166	6,66	AT5G42020	BIP2	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
ZA7176079 ZA7176080	6,64	AT4G09030	AGP10	arabinogalactan protein 10

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7103294 ZA7103296	6,44	AT2G38250	AT2G38250.1	Homeodomain-like superfamily protein
ZA7046389 ZA7046392 ZA7046395	6,41	AT1G55610	BRL1	BRI1 like
ZA7140597 ZA7140602	6,36	AT3G26470	AT3G26470.1	Powdery mildew resistance protein, RPW8 domain
ZA7242247	6,31	AT5G40212	AT5G40212.1	Pseudogene of AT5G40240; nodulin MtN21 family
ZA7201490 ZA7201491 ZA7201492	6,30	AT4G33050	EDA39	calmodulin-binding family protein
ZA7230163	6,25	AT5G23420	HMGB6	high-mobility group box 6
ZA7064789 ZA7064791 ZA7064797	6,22	AT1G75170	AT1G75170.1	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
ZA7196847 ZA7196848	6,16	AT4G28550	AT4G28550.1	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein
ZA7016150 ZA7016159	6,13	AT1G16500	AT1G16500.1	unknown protein
ZA7169147 ZA7169148	6,08	AT4G01200	AT4G01200.1	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
ZA7061880 ZA7061882	6,02	AT1G72280	ERO1	endoplasmic reticulum oxidoreductins 1
ZA7198563 ZA7198572	5,97	AT4G30230	AT4G30230.1	unknown protein
ZA7072490 ZA7072492	5,97	AT2G02810	UTR1	UDP-galactose transporter 1
ZA7201484	5,96	AT4G33040	AT4G33040.1	Thioredoxin superfamily protein
ZAB002332	5,95	AT3G30390	AT3G30390.2	Transmembrane amino acid transporter family protein
ZA7270361	5,89	AT5G67340	AT5G67340.1	ARM repeat superfamily protein
ZA7091978 ZA7091987	5,88	AT2G27310	AT2G27310.1	F-box family protein
ZA7096899 ZA7096901	5,87	AT2G32130	AT2G32130.1	Plant protein of unknown function (DUF641)
ZA7206128 ZA7206129 ZA7206135	5,83	AT4G37520	AT4G37520.1	Peroxidase superfamily protein
ZA7264711	5,83	AT5G61790	CNX1	calnexin 1
ZA7266860 ZA7266861	5,77	AT5G63990	AT5G63990.1	Inositol monophosphatase family protein
ZA7095130 ZA7095133	5,70	AT2G30480	AT2G30480.3	unknown protein
ZA7191177 ZA7191181	5,67	AT4G23170	EP1	receptor-like protein kinase-related family protein
ZA7242275 ZA7242276 ZA7242278	5,67	AT5G40240	AT5G40240.2	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
ZA7208601	5,66	AT4G39955	AT4G39955.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7235297	5,63	AT5G28540	BIP1	heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
ZA7264156 ZA7264157	5,61	AT5G61250	GUS1	glucuronidase 1
ZA7034003 ZA7034004	5,58	AT1G35320	AT1G35320.1	unknown protein
ZA7126520 ZA7126522	5,58	AT3G13432	AT3G13432.1	unknown protein
ZA7202938	5,57	AT4G34400	AT4G34400.1	AP2/B3-like transcriptional factor family protein
ZA7055479 ZA7055482	5,54	AT1G66090	AT1G66090.1	Disease resistance protein (TIR-NBS class)
ZA7013305 ZA7013306	5,54	AT1G13750	AT1G13750.1	Purple acid phosphatases superfamily protein
ZA7009740 ZA7009746	5,53	AT1G10417	AT1G10417.1	Encodes protein with unknown function whose expression is repressed by inoculation with Agrobacterium tumerifaciens
ZA7165509 ZA7165511 ZA7165518	5,48	AT3G61280	AT3G61280.1	Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF821)
ZAB003974	5,47	AT5G60040	AT5G60040.1	nuclear RNA polymerase C1
ZA7070802 ZA7070803	5,45	AT2G01120	ORC4	origin recognition complex subunit 4

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7070804				
ZA7105208 ZA7105214	5,40	AT2G40095	AT2G40095.1	Alpha/beta hydrolase related protein
ZA7247522 ZA7247523	5,38	AT5G45100	BRG1	SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
ZA7197815 ZA7197816	5,37	AT4G29520	AT4G29520.1	unknown protein
ZA7050590 ZA7050593	5,36	AT1G61420	AT1G61420.1	S-locus lectin protein kinase family protein
ZA7152064 ZA7152069	5,32	AT3G48080	AT3G48080.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7050040 ZA7050041	5,30	AT1G60960	IRT3	iron regulated transporter 3
ZA7169536 ZA7169537	5,29	AT4G01540	NTM1	NAC with transmembrane motif1
ZA7199854	5,26	AT4G31500	CYP83B1	cytochrome P450, family 83, subfamily B, polypeptide 1
ZA7063864 ZA7063865	5,22	AT1G74210	GDPD5	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein
ZA7233512 ZA7233514 ZA7233515	5,22	AT5G26920	CBP60G	Cam-binding protein 60-like G
ZA7195685 ZA7195686 ZA7195692	5,19	AT4G27480	AT4G27480.1	Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
ZA7261388 ZA7261390	5,19	AT5G58540	AT5G58540.1	Protein kinase superfamily protein
ZA7038681 ZA7038682	5,16	AT1G48000	MYB112	myb domain protein 112
ZA7011459 ZA7011461	5,13	AT1G11940	AT1G11940.1	Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
ZA7232701	5,10	AT5G25930	AT5G25930.1	Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain
ZA7139605 ZA7139606	5,09	AT3G25597	AT3G25597.1	unknown protein
ZA7255388	5,04	AT5G52750	AT5G52750.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
ZA7133619 ZA7133620	5,01	AT3G19970	AT3G19970.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7112512	5,01	AT2G46980	ASY3	unknown protein
ZA7213485	5,00	AT5G05600	AT5G05600.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
ZA7017293 ZA7017294	4,98	AT1G17610	AT1G17610.1	Disease resistance protein (TIR-NBS class)
ZA7247250	4,98	AT5G44820	AT5G44820.1	Nucleotide-diphospho-sugar transferase family protein
ZA7116646 ZA7116648 ZA7116649	4,97	AT3G03780	MS2	methionine synthase 2
ZA7232078	4,95	AT5G25260	AT5G25260.1	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family
ZA7103635 ZA7103637	4,95	AT2G38580	AT2G38580.1	Mitochondrial ATP synthase D chain-related protein
ZA7033903 ZA7033905	4,89	AT1G35210	AT1G35210.1	unknown protein
ZA7048146 ZA7048150	4,88	AT1G58190	RLP9	receptor like protein 9
ZA7209738	4,88	AT5G01850	AT5G01850.1	Protein kinase superfamily protein
ZA7114142 ZA7114143 ZA7114144	4,87	AT3G01410	AT3G01410.1	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
ZA7166807 ZA7166809	4,86	AT3G62600	ATERDJ3B	DNAJ heat shock family protein
ZA7226588	4,85	AT5G19240	AT5G19240.1	Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored
ZA7104673 ZA7104675	4,83	AT2G39650	AT2G39650.1	Protein of unknown function (DUF506)
ZA7214225	4,82	AT5G06320	NHL3	NDR1/HIN1-like 3

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7250442	4,81	AT5G47910	RBOHD	respiratory burst oxidase homologue D
ZA7046699 ZA7046701	4,78	AT1G55915	AT1G55915.1	zinc ion binding
ZA7192085 ZA7192087	4,77	AT4G24026	AT4G24026.1	unknown protein
ZA7032559 ZA7032560	4,77	AT1G33560	ADR1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
ZA7139614 ZA7139616	4,74	AT3G25600	AT3G25600.1	Calcium-binding EF-hand family protein
ZA7092825 ZA7092826	4,72	AT2G28160	FRU	FER-like regulator of iron uptake
ZA7261823	4,71	AT5G58940	CRCK1	calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 1
ZA7252966	4,66	AT5G50315	AT5G50315.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7081299 ZA7081301	4,63	AT2G16870	AT2G16870.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
ZA7055145 ZA7055146	4,62	AT1G65770	AMR1	ascorbic acid mannose pathway regulator 1
ZA6044597	4,62	AT1G54270	EIF4A-2	eif4a-2
ZA7049977 ZA7049978 ZA7049979	4,60	AT1G60890	AT1G60890.2	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase family protein
ZA7082227 ZA7082230	4,59	AT2G17720	P4H5	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
ZA7062516 ZA7062518	4,59	AT1G72920	AT1G72920.1	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
ZA7033665 ZA7033668	4,56	AT1G34770	AT1G34770.1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: MAGE protein (InterPro:IPR002190)
ZA7116469 ZA7116473	4,56	AT3G03640	BGLU25	beta glucosidase 25
ZA7166991 ZA7166994	4,56	AT3G62780	AT3G62780.1	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
ZA7121312 ZA7121313 ZA7121314	4,55	AT3G08590	iPGAM2	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent
ZA7122732 ZA7122736	4,53	AT3G09960	AT3G09960.1	Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily protein
ZA7122561 ZA7122566	4,49	AT3G09810	IDH-VI	isocitrate dehydrogenase VI
ZA7164605 ZA7164608	4,44	AT3G60440	AT3G60440.1	Phosphoglycerate mutase family protein
ZA7267760	4,43	AT5G64870	AT5G64870.1	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family
ZA7258762	4,43	AT5G56010	HSP81-3	heat shock protein 81-3
ZA7269608	4,43	AT5G66620	DAR6	DA1-related protein 6
ZA7251304 ZA7251306	4,36	AT5G48720	XRI1	x-ray induced transcript 1
ZA7258310	4,35	AT5G55560	AT5G55560.1	Protein kinase superfamily protein
ZA7019704	4,29	AT1G20015	AT1G20015.1	snoRNA small_nucleolar_rna
ZA7028207 ZA7028211	4,26	AT1G29240	AT1G29240.1	Protein of unknown function (DUF688)
ZA7103877 ZA7103878 ZA7103879	4,26	AT2G38810	HTA8	histone H2A 8
ZA7047330 ZA7047332	4,25	AT1G56470	AT1G56470.1	pseudogene, disease resistance protein (fragment)
ZA7095150 ZA7095151 ZA7095153	4,25	AT2G30500	NET4B	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
ZA7161711 ZA7161712 ZA7161713	4,24	AT3G57550	AGK2	guanylate kinase
ZAB002638 ZAB002640	4,21	AT3G61620	AT3G61620.2	3'-5'-exoribonuclease family protein
ZA6100926 ZA7101875 ZA7101876	4,19	AT2G36880	MAT3	methionine adenosyltransferase 3

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7265639	4,19	AT5G62740	HIR1	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family
ZA7269618	4,19	AT5G66630	DAR5	DA1-related protein 5
ZA7095200 ZA7095202	4,15	AT2G30550	AT2G30550.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7258752	4,14	AT5G56000	Hsp81.4	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4
ZA7151520 ZA7151524	4,14	AT3G47530	AT3G47530.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
ZA7251609 ZA7251610	4,13	AT5G49010	SLD5	DNA replication protein-related
ZA7152662 ZA7152671	4,11	AT3G48650	AT3G48650.1	pseudogene, At14a-related protein
ZA7205197	4,09	AT4G36648	AT4G36648.1	other RNA other_rna
ZA7013938 ZA7013939	4,06	AT1G14360	UTR3	UDP-galactose transporter 3
ZA7208632	4,06	AT4G39980	DHS1	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase 1
ZA7026064 ZA7026065	4,05	AT1G26930	AT1G26930.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
ZA7266415 ZA7266416	4,01	AT5G63550	AT5G63550.2	DEK domain-containing chromatin associated protein
ZA7082123 ZA7082125	4,00	AT2G17630	AT2G17630.1	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein
ZAB001148 ZAB001150	3,99	AT1G78920	AT1G78920.2	vacuolar H ⁺ -pyrophosphatase 2
ZA7230637	3,99	AT5G23910	AT5G23910.1	ATP binding microtubule motor family protein
ZA7000574 ZA7000578 ZA7000579	3,99	AT1G01560	MPK11	MAP kinase 11
ZA7068439 ZA7068440 ZA7068442	3,98	AT1G78780	AT1G78780.2	pathogenesis-related family protein
ZA7108255 ZA7108259	3,96	AT2G42950	AT2G42950.1	Magnesium transporter CorA-like family protein
ZA7057021 ZA7057026	3,95	AT1G67520	AT1G67520.1	lectin protein kinase family protein
ZA7264379	3,95	AT5G61460	MIM	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
ZA7230997	3,94	AT5G24210	AT5G24210.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
ZA7194034 ZA7194037	3,91	AT4G25900	AT4G25900.1	Galactose mutarotase-like superfamily protein
ZA7018245 ZA7018246	3,89	AT1G18570	MYB51	myb domain protein 51
ZA7058282 ZA7058285	3,88	AT1G68710	AT1G68710.1	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
ZA7110732 ZA7110733 ZA7110734	3,88	AT2G45280	RAD51C	RAS associated with diabetes protein 51C
ZA7124732 ZA7124734	3,88	AT3G11840	PUB24	plant U-box 24
ZA7212818	3,87	AT5G04930	ALA1	aminophospholipid ATPase 1
ZA7007489 ZA7007490	3,83	AT1G08260	TIL1	DNA polymerase epsilon catalytic subunit
ZA7191931 ZA7191932	3,82	AT4G23885	AT4G23885.1	unknown protein
ZA7053647 ZA7053648	3,80	AT1G64360	AT1G64360.1	unknown protein
ZA7024887 ZA7024888	3,80	AT1G25370	AT1G25370.1	Protein of unknown function (DUF1639)
ZA7222899	3,80	AT5G15650	RGP2	reversibly glycosylated polypeptide 2
ZA7150997 ZA7150998	3,77	AT3G46930	AT3G46930.1	Protein kinase superfamily protein
ZA7160365 ZA7160367	3,75	AT3G56200	AT3G56200.1	Transmembrane amino acid transporter family protein
ZA7173569 ZA7173570 ZA7173573	3,73	AT4G05390	RFNR1	root FNR 1

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7102757 ZA7102758	3,72	AT2G37710	RLK	receptor lectin kinase
ZA6231941	3,72	AT5G27420	CNI1	carbon/nitrogen insensitive 1
ZA7150470 ZA7150472 ZA7150473	3,70	AT3G46440	UXS5	UDP-XYL synthase 5
ZA7169761 ZA7169762	3,70	AT4G01740	AT4G01740.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
ZA7113641 ZA7113644	3,70	AT3G01010	AT3G01010.1	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase family protein
ZA7121758 ZA7121761	3,70	AT3G09020	AT3G09020.1	alpha 1,4-glycosyltransferase family protein
ZA7256820	3,70	AT5G54100	AT5G54100.1	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family
ZA7145273 ZA7145276 ZA7145279	3,68	AT3G31442	SADHU7-2	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7040091 ZA7040092	3,68	AT1G49405	AT1G49405.1	Uncharacterised protein family (UPF0497) -
ZA7103532 ZA7103535	3,67	AT2G38470	WRKY33	WRKY DNA-binding protein 33 -
ZA7166210 ZA7166211	3,65	AT3G61960	AT3G61960.1	Protein kinase superfamily protein -
ZA7217023	3,64	AT5G09420	TOC64-V	translocon at the outer membrane of chloroplasts 64-V -
ZA7046814 ZA7046815 ZA7046816	3,64	AT1G56010	NAC1	NAC domain containing protein 1 -
ZA7046881 ZA7046882	3,64	AT1G56080	AT1G56080.1	unknown protein
ZA7249649	3,63	AT5G47120	BI1	BAX inhibitor 1 -
ZA7258780 ZA7258781	3,62	AT5G56030	HSP81-2	heat shock protein 81-2 -
ZA7040344 ZA7040345	3,59	AT1G49670	NQR	ARP protein (REF) -
ZA7149661 ZA7149662 ZA7149664	3,58	AT3G45620	AT3G45620.2	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein -
ZA7037395 ZA7037398	3,57	AT1G45145	TRX5	thioredoxin H-type 5 -
ZA7226109 ZA7226111 ZA7226112	3,56	AT5G18780	AT5G18780.1	F-box/RNI-like superfamily protein -
ZA7120547 ZA7120556	3,55	AT3G07390	AIR12	auxin-responsive family protein -
ZA7167207 ZA7167208	3,55	AT3G63010	GID1B	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein -
ZA7063308 ZA7063309	3,53	AT1G73687	MIR159A	MIR159/MIR159A; miRNA miRNA
ZA7237980	3,52	AT5G35735	AT5G35735.1	Auxin-responsive family protein -
ZA7126673 ZA7126674 ZA7126675	3,49	AT3G13560	AT3G13560.1	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein -
ZA7067545 ZA7067547	3,46	AT1G77880	AT1G77880.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein -
ZA7169969 ZA7169972	3,45	AT4G01920	AT4G01920.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein -
ZA7126543 ZA7126551	3,44	AT3G13438	SADHU7-1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7257536	3,44	AT5G54780	AT5G54780.1	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein -
ZA7178904 ZA7178907	3,42	AT4G11850	PLDGAMMA1	phospholipase D gamma 1 -
ZA7082271 ZA7082272	3,40	AT2G17760	AT2G17760.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein -
ZA7057391 ZA7057395 ZA7057396	3,37	AT1G67850	AT1G67850.1	Protein of unknown function (DUF707) -
ZA7185561 ZA7185562	3,36	AT4G17720	AT4G17720.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein -
ZA7203189	3,34	AT4G34630	AT4G34630.1	unknown protein;
ZA7106660	3,33	AT2G41440	AT2G41440.1	unknown protein
ZA7067862 ZA7067863	3,33	AT1G78190	AT1G78190.1	Trm112p-like protein -
ZA7153334 ZA7153335	3,31	AT3G49320	AT3G49320.1	Metal-dependent protein hydrolase -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7195889 ZA7195892	3,31	AT4G27652	AT4G27652.1	unknown protein
ZA7243555	3,28	AT5G41471	SNOR108	SNOR108; snoRNA small_nucleolar_rna
ZA7156492 ZA7156493	3,27	AT3G52400	SYP122	syntaxin of plants 122 -
ZA7269930	3,26	AT5G66910	AT5G66910.1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family -
ZA7168934 ZA7168940	3,25	AT4G01010	CNGC13	cyclic nucleotide-gated channel 13 -
ZA7228484	3,25	AT5G21140	emb1379	embryo defective 1379 -
ZA7263950	3,25	AT5G61030	GR-RBP3	glycine-rich RNA-binding protein 3 -
ZA7179180 ZA7179183	3,25	AT4G12120	SEC1B	Sec1/munc18-like (SM) proteins superfamily -
ZA7200597 ZA7200598 ZA7200601	3,23	AT4G32208	AT4G32208.1	heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein -
ZA7181479 ZA7181480	3,22	AT4G14220	RHF1A	RING-H2 group F1A -
ZA7007358 ZA7007359	3,22	AT1G08130	LIG1	DNA ligase 1 -
ZA7116437 ZA7116440	3,21	AT3G03610	AT3G03610.1	ELMO/CED-12 family protein -
ZA7058447 ZA7058454	3,19	AT1G68850	AT1G68850.1	Peroxidase superfamily protein -
ZA7068430 ZA7068432	3,18	AT1G78770	APC6	anaphase promoting complex 6 -
ZA7154968 ZA7154971	3,18	AT3G50910	AT3G50910.1	unknown protein
ZA7223807 ZA7223810 ZA7223811	3,18	AT5G16510	RGP5	Alpha-1,4-glucan-protein synthase family protein -
ZA7054886 ZA7054887	3,18	AT1G65520	ECI1	delta(3), delta(2)-enoyl CoA isomerase 1 -
ZA7243262	3,17	AT5G41170	AT5G41170.1	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein -
ZA7049934 ZA7049935	3,15	AT1G60830	AT1G60830.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein -
ZA7222887	3,15	AT5G15640	AT5G15640.1	Mitochondrial substrate carrier family protein -
ZA7097974 ZA7097975 ZA7097977	3,12	AT2G33120	SAR1	synaptobrevin-related protein 1 -
ZAB003231	3,12	AT5G01010	AT5G01010.3	EXPRESSED IN: 23 plant structures
ZA7231451 ZA7231453 ZA7231454	3,10	AT5G24630	BIN4	double-stranded DNA binding -
ZA7042288 ZA7042293	3,09	AT1G51660	MKK4	mitogen-activated protein kinase kinase 4 -
ZA7265311	3,08	AT5G62410	SMC2	structural maintenance of chromosomes 2 -
ZA7225789	3,07	AT5G18480	PGSIP6	plant glycogenin-like starch initiation protein 6 -
ZA7227286	3,05	AT5G19920	AT5G19920.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein -
ZA7103810 ZA7103811	3,05	AT2G38740	AT2G38740.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
ZA7026233 ZA7026235 ZA7026236	3,04	AT1G27110	AT1G27110.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein -
ZA7097968 ZA7097972	3,04	AT2G33110	VAMP723	vesicle-associated membrane protein 723 -
ZA7193522 ZA7193526	3,03	AT4G25433	AT4G25433.1	peptidoglycan-binding LysM domain- containing protein -
ZA7187361	3,02	AT4G19395	MIR168A	MIR168/MIR168A; miRNA miRNA
ZAB003598	3,02	AT5G24810	AT5G24810.1	ABC1 family protein -
ZA7038548 ZA7038549 ZA7038550	3,01	AT1G47870	ATE2F2	winged-helix DNA-binding transcription factor family protein -
ZA7036139 ZA7036140	3,01	AT1G42990	BZIP60	basic region/leucine zipper motif 60 -
ZA7026932 ZA7026933	3,00	AT1G27820	AT1G27820.1	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein -
ZA7217216	3,00	AT5G09590	MTHSC70-2	mitochondrial HSO70 2 -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7160490 ZA7160491	2,99	AT3G56320	AT3G56320.1	PAP/OAS1 substrate-binding domain superfamily -
ZA7232791 ZA7232794 ZA7232796	2,99	AT5G26030	FC1	ferrochelataze 1 -
ZA7127181 ZA7127183	2,98	AT3G13940	AT3G13940.1	DNA binding;DNA-directed RNA polymerases -
ZA7029644 ZA7029646	2,97	AT1G30630	AT1G30630.1	Coatomer epsilon subunit -
ZA7057339 ZA7057342 ZA7057347	2,96	AT1G67800	AT1G67800.2	Copine (Calcium-dependent phospholipid-binding protein) family -
ZA7110448 ZA7110449 ZA7110450	2,96	AT2G45010	AT2G45010.1	PLAC8 family protein -
ZA7266547	2,96	AT5G63680	AT5G63680.1	Pyruvate kinase family protein -
ZA7232798	2,95	AT5G26038	MIR860A	MIR860a; miRNA miRNA
ZA7131084 ZA7131085 ZA7131087	2,94	AT3G17611	RBL14	RHOMBOLD-like protein 14 -
ZA7140817 ZA7140818 ZA7140819	2,94	AT3G26670	AT3G26670.1	Protein of unknown function (DUF803) -
ZA7061006 ZA7061013	2,93	AT1G71330	NAP5	non-intrinsic ABC protein 5 -
ZA7126400 ZA7126401	2,93	AT3G13330	PA200	proteasome activating protein 200 -
ZA7184748 ZA7184752	2,91	AT4G16960	AT4G16960.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family -
ZA7151818 ZA7151820	2,91	AT3G47830	AT3G47830.1	DNA glycosylase superfamily protein -
ZA7119558 ZA7119559 ZA7119560	2,90	AT3G06450	AT3G06450.1	HCO3- transporter family -
ZA7232542 ZA7232543 ZA7232544	2,89	AT5G25770	AT5G25770.3	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein -
ZA7261585	2,89	AT5G58730	MIK	pfkB-like carbohydrate kinase family protein -
ZA7188381 ZA7188382	2,87	AT4G20390	AT4G20390.1	Uncharacterised protein family (UPF0497) -
ZA7108842 ZA7108843 ZA7108846	2,86	AT2G43490	AT2G43490.1	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein -
ZA7143282 ZA7143286	2,86	AT3G28930	AIG2	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein -
ZA7224360	2,86	AT5G17060	ARFB1B	ADP-ribosylation factor B1B -
ZA7207876 ZA7207877 ZA7207878	2,83	AT4G39270	AT4G39270.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein -
ZA7018275 ZA7018276	2,81	AT1G18600	RBL12	RHOMBOLD-like protein 12 -
ZA7223434	2,81	AT5G16170	AT5G16170.1	Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein -
ZA7256848	2,80	AT5G54140	ILL3	IAA-leucine-resistant (ILR1)-like 3 -
ZA7123842 ZA7123849	2,77	AT3G10985	SAG20	senescence associated gene 20 -
ZA7116150 ZA7116151	2,76	AT3G03310	LCAT3	lecithin:cholesterol acyltransferase 3
ZA7231798	2,76	AT5G24980	AT5G24980.1	unknown protein
ZA7069222 ZA7069224	2,76	AT1G79530	GAPCP-1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 1 -
ZA7214654 ZA7214655 ZA7214656	2,75	AT5G06750	AT5G06750.1	Protein phosphatase 2C family protein -
ZA7178152 ZA7178154	2,73	AT4G11120	AT4G11120.1	translation elongation factor Ts (EF-Ts), putative -
ZA7249244	2,71	AT5G46740	UBP21	ubiquitin-specific protease 21 -
ZA7029474 ZA7029475 ZA7029476	2,71	AT1G30475	AT1G30475.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: embryo defective 1303 (TAIR:AT1G56200.1)
ZA7192970 ZA7192971	2,69	AT4G24920	AT4G24920.1	secE/sec61-gamma protein transport protein -
ZA7162335 ZA7162340	2,69	AT3G58150	AT3G58150.1	Optic atrophy 3 protein (OPA3) -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7198124 ZA7198125 ZA7198126 ZAB003124	2,69	AT4G29810	MKK2	MAP kinase kinase 2 -
ZA7021001 ZA7021003	2,68	AT4G32560	AT4G32560.2	paramyosin-related -
ZA7081907 ZA7081911	2,67	AT1G21270	WAK2	wall-associated kinase 2 -
ZA7184386 ZA7184394	2,66	AT2G17420	NTRA	NADPH-dependent thioredoxin reductase A -
ZA7021114 ZA7021115 ZA7021117	2,66	AT4G16660	AT4G16660.1	heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein -
ZA7058260 ZA7058269	2,66	AT1G21370	AT1G21370.1	unknown protein; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF218 (InterPro:IPR003848)
ZA7072082	2,64	AT1G68690	PERK9	Protein kinase superfamily protein -
ZA7056969 ZA7056975	2,64	AT2G02370	AT2G02370.1	SNARE associated Golgi protein family -
ZA7216261	2,63	AT1G67470	AT1G67470.1	Protein kinase superfamily protein -
ZA7006371 ZA7006372	2,61	AT5G08300	AT5G08300.1	Succinyl-CoA ligase, alpha subunit -
ZA7259114	2,60	AT1G07220	AT1G07220.1	Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF821) -
ZA7243999	2,59	AT5G56350	AT5G56350.1	Pyruvate kinase family protein -
ZA7028277 ZA7028281	2,58	AT5G41850	AT5G41850.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein -
ZA7070864 ZA7070865 ZA7070866	2,58	AT1G29310	AT1G29310.1	SecY protein transport family protein -
ZA7234028 ZA7234029 ZA7234031	2,57	AT2G01180	PAP1	phosphatidic acid phosphatase 1 -
ZA7169673 ZA7169674	2,57	AT5G27450	MK	mevalonate kinase -
ZA7065572 ZA7065573	2,56	AT4G01660	ABC1	ABC transporter 1 -
ZA7109750 ZA7109751 ZA7109752	2,55	AT1G75990	AT1G75990.1	PAM domain (PCI/PINT associated module) protein -
ZA7226603	2,55	AT2G44350	ATCS	Citrate synthase family protein -
ZA7202926	2,54	AT5G19250	AT5G19250.1	Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored -
ZA7112981 ZA7112982 ZA7112983	2,54	AT4G34390	XLG2	extra-large GTP-binding protein 2 -
ZA7128174 ZA7128176	2,53	AT2G47470	UNE5	thioredoxin family protein -
ZA7268016	2,51	AT3G14840	AT3G14840.2	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase -
ZA7059164 ZA7059169	2,51	AT5G65120	AT5G65120.1	unknown protein
ZA7185048 ZA7185051	2,51	AT1G69550	AT1G69550.1	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) -
ZA7190848 ZA7190849	2,50	AT4G17260	AT4G17260.1	Lactate/malate dehydrogenase family protein -
ZA7247543	2,49	AT4G22840	AT4G22840.1	Sodium Bile acid symporter family -
ZA7228584	2,49	AT5G45110	NPR3	NPR1-like protein 3 -
ZA7154596 ZA7154601	2,47	AT5G21900	AT5G21900.1	RNI-like superfamily protein -
ZA7198667 ZA7198672	2,47	AT3G50550	AT3G50550.1	unknown protein
ZA7013552 ZA7013553	2,46	AT4G30340	DGK7	diacylglycerol kinase 7 -
ZA7025767 ZA7025768	2,46	AT1G14010	AT1G14010.1	emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein -
ZA7141038 ZA7141040	2,46	AT1G26690	AT1G26690.1	emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein -
ZA7199159 ZA7199160	2,46	AT3G26820	AT3G26820.1	Esterase/lipase/thioesterase family protein -
ZA7234187	2,44	AT4G30840	AT4G30840.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein -
	2,44	AT5G27610	ALY1	DIRP ;Myb-like DNA-binding domain

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7153536 ZA7153537	2,42	AT3G49530	NAC062	NAC domain containing protein 62 -
ZA7202386	2,42	AT4G33920	AT4G33920.1	Protein phosphatase 2C family protein -
ZA7210272	2,42	AT5G02410	ALG10	DIE2/ALG10 family -
ZA7126968 ZA7126970	2,42	AT3G13782	NAP1;4	nucleosome assembly protein1;4 -
ZA7192889 ZA7192890	2,41	AT4G24820	AT4G24820.1	26S proteasome, regulatory subunit Rpn7;Proteasome component (PCI) domain -
ZA7203498	2,41	AT4G34960	AT4G34960.1	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein -
ZA7072536 ZA7072537 ZA7072539	2,40	AT2G02860	SUT2	sucrose transporter 2 -
ZA7003217 ZA7003218	2,40	AT1G04200	AT1G04200.1	unknown protein
ZA7061930 ZA7061931 ZA7061936	2,40	AT1G72330	ALAAT2	alanine aminotransferase 2 -
ZA7202375	2,40	AT4G33910	AT4G33910.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein -
ZA7189359 ZA7189360	2,39	AT4G21490	NDB3	NAD(P)H dehydrogenase B3 -
ZA7265109	2,39	AT5G62200	AT5G62200.1	Embryo-specific protein 3, (ATS3) -
ZA7010604 ZA7010605	2,38	AT1G11200	AT1G11200.1	Protein of unknown function (DUF300) -
ZA7234395 ZA7234398 ZA7234399	2,37	AT5G27830	AT5G27830.4	unknown protein
ZA7268702	2,37	AT5G65750	AT5G65750.1	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component -
ZA7008557 ZA7008559	2,36	AT1G09330	AT1G09330.1	unknown protein
ZA7111495 ZA7111496	2,36	AT2G46040	AT2G46040.1	ARID/BRIGHT DNA-binding domain;ELM2 domain protein -
ZA7207856	2,35	AT4G39240	AT4G39240.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein -
ZA7128357 ZA7128358 ZA7128364	2,33	AT3G15020	mMDH2	Lactate/malate dehydrogenase family protein -
ZA7091650 ZA7091651	2,32	AT2G27020	PAG1	20S proteasome alpha subunit G1 -
ZA7168724 ZA7168725	2,32	AT4G00860	ATOZI1	Protein of unknown function (DUF1138) -
ZA7181756 ZA7181759	2,29	AT4G14420	AT4G14420.1	HR-like lesion-inducing protein-related -
ZA7116386 ZA7116388	2,28	AT3G03560	AT3G03560.1	unknown protein
ZA7135008 ZA7135009	2,28	AT3G21220	MKK5	MAP kinase kinase 5 -
ZA7120751 ZA7120752	2,27	AT3G07570	AT3G07570.1	Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane with DOMON related domain -
ZA7101572 ZA7101573	2,26	AT2G36580	AT2G36580.1	Pyruvate kinase family protein -
ZA7115475 ZA7115477	2,26	AT3G02680	NBS1	nijmegen breakage syndrome 1 -
ZA7120529 ZA7120530	2,25	AT3G07370	CHIP	carboxyl terminus of HSC70-interacting protein -
ZAB003765	2,25	AT5G46630	AT5G46630.1	Clathrin adaptor complexes medium subunit family protein -
ZA7167035 ZA7167036 ZA7167037	2,24	AT3G62830	AUD1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein -
ZA7004640 ZA7004642 ZA7004643	2,20	AT1G05570	CALS1	callose synthase 1 -
ZA7197747 ZA7197748 ZA7197751	2,20	AT4G29440	AT4G29440.1	Regulator of Vps4 activity in the MVB pathway protein -
ZA7106271 ZA7106273 ZA7106274	2,18	AT2G41070	EEL	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein -
ZA7268097	2,18	AT5G65200	PUB38	plant U-box 38 -
ZAB002136	2,15	AT3G13445	AT3G13445.2	TATA binding protein 1 -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7041063 ZA7041064 ZA7041065 ZA7011909	2,13	AT1G50430	DWF5	Ergosterol biosynthesis ERG4/ERG24 family -
ZA7241066	2,11	AT1G12390	AT1G12390.1	Cornichon family protein -
ZA7240922	2,11	AT5G39040	ABCB27	transporter associated with antigen processing protein 2 -
ZA7095520 ZA7095521	2,09	AT5G38890	AT5G38890.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein -
ZA7082425 ZA7082428	2,07	AT2G30870	GSTF10	glutathione S-transferase PHI 10 -
ZA7169066 ZA7169067	-2,11	AT2G17900	SDG37	SET domain group 37 -
ZA7238535	-2,12	AT4G01120	GBF2	G-box binding factor 2 -
ZA7029703 ZA7029704 ZA7029705	-2,18	AT5G36230	AT5G36230.1	ARM repeat superfamily protein -
ZA7166965 ZA7166966	-2,22	AT1G30690	AT1G30690.1	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein -
ZA7208965	-2,25	AT3G62750	BGLU8	beta glucosidase 8 -
ZA7048968	-2,26	AT5G01160	AT5G01160.1	RING/U-box superfamily protein -
ZA7207295	-2,26	AT1G59840	CCB4	cofactor assembly of complex C -
ZA7148726 ZA7148727	-2,26	AT4G38660	AT4G38660.1	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein -
ZA7271142	-2,27	AT3G44716	AT3G44716.1	unknown protein
ZA7168001 ZA7168002	-2,27	ATCG00980	TRNR.2	tRNA-Arg pre_trna
ZA7224724	-2,28	AT4G00230	XSP1	xylem serine peptidase 1 -
ZA7188564 ZA7188566	-2,29	AT5G17440	AT5G17440.1	LUC7 related protein -
ZA7029976 ZA7029977	-2,30	AT4G20720	AT4G20720.1	dentin sialophosphoprotein-related -
ZA7100048 ZA7100049	-2,33	AT1G30910	AT1G30910.1	Molybdenum cofactor sulfurase family protein -
ZA7172521 ZA7172523	-2,36	AT2G35120	AT2G35120.1	Single hybrid motif superfamily protein -
ZA7220672	-2,38	AT4G04350	EMB2369	tRNA synthetase class I (I, L, M and V) family protein -
ZA7239857	-2,38	AT5G13410	AT5G13410.1	FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein -
ZA7111055 ZA7111057	-2,39	AT5G37890	AT5G37890.1	Protein with RING/U-box and TRAF- like domains -
ZA7237514	-2,39	AT2G45600	AT2G45600.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein -
ZA7056818 ZA7056826	-2,40	AT5G35370	AT5G35370.1	S-locus lectin protein kinase family protein -
ZA7179323 ZA7179325	-2,43	AT1G67330	AT1G67330.1	Protein of unknown function (DUF579) -
ZA7034322 ZA7034323	-2,43	AT4G12310	CYP706A5	cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 5 -
ZA7246520	-2,44	AT1G35620	PDIL5-2	PDI-like 5-2 -
ZA7092755 ZA7092756	-2,45	AT5G44190	GLK2	GOLDEN2-like 2 -
ZA7177293 ZA7177294	-2,47	AT2G28100	FUC1	alpha-L-fucosidase 1 -
ZA7093987 ZA7093988	-2,49	AT4G10300	AT4G10300.1	RmlC-like cupins superfamily protein
ZAB002959 ZAB002960	-2,50	AT2G29340	AT2G29340.1	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein -
ZA7098118 ZA7098120	-2,53	AT4G23330	AT4G23330.2	unknown protein
ZA7086643 ZA7086644	-2,53	AT2G33255	AT2G33255.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
ZA7025303 ZA7025304	-2,54	AT2G22080	AT2G22080.1	unknown protein
ZA7069860 ZA7069861	-2,54	AT1G26220	AT1G26220.1	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein -
	-2,55	AT1G80170	AT1G80170.1	Pectin lyase-like superfamily protein -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7224695 ZA7224696 ZA7224698	-2,57	AT5G17410	AT5G17410.2	Spc97 / Spc98 family of spindle pole body (SBP) component -
ZA7048112 ZA7048114	-2,58	AT1G58150	AT1G58150.1	unknown protein
ZA7114546 ZA7114547 ZA7114554	-2,59	AT3G01790	AT3G01790.1	Ribosomal protein L13 family protein -
ZA7239014	-2,61	AT5G37055	SEF	HIT-type Zinc finger family protein -
ZA6001123 ZA7001114	-2,63	AT1G02110	AT1G02110.1	Protein of unknown function (DUF630 and DUF632) -
ZA7102884 ZA7102885 ZA7102887	-2,64	AT2G37860	LCD1	Protein of unknown function (DUF3411) -
ZA7180725 ZA7180726	-2,64	AT4G13575	AT4G13575.1	unknown protein
ZA7010066 ZA7010068	-2,66	AT1G10682	AT1G10682.1	other RNA other_rna
ZA7114803 ZA7114804 ZA7114807	-2,66	AT3G02060	AT3G02060.1	DEAD/DEAH box helicase, putative -
ZA7112335 ZA7112337	-2,66	AT2G46810	AT2G46810.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein -
ZA7226607	-2,66	AT5G19260	FAF3	Protein of unknown function (DUF3049) -
ZA7207218	-2,68	AT4G38580	FP6	farnesylated protein 6 -
ZA7252825	-2,71	AT5G50180	AT5G50180.1	Protein kinase superfamily protein -
ZA7145028 ZA7145029	-2,77	AT3G30841	AT3G30841.1	Cofactor-independent phosphoglycerate mutase -
ZA7090814 ZA7090817	-2,79	AT2G26220	AT2G26220.1	pseudogene, similar to phosphoenolpyruvate/phosphate translocator precursor, similar to AraPPT
ZA7226939	-2,80	AT5G19570	AT5G19570.1	unknown protein
ZA7058215 ZA7058218	-2,82	AT1G68640	PAN	bZIP transcription factor family protein -
ZA7082145 ZA7082146	-2,82	AT2G17650	AT2G17650.1	AMP-dependent synthetase and ligase family protein -
ZA7114686 ZA7114687 ZA7114690	-2,83	AT3G01930	AT3G01930.2	Major facilitator superfamily protein -
ZA7083937 ZA7083940	-2,83	AT2G19430	DWA1	DWD (DDB1-binding WD40 protein) hypersensitive to ABA 1 -
ZA7214939	-2,85	AT5G07020	AT5G07020.1	proline-rich family protein -
ZA7237437 ZA7237438 ZA7237439	-2,85	AT5G35330	MBD02	methyl-CPG-binding domain protein 02 -
ZA7079021 ZA7079024	-2,88	AT2G14115	AT2G14115.1	other RNA other_rna
ZA7176735 ZA7176739 ZA7176741	-2,88	AT4G09760	AT4G09760.2	Protein kinase superfamily protein -
ZA7100132 ZA7100137	-2,90	AT2G35200	AT2G35200.1	unknown protein;
ZA7097661 ZA7097662 ZA7097663	-2,92	AT2G32840	AT2G32840.1	proline-rich family protein -
ZA7133987 ZA7133989	-2,94	AT3G20300	AT3G20300.1	Protein of unknown function (DUF3537) -
ZA7002494 ZA7002495 ZA7002497	-2,95	AT1G03470	NET3A	Kinase interacting (KIP1-like) family protein -
ZA7238171	-2,95	AT5G35910	AT5G35910.1	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H fold protein with HRDC domain -
ZA7090383 ZA7090385 ZA7090388	-2,95	AT2G25760	AT2G25760.2	Protein kinase family protein -
ZA7195400 ZA7195401	-2,96	AT4G27180	ATK2	kinesin 2 -
ZA7232775	-2,98	AT5G26010	AT5G26010.1	Protein phosphatase 2C family protein -
ZA7068721 ZA7068723	-2,99	AT1G78995	AT1G78995.1	unknown protein
ZA7087514 ZA7087515 ZA7087519	-3,00	AT2G22970	SCPL11	serine carboxypeptidase-like 11 -
ZA7150944 ZA7150946	-3,00	AT3G46880	AT3G46880.1	unknown protein

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7049792 ZA7049798	-3,01	AT1G60690	AT1G60690.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein -
ZA7188869 ZA7188870 ZA7188871	-3,01	AT4G21060	AT4G21060.1	Galactosyltransferase family protein -
ZA7249627	-3,01	AT5G47100	CBL9	calcineurin B-like protein 9 -
ZA7095671 ZA7095672	-3,03	AT2G30984	AT2G30984.1	other RNA other_rna
ZA7078822 ZA7078823	-3,04	AT2G13840	AT2G13840.1	Polymerase/histidinol phosphatase-like -
ZA7037343 ZA7037345	-3,05	AT1G45050	ATUBC2-1	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein -
ZA7096171 ZA7096173	-3,05	AT2G31440	AT2G31440.1	unknown protein
ZA7149801 ZA7149803 ZA7149806	-3,06	AT3G45750	AT3G45750.1	Nucleotidyltransferase family protein -
ZA7239479	-3,06	AT5G37500	GORK	gated outwardly-rectifying K+ channel -
ZA7022849 ZA7022853	-3,07	AT1G23052	AT1G23052.1	other_rna
ZA7144582 ZA7144583	-3,09	AT3G30300	AT3G30300.1	O-fucosyltransferase family protein -
ZA7231041	-3,11	AT5G24260	AT5G24260.1	prolyl oligopeptidase family protein -
ZA7075931 ZA7075932	-3,16	AT2G07170	AT2G07170.1	ARM repeat superfamily protein -
ZA7239123	-3,17	AT5G37190	CIP4	COP1-interacting protein 4 -
ZA7076064 ZA7076065 ZA7076066	-3,19	AT2G07360	AT2G07360.2	SH3 domain-containing protein -
ZA7142408 ZA7142411 ZA7142416	-3,21	AT3G28080	AT3G28080.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein -
ZA7087455 ZA7087456 ZA7087458	-3,24	AT2G22920	SCPL12	serine carboxypeptidase-like 12 -
ZA7014357 ZA7014359	-3,26	AT1G14730	AT1G14730.1	Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane protein family -
ZA7100067 ZA7100069 ZA7100070	-3,28	AT2G35140	AT2G35140.1	DCD (Development and Cell Death) domain protein -
ZA7064911 ZA7064914	-3,29	AT1G75290	AT1G75290.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein -
ZA7203164	-3,35	AT4G34600	AT4G34600.1	unknown protein
ZA7080581 ZA7080582	-3,35	AT2G16050	AT2G16050.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein -
ZA7112204 ZA7112205	-3,35	AT2G46690	AT2G46690.1	SAUR-like auxin-responsive protein family -
ZA7237326	-3,38	AT5G35170	AT5G35170.1	adenylate kinase family protein -
ZA7221842	-3,41	AT5G14570	NRT2.7	high affinity nitrate transporter 2.7 -
ZA7108266 ZA7108270	-3,43	AT2G42955	AT2G42955.1	unknown protein
ZA7111016 ZA7111018	-3,46	AT2G45560	CYP76C1	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1 -
ZA7074536 ZA7074537	-3,49	AT2G04940	AT2G04940.1	scramblase-related -
ZA7080506 ZA7080507	-3,52	AT2G15970	COR413-PM1	cold regulated 413 plasma membrane 1 -
ZA7028695 ZA7028696	-3,52	AT1G29730	AT1G29730.1	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase -
ZAB000589 ZAB000590	-3,53	AT1G36160	AT1G36160.2	acetyl-CoA carboxylase 1 -
ZA7007797 ZA7007798	-3,55	AT1G08560	SYP111	syntaxin of plants 111 -
ZA7088071 ZA7088078	-3,58	AT2G23570	MES19	methyl esterase 19 -
ZA7020762 ZA7020763	-3,63	AT1G21010	AT1G21010.1	unknown protein
ZA7154505 ZA7154507	-3,64	AT3G50440	MES10	methyl esterase 10 -
ZA7135177 ZA7135178	-3,65	AT3G21360	AT3G21360.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein -
ZA7018513 ZA7018521	-3,67	AT1G18830	AT1G18830.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7234596	-3,68	AT5G27950	AT5G27950.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein -
ZA7235358	-3,71	AT5G28622	AT5G28622.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7201420	-3,72	AT4G32980	ATH1	homeobox gene 1 -
ZA7143080 ZA7143081	-3,72	AT3G28770	AT3G28770.1	Protein of unknown function (DUF1216) -
ZA7046153 ZA7046156	-3,72	AT1G55390	AT1G55390.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein -
ZA7094642 ZA7094645	-3,79	AT2G29995	AT2G29995.1	unknown protein
ZA7020193 ZA7020194	-3,82	AT1G20520	AT1G20520.1	Arabidopsis protein of unknown function (DUF241) -
ZA7113587 ZA7113589 ZA7113590	-3,82	AT2G48120	PAC	pale cress protein (PAC) -
ZA7103350 ZA7103351	-3,84	AT2G38300	AT2G38300.1	myb-like HTH transcriptional regulator family protein -
ZA7006591 ZA7006593 ZA7006594	-3,85	AT1G07440	AT1G07440.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein -
ZA7017921 ZA7017922	-3,89	AT1G18265	AT1G18265.1	Protein of unknown function, DUF593 -
ZA7087323 ZA7087325	-3,90	AT2G22800	HAT9	Homeobox-leucine zipper protein family -
ZA7179433 ZA7179434	-3,92	AT4G12410	AT4G12410.1	SAUR-like auxin-responsive protein family -
ZA7201325	-3,94	AT4G32890	GATA9	GATA transcription factor 9 -
ZA7064901 ZA7064902	-3,97	AT1G75280	AT1G75280.1	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein -
ZA7135514 ZA7135515 ZA7135517	-3,97	AT3G21710	AT3G21710.2	unknown protein
ZA7200254	-3,98	AT4G31877	MIR156C	MIR156C; miRNA miRNA
ZA7129580 ZA7129581	-4,01	AT3G16175	AT3G16175.1	Thioesterase superfamily protein -
ZA7148899 ZA7148901	-4,07	AT3G44820	AT3G44820.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein -
ZA7043039 ZA7043041 ZA7043042	-4,12	AT1G52410	TSA1	TSK-associating protein 1 -
ZA7096527 ZA7096528	-4,12	AT2G31790	AT2G31790.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein -
ZA7097285 ZA7097288	-4,15	AT2G32487	AT2G32487.1	unknown protein
ZA7019218 ZA7019221	-4,19	AT1G19510	RL5	RAD-like 5 -
ZA7238770 ZA7238771 ZA7238773	-4,20	AT5G36710	AT5G36710.1	unknown protein
ZA7099459 ZA7099460	-4,21	AT2G34555	ATGA2OX3	gibberellin 2-oxidase 3 -
ZA7043737 ZA7043738	-4,21	AT1G53070	AT1G53070.1	Legume lectin family protein -
ZA7075486 ZA7075489	-4,22	AT2G06210	ELF8	binding -
ZA7031066 ZA7031069	-4,24	AT1G31970	STRS1	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein -
ZA7193580 ZA7193584	-4,26	AT4G25490	CBF1	C-repeat/DRE binding factor 1 -
ZA7231936	-4,26	AT5G25130	CYP71B12	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 12 -
ZA7064932 ZA7064938	-4,30	AT1G75300	AT1G75300.1	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein -
ZA7133784 ZA7133788	-4,34	AT3G20100	CYP705A19	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 19 -
ZA7079751 ZA7079752 ZA7079757	-4,34	AT2G15080	RLP19	receptor like protein 19 -
ZA6204464 ZA7206493 ZA7206496	-4,35	AT4G37890	EDA40	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein -
ZA7051431 ZA7051433 ZA7051434	-4,35	AT1G62250	AT1G62250.1	unknown protein; LOCATED IN: chloroplast

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7183333 ZA7183334 ZA7183335	-4,41	AT4G15760	MO1	monooxygenase 1 -
ZA7138898 ZA7138900	-4,45	AT3G24800	PRT1	proteolysis 1 -
ZA7000374 ZA7000378	-4,48	AT1G01380	ETC1	Homeodomain-like superfamily protein -
ZA7026817 ZA7026818	-4,49	AT1G27680	APL2	ADPGLC-PPase large subunit -
ZA7131812 ZA7131814	-4,49	AT3G18280	AT3G18280.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein -
ZA7237034	-4,58	AT5G34850	PAP26	purple acid phosphatase 26 -
ZA7182708 ZA7182711	-4,60	AT4G15230	ABCG30	pleiotropic drug resistance 2 -
ZA7054112 ZA7054114 ZA7054116	-4,64	AT1G64790	ILA	ILITYHIA -
ZA7097359 ZA7097361	-4,66	AT2G32560	AT2G32560.1	F-box family protein -
ZA7096646 ZA7096650	-4,69	AT2G31900	XIF	myosin-like protein XIF -
ZA7175594 ZA7175595	-4,78	AT4G08580	AT4G08580.1	microfibrillar-associated protein- related -
ZA7230796	-4,91	AT5G24060	AT5G24060.2	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein -
ZA7170833 ZA7170834	-4,93	AT4G02680	EOL1	ETO1-like 1 -
ZA7226184	-5,02	AT5G18860	NSH3	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein -
ZA7143329 ZA7143330	-5,12	AT3G28960	AT3G28960.1	Transmembrane amino acid transporter family protein -
ZA7172985 ZA7172986	-5,18	AT4G04810	MSRB4	methionine sulfoxide reductase B4 -
ZA7174821 ZA7174824	-5,21	AT4G07812	AT4G07812.1	unknown pseudogene pseudogene
ZA7214614 ZA7214615 ZA7214616	-5,23	AT5G06710	HAT14	homeobox from Arabidopsis thaliana -
ZA7058799 ZA7058800 ZA7058803	-5,41	AT1G69230	SP1L2	SPIRAL1-like2 -
ZA7261653	-5,43	AT5G58784	AT5G58784.1	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase family protein -
ZA7108883 ZA7108884	-5,56	AT2G43535	AT2G43535.1	Scorpion toxin-like knottin superfamily protein -
ZA7247583	-5,57	AT5G45140	NRPC2	nuclear RNA polymerase C2 -
ZA7231966	-5,61	AT5G25160	ZFP3	zinc finger protein 3 -
ZA7197890 ZA7197891	-5,75	AT4G29590	AT4G29590.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein -
ZA7234872	-5,86	AT5G28220	AT5G28220.1	Protein prenyltransferase superfamily protein -
ZA7148229 ZA7148230	-5,94	AT3G44220	AT3G44220.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family -
ZA7264326 ZA7264327	-5,96	AT5G61420	MYB28	myb domain protein 28 -
ZA7130500 ZA7130501	-6,15	AT3G17070	AT3G17070.1	Peroxidase family protein -
ZA7248223 ZA7248224	-6,15	AT5G45720	AT5G45720.1	AAA-type ATPase family protein -
ZA7193559 ZA7193560	-6,18	AT4G25470	CBF2	C-repeat/DRE binding factor 2 -
ZA7191458 ZA7191459 ZA7191461	-6,26	AT4G23430	Tic32-IVa	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein -
ZA7004677 ZA7004680	-6,34	AT1G05590	HEXO2	beta-hexosaminidase 2 -
ZA7093708 ZA7093710	-6,42	AT2G29050	RBL1	RHOMBOID-like 1 -
ZA7133668 ZA7133669	-6,43	AT3G20015	AT3G20015.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein -
ZA7176459 ZA7176461	-6,50	AT4G09490	AT4G09490.1	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein -
ZAB001445	-6,52	AT2G22980	AT2G22980.2	serine carboxypeptidase-like 13 -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7174915 ZA7174922	-6,63	AT4G07950	AT4G07950.1	DNA-directed RNA polymerase, subunit M, archaeal -
ZA7067515 ZA7067516	-6,64	AT1G77855	AT1G77855.1	unknown protein
ZA7144097 ZA7144099	-6,74	AT3G29680	AT3G29680.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein -
ZAB002753 ZAB002754	-6,82	AT4G08035	AT4G08035.2	other RNA other_rna
ZA7165288 ZA7165289	-6,90	AT3G61090	AT3G61090.1	Putative endonuclease or glycosyl hydrolase -
ZA7177309 ZA7177310	-7,00	AT4G10310	HKT1	high-affinity K ⁺ transporter 1 -
ZA7076057 ZA7076058 ZA7076061	-7,05	AT2G07340	PFD1	PREFOLDIN 1 -
ZA7067788 ZA7067789	-7,19	AT1G78120	TPR12	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein -
ZA7117874 ZA7117878 ZA7117880	-7,19	AT3G04960	AT3G04960.3	Domain of unknown function (DUF3444) -
ZA7099249 ZA7099250	-7,32	AT2G34355	AT2G34355.1	Major facilitator superfamily protein -
ZA7036348 ZA7036349	-7,49	AT1G43245	AT1G43245.1	SET domain-containing protein -
ZAB002757 ZAB002758	-7,50	AT4G08870	AT4G08870.2	Arginase/deacetylase superfamily protein -
ZA7133824 ZA7133831	-7,83	AT3G20140	CYP705A23	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 23 -
ZA7028482 ZA7028486	-7,83	AT1G29490	AT1G29490.1	SAUR-like auxin-responsive protein family -
ZA7145910 ZA7145912	-7,88	AT3G32930	AT3G32930.1	unknown protein
ZA7040002 ZA7040004	-8,15	AT1G49320	USPL1	unknown seed protein like 1 -
ZA7147452 ZA7147453 ZA7147454	-8,17	AT3G43540	AT3G43540.1	Protein of unknown function (DUF1350) -
ZA7176319 ZA7176320	-8,28	AT4G09350	NdhT	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein -
ZA7234916	-8,34	AT5G28237	AT5G28237.1	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme family protein -
ZA7151245 ZA7151248	-8,37	AT3G47180	AT3G47180.1	RING/U-box superfamily protein -
ZA7232965	-8,38	AT5G26220	AT5G26220.1	ChaC-like family protein -
ZA7068189 ZA7068190	-8,40	AT1G78530	AT1G78530.1	Protein kinase superfamily protein -
ZA7175114	-8,58	AT4G08112	AT4G08112.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7185849 ZA7185850	-8,65	AT4G17970	ALMT12	aluminum-activated, malate transporter 12 -
ZA7232602	-8,66	AT5G25830	GATA12	GATA transcription factor 12 -
ZAB003190	-8,66	AT4G37980	AT4G37980.2	elicitor-activated gene 3-1 -
ZA7162528 ZA7162529	-8,72	AT3G58350	RTM3	RESTRICTED TEV MOVEMENT 3 -
ZA7044339 ZA7044340	-9,33	AT1G53633	AT1G53633.1	unknown protein
ZA7030398 ZA7030399	-9,65	AT1G31290	AGO3	ARGONAUTE 3 -
ZA7217971	-9,98	AT5G10310	AT5G10310.1	unknown protein
ZA7100489 ZA7100490	-9,99	AT2G35580	AT2G35580.1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein -
ZA7154482 ZA7154483	-10,10	AT3G50410	OBP1	OBF binding protein 1 -
ZA7193570 ZA7193576	-10,18	AT4G25480	DREB1A	dehydration response element B1A -
ZA7042668 ZA7042669	-10,48	AT1G52040	MBP1	myosinase-binding protein 1 -
ZA7081444 ZA7081445 ZA7081446	-10,49	AT2G16990	AT2G16990.1	Major facilitator superfamily protein -
ZA7051269 ZA7051271	-10,49	AT1G62085	AT1G62085.1	Mitochondrial transcription termination factor family protein -
ZA7036644 ZA7036651 ZA7036652	-10,59	AT1G43770	AT1G43770.2	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein -
ZA7174021 ZA7174024	-10,77	AT4G06534	AT4G06534.1	unknown protein

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7237650	-10,81	AT5G35490	MRU1	mta 1 responding up 1 -
ZA7038512 ZA7038513 ZA7038514	-10,87	AT1G47820	AT1G47820.1	unknown protein
ZA7003196 ZA7003200	-10,98	AT1G04180	YUC9	YUCCA 9 -
ZA7172922 ZA7172923	-11,01	AT4G04750	AT4G04750.1	Major facilitator superfamily protein -
ZA7175103 ZA7175104	-11,17	AT4G08110	AT4G08110.1	transposable element gene transposable_element_gene
ZA7078572 ZA7078574	-11,22	AT2G13540	ABH1	ARM repeat superfamily protein -
ZA7163405 ZA7163406 ZA7163407	-11,59	AT3G59210	AT3G59210.1	F-box/RNI-like superfamily protein -
ZA7086403 ZA7086405	-11,70	AT2G21830	AT2G21830.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein -
ZA7029896	-11,71	AT1G30840	PUP4	purine permease 4 -
ZA7175742 ZA7175743	-11,79	AT4G08700	ATPUP13	Drug/metabolite transporter superfamily protein -
ZA7144088 ZA7144090	-11,80	AT3G29670	PMAT2	HXXXD-type acyl-transferase family protein -
ZA7175605 ZA7175606 ZA7175610	-12,07	AT4G08590	ORTHL	ORTHRUS-like -
ZA7228100	-12,82	AT5G20740	AT5G20740.1	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein -
ZA7129844 ZA7129845 ZA7129847	-13,07	AT3G16430	JAL31	jacalin-related lectin 31 -
ZA7215525	-13,10	AT5G07571	AT5G07571.1	Oleosin family protein -
ZA7228000	-13,33	AT5G20640	AT5G20640.1	Protein of unknown function (DUF567) -
ZA7093470 ZA7093471	-13,73	AT2G28790	AT2G28790.1	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein -
ZA7134086 ZA7134087	-14,13	AT3G20395	AT3G20395.1	RING/U-box superfamily protein -
ZA7182999 ZA7183000	-14,73	AT4G15440	HPL1	hydroperoxide lyase 1 -
ZA7183342 ZA7183344	-14,97	AT4G15765	AT4G15765.1	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein -
ZA7230716	-15,50	AT5G23980	FRO4	ferric reduction oxidase 4 -
ZA7253431	-16,36	AT5G50800	SWEET13	Nodulin MtN3 family protein -
ZA7090396 ZA7090401 ZA7090402	-17,17	AT2G25770	AT2G25770.1	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein -
ZA7146186 ZA7146188	-17,60	AT3G33520	ARP6	actin-related protein 6 -
ZA7029171 ZA7029175 ZA7029180	-17,77	AT1G30160	AT1G30160.2	Protein of unknown function (DUF295) -
ZA7127783	-19,37	AT3G14452	AT3G14452.1	unknown protein
ZA7055420 ZA7055422 ZA7055425	-19,70	AT1G66040	VIM4	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein -
ZA7078729 ZA7078731	-19,80	AT2G13690	AT2G13690.1	PRLI-interacting factor, putative -
ZA7133813 ZA7133814 ZA7133816	-20,40	AT3G20130	CYP705A22	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 22 -
ZA7144321 ZA7144322	-21,70	AT3G29810	COBL2	COBRA-like protein 2 precursor -
ZA7055433 ZA7055435	-21,97	AT1G66050	VIM2	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein -
ZA7134171 ZA7134172 ZA7134173	-22,87	AT3G20480	LPXK	tetraacyldisaccharide 4'-kinase family protein -
ZA7237646	-24,73	AT5G35480	AT5G35480.1	unknown protein
ZA7239060	-24,87	AT5G37130	AT5G37130.1	Protein prenyltransferase superfamily protein -
ZA7154161 ZA7154162	-25,37	AT3G50120	AT3G50120.1	Plant protein of unknown function (DUF247) -
ZA7146205 ZA7146208 ZA7146209	-25,90	AT3G33530	AT3G33530.3	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein -
ZA7230469 ZA7230470	-27,73	AT5G23750	AT5G23750.1	Remorin family protein -

Oligo-Bezeichnung	FC_Mittelwert	AGI Code	Genname	Beschreibung
ZA7230478				
ZA7161146 ZA7161148	-32,25	AT3G56970	BHLH038	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein -
ZA7198094 ZA7198097	-32,31	AT4G29780	AT4G29780.1	unknown protein
ZA7042645 ZA7042646	-32,47	AT1G52000	AT1G52000.1	Mannose-binding lectin superfamily protein -
ZA7133802 ZA7133803 ZA7133807	-37,43	AT3G20120	CYP705A21	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 21 -
ZA7161155 ZA7161157	-40,21	AT3G56980	BHLH039	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein -
ZA7174186 ZA7174187	-45,10	AT4G06599	AT4G06599.1	ubiquitin family protein -
ZA7147550 ZA7147552	-46,83	AT3G43600	AAO2	aldehyde oxidase 2 -
ZA7033055 ZA7033056	-50,73	AT1G34060	AT1G34060.1	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein -
ZA7172614 ZA7172615	-51,40	AT4G04423	AT4G04423.1	unknown protein
ZA7254098	-61,73	AT5G51480	SKS2	SKU5 similar 2 -
ZA7174466 ZA7174467 ZA7174469	-68,07	AT4G06701	AT4G06701.1	other RNA other_rna
ZA7100503 ZA7100504	-115,07	AT2G35590	AT2G35590.1	pseudogene, serpin (serine protease inhibitor), putative, similar to protein zx (Hordeum vulgare subsp. vulgare) GI:19071
ZA7145959 ZA7145960	-215,87	AT3G32980	AT3G32980.1	Peroxidase superfamily protein -

Die Transkriptdaten wurden aus RNA-Extrakten der drei 35S-*STKR1*-Linien mit je drei biologischen Replikaten sowie von drei biologischen Replikaten von Col-0 aus vollständig expandierten Blättern generiert. Die Probennahme erfolgte nach einer verlängerten Dunkelphase (22 h Stunden Dunkelheit). Aufgelistet sind Gene, die in allen drei 35S-*STKR1*-Linien verglichen mit dem Wildtyp mindestens 2-fach differentiell reguliert waren ($p \leq 0,05$) und in mindestens einer Linie auch einen signifikanten korrigierten p-Wert ($p \leq 0,05$) aufwiesen. Dargestellt sind der Name des Array-Elementes (Oligo-Bezeichnung), die gemittelte Änderungsrate über die drei 35S-*STKR1*-Linien (*fold change*, FC Mittelwert), der AGI Code und der Genname und die Beschreibung annotierter Gene.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Frederik Börnke für die Überlassung des spannenden Themas, die Bereitstellung der Mittel, die konstruktiven Diskussionen und die Möglichkeit frei und selbstständig arbeiten zu können.

PD Dr. Lars Voll und PD Dr. Jörg Fettke danke ich für die Bereitschaft meine Dissertation zu begutachten.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie an der FAU Erlangen-Nürnberg bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima und den immer netten Empfang, wenn es mich mal wieder nach Erlangen verschlägt. Ein besonderer Dank geht dabei an alle ehemaligen Mitarbeiter der AG Börnke. Es war sehr schön mit euch!

Den Mitarbeitern des IGZ in Großbeeren möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die Bereitstellung der Laborgeräte und die freundliche Aufnahme bei meinem Arbeitsortwechsel danken. Besonders hervorheben möchte ich dabei die Mitarbeiter der AG Börnke und der Abteilung Pflanzengesundheit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Ingrid Schießl und Susanne Jeserig für die hervorragende, technische Assistenz bedanken.

Mario Drungowski danke ich für die Unterstützung bei der Analyse des Microarrays.

Ein besonderer Dank geht an Suayib für die hilfreichen Anregungen und Diskussionen und natürlich die lustigen Donnerstagabende!

Meiner Familie und allen guten Freunden danke ich für ihre Unterstützung, Motivation und auch für die Nachsicht, wenn bei mir mal wieder die Zeit knapp war. Ein besonders großes Dankeschön geht hier an meine Eltern Kathrin und Jörg, meinen Bruder Mario und meine Großeltern Monika und Volker für die Unterstützung in jeglicher Form!

Mein allergrößter Dank geht an Pierre für die aufmunternden Worte, das „Antreiben“ und die grenzenlose Unterstützung vor allem in turbulenteren Zeiten. Ich bin sehr glücklich, dass du ein so wichtiger Teil meines Lebens bist!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht sowie von mir und nur mit den angegebenen Mitteln angefertigt wurde.

Potsdam, den 20.04.2016

Madlen Nietzsche