

ZUSAMMENFASSUNG

Die Familie der AMP aktivierbaren Protein Kinasen (AMPK) ist in Eukaryoten auf struktureller und funktioneller Ebene in hohem Maße konserviert. Aktiviert werden AMPKs bei Energiemangel auf zellulärer Ebene (Anstieg der AMP/ATP Rate), der stressbedingt, wie etwa bei Glucosemangel, auftreten kann. Im Vergleich zu AMPKs in Säugetieren und ihrem Äquivalent SNF1 in Hefe ist bezüglich der regulatorischen Elemente SNF1-verwandter pflanzlicher AMPKs (Typ I SnRK1 Kinasen) wenig bekannt. Als Mitglied der AMPK Familie sind SnRK1 Enzyme Trimere, bestehend aus einer katalytischen α -, einer für die Substraterkennung verantwortlichen β -, sowie einer γ -Untereinheit welche die Aktivität des Enzyms reguliert. Die N-terminalen Domänen der katalytischen α -Untereinheit weisen einen konservierten T-loop auf, ein Threonin-Rest welcher im Zuge der SnRK1 Aktivierung phosphoryliert wird. Proteine der AMPK Familie in Säugern bzw. SNF1 in Hefe werden ausschließlich durch übergeordnete Kinasen aktiviert, während pflanzliche SnRK1s teilweise auch durch Autophosphorylierung in ihrer Aktivität reguliert werden. Orthologe der in Hefe für die SNF1 Aktivierung verantwortlichen Kinasen Elm1p, Tos3p und Sak1p sind in Pflanzen allerdings auch vorhanden. Darüber hinaus wird die Aktivität der α -Untereinheit durch Interaktion von in ihrer C-terminalen Domäne vorhandenen autoinhibitorischen Sequenzen mit der unphosphorylierten N-terminalen katalytischen Domäne reguliert. Die β -Untereinheiten fungieren zusätzlich zu ihrer Funktion in der Substraterkennung auch als Basis für den Zusammenbau der α - und γ -Untereinheiten und zeichnen sich durch zwei konservierte Domänen aus. Dies sind die *kinase interacting sequence* (KIS), die auch als *glycogen/glucose-binding domain* (GBD) bezeichnet wird sowie die *kinase association domain* (ASC). Die Aktivator Untereinheit γ , trägt eine *AMP-binding CBS* (cystathionine- β -synthase/Bateman 2) Domäne und wird für die AMP-abhängige Konformationsänderung mit der die Aktivierung der α -Untereinheiten einhergeht benötigt. Die Untereinheiten pflanzlicher SnRK1 Enzyme unterscheiden sich darüber hinaus in einigen Merkmalen von ihren Pendanten in anderen Organismen. So trägt die α -Untereinheit pflanzlicher SnRK1 Enzyme Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domänen welche womöglich eine Rolle bei deren Degradation, bzw. Interaktion mit der proteasomalen $\alpha 7$ Untereinheit spielen. Auch die N-terminale Region pflanzlicher γ /SNF4 Untereinheiten unterscheidet sich von der anderer Organismen durch eine zusätzliche GBD Domäne, wie sie sonst nur in der AMPK- β Untereinheit zu finden ist. SnRK1 Enzyme werden in Pflanzen scheinbar als Folge von Zuckermangel, osmotischem Stress oder aber durch ABA aktiviert. Diese Aktivierung führt zu Veränderungen im Transkriptions bzw. Phosphorylierungsmuster einiger Schlüsselenzyme des Metabolismus wie etwa 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA Reduktase (HMGR), Nitrat Reduktase (NR), Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS), Trehalose-6-Phosphat Synthase (TPS5) und 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (FBPase2). Diese Modifikationen erlauben eine gezielte Adaptation metabolischer Prozesse zur Bewältigung etwaiger stressbedingter Engpässe im Energiehaushalt.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Transkriptions-regulatorischen

Funktion von *Arabidopsis thaliana* SnRK1 Kinasen sowie deren Einbindung in den *crossstalk* zwischen Glukose, ABA und Ethylen Signalwegen. Die Subzelluläre Lokalisierung der SnRK1 Untereinheiten im Zellkern wurde durch Fusion dieser mit fluoreszierenden Reporterproteinen (GFP, RFP, CFP und YFP) ermöglicht. Zur Herstellung dieser Fusionsproteine wurden die entsprechenden Gene für Reporterprotein und SnRK1 Untereinheit durch sogenanntes *recombineering* in Arabidopsis BAC-Klonen zusammengefügt. Im Detail erfolgte dies indem zunächst mittels der erwähnten, auf einem *galk* Austausch basierenden, *recombineering* Methode (Warming et al., 2005) das Stop-codon der jeweiligen SnRK1 Untereinheiten durch eine Reporter-gen Sequenz ersetzt wurde. Die so modifizierten Gene wurden im Anschluss, inklusive ihrer nativen regulatorischen Regionen, durch Rekombination der sie beherbergenden BACs mit speziell hierfür geeigneten binären *Agrobacterium tumefaciens* Vektoren in diese transferiert. Nach Transfer der Konstrukte in Arabidopsis wurde die Expression der SnRK1-GFP/YFP/CFP Fusionsproteine, den gesamten Lebenszyklus hindurch, in verschiedenen Gewebetypen charakterisiert. Die genetische Analyse verfügbarer T-DNA Insertions-Mutanten ließ erkennen, dass die individuelle bzw. kombinierte Inaktivierung der für myristoylierte membrangebundene AKIN β 1 und β 2 SnRK1 Untereinheiten kodierenden Gene, keinen erkennbaren Einfluß auf durch Zucker oder ABA modulierte Prozesse hat. Im Gegensatz dazu zeigen Insertionsmutanten des single copy Gens *SNF4/AKIN β γ* , welches für die im Zellkern-lokalisierte SnRK1 aktivierende Untereinheit kodiert in männlichen Keimzellen einen Defekt bei der Trennung der Schwesterchromatiden in der Meiose 2, aufgrund dessen nur infertile Pollen gebildet werden. Da für die Gene der katalytischen SnRK1 Untereinheiten AKIN10 und AKIN11 keine Insertionsmutanten existieren und aufgrund der Sterilität männlicher Keimzellen in der *snf4/akin β γ* Insertionsmutante keine Homozygoten Mutanten erzeugt werden konnten, konnte deren Phänotyp zunächst nicht bestimmt werden. Um diese Problematik zu umgehen wurden artifizielle MikroRNAs (amiRNAs) entwickelt um die Expression der für die verschiedenen SnRK1 Untereinheiten kodierenden Gene einzeln, bzw. im Fall der katalytischen Untereinheiten simultan, zu supprimieren (Schwab et al., 2006). Um die bei der konstitutiven Repression der SnRK1 α und γ Untereinheiten auftretende Lethalität zu vermeiden, wurde zur Expression der amiRNAs ein Östradiol-induzierbares System gewählt das auf dem pER8 Vektor basiert (Zuo et al., 2000). AmiRNA Linien zur individuellen Herunterregulierung von AKIN10, AKIN11, AKIN12, AKIN β 1, AKIN β 2, AKIN β 3 und SNF4/AKIN β γ sowie solche die eine simultane Suppression der AKIN10/11/12 α -Untereinheiten ermöglichten wurden generiert und auf molekularer und phänotypischer Ebene charakterisiert. Die Entwicklung dieser amiRNA Linien wurde bei Licht, Dunkelheit und erhöhten Zuckerkonzentrationen im Medium verfolgt. Dabei wurden die Auswirkungen von ABA, Ethylen, sowie rotem, infrarotem und blauem Licht untersucht, um die Funktion der einzelnen SnRK1 Untereinheiten in den bekannten Signalwegen zu ermitteln. Ein Knockdown der Expression der SNF4/AKIN β γ Untereinheit führte zu ABA unabhängiger Samenkeimung und einer teilweisen Aktivierung der Ethylen *triple response* im Dunkeln sowie bei rotem und infrarotem Licht. Dies führte in der Folge zu Wachstumsarrest und

Apoptose, sowie nach 7 Tagen schliesslich zum Absterben der Keimlinge.

Um die Auswirkungen der *SNF4/AKINβγ* Suppression auf Transkriptomebene zu untersuchen, wurde nach Induktion der entsprechenden amiRNA Expression eine Affymetrix Mikroarray Analyse durchgeführt. Hierbei wurde sowohl Material von im Dunkeln als auch im Licht herangewachsener und induzierter Knockdown Linien untersucht. Unter anderem konnte anhand der Ergebnisse festgestellt werden, dass neben der Pathogen Abwehr die Ethylen und Jasmonat Signalwege aktiviert wurden. Parallel durchgeführte genetische Studien zeigten weiterhin, dass der Effekt der amiRNA Expression auf den Ethylen Signalweg durch die *ein6* Mutation unterdrückt wird. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass SnRK1 Kinasen eine Schlüsselrolle in der koordinierten Regulation verschiedener, im Zuge abiotischen und biotischen Stresses aktivierter, Signalwege spielen.