

**Die Funktion des Responseregulators ARR2
in der Entwicklung von *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Claudia Haß
aus Bremen

Köln 2004

Berichtersteller:

Prof. Dr. Klaus Harter
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

3. Dezember 2004

Für meine Mutter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
35S	Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
A. bidest	bidestilliertes Wasser
ABA	Abcisinsäure
Abb.	Abbildung
ACC	1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxyl-Säure
ad	Auffüllen bis zu einem Volumen von
AHK	Arabidopsis Histidinkinase
AHP	Arabidopsis HPt-Protein
Amp	Ampicillin
AP	Alkaline Phosphatase
ARR	Arabidopsis Responseregulator
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp80	Aspartat an der Position 80
At	Arabidopsis thaliana
ATP	Adenosintriphosphat
BA	6-Benzylamino Purine Lösung
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
chs	Chalkonsynthasegen
Col	Columbia (Ökotyp von Arabidopsis)
cpm	counts per minute
D	Aspartat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DR	dunkelrotes Licht
E. coli	Echerichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EST	expressed sequence tag
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FR	dunkelrotes Licht (far-red)
G	Glyzin
GA	Gibberellinsäure
GAL	am Galaktosestoffwechsel beteiligtes Protein in <i>S. cerevisiae</i>
Gent	Gentamycin
GFP	green fluorescent protein
Glu	Glutamat
GUS	β -Glukuronidase
H	Histidin
HIR	High irradiation reaction
HR	hypersensitive reaction
i.d.R.	in der Regel
JA	Methyljasmonat

K	Kinase
Kan	kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KK	Kinasekinase
KT	Kurztag (8 h Licht, 16 h Dunkel)
KKK	Kinasekinasekinase
Ler	Landsberg erecta (Ökotyp von Arabidopsis)
LFR	Low fluence response
LT	Langtag (16 h Licht, 8 h Dunkel)
M	molare Konzentration
MAP	mitogen activated
MeJA	Methyljasmonat
Mr	relatives Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
Ni-NTA	Nickel-nitrilo-tri-acetic-acid
NLS	Kernlokalisierungssequenz
nCl	nuclear-encoded Cl
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
Q	Glutamin
Pi	Orthophosphat
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
Pfr	dunkelrotes Licht (far red) absorbierende Form von Phytochrom
Pr	hellrotes Licht (red) absorbierende Form von Phytochrom
R	rotes Licht
rec	Receiver-Domäne
Rif	Rifampicin
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SA	Salicylsäure
Ser	Serin
sog.	sogenannt
tech.	Technisch
Thr	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
v	Volumen
vgl.	vergleiche
w	Gewicht
WL	Weißlicht
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -glukoronsäure
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1-1</i>	Das Zwei-Komponentensystem	3
<i>Abb. 1-2:</i>	Struktur der Arabidopsis Responseregulatoren (ARR) Typ A und B	8
<i>Abb. 1-3:</i>	Struktur des Responseregulators 2 aus Arabidopsis (ARR2)	9
<i>Abb. 1-4:</i>	Klassisches Modell der Ethylensignaltransduktion	18
<i>Abb. 3-1:</i>	Insertion des modifizierten Mais Transposons Dissociation (DS) im 19. Kodon des ersten Exons des ARR2 Gens	55
<i>Abb. 3-2:</i>	Phänotyp der <i>arr2</i> -Transposoninsertionslinie und des Wildtyps Ler	56
<i>Abb. 3-3:</i>	Die <i>arr2</i> -Nullmutante weist im Vergleich zum Wildtyp ein verstärktes Lateralwurzelwachstum auf	58
<i>Abb. 3-4:</i>	Kalluswachstumsanalyse der <i>arr2</i> -Nullmutante und des Wildtyps Ler	59
<i>Abb. 3-5:</i>	Analyse des Hypokotyllängenwachstums unter exogener Cytokininapplikation	60
<i>Abb. 3-6:</i>	Analyse des Hypokotyllängenwachstums unter exogener Hormonapplikation	62
<i>Abb. 3-7:</i>	Ethylenproduktion der <i>arr2</i> -Nullmutante und des korrespondierenden Wildtyps Ler	63
<i>Abb. 3-8:</i>	Einfluss von verschiedenen Lichtqualitäten auf das Hypokotyllängenwachstum der <i>arr2</i> -Nullmutante und des Wildtyps Ler	65
<i>Abb.3-9:</i>	Expressionsanalyse des Wildtyps Ler im Vergleich zur <i>arr2</i> -Nullmutante mittels RT-PCR	66
<i>Abb. 3-10:</i>	Phänotypische Analyse der Komplementation der <i>arr2</i> -Nullmutante	68
<i>Abb. 3-11:</i>	Hypokotyllängenwachstum der <i>arr2</i> -Nullmutante, des Wildtyps Ler und drei unabhängiger komplementierter Linien <i>arr2-I</i> , <i>arr2-III</i> , <i>arr2-IV</i>	69
<i>Abb.3-12:</i>	Trockenstressanalyse der Komplementation der <i>arr2</i> -Nullmutante	70
<i>Abb. 3-13:</i>	Induktion des Ethylen-responsiven Reportergens <i>ERF1::LUC</i> im transienten Mesophyllprotoplastenassay	73
<i>Abb. 3-14:</i>	Die Phosphorylierung von ARR2 im pflanzlichen zellfeien Phosphorelay-System hängt von funktionellem ETR1 ab	75
<i>Abb. 3-15:</i>	Rosettenblätter der <i>arr2</i> -Nullmutante zeigen sporadisch auftretende Läsionen bei Anzucht auf Erde	76
<i>Abb. 3-16:</i>	<i>Peronospora</i> -Behandlung von Ler und der <i>arr2</i> -Nullmutante	77
<i>Abb. 3-17:</i>	<i>Botrytis</i> -Behandlung von Ler, Col und der <i>arr2</i> -Nullmutante	78
<i>Abb. 3-18:</i>	Zuordnung von verändert-exprimierten Genen einer vergleichenden	79

	Transkriptomanalyse von der <i>arr2</i> -Nullmutante zum Wildtyp in elf funktionelle Gruppen	
<i>Abb. 3-19:</i>	Expressionanalyse der <i>arr2</i> -Nullmutante und des Wildtyps Ler	84
<i>Abb. 3-20:</i>	Phänotyp ARR2 ^{D80E} -überexprimierenden Linien (ARR2 ^{D80E} -ox) im Vergleich zu Wildtyp ARR2-überexprimierenden (ARR2-ox) Pflanzen	86
<i>Abb. 3-21:</i>	Analyse der Hypokotyllängen von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen unter Exposition der Ethylenbiosynthesevorstufe Amino (ACC) und des Ethylenbiosyntheseinhibitors Aminoethoxyvinylglycin (AVG)	87
<i>Abb. 3-22:</i>	Transkriptmengen von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	88
<i>Abb. 3-23:</i>	Vergleichende Mikroarray-Analyse von <i>Arabidopsis</i> pflanzen der ARR2 ^{D80E} -ox zu ARR2-ox-Linien	89
<i>Abb. 3-24:</i>	Expressionanalyse einer ARR2-Überexpressionslinie (ARR2-ox) und einer ARR2 ^{D80E} -Überexpressionslinie (ARR2 ^{D80E} -ox)	93
<i>Abb. 3-25:</i>	Lokalisation von ARR2-GFP, ARR2 ^{D80E} -GFP und ARR2 ^{D80N} -GFP in <i>Arabidopsis</i>	95
<i>Abb. 3-26:</i>	Induktion des Ethylen responsiven Reportergen-Konstrukts <i>ERF1::LUC</i> im transienten Mesophyllprotoplastenassay	97
<i>Abb. 3-27:</i>	Induktion des Cytokinin responsiven Reportergen-Konstrukts <i>ARR6::LUC</i> im transienten Mesophyllprotoplastenassay	98
<i>Abb. 3-28:</i>	Phänotypische Charakterisierung der AHP-RNAi-Linien	100
<i>Abb. 4-1:</i>	Modell einer ARR2- vermittelten Verschaltung verschiedener Signaltransduktionswege	118

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Signaltransduktion über Phosphorelay im Zwei-Komponentensystem.....	2
1.1.1	Das Zwei-Komponentensystem in <i>Arabidopsis</i>	6
	Der Responseregulator ARR2	8
1.2	Welche Signaltransduktionswege werden durch das Zwei-Komponentensystem reguliert?.....	9
1.2.1	Signaltransduktion via CKI1 und AHK5/CKI2	10
1.2.2	Osmoregulation über AHK1/AtHK1	11
1.2.3	Phytohormone als endogene Signalmoleküle der Pflanzen.....	12
1.2.3.1	Cytokininsignaltransduktion.....	13
1.2.3.2	Ethylensignaltransduktion	15
1.3	Ziele der Arbeit.....	22
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	24
2.1	Materialien	24
2.1.1	Verwendete Vektoren	24
2.1.2	Verwendete Oligonukleotide (PCR)	25
2.1.3	Verwendete DNA-Konstrukte.....	26
2.1.4	Rekombinante Proteine	26
2.1.5	Verwendete Seren	27
2.1.6	Verwendete Bakterien- und Hefestämme	27
2.1.6.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	27
2.1.6.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.1.7	Standard Medien	28
2.1.8	Standard Puffer	28
2.1.9	Größenmarker	29
2.1.10	Datenbanken und andere Internetressourcen	29
2.1.11	Wildtypen und Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
2.1.12	Lichtfelder	30
2.1.13	Chemikalien	30
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Anzucht des Pflanzenmaterials	32
2.2.1.1	Anzucht auf Keimpapier.....	32
2.2.1.2	Anzucht unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium oder auf Agarplatten	32
2.2.1.3	Anzucht auf Erde in 9mm- oder 12 mm-Töpfen	32

2.2.2	Physiologische Experimente	32
2.2.2.1	Messung der Hypokotyl- und Wurzellängen	32
2.2.2.2	Kalluswachstums-Assay	32
2.2.2.3	Methoden zum Studium der Interaktion von <i>Botrytis cinerea</i> mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.2.2.4	Photoakustische Messung von Ethylen	34
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.3.1	Methoden zur Erzeugung und Analyse von rekombinanter DNA	35
2.2.3.1.1	Synthese von DNA mittels PCR	35
2.2.3.1.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	36
2.2.3.1.3	Inkubation von DNA mit Restriktionsenzymen	37
2.2.3.1.4	Reinigung eines geschnittenen PCR Produktes oder eines Vektors mittels Gelelektrophorese und nachfolgender Elution der DNA	37
2.2.3.1.5	Ligation von Vektor und Insert	37
2.2.3.1.6	Transformation von Bakterien	38
2.2.3.1.7	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> im kleinen Maßstab (Minipräp)	39
2.2.3.1.8	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> im großen Maßstab (Maxipräp)	40
2.2.3.1.9	<i>E. coli</i> Dauerkulturen	40
2.2.3.1.10	Fällung von DNA mittels Isopropanol	41
2.2.3.1.11	Fällung von DNA mittels Natriumacetat	41
2.2.3.1.12	Isolation genomischer DNA	41
2.2.3.2	Herstellung transgener Pflanzen	42
2.2.3.2.1	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
2.2.3.2.2	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
2.2.3.2.3	Selektion putativ transgener Pflanzen	43
2.2.3.3	Methoden zur Analyse von RNA	44
2.2.3.3.1	RNA Isolierung aus <i>Arabidopsis</i>	44
2.2.3.3.2	Nachweis der RNA	45
2.2.3.3.3	Reverse Transkription	45
2.2.3.3.4	Mikroarray-Analyse	46
2.2.3.4	Methoden zum Studium von Proteinen	46
2.2.3.4.1	Denaturierendes Gelsystem nach Schägger (SDS-PAGE)	46
2.2.3.4.2	Färben von Proteingelen mit Coomassieblau	47
2.2.3.4.3	Strep-Peptid markierte Fusionsproteine	47
2.2.3.4.4	Affinitätspräzipitation von Proteinen	48
2.2.3.4.5	Protoplastierung von <i>Arabidopsis</i> Blattgewebe	48
2.2.3.4.6	Evakuolisierung	49
2.2.3.4.7	Zellfreier Phosphorelay-Assay: Proteinphosphorylierung in vitro	50
2.2.3.4.8	Transfer der Proteine auf eine Membran (Western-Blot)	51
2.2.3.4.9	Immundetektion von Proteinen	52
2.2.3.4.10	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	53
2.2.4	Transiente Expressionsanalyse in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten	54

2.2.5	Autoradiografie	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Phänotypische Charakterisierung einer <i>arr2</i>-Transposoninsertionslinie	55
3.2	Physiologische Charakterisierung einer <i>arr2</i>-Nullmutante.....	57
3.2.1	Einfluss von Cytokinin auf die <i>arr2</i> -Nullmutante	57
3.2.1.1	Wurzelwachstums- und Kalluswachstumsanalyse der <i>arr2</i> -Nullmutante	57
3.2.1.2	Analyse des Hypokotyllängenwachstum der <i>arr2</i> -Nullmutante unter exogener Cytokinin Applikation	59
3.2.2	Einfluss von Ethylen auf die <i>arr2</i> -Nullmutante	60
3.2.2.1	Keimlinge der <i>arr2</i> -Nullmutante haben unter Einfluss exogen applizierter Hormone ein verändertes Hypokotyllängenwachstum.....	61
3.2.2.2	Photoakustische Messung der Ethylenproduktion der <i>arr2</i> -Nullmutante.....	62
3.2.3	Einfluss der Lichtqualität auf Entwicklungsprozesse in der <i>arr2</i> -Nullmutante.....	64
3.2.3.1	Analyse des Hypokotyllängenwachstums der <i>arr2</i> -Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp .	64
3.2.3.2	Analyse des molekularen Phänotyps der <i>arr2</i> -Nullmutante: Quantifizierung der Transkriptmengen der Chalkonsynthase (<i>CHS</i>) und des Chlorophyll a/b bindenden Proteins (<i>CAB</i>).....	65
3.3	Phänotypische Charakterisierung der komplementierten <i>arr2</i>-Nullmutante	67
3.3.1	Hypokotyllängenwachstum der Komplementationslinien der <i>arr2</i> -Nullmutante unter Einfluss exogen applizierter Hormone.....	68
3.3.2	ARR2 hat eine Funktion in der Austrocknungstoleranz	69
3.4	ARR2 und die Ethylensignaltransduktion.....	71
3.4.1	Funktion von ARR2 in der ERF1-vermittelten Genregulierung	71
3.4.1.1	<i>In vivo</i> Studien zur Interaktion von ARR2 mit dem <i>erf1</i> Promotor.....	72
3.4.2	Beteiligung von ETR1 an der Regulation der Phosphorylierung von ARR2.....	73
3.4.2.1	Pathogenresistenz der <i>arr2</i> -Nullmutante	75
3.4.3	ARR2 erfüllt eine Funktion bei der Integration und Interaktion von verschiedenen Signaltransduktionswegen.....	79
3.4.3.1	Expressionsanalyse der <i>arr2</i> -Nullmutante	79
3.5	Die Aktivität von ARR2 wird über die Aspartat-Phosphorylierung an der Aminosäureposition reguliert.....	85
3.5.1	Charakterisierung der Aminosäuresubstitutionsmutante ARR2 ^{D80E}	85
3.5.1.1	Analyse der Hypokotyllängen von ARR2 ^{D80E} -überexprimierenden Keimlingen unter exogener Hormonapplikation.....	86
3.5.1.2	Expressionsanalyse von ARR2 ^{D80E} -überexprimierenden Pflanzen	88
3.5.1.3	Lokalisation von ARR2, ARR2 ^{D80E} und ARR2 ^{D80N}	94
3.5.1.4	Transaktivierungs-Analyse von ARR2 und ARR2 ^{D80E}	96

3.6	Funktion von Arabidopsis HPT-Proteinen für ARR2 und in einem Zwei-Komponentennetzwerk	99
4	DISKUSSION	101
4.1	ARR2 ist ein Element der Cytokininsignaltransduktion	102
4.2	<i>arr2</i> -Nullmutanten zeigen eine veränderte Phytochrom A Signaltransduktion	105
4.3	ARR2 als Komponente der Ethylensignaltransduktion	107
4.3.1	ARR2-defiziente Keimlinge reagieren vermindert auf Ethylen / ARR2 transaktiviert <i>ERF1</i>	107
4.3.2	ARR2 hat eine Funktion in der Signaltransduktion von Ethylen	108
4.3.3	Die Regulierung von ARR2 hängt von der Ethylenrezeptorhistidinkinase ETR1 und der Phosphorylierung ab	110
4.3.4	ARR2 vermittelt Signale der Pathogenantwort	111
4.3.5	ARR2 agiert in der abiotischen Stressantwort in <i>Arabidopsis</i>	113
4.4	Existenz eines alternativen ARR2-abhängigen Ethylensignaltransduktionswegs	114
4.5	ARR2 vermittelt verschiedene Signale in einem Expressionsnetzwerk	116
4.6	Das Zweikomponentensystem ermöglicht eine Vernetzung und damit den Cross talk verschiedener Signaltransduktionswege	117
5	AUSBLICK	120
6	ZUSAMMENFASSUNG	122
7	LITERATUR	124

1 EINLEITUNG

Eine erfolgreiche Existenz aller Organismen hängt von ihrer Fähigkeit ab, komplexe umweltbedingte Änderungen zu perzipieren und auf diese adäquat zu reagieren. Für die Steuerung der geregelten Reizverarbeitung sind folgende Schritte von Bedeutung: die Bildung eines spezifischen Signals in der signalgebenden Zelle als Folge eines externen Reizes, die Weiterleitung des Signals innerhalb der Zelle, und dessen Umsetzung und Terminierung (McCourt 1999).

Die Perzeption eines Signals erfolgt über einen Rezeptor, der es in ein zelluläres Signal umsetzt. Diese Information wird von dem Rezeptor an nachgeschaltete Komponenten weitergegeben. Dieser Prozess wird als Signaltransduktion bezeichnet (Bowler und Chua, 1994). Durch die Informationsweiterleitung wird eine zelluläre Antwort induziert, die eine morphologische und physiologische Anpassung auf die geänderte Situation beinhaltet. Die zelluläre Antwort wird durch chemische sekundäre Botenstoffe und Effektorproteine reguliert. Schlüsseleigenschaften der Signaltransduktion sind Geschwindigkeit und Spezifität, sowie Sensitivität, die unter anderem durch Amplifikation erreicht wird. Diese Eigenschaften werden durch ein Netzwerk von positiv- und negativ-agierenden Mediatoren reguliert (Bowler und Chua, 1994). Sie stellen sicher, dass die Antwort in angemessener Quantität, zur korrekten Zeit und in exakter Koordination mit anderen Aktivitäten in der Zelle abläuft. Die negative Kontrolle ermöglicht,

- (1) Sensitivitätswechsel zu einem bestimmten Stimulus,
- (2) eine Antwort zu beenden, obwohl der Stimulus noch andauert (Desensibilisierung oder Adaptation),
- (3) die Wiederverwertung eines Signalweges zuzulassen und
- (4) eine schnelle erneute Reaktion zu erlauben.

Die Zellen sind in der Lage die unterschiedlichen Signale, die z.B. durch Hitze, Kälte, Licht, Salz, Hormon oder Pathogenen stimuliert werden, zu verarbeiten und in spezifische, für den einzelnen Zelltyp charakteristische Reaktionen umsetzen. Der zelltypspezifische Verlauf des intrazellulären Signalwegs und damit die Variabilität und Spezifität einer Signalantwort wird durch verschiedene Strategien erreicht. Signalproteine sind multivalent und können spezifisch an unterschiedliche Domänen

der verschiedenen vor- oder nachgeschalteten Signalproteine binden. Außerdem werden zelltypspezifische Signalproteine durch ihre Menge (durch spezifische Expression und Spleißen), Aktivität (durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung) und subzelluläre Lokalisierung reguliert (Krauss 1997).

Die verschiedenen Signalwege haben unterschiedliche Strukturen. Sie können eine lineare Abfolge von Reaktionen beinhalten, wobei die Reaktion durch eine Hierarchie der Komponenten weitergeleitet wird. Sind einem Signalprotein mehrere Effektorproteine zugeordnet, erfolgt eine Verzweigung von Signalwegen. Die Interaktion von zentralen Proteindomänen zweier Signalwege miteinander, kann eine spezifische Modifikation eines Signalweges bewirken. Es besteht eine Vernetzung von Signalwegen zur gegenseitigen Regulation und Integration unabhängiger Stimuli, um eine fein regulierte Antwort in der Zelle einzuleiten.

1.1 Signaltransduktion über Phosphorelay im Zwei-Komponentensystem

Da Pflanzen durch ihre sessile Lebensweise nicht in der Lage sind, ungünstigen Umweltbedingungen zu entkommen, haben sie komplexe Signaltransduktionsmechanismen entwickelt, um die unterschiedlichen Umweltsignale zu perzipieren, zu integrieren und mit endogenen Signalen abzugleichen (Bowler und Chua, 1999).

Ein für Prokaryoten typischer Signalweg ist das sogenannte Zwei-Komponentensystem, welches auch in Pflanzen und niederen Eukaryoten beispielsweise Hefen, aber nicht in Tieren zu finden ist.

In der einfachsten Form besteht das Zwei-Komponentensystem aus einer Histidinkinase, die den externen Stimulus perzipiert und die Information zu einem zweiten Element, dem Responseregulator, weiterleitet (Abb. 1-1A; Stock et al., 2000; Hwang et al., 2002; Grefen und Harter, 2004). Charakteristisch ist der in Domänen gegliederte Aufbau der Proteine des Zwei-Komponentensystems.

Histidinkinasen

Histidinkinasen bestehen aus einer aminoterminalen Inputdomäne und einer carboxyterminalen Kinase, der Transmitterdomäne (Abb. 1-1A). Die Familie der Histidinkinasen wird über eine konservierte Region mit einem zentralen Histidinrest in

der Transmitterdomäne definiert. Der Histidinrest wird als Autophosphorylierungsstelle benötigt. Zusätzlich sind weitere mehr carboxyterminal gelegene Boxen (N, G1, F und G2, Stock et al. 1989) konserviert, die die Bindung von ATP vermitteln. Die Histidinkinasen liegen in Form von Dimeren vor. Viele Histidinkinasen sind über hydrophobe Sequenzabschnitte membrangebunden, sodass die aminoternale Domäne extracytoplasmatisch liegt, während die Transmitterdomäne cytoplasmatisch ist. Diese Proteine können als Rezeptor über die Inputdomäne externe Stimuli perzipieren, die über den Transmitter in die Zelle weitergeleitet werden.

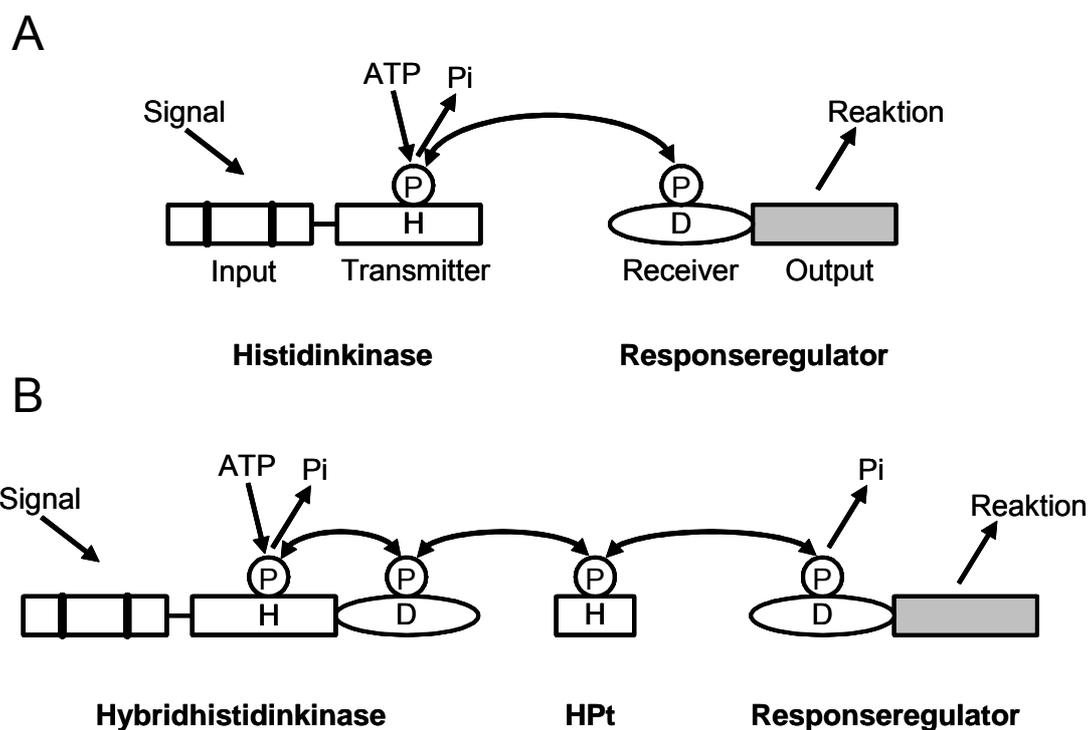


Abb. 1-1: Das Zwei-Komponentensystem: Schematisch dargestellt ist ein einfaches Zwei-Komponentensystem (A) und in ein Mehrschrittphosphorelay (B). H und D symbolisieren die phosphorylierbaren Histidin- bzw. Aspartatreste, P die Phosphatgruppe eines phosphorylierten Restes. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text (verändert nach Kakimoto, 2003).

In pflanzlichen transmembranständigen Histidinkinasen ist die Perzeptionsdomäne mit einem cytoplasmatischen Kern durch einen Linker verbunden (Singh et al., 1998). Diese Linkerdomäne ist zumindest in prokaryotischen Histidinkinasen essentiell für die korrekte Signaltransduktion, aber für die pflanzliche Signaltransduktion konnte das bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden (Aravind und Ponting, 1999; Stock et al., 2000). Interessanterweise trägt die Linkerdomäne der Ethylenrezeptoren eine GAF-verwandte Protein-Protein Interaktionsdomäne (Hwang et al., 2001; Wang et al., 2002), jedoch ist deren Funktion in der Ethylensignaltransduktion nicht geklärt.

Im Gegensatz zu den Prokaryoten, deren Rot- und Dunkelrot-absorbierende Photorezeptoren als lichtregulierte Histidinkinasen agieren, haben sich die Phytochrome der höheren Pflanzen im Laufe der Evolution signifikant von ihren bakteriellen Vorfahren verändert. Sie vermitteln eine Ser/Thr-Kinaseaktivität anstelle einer Histidinkinaseaktivität (Yeh und Lagarias, 1998).

Responseregulatoren

Die Responseregulatoren bestehen ebenfalls aus zwei Domänen, der aminoterminalen Receiverdomäne mit einem konservierten Aspartatrest und der carboxyterminalen Outputdomäne (Abb. 1-1). Das bedeutet, dass die Signaltransduktion durch die Interaktion der zwei „zentralen“ Domänen von Transmitter und Receiver vermittelt wird. Aus diesem Grund ist die Aminosäuresequenz, Struktur und Biochemie dieser Domänen hoch konserviert. Innerhalb der verschiedenen Input- und Outputdomänen werden kaum homologe Sequenzen gefunden, da sie jeweils spezifische Funktionen ausüben.

Responseregulatoren agieren in Pflanzen entweder als Transkriptionsfaktoren oder modulieren durch Protein-Protein-Interaktion spezifische Zielproteine (Hwang et al., 2002; Kakimoto, 2003; Hass et al, 2004a).

Der Mechanismus

Mit der Inputdomäne ist die Histidinkinase in der Lage, ein Signal zu perzipieren, auf das der Responseregulator durch seine Outputdomäne vermittelt antwortet.

Die zugrunde liegende biochemische Signaltransduktion wird durch einen Phosphattransfer vermittelt. Dabei reagiert die Histidinkinase auf einen Stimulus mit einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung eines konservierten Histidins innerhalb des katalytischen Kerns seiner Transmitterdomäne. Die Autophosphorylierung ist eine bimolekulare Reaktion zwischen zwei Histidinkinase-molekülen. Ein Histidinkinase-monomer katalysiert die Phosphorylierung eines Stickstoffatoms im konservierten Histidinrest des zweiten Monomers. Mit diesem Schritt wird die Signaltransduktion initiiert. Diese Phosphatgruppe wird dann Mg^{2+} -abhängig auf eine Acylgruppe eines invarianten Aspartats in der Receiverdomäne übertragen. Das Aspartat liegt in einem durch saure Aminosäuren charakterisierten Sequenzbereich. Die Phosphorylierung induziert eine Konformationsänderung der Outputdomäne und moduliert auf diese Weise die Aktivität der Histidinkinase (Stock et al., 2000). Der Signalmechanismus des Zwei-Komponentensystems wird auch als His-Asp-Phosphorelaysystem bezeichnet.

Obwohl die Histidinkinasefunktion katalytisch der von Ser/Thr/Tyr-Proteinkinasen gleicht, ist die Biochemie der His-Phosphorylierung verschieden. Im Gegensatz zu Ser/Thr/Tyr-Kinasen, die Phosphoester generieren, produzieren Histidinkinasen His-Phosphoramidate. Diese Verbindungen besitzen eine signifikant höhere freie Energie im Vergleich zu Phosphoestern und bewirken eine Verschiebung des Gleichgewichts zu unphosphorylierten Histidinkinasen. Die Folge dieser energetischen Gegebenheit ist, dass sogar nach Aktivierung der Histidinkinase durch Phosphorylierung nur ein kleiner Teil der Histidinkinasenpopulation im phosphorylierten Zustand vorliegt (Stock et al., 2000). Im Gegensatz zum phosphoryliertem Ser/Thr, welches die Proteinaktivitäten durch lokale elektrostatische Effekte ändert, entstehen durch die Phosphorylierung von Aspartatresten energiereiche Acylphosphate. Von diesen wird angenommen, dass sie eine langanhaltende Konformationsänderung in phosphorylierten Receiverdomänen bewirken. Ein wichtiger Unterschied zu konventionellen eukaryotischen Kinasen ist hierbei, dass der Phosphattransfer zum Interaktionspartner stöchiometrisch erfolgt und darum keine Signalamplifikation entsteht (Stock et al., 2000).

Der funktionelle Zusammenhang zwischen Histidinkinase und Responseregulator liegt darin, daß die Inputdomäne der Sensorkinasen Stimulus-abhängig die Auto-kinaseaktivität des Transmitters moduliert, und über einen Phosphorelay den Phosphorylierungsstatus des Responseregulators kontrolliert.

Mehrschrittphosphorelay

In Eukaryoten wie Hefen und Pflanzen ist ein Zwei-Komponentensystem mit zusätzlichen Phosphorylierungsereignissen vorhanden (Abb. 1-1B). Im sogenannten Mehrschrittphosphorelay wird die Histidinkinase als Hybridkinase bezeichnet, weil sie eine zusätzliche Receiverdomäne am carboxyterminalen Ende trägt (Abb.1-1). Die Phosphatgruppe wird dabei nicht direkt zum konservierten Aspartat im Receiver des Responseregulators, sondern statt dessen zu einem weiteren Aspartat der eigenen Receiverdomäne transferiert (Abb. 1-1B). In diesem erweiterten Phosphorelay empfängt ein zusätzliches konserviertes Histidin in einer gesonderten Domäne, der sog. HPt-Domäne (Histidin enthaltende Phosphotransferdomäne), die Phosphatgruppe der Hybridkinase.

Die HPt-Domäne vermittelt so die Phosphatübertragung zwischen zwei Receiverdomänen, indem sie die Phosphatgruppe vom eigenen Histidin zum konservierten

Aspartat des Responseregulators weiterleitet. In einem Mehrschrittphosphorelay sind also zwei His-Asp-Phosphattransferschritte hintereinander geschaltet (Appleby et al., 1996; Stock et al., 2000; Grefen und Harter, 2004). Da der Phosphattransfer nicht über spezifische Proteine sondern über Proteindomänen erfolgt, können diese, wie z.B. die HPt-Domäne sowohl als selbstständiges Protein als auch fusioniert mit weiteren Phosphat-transferierenden Domänen vorliegen.

Die in mehrzelligen Organismen bestehende Kompartimentierung kann in einer räumlichen Trennung zwischen der membranständigen Hybridkinase und einem kernlokalisierten Responseregulator resultieren. HPt-Proteine sind klein (um 160 AS) und können sich wahrscheinlich darum ungehindert zwischen dem Kern und dem Cytosol bewegen. Somit ist die Zwei-Komponenten-Signaltransduktion auch in kompartimentierten Zellen gewährleistet.

1.1.1 Das Zwei-Komponentensystem in Arabidopsis

Der erfolgreiche Abschluss der Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms führte zur Identifizierung der Zwei-Komponenten-Proteine in dieser Pflanze (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Es gibt elf verschiedene *Arabidopsis* Histidinkinasen (AHK), die sich in fünf Untergruppen aufteilen (Tab. 1). Die aufgrund ihrer Homologie zum HPt-Domänen Protein YPD1 aus Hefe identifizierten *Arabidopsis* HPt-Proteine (AHP) bilden eine Familie mit fünf Mitgliedern (Suzuki et al. 1998, Miyata et al. 1998, Riechmann et al., 2000). Die AHP-Proteine sind um 160 Aminosäuren lang und können aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit funktionelle Redundanz zeigen (Urao et al., 2000).

Durch heterologe Expression der HPt-Proteine AHP1, 2 und 3 in der HPt-Protein-defizienten Hefe Δ -ypd1 wurde der letale Phänotyp des Stammes komplementiert. Eine Mutation des invarianten Histidins in AHP1 ermöglichte keine Komplementation. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass mindestens AHP1 im Prinzip als intermediäres Element eines Mehrschrittphosphorelays agiert (Miyata et al., 1998; Suzuki et al., 1998b).

Die vierundzwanzig bekannten Responseregulatoren wurden aufgrund ihrer Homologie zu dem prokaryotischen Responseregulator CheY von *Escherichia coli* identifiziert und anhand von konservierten Aminosäureresten im katalytischen Zentrum als *Arabidopsis* Responseeregulatoren (ARR) klassifiziert (Lohrmann et al., 1999; Lohrmann et al., 2001; Sweere et al., 2001). Aufgrund von Sequenz- und

Größenunterschieden in den carboxyterminalen Outputdomänen lassen sich die ARR in zwei gleich große Untergruppen einteilen (Abb. 1-2; D'Angostino und Kieber, 1999b).

Tab. 1: Einteilung der *Arabidopsis* Histidinkinase (AHK) in fünf Untergruppen

Gruppe	Name	Funktion	Referenz
1	ETR1, ETR2, EIN4, ERS1, ERS2	Ethylenrezeptor	Chang, 2003
2	AHK2, AHK3, AHK4/WOL/CRE1	Cytokininrezeptor	Kakimoto, 2003
3	CKI1	weibliche Gametophyten- entwicklung	Hass et al., 2002a
4	AHK5/CKI2	unbekannt	
5	AtHK1/AHK1	Osmolaritätsrezeptor	Hass et al., 2004a

Typ B Responseregulatoren besitzen eine sehr große Outputdomäne (260 bis 600 Aminosäuren), die neben Kernlokalisierungssequenzen (NLS) zusätzlich auch DNA-Bindedomänen und Transaktivierungsdomänen tragen (Abb.1-2).

Die Typ A Responseregulatoren verfügen dagegen nur über eine sehr kleine carboxyterminale Extension. Der strukturelle Unterschied der beiden Gruppen von Responseregulatoren spiegelt sich auch in ihrer Funktion wider. Typ B Responseregulatoren sind Transkriptionsfaktoren und regulieren auch die Expression von Typ A Responseregulatorgenen (Hwang und Sheen, 2001; To et al., 2004). Den Typ A Responseregulatoren konnten eine Funktion in der Cytokinin-signaltransduktion nachgewiesen werden (Hwang und Sheen, 2001; To et al., 2004).

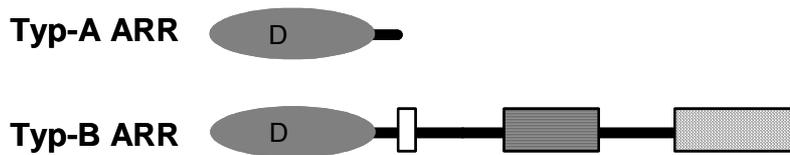


Abb. 1-2: Struktur der *Arabidopsis* Responseregulatoren (ARR) Typ A und B: Beide Untergruppen besitzen aminoterminal eine Receiverdomäne (grau) mit der konservierten Aminosäure Aspartat (D), der putativen Phosphorylierungsstelle der Responseregulatoren. Die anschließende Outputdomäne ist im Typ B groß und trägt neben Nukleus Lokalisationssignalen (NLS, weiß), DNA-Bindemotive (gestreift) und Transaktivierungsmotive (kariert). Hingegen ist die Outputdomäne im Typ A kurz.

Bei den neun identifizierten *Arabidopsis* Pseudoresponseregulatoren (APRR; Grefen und Harter, 2004) ist das invariante Phosphat-akzeptierende Aspartat in der Receiverdomäne durch andere Aminosäuren ersetzt (Hwang et al., 2002). Anhand *in vitro*-Studien konnte nachgewiesen werden, dass keine Phosphorylierung der APRR stattfindet (Makino et al., 2000). Michael et al. (2003) vermuten, dass APRR-Proteine eine Funktion in verschiedenen in circadian regulierten Prozessen ausüben, die auch zur natürlichen Variabilität von *Arabidopsis* Ökotypen führte. Diese Analysen implizieren eine Funktion der APRR als transkriptionelle Regulatoren des circadianen Rhythmus in Pflanzen.

Der Responseregulator ARR2

Der Responseregulator ARR2 ist ein 72,6 kDa großes Protein, welches aus den zwei Responseregulatoren typischen Domänen, der Receiver- und der Outputdomäne besteht. Die aminoterminalen Receiverdomäne trägt in einem sauren Sequenzbereich (DD80K-Motiv) einen konservierten Aspartatrest (D80), welcher phosphorylierbar ist (Abb. 1-3; Lohrmann, 2001). Die carboxyterminale Outputdomäne enthält drei putative Kernlokalisationssequenzen (nuclear localisation sequence NLS), eine P/Q-reiche Domäne und ein DNA-Bindemotiv des GARP¹-Typs (Lohrmann et al., 1999 und 2001).

¹ Zur Namensgebung: Dieser Bereich wurde von mehreren Gruppen unabhängig identifiziert und mit verschiedenen Namen belegt. Sakai et al. (1998a): Myb-ähnliche Domäne; Lohrmann et al. (1999): bHLH-Motiv; Imamura et al. (1999): B-Motiv; Sakai et al., (2000): ARRM-Domäne; Riechmann et al. (2000).

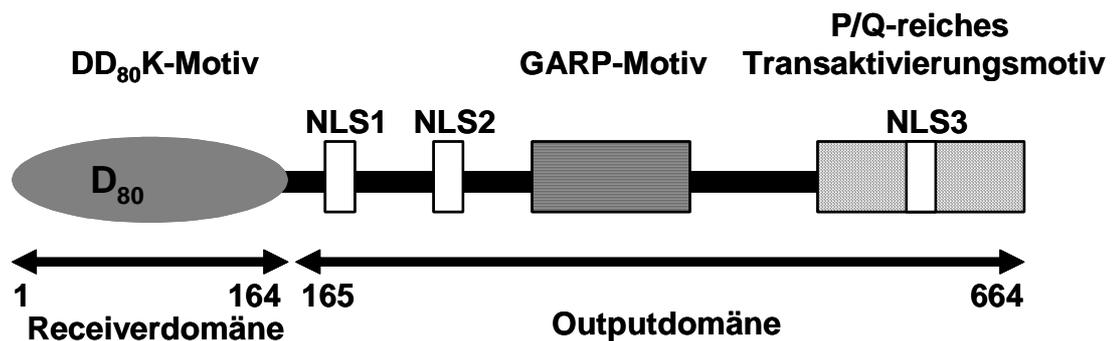


Abb. 1-3: Struktur des Responseregulators 2 aus *Arabidopsis* (ARR2): Die Aminosäuren 1 bis 164 umfassen die Receiverdomäne (grau) mit den konservierten Aminosäuren DDK, die eine saure Tasche bilden. Die Outputdomäne von Aminosäure 165 bis 664 enthält drei SV40-ähnliche Nukleus Lokalisationssignale (NLS, weiß), ein DNA-Bindemotiv des GARP-Typs (gestreift) und ein P/Q-reiches Transaktivierungsmotiv (kariert).

Die Outputdomäne von ARR2 vermittelt zwei Funktionen: DNA-Bindung über das GARP-Motiv (Abb. 1-3) und Transaktivierung von Zielgenen mit dem P/Q-reichen Motiv (Abb. 1-3; Sakai et al., 2000; Lohrmann et al., 2001, Hass et al., 2004b).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ARR2 ein nukleärer, transkriptioneller Regulator der GARP Transkriptionsfaktorfamilie ist. ARR2 bindet das 5'-RGATY-3'-Sequenzmotiv, welches in den Promotoren der kernkodierten Gene des mitochondrialen Atmungskomplexes CI (nCI: nuclear-encoded CI) in *Arabidopsis* konserviert vorliegt (Abb 1-3; Sakai et al., 2000; Lohrmann et al., 2001). Obwohl ARR2 überwiegend in Pollenkörnern vorhanden ist, wird ARR2 in allen Organen von adulten *Arabidopsis*-Pflanzen und in deren Keimlingen exprimiert (Lohrmann et al., 2001; Tajima et al., 2004). Die Receiverdomäne interagiert mit den AHP-Proteinen 1 und 2 (Lohrmann et al., 2001). Daher kann angenommen werden, dass ARR2 ein Element des Zwei-Komponentensystems darstellt, welches stromabwärts mindestens einer Hybridkinase und einem HPT-Protein liegt (Lohrmann und Harter, 2002; Grefen und Harter, 2004).

1.2 Welche Signaltransduktionswege werden durch das Zwei-Komponentensystem reguliert?

Pflanzen haben verschiedene Signaltransduktionsmechanismen entwickelt, um auf biotische und abiotische Reize sowie endogene Signale, adäquat reagieren zu können. In *Arabidopsis* werden verschiedene Signalwege durch das Zwei-Komponentensystem reguliert. Im Folgenden sollen einige davon vorgestellt werden.

1.2.1 Signaltransduktion via CKI1 und AHK5/CKI2

CKI1 besitzt alle Attribute einer membranständigen Rezeptorhistidinkinase (Kakimoto, 2003). AHK5/CKI2 hingegen fehlt jegliches Transmembransegment und ist sehr wahrscheinlich im Cytoplasma von Pflanzenzellen lokalisiert. Bei Co-Inkubation von phosphoryliertem AHP1 oder AHP2 und CKI1 wurde die Aktivität von CKI1 als Phosphatase *in vitro* nachgewiesen (Nakamura et al., 1999). Zusätzlich konnte durch Untersuchungen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Interaktion von CKI1 mit den *Arabidopsis* HPT Proteinen AHP1 und AHP2 nachgewiesen werden (Urao et al., 2000). Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass CKI1 und AHK5/CKI2 Elemente des Zwei-Komponentensystems sind. Die beiden Hybridkinasen CKI1 und CKI2/AHK5 wurden ursprünglich bei einem Screening für Cytokinin-unabhängiges Wachstum von *Arabidopsis* Kalluskulturen identifiziert (Kakimoto, 1996). Überexpression von CKI1 in transgenen Pflanzen führt auch in Abwesenheit von Cytokinin zu einer konstitutiven Cytokininantwort (Kakimoto, 1993; Hwang und Sheen, 2001). Aus diesem Grund wurden CKI1 und CKI2/AHK5 als potenzielle Cytokininrezeptoren diskutiert. Nach aktuellem Stand der Forschung sind die Funktionen von CKI1 und AHK5/CKI2 als Cytokininrezeptoren fraglich. Genetische und mikroskopische Studien sowie mRNA basierende Expressionsdaten des sich entwickelnden weiblichen Gametophyten legen nahe, dass CKI1 an der Entwicklung des Megagametophyten beteiligt ist (Pischke et al., 2002). Im Vierkernstadium des sich entwickelnden weiblichen Gametophyten zeigten *cki1*-Funktionsverlustmutanten phänotypische Abnormalitäten (Pischke et al., 2002): Zu diesem Zeitpunkt werden wichtige entwicklungsbedingte Schritte initiiert wie Zellbildung, Vakuolenformation und die Etablierung von Zellidentitäten. Im letzten Entwicklungsstadium des Gametophyten kollabiert und degeneriert der Embryosack von *cki1*-Mutanten (Pischke et al., 2002). Die Zerstörung von CKI1 ist demnach letal für den weiblichen Gametophyten von *Arabidopsis*. In diesem Entwicklungsprozess ist Cytokinin sehr wahrscheinlich nicht involviert, und darum ist das Phytohormon sehr wahrscheinlich kein Ligand von CKI1 und AHK5/CKI2. Aus diesen Gründen wird heute angenommen, dass andere, bisher noch unbekannte Komponenten CKI1 und AHK5/CKI2 binden und ihre Histidinkinaseaktivität modulieren. Der bei Überexpression von CKI1 und AHK5/CKI2 beobachtete Effekt auf Cytokininantworten, wird als unerwartete Interferenz des überexprimierten Proteins mit Cytokininrezeptor-verbundenen Signalwegen interpretiert (Pischke et al., 2002; Kakimoto, 2003). Der

molekulare Mechanismus zum Ablauf CK11 modulierter weiblicher Gametophytenentwicklung ist noch unbekannt, könnte aber möglicherweise einen Zwei-Komponenten-Phosphorelay beinhalten.

1.2.2 Osmoregulation über AHK1/AtHK1

Die Pflanzen werden am stärksten durch die Umweltparameter Temperatur, Trockenheit und daraus resultierenden Änderungen der Osmolarität beeinflusst (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Sie reagieren auf osmotische Wechsel mit einer Anzahl an verschiedenen physiologischen und entwicklungsbedingten Veränderungen. Durch diese Veränderungen werden Gene induziert, die eine direkte oder eine indirekte Schutzfunktion ausüben. Die Induktion der Schutzfunktion erfolgt über regulatorische Gene, die in der Signaltransduktion der Stressantwort involviert sind (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

In Bakterien und Hefen erfolgt die Osmoregulation über das einfache Zwei-Komponentensystem (Urao et al., 1999 und 2000). Die Hybridkinase SLN1 wirkt in Hefe als Osmosensor und hat strukturelle Ähnlichkeiten zu AHK1/AtHK1 aus *Arabidopsis* (Urao et al., 1999). Des Weiteren besitzt AHK1/AtHK1 zwei putative Transmembransegmente im Aminoterminal. Die heterologe Expression von AHK1/AtHK1 in einer Osmosensor-defizienten Hefemutante, unterdrückte den letalen Wachstumsphänotyp auf hohen Salzkonzentrationen. Die hohe Osmolarität induzierte über AHK1/AtHK1 eine Glyzerolantwort, die in einer Aktivierung von Stress-responsiven Genen resultiert (Urao et al., 1999). Diese Aktivität von AHK1/AtHK1 ist von einem Histidinkinase typischen katalytischen Zentrum in der putativen Transmitterdomäne und außerdem von einem phosphorylierbaren Aspartatrest in der putativen Receiverdomäne abhängig. Diese Experimente identifizierten AHK1/AtHK1 damit als eine Hybridkinase mit Phosphotransferaktivität (Urao et al., 1999). Genauso wie SLN1 aus Hefe scheint auch AHK1/AtHK1 unter normalen Wachstumsbedingungen aktiv zu sein und wechselt bei ansteigender Osmolarität von der aktiven zur inaktiven Form. Die AHK1/AtHK1-Transkripte zeigten eine größere Abundanz in Wurzeln als in anderen Geweben und akkumulierten unter Hochsalzbedingungen. Diese Beobachtungen führen zur Annahme, dass AHK1/AtHK1 möglicherweise Änderungen der Osmolarität in Pflanzen detektiert und anschließend das Stresssignal transduziert (Urao et al., 1999). Die präzise

molekulare Funktion von AHK1/AtHK1 in Pflanzen ist jedoch noch nicht geklärt. Wie auch SLN1 interagiert AHK1/AtHK1 mit dem *Arabidopsis* HPt Protein AHP2 im Hefe-Zwei-Hybridsystem (Urao et al., 2000). Dies lässt eine ähnliche Signaltransduktion des Osmostresssignals wie in Hefe vermuten, welche über einen Mehrschrittphosphorelay erfolgen könnte.

1.2.3 Phytohormone als endogene Signalmoleküle der Pflanzen

Phytohormone sind eine heterogene Gruppe von natürlich vorkommenden Substanzen, die in niedriger Konzentration verschiedene physiologische Prozesse kontrollieren. Zu den fünf klassischen Phytohormonen werden die Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Abscisinsäure und das Ethylen gerechnet. Darüber hinaus gibt es noch die Familie der Jasmonate, Salicylsäure und die Brassinosteroide, wobei vermutlich das pflanzliche Spektrum an Hormonen noch wesentlich umfangreicher ist (Westhoff und Kloppstech, 1996). In Pflanzen erfolgt die Kommunikation zwischen Zellen im organischen Verbund unter anderem auch durch Phytohormone. Diese Botenstoffe ermöglichen es den Pflanzen auf endogene Signale und Umweltreize in einer koordinierten Weise zu reagieren und sich unter diesen Gegebenheiten optimal zu entwickeln. Sie beeinflussen verschiedene Entwicklungsprozesse der Pflanzen, wie Keimung, Wurzel- und Sproßwachstum sowie Blütenbildung, wobei sich ihre Wirkungsspektren teilweise überschneiden, aber auch antagonistisch sein können. Die Hormon-vermittelten Reaktionen zeigen eine große Diversität und darum wird allgemein davon ausgegangen, dass ein bestimmtes Hormon über verschiedene Signalwege transduziert werden kann. Dabei haben einzelne Zell- und Gewebetypen vermutlich die Fähigkeit zwischen den verschiedenen Wegen zu diskriminieren. Es ist aber auch denkbar, dass verschiedene Phytohormone die selben konservierten Signalwege benutzen, wobei das Signal unterschiedlich verstärkt oder gedämpft wird (McCourt 1999).

1.2.3.1 Cytokininsignaltransduktion

Cytokinine sind N6-substituierte Adeninderivate, die in fast allen Aspekten des Wachstums und der Entwicklung von Pflanzen (Zellteilung, Sprossinitiierung und -entwicklung, Lichtregulation, Blattseneszenz) eine Funktion haben (Kakimoto, 2003). Die Familie der Cytokininrezeptoren besteht aus den drei Mitgliedern AHK2, AHK3 und AHK4/CRE1/WOL, welche untereinander ca. 53% Identität über die gesamte Aminosäuresequenz aufweisen. Die Mitglieder der Familie besitzen entweder eine (AHK4/CRE1/WOL), zwei (AHK3) oder drei (AHK2) aminoterminalen Transmembransegmente und eine carboxyterminale Transmitter- und Receiverdomäne (Hutchison und Kieber, 2002). Es ist bezeichnend, dass alle drei Cytokininrezeptoren ein weiteres, zwischen der Transmitter- und Receiverdomäne eingebettetes Receiver-ähnliches Motiv von unbekannter Funktion tragen. Die extrazelluläre, aminoternale Region der Cytokininrezeptoren repräsentiert die sogenannte CHASE-Domäne (Cyclase/Histidine kinase-associated sensing extracellular). Dieser Domäne wird die Funktion eines Bindemoduls für Liganden zugeschrieben und sie ist auch in der Transmembranregion von niederen Eukaryoten und Bakterien zu finden (Anantharaman und Aravind, 2001; Mougél und Zhulin, 2001). Die gestörte Fähigkeit zur Cytokininbindung von *ahk4/cre1/wol* ist auf eine Mutation in der CHASE-Domäne zurückzuführen (Yamada et al., 2001). Diese Daten legen nahe, dass das CHASE-Motiv die Cytokininbindedomäne von AHK2, AHK3 und AHK4/CRE1/WOL ist (Kakimoto, 2003).

AHK4/CRE1/WOL wurde ursprünglich bei einem Screening von *Arabidopsis* Hypokotylsegmenten nach dem Verlust der durch Cytokinin induzierten Ergrünungsreaktion, Zellproliferation und Sprossbildung als *cre1* (*cytokinin response*) identifiziert (Inoue et al., 2001). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten durch Analysen von Funktionsverlustmutanten im AHK4/CRE1/WOL deren reduzierte Sensitivität gegenüber Cytokinin (Inoue et al., 2001; Ueguchi et al., 2001). Ein mutantes Allel des AHK4/CRE1/WOL-Gens ist außerdem für den *wol* (*wodden leg*) Phänotyp verantwortlich (Mähönen et al., 2000). Das vaskuläre Wurzelsystem des Embryos von *wol* besteht nur aus primärem Xylem und bildet nur noch eine reduzierte Anzahl von Zellreihen aus. Dieser Wurzelphänotyp ist sehr wahrscheinlich durch eine Beeinträchtigung der Zellteilung im Embryo entstanden. Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass AHK4/CRE1/WOL zu den Cytokinin-regulierten Reaktionen wie Zellwachstum und Zellteilung beiträgt.

Die Cytokininrezeptoren sind teilweise funktionell redundant, was bereits durch die hochkonservierte Primärstruktur vermutet wurde (Nishimura et al., 2004). AHK2 und AHK3 wurden als Hauptrezeptoren postuliert, die das Cytokinin-abhängige Wachstum und die Cytokinin-abhängige Entwicklung in allen Geweben und Wachstumsphasen aufrecht erhalten. Hingegen konnten Kalluswachstumsexperimente, Wurzelwachstumssassays sowie Phosphatmangeluntersuchungen (Frank et al., 2002) zeigen, dass AHK4/CRE1/WOL in der zellulären Antwort auf exogene Signale und appliziertes Cytokinin eine besondere Funktion einnimmt. AHK4 macht somit eine Adaptation von Pflanzen auf geänderte Wachstumsbedingungen möglich.

Die potenzielle Signaltransduktion von Cytokinin in Form eines Mehrschrittphosphotransfers durch Induktion der Hybridkinasen AHK2, AHK3 und AHK4/CRE1/WOL über ein HPT-Protein zu mindestens einem Responseregulator wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die Bindung von Cytokinin durch AHK4/CRE1/WOL wurde anhand mikrosomaler Fraktionen aus *Saccharomyces pombe*-Extrakten nachgewiesen, die den Rezeptor überexprimierten (Yamada et al., 2001). Die Funktion von AHK4/CRE1/WOL als Histidinkinase wurde durch eine Cytokinin-abhängige Komplementation des letalen Wachstumsphänotyp der *sln1*, einer Mutante von *Saccharomyces cerevisiae*, bewiesen (Maeda et al., 1994; Posas et al., 1996). Eine ähnliche Komplementation in dem Hefesystem war die Funktion der einzigen Histidinkinase SLN1 zerstört und wurde durch gerettet. Eine ähnliche Komplementation durch Cytokinin-abhängige Aktivierung von AHK4/CRE1/WOL wurde in Mutanten mit inaktivierten Histidinkinasegenen von *Schizosaccharomyces pombe* und *Escherichia coli* gefunden (Suzuki et al., 2001). Daraus kann geschlossen werden, dass AHK4/CRE1/WOL als Cytokinin regulierte Histidinkinase agiert. Diese Hypothese wurde auch durch Transaktivierungsstudien in *Arabidopsis*-Protoplasten bestätigt (Hwang und Sheen, 2001). In diesem System induzierte AHK4/CRE1/WOL die Promotoraktivität eines Cytokinin-responsiven Reportergens in Abhängigkeit von Cytokinin (Hwang und Sheen, 2001). Da eine ähnliche Cytokinin-abhängige Histidinkinaseaktivität auch für AHK2 und AHK3 beobachtet wurde, gelten diese Proteine ebenfalls als aktive Hybridkinasen (Yamada et al., 2001; Hwang und Sheen, 2001; Kakimoto, 2003).

Die Expression von AHP2 und AHP4 unterbrach den vorher identifizierten artifiziellen Phosphotransfer von AHK4/CRE1/WOL über das bakterielle HPT-Protein YojN zum

bakteriellen Responseregulator RcsB (Suzuki et al., 2001b). Diese beobachtete negative Interferenz könnte durch eine stärkere Affinität der Phosphorylgruppe von AHK4/CRE1/WOL zu den *Arabidopsis* AHP-Proteinen als zu dem bakteriellen HPT-Protein YojN erklärt werden. Die prinzipielle Fähigkeit von *Arabidopsis* HPT-Proteinen eine Phosphorylgruppe von AHK4/CRE1/WOL, entgegenzunehmen wurde durch ein *in vivo* Interferenzassay in *Escherichia coli* untersucht (Suzuki et al., 2001b und 2002). Des Weiteren konnte mittels *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass AHP1 und AHP2 Phosphorylgruppen zu den Responseregulatoren ARR3, ARR4, ARR6 und ARR10 transferieren (Suzuki et al., 1998; Imamura et al., 2001). Responseregulatoren des Typs A können schnell durch Cytokinin induziert werden (D'Angostino et al., 2000; Hwang und Sheen, 2001; Sakai et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um J. Kieber konnte mit einem Ansatz der reversen Genetik durch Doppel-, Vierfach-, und Sechsfachmutanten der Typ A Responseregulatoren ARR3, ARR4, ARR5, ARR6, ARR8 und ARR9 nachweisen, dass sie die Cytokininsignaltransduktion negativ regulieren, wobei sie zum Teil funktionelle Redundanz zeigen, aber auch noch zusätzlich spezifische Funktionen ausüben können. Ihre Aktivität wird über negative Rückkopplungsmechanismen und Typ B Responseregulatoren (Hwang und Sheen, 2001) reguliert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Cytokininsignaltransduktion in Pflanzenzellen hauptsächlich über einen Mehrschrittphosphorelay des Zwei-Komponentensystems reguliert wird (Hwang und Sheen, 2001; Sakai et al., 2001; Kakimoto, 2003; Tajima et al., 2004).

1.2.3.2 Ethylensignaltransduktion

Das gasförmige Phytohormon Ethylen beeinflusst viele verschiedene Aspekte des pflanzlichen Lebenszyklus wie Samenreife, Wurzelhaarentwicklung, Abszission und Fruchtreife (Guo und Ecker, 2004). Des Weiteren ist Ethylen in biotischen und abiotischen Stressreaktionen von Pflanzen involviert. Das heutige Verständnis des Ethylensignalwegs konnte hauptsächlich durch molekulare Studien des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* gewonnen werden (Ecker, 1995; Johnson und Ecker, 1998; Stepanova und Ecker, 2000). In genetischen Ansätzen, wurde nach Mutanten gesucht, basierend auf der für die Ethylenreaktion typische Triple Response. Die zeigt eine starke Hemmung des Hypokotyllängenwachstums unter

gleichzeitiger Förderung des Radialwachstums und einer starken Krümmung des Hypokotylhakens (Bleecker et al., 1988). Diese Reaktion ist ein Anpassungsmechanismus an mechanischen Stress, den der junge Keimling beim Durchbrechen der obersten Erdschicht erfährt (Goeschl et al., 1966).

Es wurden verschiedene *etr* (*ethylene triple response*) und *ein* (*ethylene insensitive*) Mutanten in *Arabidopsis* identifiziert, die in Gegenwart von Ethylen oder der biochemischen Vorstufe 1-Aminozyklopropan-1-Carboxylsäure (ACC) eine reduzierte Triple Response zeigten. Durch Klonierung dieser Gene und Charakterisierung der mutanten Allele wurde ein Grundgerüst des Signalwegs etabliert, welches von der Ethylenperzeption ausgehend zu Änderungen der Genexpression führt (Guo und Ecker 2004).

In *Arabidopsis* konnte eine kleine Familie von Ethylenrezeptoren identifiziert werden. ETR1, ERS1 (*ethylene response sensor*), ETR2, EIN4 und ERS2 können alle in Anwesenheit von Cu^{2+} Ethylen mit der gleichen Affinität binden (Schaller und Bleeker, 1995; Rodriguez et al., 1999).

Die Rezeptoren bestehen aus einer aminoterminalen Empfängerdomäne für die Ethylenbindung, einer GAF²-ähnlichen Protein-Protein-Interaktionsdomäne mit unbekannter Funktion sowie einer Histidinkinase bzw. Histidinkinasen-ähnlichen Domäne. ETR1, ETR2 und EIN4 tragen außerdem eine carboxyterminale Receiverdomäne. Exemplarisch wurde für ETR1 gezeigt, dass Ethylenrezeptoren vornehmlich an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind (Chen et al., 2002). Auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten werden die Rezeptoren in zwei Untergruppen eingeteilt: ETR1 und ERS1 mit 68% Identität bzw. 80% Ähnlichkeit sowie ETR2, EIN4 und ERS2 mit ca. 48% Identität bzw. etwa 62% Ähnlichkeit (Hwang et al., 2002). Nur zwei der Gruppe 1 Rezeptoren, nämlich ETR1 und ERS1, besitzen die Aminosäuremotive (H, N, G1, F, G2), die essentiell für Histidinkinaseaktivität sind. Obwohl für ETR1 die Histidinkinaseaktivität *in vitro* demonstriert wurde (Gamble et al., 1998; Gamble et al., 2002), hat diese Beobachtung die Diskussion eröffnet, ob die Transmission des Ethylensignals über einen Mehrschrittphosphorelay abläuft. Genetische Studien der Triple Response von *Arabidopsis* hingegen führten zur Etablierung eines anderen Modells, in dem die Ethylensignaltransduktion stromabwärts des Rezeptors ohne die Beteiligung von Zwei-Komponentensystem-

² GAF-Domänen wurden ursprünglich in cCMP-spezifischen und cGMP-stimulierten Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen und dem *Escherichia coli* Protein Fh1A identifiziert. Ihre Funktion in der Lichtregulation ist im Gegensatz zu ihrer Funktion in der Ethylensignaltransduktion bekannt (Aravind und Ponting, 1997).

Elementen abläuft (Abb. 1-4). Interessanterweise zeigen Vierfach-Funktionsverlustmutanten der Rezeptoren einen konstitutiven Ethylenantwortphänotyp, und Funktionsgewinnmutationen in allen fünf Rezeptoren führten zur dominanten Insensitivität gegenüber Ethylen (Urao et al., 2001). Außerdem konnten Bindungsstudien in Hefe zeigen, dass Genprodukte von den dominanten Funktionsgewinn der Allele *etr1-1* und *etr1-4* nicht mehr Ethylen binden können. Das Verhindern der Ethylenbindung ist also die Ursache der dominanten Insensitivität des Rezeptors gegenüber Ethylen und fixiert den Rezeptor in einen konstitutiv aktiven Signalmodus. Diese Beobachtungen führten zur These, dass die Rezeptoren die Ethylenantwort negativ regulieren. In diesem fixierten Zustand des Rezeptors reprimiert er den stromabwärtigen Ethylensignalweg unabhängig von einem Signal (Hall et al., 1999; Gamble et al., 2002).

Die fünf Rezeptoren interagieren mit CTR1 (constitutive triple response), einer mit Raf verwandten Proteinkinase, zur negativen Regulierung der Ethylenantwort (Abb. 1-4). Genetische Ansätze konnten belegen, dass CTR1 eine negativ regulierende Komponente der Ethylensignaltransduktion ist, da Mutationen von CTR1 zu einer konstitutiven Triple Response in Abwesenheit von Ethylen führen (Wang et al., 2002).

Kürzlich wurde durch biochemische Analysen gezeigt, dass rekombinantes CTR1-Protein in der carboxyterminalen Domäne intrinsische Ser/Thr Proteinkinaseaktivität aufweist, welche mit der von Raf-1 vergleichbar ist (Huang et al., 2003). CTR1 befindet sich außerdem in einem Komplex mit ETR1, assoziiert am Endoplasmatischen Retikulum (Gao et al., 2003). Für die Assoziation von CTR1 mit ETR1 scheint eine Histidinkinaseaktivität des Rezeptors nicht notwendig zu sein (Gao et al., 2003).

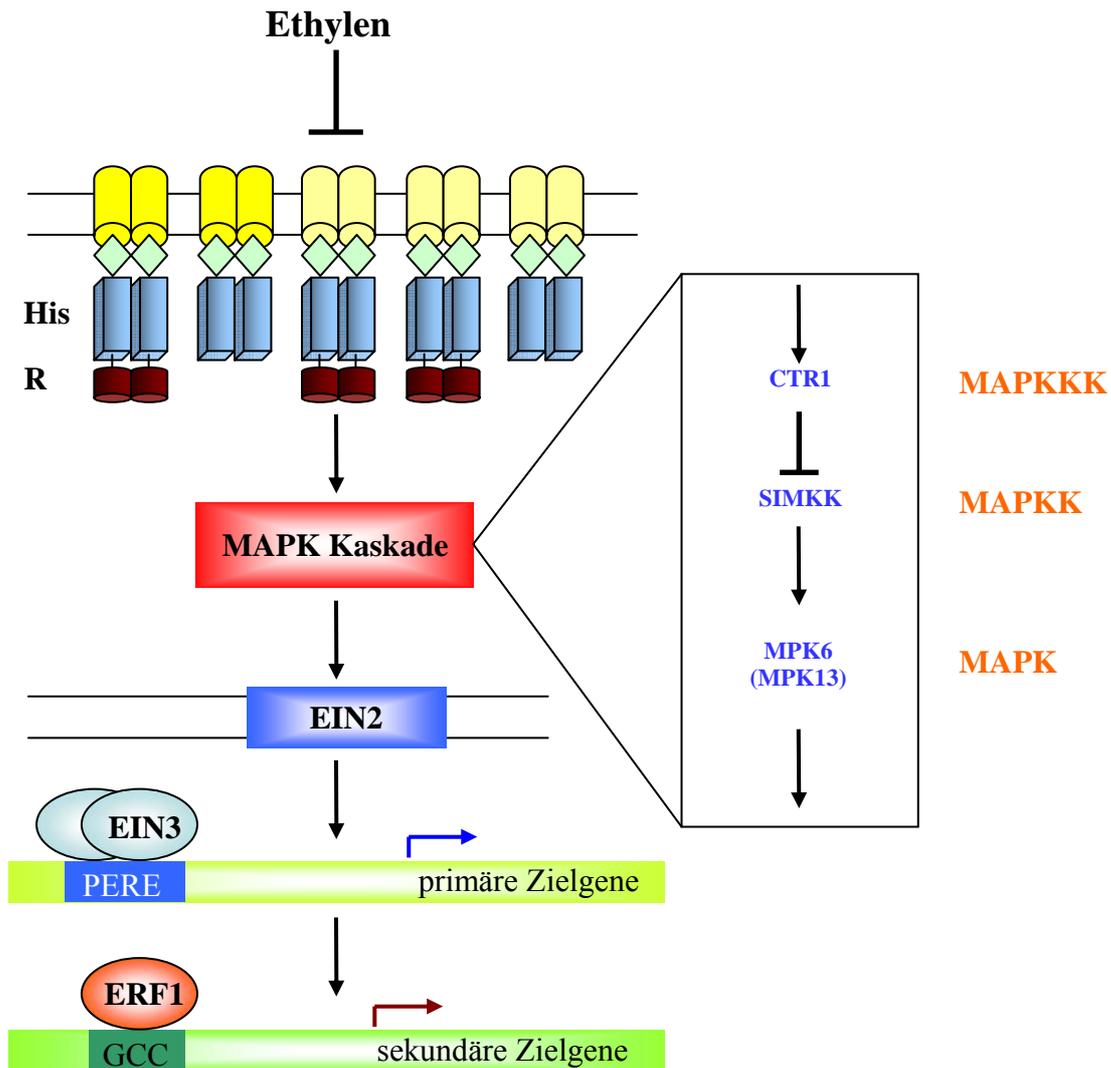


Abb. 1-4: Klassisches Modell der Ethylensignaltransduktion: Die fünf Ethylensensoren ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 und ERS2 agieren als Dimere und sind Mitglieder der Zwei-Komponenten-Rezeptorfamilie, die durch eine Histidinkinasedomäne (His) und eine Receiverdomäne (R) charakterisiert ist. Die Ethylenrezeptoren sind negative Regulatoren der Ethylenantwort. Die Bindung von Ethylen reprimiert die Rezeptoraktivität. Die nächste bekannte Komponente der Ethylensignaltransduktion ist CTR1, ein negativer Regulator, der möglicherweise über direkte Interaktion mit dem Ethylenrezeptor interagiert. CTR1 ist eine Raf-ähnliche Proteinkinase, und es wird vermutet, dass CTR1 durch negative Regulation eine MAP-Kinase-Kaskade initiiert. Es wird angenommen, dass eine Inaktivierung von CTR1 in einer Aktivierung von EIN2 resultiert. EIN2 ist ein positiver Regulator der Ethylenantwort, dessen Signalmechanismus noch unbekannt ist. Im Nukleus läuft eine Ethylenabhängige transkriptionelle Kaskade ab. Mitglieder der EIN3 Transkriptionsfaktorfamilie binden als Dimere das primäre Ethylenantwort Element (primary ethylene response element → PERE) der Promotoren von Ethylen-responsiven Genen wie *ERF1*. Diese Transkriptionsfaktoren vermitteln schließlich nach Bindung an GCC-Box-Promotoren die Expression von sekundären Zielgenen. EIN3 ist ein repräsentatives Beispiel der EIL-Gruppe und ERF1 der EREBP-Gruppe von Transkriptionsfaktoren (verändert nach Chang, 2003).

Eine Überexpression der carboxyterminalen Domäne von CTR1 resultiert in einem Funktionsverlust von CTR1 und ist phänotypisch mit der *ctr1*-Funktionsverlustmutante vergleichbar. Eine Überexpression der Funktionsverlustmutante *ctr1-8*, die

eine Mutation in der aminoterminalen Domäne trägt, konnte hingegen keinen Funktionsverlustphänotyp hervorrufen (Huang, 2003). Diese Untersuchungen zeigten eine Regulation von CTR1 durch Assoziation und Dissoziation vom Ethylenrezeptor. Weitere molekulare Untersuchungen implizieren, dass eine Kinaseaktivität für die Funktion von CTR1 notwendig ist. Es wird vermutet, dass der Rezeptor durch Protein-Protein Interaktion die Kinasefunktion von CTR1 in Abwesenheit von Ethylen aktiviert. Das aktive, vom Rezeptor gebundene CTR1 könnte dann stromabwärts liegende Komponenten der Ethylensignaltransduktion mittels Phosphorylierung herunterregulieren. Somit wäre die Assoziation von CTR1 mit dem Ethylenrezeptor notwendig, um die Ethylensignaltransduktion in einem ausgeschalteten Status zu halten (Huang et al., 2003). Kürzlich konnte eine funktionelle Rolle der CTR1-Phosphorylierung mit der Isolierung und Charakterisierung der *Arabidopsis eer1*-Mutante (*enhanced ethylene response*) untermauert werden (Larsen und Cancel, 2003). Die *eer1*-Mutante zeigte eine stärkere Sensitivität gegenüber Ethylen und eine ansteigende Amplitude der Ethylenantwort (Larsen und Chang, 2001). Es stellte sich heraus, dass *eer1* eine Funktionsverlustmutante des RCN1-Gens ist, welches eine der drei regulatorischen Untereinheiten von PP2A in *Arabidopsis* darstellt. Eine katalytische Untereinheit von PP2A, die mit RCN1 interagiert, assoziiert mit der Kinasedomäne von CTR1 *in vitro*. Dies weist eine Funktion von PP2A in der Kontrolle des Phosphorylierungsstatus und der Aktivität von CTR1 hin (Larsen und Cancel, 2003). Inwieweit sich die Phosphorylierung auf die CTR1-Kapazität auswirkt, tatsächlich potenzielle Substrate zu modifizieren, muss noch geklärt werden. Diese Experimente weisen darauf hin, dass bei der CTR1-vermittelten Ethylensignaltransduktion die Histinkinaseaktivität des Rezeptors keine Rolle spielt. Die bis heute identifizierten *ctr1*-Funktionsverlustallele führen zu einer nicht vollständigen konstitutiven Ethylenantwort. Allerdings zeigen die Vierfachmutanten der Funktionsverlustallele der Rezeptoren (*etr1*, *etr2*, *ein4* und *ers2*) einen deutlich intensiveren Phänotyp als *ctr1*-Pflanzen. Demnach regulieren die Ethylenrezeptoren auch CTR1-unabhängige Signalpfade, deren Signalproteine aber bisher unbekannt sind (Kieber et al., 1993; Hua und Meyerowitz, 1998). Es wird vermutet, dass CTR1 als Teil einer Proteinkinasekaskade zur Regulierung der Ethylenantwort stromabwärts das integrale Membranprotein EIN2 reguliert (Abb. 1-4; Wang et al., 2002; Ouaked et al., 2003). EIN2 hat Ähnlichkeit mit den Nramp-Metallionentransportern. Es reguliert mit einem noch nicht bekannten Mechanismus die

Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren. Mit EIN3 und EIN3-ähnlichen (EIL - EIN3-like) Proteinen und Genprodukten, die spezifisch Elemente der Ethylenantwort binden können (EREbps), wurden zwei Familien von Ethylen-abhängigen Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* beschrieben (Chao et al., 1997). EIN3 und andere Mitglieder der EIN3/EIL-Familie binden ein konserviertes *cis*-regulatorisches Element im Promotoren des *ERF1*-Gens (Ethylene Response Factor, Abb. 1-4; Solano et al., 1998), einem Mitglied EREBP-Familie und induzieren Genexpression. Die EIN3-vermittelte *ERF1*-Genexpression resultiert in einer Interaktion von *ERF1* mit der konservierten *cis*-agierenden GCC-Box innerhalb der Promotoren von sekundären Zielgenen, welche die Ethylenantwort induzieren (Ohta et al., 2000; Solano et al., 1998).

Der Crosstalk zwischen den Elementen des Zwei-Komponentensystems

Die relative Ähnlichkeit der Proteinoberflächen einer bestimmten Domänengruppe kann zur Vernetzung von verschiedenen Zwei-Komponenten-Signalwegen führen. Chang und Stewart (1998) und Rodrigue et al. (2000) zeigten, dass eine Histidinkinase die Aktivität von unterschiedlichen Responseregulatoren oder verschiedener HPt-Proteine regulieren kann. Dabei ist die Anzahl der möglichen Knotenpunkte im Mehrschrittssystem entsprechend höher als vergleichsweise in einem einfachen His-Asp-Phosphorelay. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass bestimmte Histidinkinasen mit verschiedenen AHP-Proteinen interagieren können (Miyata et al., 1998; Suzuki et al., 1998b). Wie oben beschrieben regulieren Elemente des Zwei-Komponentensystems in Pflanzen die Antwort auf Ethylen. Das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen benötigt jedoch die koordinierte Wirkung multipler Phytohormone. Zahlreiche Beispiele sind dafür bekannt: Die *Arabidopsis*-Mutante *axr2* reagiert insensitiv auf exogene Gabe von sowohl Auxin, als auch Ethylen und ABA (Wilson et al. 1990). Die Mutante *ckr1* wurde als in der Cytokinin-Antwort gestört identifiziert (Su und Howell, 1995). Genetische Analysen zeigten, dass das mutierte Gen allelisch zu *ein2* (ethylene-insensitive) ist. Die Triple Response bei im Dunkeln gewachsenen Keimlingen wird sowohl durch exogene Cytokiningabe, als auch Ethylenapplikation verursacht. Die Ursache dafür ist eine Verknüpfung der beiden Signalwege. Cytokinin wirkt indirekt über Ethylen, da es die Ethylenbiosynthese in ihrem ersten Schritt induziert (Vogel et al. 1998b). Die Seneszenz hingegen

wird entgegengesetzt von Cytokinin und Ethylen beeinflusst: Ethylen fördert, Cytokinin hemmt die Alterung (Quirino et al. 2000).

Da die Phytohormone wie auch das Licht eine entscheidende Rolle in der Regulation des Wachstums und der Entwicklung der Pflanze spielen, scheint eine gegenseitige Beeinflussung von Licht- und Hormon-vermittelten morphologischen Reaktionen notwendig (Chory, 1993). Für typische Licht-gesteuerte Reaktionen wurde eine Beteiligung von Hormonen gefunden. So hat beispielsweise Gibberellin als auch ABA eine Funktion bei der Keimung (Khurana et al. 1998). Mutierte Pflanzen der Photomorphogenese-Repressoren COP und DET (constitutive photoporphenesis und de-etiolated; Nagy und Schäfer, 2000), zeigten eine Licht-unabhängige Photomorphose in Keimlingen. Die Defekte der entsprechenden Mutanten lassen aber vermuten, dass die veränderte Entwicklung auch durch Licht-unabhängige Signalwege induziert wurde (Chamovitz und Deng, 1996). Cytokinin beeinflusst ebenfalls photomorphogenetische Reaktionen: In der Keimlingsentwicklung wirken Cytokinin und Licht synergistisch (Miller 1958), und Cytokinin kann in bestimmten photomorphogenetischen Antworten den Faktor Licht phänokopieren (Chory, 1992). Auf einzelne physiologische Reaktionen wirkt Cytokinin und auch Licht antagonistisch. Wurzelwachstum wird durch Licht gefördert, aber die exogene Applikation von Cytokinin hemmt das Wachstum (Su und Howell, 1995).

Durch die große Anzahl an verschiedener Komponenten des Zwei-Komponentensystems, die miteinander interagieren, wäre eine hohe Komplexität zur Feinregulierung der pflanzlichen Signaltransduktion möglich (Hwang et al., 2002).

1.3 Ziele der Arbeit

Die Bedeutung des Zwei-Komponentensystems für die Signaltransduktion in Pflanzen ist in den letzten Jahren offensichtlich geworden. Die Funktion von Sensor-histidinkinasen als Phytohormonrezeptoren wurde bereits intensiv untersucht. Ziel dieser Arbeit war, den Responseregulator ARR2 molekularbiologisch, physiologisch und biochemisch zu charakterisieren und damit zum Verständnis der Komplexität der Signaltransduktion über Zwei-Komponentensysteme beizutragen.

Zur Identifikation möglicher Zielgene von ARR2 sollten eine *arr2*-Nullmutante und deren komplementierte Linien physiologisch und molekularbiologisch untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit gab es erste Hinweise, dass ARR2 eine Aktivität in der Ethylensignaltransduktion aufweist und es galt zu klären, welches Spektrum der Ethylenantworten durch ARR2 reguliert wird. Dafür sollte mit Hilfe physiologischer Experimente die Funktion von ARR2 auch biochemisch mit Hilfe von Transaktivierungsanalysen und *in vitro* mit Phosphorylierungsstudien untersucht werden.

Interaktionsstudien im Hefe-Drei-Hybridsystem lassen vermuten, dass ETR1 die entsprechende Hybridkinase von ARR2 repräsentiert. Die funktionelle Verbindung soll mit dem zellfreien pflanzlichen Phosphotransfersystem (Lohrmann, 2001; Hass et al., 2004) biochemisch nachgewiesen werden.

Vorangehende Analysen lieferten erste Hinweise, dass der Responseregulator ARR2 Phosphorylierungs-abhängig aktiviert werden kann (Lohrmann, 2001). Die Phosphorylierung des Responseregulators ARR2 erfolgt dabei an einem Aspartatrest der Aminosäureposition 80 innerhalb einer konservierten Aminosäuresequenz des Receivers. Mutationen in diesem Bereich von Responseregulatoren führen zu einer reduzierten bzw. zum Verlust der Phosphorylierbarkeit (Lohrmann, 2001). In dieser Arbeit sollte eine mutierte Form des ARR2, in der die putative Phosphorylierungsstelle Aspartat 80 durch Glutamat ersetzt wurde, *in vitro* und *in planta* analysiert werden, um die Aktivitätsmodulation von ARR2 und deren Bedeutung im Signalleitungsnetz aufzuklären.

Der Ethylenrezeptor ETR1 und der Cytokininrezeptor AHK4/CRE1/WOL sind funktionelle Hybridkinasen (Kieber, 1997; Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001). Die Möglichkeit einer Verknüpfung der Hormonsignalwege von Ethylen und Cytokinin mit

den *Arabidopsis* HPt-Proteinen (AHP) als Schnittstellen sollte überprüft werden. Zu diesem Zweck sollte RNA-Interference (RNAi)-Pflanzen der HPt-Proteine generiert werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Vektoren

Folgende Vektoren wurden zur Klonierung verschiedenster cDNA Fragmente eingesetzt:

Vektor	Größe [kb]	Firma/Herkunft	Verwendungszweck
pASK-IBA3	3,3	IBA	Expression mit carboxyterminalem StrepII-Peptid
pBS-SK	3,0	Stratagene	Klonierung
pET24b	5,3	Novagen	Expression mit carboxyterminalem (His) ₆ -Peptid
pGEX-6P1	5,0	Clontech	Expression mit aminoternalem GST-Peptid
pGPTV-BAR	8,4	Becker <i>et al.</i> , 1992	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis</i>
pPCV812-35S	8,6	Koncz (Kretsch/Ehmann)	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis</i>
pPCV835	8,4	Koncz (Kretsch/Ehmann)	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis</i>
pQE31	3,5	Qiagen	Expression mit carboxyterminalem (His) ₆ -Peptid
pSMAV4	4,5	Daris und Vierstra (1996)	Analyse von GFP Fusionsproteinen
pFGC5941	11,4	Invitrogen	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis</i>

2.1.2 Verwendete Oligonukleotide (PCR)

Folgende Oligonukleotide wurden zur Klonierung verschiedenster cDNA Fragmente mittels PCR eingesetzt:

interne Nr.	Interne Bezeichnung	Sequenz (5' →3')
611B	JL/5'ARR2	CTAGAATTCGGATCCGTAAACCCTGGTCATGGAAGAGGAC
109	3'-SS-AtCheY4	CGCGTCGACCCGGGAACCTGTTTTGAGAAATGCGCTCATCAGATCTTC
1500	iRNA Sense-Sense	GATCCCATCAACTCAAAGGTAGTAGCTCCATCAGTTTAAAGGAAGCAGCACAATCA GCTGGTGGGAAGCAGTTCT
1501	iRNA Sense-Antisense	CTAGAGAACTGCTTCCCACCAGCTGATTGTGCTGCTTCCCTTAAACTGATGGAGCT ACTACCTTTGAGTTGATGG
1502	iRNA Sense-Antisense	AAATCATCAACTCAAAGGTAGTAGCTCCATCAGTTTAAAGGAAGCAGCACAATCAG CTGGTGGGAAGCAGTTCCG
1504	iRNA Antisense- Antisense	CGCGCCGAACTGCTTCCCACCAGCTGATTGTGCTGCTTCCCTTAAACTGATGGAGC TACTACCTTTGAGTTGATGATTT
920	JH/ACT2-U1	CTGCTCAATCTCATCTTCTTCC
921	JH/ACT2-L1	GAGCTGCCTCATCATACTCG
1145	CH/At2g14610-S1	TTACTGGCTATTCTCG
1146	CH/3' At2g14610-A1	ACGAGGATCATAGTTG
1147	CH/At2g40670-S1	ATTGACCGTAAACTCG
1148	CH/3'At2g40670-A1	TCTCAACATCAGCAAG
1149	CH/At3g23240-S1	TACGGTCTAATCGAGCAGTCCACG
1150	CH/3'At3g23240-A1	AAGTCACTATCTTTCGTCTTCTTATTG
1155	CH/At5g44420-S1	TGCTTCCATCATCACCCCTTATCTTCG
1156	CH/3' At5g44420-A1	ATGGGACGTAACAGATACACTTGTGTG
1151	CH/At5g13320-S1	TCCGATGTTATATCGG
1152	CH/At5g13320-A1	GGACCATGACTGAAG
1157	CH/At3g56380-S1	GTC AATGGAGGAGGAG
1158	CH/3'At3g56380-A1	GTTTCAGTGGCTTCTG
1504	CH/-CHS	ATCTTGGCAATAGGCACGGCTAACCCCT
1505	CH/3'-CHS	GAAGCAACCTTGCTGGTACATCAT
1506	CH/-CAB3	CGTCTAGATCAATGGCCGCCTCAACAATGGC
1507	CH/3'-CAB3	CGAATTCGCTCACTTTCCGGGAACAAAGTTGG
KO1	DS5-2	TCCGTTCCGTTTTTCGTTTTTTAC
KO2	DS3-2	CGATTACCGTATTTATCCCCTTC
KO3	JL-ARR2-S1	ATGGTAAATCCGGGTCACG
KO4	JL-ARR2-A1	TGCGCTCTCTGCTCTTGTT

2.1.3 Verwendete DNA-Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt oder mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt (letztere sind wie folgt gekennzeichnet: Sweere, 2001°, Hummel*).

cDNA	Klonierungsstellen	Vektor	5' Oligonukleotid	3' Oligonukleotid
arr2	Bam HI/Sal I	pSK°	108	109
	Bam HI/Sal I	pASK-IBA3	611	467
	Bgl II/Sal I	pPCV812-35S°	497B	467
	Bam HI/Sma I	pSMAV4*	497B	467
arr2d80e	Bam HI/Sal I	pASK-IBA3	497B	498
	Bam HI/Sma I	pSMAV4*	497B	467
arr2d80n	Bam HI/Sal I	pASK-IBA3	497B	498
	Bam HI/Sma I	pSMAV4*	497B	467
ahp1,2,3,4,5 Sequenz für RNAi	Sinn: Bam HI/Xba I	pFGC5941	1500	1501
	Gegensinn:		1502	1503
	Asc I/Swa I			

2.1.4 Rekombinante Proteine

Folgende Proteine wurden rekombinant exprimiert, aufgereinigt und in Experimenten eingesetzt (für eine Charakterisierung der rekombinanten Proteine siehe:

Protein	Verwendungszweck	Affinitätspeptid	Position des Peptids	Vektor (Firma)
ARR2	Phosphorylierung, Interaktionsstudien	StreptII	C-	pASK-IBA3 (IBA)
<i>ARR2D80E</i>	Phosphorylierung, Interaktionsstudien	StreptII	C-	pASK-IBA3 (IBA)
ARR2-204/644	Antigen	(His) ₆	C-	pET-24b (Novagen)
ETR1-R	Interaktionsstudien	GST	N-	pGEX-6P1 (Clontech)

2.1.5 Verwendete Seren

Folgende primäre Seren wurden in Immunoblotanalysen und *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien eingesetzt:

Serum	Typ	aus	gegen	Referenz/Hersteller
α -ARR2	Polyklonal	Maus	At-ARR2-204/644	Lohrmann, 2001
α -ARR2	Polyklonal	Kaninchen	At-ARR2-204/644	Lohrmann, 2001
HA	Polyklonal	Maus	Hämagglutinin (Influenza A)	
RBC	Polyklonal	Maus	RBC	Hwang und Sheen, 2001

Sekundäre Seren wurden meist von Boehringer (Mannheim) bezogen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Seren wurden nach Gebrauch mit 0,02%igem Natriumazid versetzt, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.1.6 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

2.1.6.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Stamm	Firma	Verwendungszweck
XL1 blue	Stratagene	Klonierung

Die XL1 blue Zellen eignen sich aufgrund der besonders hohen Transformationseffizienz sehr gut als Klonierungsstamm. Darüberhinaus sind sie Rekombinase-negativ.

2.1.6.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm	Herkunft	Verwendungszweck
GV3101 (pMP90RK)	Kudla	stabile Pflanzentransformation

Die Zellen tragen eine genomische Rifampicinresistenz. Der Hilfsvektor pMP90RK vermittelt eine Kanamycinresistenz. Außerdem beinhaltet der Vektor das *vir*-Operon der Ti-Plasmide sowie Gene die zur Konjugation und Replikation der binären Transformationsvektoren notwendig sind. Die binären Transformationsvektoren selbst tragen eine Carbenicillin/Ampicillinresistenz.

2.1.7 Standard Medien

LB-Medium (*E. coli*):

- 1% (w/v) Bacto-Tryptone
- 0,5% (w/v) BactoYeast Extract
- 1% (w/v) NaCl
- (je nach Bedarf Antibiotika zugeben)
- (Platten: 1,5 % (w/v) Bactoagar)

YPD-Medium (*Saccharomyces cerevisiae*):

- 2% (w/v) Bacto Peptone
- 2% (w/v) Glucose
- 1% (w/v) Yeast Extract
- (Platten: 2% (w/v) Bactoagar, pH 5)

YEB-Medium (*Agrobacterium tumefaciens*):

- 0,5% (w/v) Beef-Extrakt
- 0,1% (w/v) Yeast-Extrakt
- 0,5% (w/v) Pepton aus Casein
- 0,5% (w/v) Saccharose
- 1,4 mM MgCl₂
- 0,044 mM CaCl₂
- (je nach Bedarf Antibiotika zugeben)
- (Platten: 1,5 % (w/v) Bactoagar)

MS-Platten (*Arabidopsis thaliana*)

- 0,5 x MS-Salze, pH 5.8
- 0,05% (v/v) MES-Puffer
- 0,8% (w/v) Bactoagar
- 1% Saccharose
- (je nach Bedarf Antibiotika zugeben)

2.1.8 Standard Puffer

PBS:

- 115 mM NaCl
- 4 mM KH₂PO₄
- 16 mM Na₂HPO₄

5 x Protein Probenpuffer:

- 15% β-Mercaptoethanol (v/v)
- 15% SDS (w/v)
- 0,15% Bromphenolblau (w/v)
- 50% Glycerin
- 50 mM Tris/HCl

TBST:

- 50 mM Tris/HCl pH 7.4
- 150 mM NaCl
- 0,1% Tween 20

Protein Probenpuffer mit Harnstoff:

- 5% β-Mercaptoethanol (v/v)
- 5% SDS (w/v)
- 0,05% Bromphenolblau (w/v)
- 15% Glycerin (v/v)
- 4 M Harnstoff
- 10 mM Tris/HCl

TE-Puffer:

- 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 1mM EDTA

10x TBE:

- 0,5 M Tris/ HCl pH 8.3
- 0,5 M Borsäure
- 10 mM EDTA

T-Puffer:

- 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

2.1.9 Größenmarker

Protein-Größenmarker: SeeBlue™ Pre-Stained Standards (Novex, Frankfurt)

See Blue™ Plus2 Pre-Stained Standards (Novex, Frankfurt)

DNA-Größenmarker: Lambda DNA *Eco471 (AvalI)* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

RNA-Größenmarker: 0.16-0.77 Kb RNA-Ladder (Gibco BRL, Karlsruhe)

2.1.10 Datenbanken und andere Internetressourcen

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool for comparing gene and protein sequences against others in public databases, Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/, EMBL: www.ebi.ac.uk/fblast2/, ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/))

EMBL European Bioinformatics Institute EBI (www.ebi.ac.uk/)

FASTA (EMBL, www.ebi.ac.uk/fasta33/ und DDBJ www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html)

MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences GSF, <http://mips.gsf.de/> A. thaliana BACs und Contigs)

NCBI (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov)

TAIR (www.arabidopsis.org)

TIGR (The Institute For Genomic Research <http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/>)

BCM Search Launcher (Baylor College of Medicine HGSC) www.searchlauncher.bcm.tmc.edu

2.1.11 Wildtypen und Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Für die stabile Pflanzentransformation und physiologische Analysen wurden die folgenden Wildtypen (bezogen von Lehle Seeds, Round Rock, Tucson, USA) verwendet: Columbia (Col), Bensheim und Landsberg erecta (Ler). Die verwendeten Mutanten waren die *arr2*-Transposoninsertionslinie (SGT4387; IMA-Kollektion; Parinov et al., 1999), deren Komplementationslinien *arr2-I*, *arr2-III* und *arr2-IV* und die ARR2^{D80E} (Aspartat zu Glutamat-Austausch an der Position 80) überexprimierende Linie im Col-Hintergrund. Es wurden die Mutanten *etr1-7*, *ein3-1*, *eto1-1* und *ctr1-8* für Hypokotyllängenassays verwendet.

2.1.12 Lichtfelder

Lichtfeld	Energiefluß [W/m ²]	Emissions- max. (λ_{max}) [nm]	Halbwerts- breite [nm]	Leuchtstoffröhren	Besonderheiten	Literatur
Weißlicht/ UV-A (cWL)	4,3	450	n.b.	Philips TL 40 W/18 Osram L 36 W/ 73		Merkle et al., 1994
Dunkelrot (cDR)	3,5	730	128	Osram Linestra 120 W	PG 501/3 PG2 627/3 KG 3/2	Schäfer, 1977
Rotlicht (cR)	0,577	656	24,5	Philips TL 40 W/15	PG 501/3	Schäfer, 1977
Blaulicht	0,5	436	nb	Philips TL 40 W/18	PG627/3	Schäfer, 1977
Sicherheits- grünlicht	nb	520	30	Philips TL 40 W/17	umwickelt mit Filterfolie Typ Nr. 874, mittelgrün	

Plexiglas (PG) und Wärmeabsorptionsglas (KG): Röhm/Haas, Darmstadt

Filterfolie: Rosco Lab. Inc., USA

Die Standardtemperatur der Lichtfelder beträgt 25 °C.

Nb: nicht bestimmt

2.1.13 Chemikalien

6- Benzylamino-Purin Lösung (BA)	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
[E]-6-[4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylamino]purine (transZEATIN)	Sigma, Deisenhofen
1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxyl-Säure (ACC)	Calbiochem, Bad Soden
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Fluka, Neu-Ulm
3-(N-Morpolino)-propansäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)	Biomol, Hamburg
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Anti-Mouse / Anti-Rabbit IgG, Phosphatase-gekoppelt	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Karlsruhe
Bacto-Peptone	Difco, Karlsruhe
Bacto-Tryptone	Difco, Karlsruhe
Bacto-Yeast Extract	Difco, Karlsruhe
Bacto-Yeast Nitrogen Base (YNB)	Difco, Karlsruhe
6-Benzylaminopurin (BA)	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt

Carbenicillin	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Cellulase	Serva, Heidelberg
Complete™ Proteasen-Inhibitor-Cocktail	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Heidelberg
Desthiobiotin (5-Methyl-2-oxo-4-imidazoline caproic acid)	Sigma, Deisenhofen
Deoxyribonucleinsäure (DNA von Salmon Testes)	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin	Calbiochem, Bad soden
Immobilon PVDF Membran	Millipore, USA
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
Kinetin	Sigma, Deisenhofen
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen
Mazerozyme R-10	Serva, Heidelberg
Murashige und Skoog Basal Salt Mixture (MS-Salze)	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
N,N,N,'N',-Methylenbisacrylamid (Bis)	Roth, Karlsruhe
N,N,N,'N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Natrium Dodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck, Darmstadt
Nitroblue Tetrazolium (NBT)	Sigma, Deisenhofen
Polyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 400 (PEG)	Roth, Karlsruhe
Rifampicin	Serva, Heidelberg
RNAwiz	Ambion, Inc USA
Röntgenfilme BIOMAX und Intensifying Screen	Siemens, Freiburg
Röntgenfilm-Entwickler, -Fixierer	Siemens, Freiburg
Sephadex G50	Pharmacia, Uppsala
Silwet	Leele Seeds, Tucson USA
Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat	IBA, Göttingen
StrepTactin-Sepharose	IBA, Göttingen
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris- (hydroxymethyl)-methylamin (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Whatman 3MM Papier	Whatmann, GB

Weitere im Text angeführte Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Duchefa Biochemie (Haarlem, NL) und Roth (Karlsruhe) in der Qualitätsstufe p.a. bezogen. Reagenzien und Enzyme für die Molekularbiologie stammten von GibcoBRL (Karlsruhe), INVITROGEN (Carlsbad), NEB (Frankfurt), MBI Fermentas (St.Leon-Rot) oder GENAXON (Stafflangen).

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht des Pflanzenmaterials

2.2.1.1 Anzucht auf Keimpapier

Für physiologische Experimente wurden die Keimlinge, wenn nicht anders angegeben, auf Filterpapier gezogen. Dafür wurden jeweils vier Lagen Rundfilter (Schleicher und Schüll, Ø 80 cm) in Petrischalen in 4 mL A. bidest eingeweicht und die Samen darauf homogen verteilt. Nach der Aussaat wurden die Samen in lichtundurchlässigen Kisten für 48 h bei 4°C stratifiziert. Die Keimungsinduktion erfolgte in der Regel für 24 h (mindestens jedoch 6 h) im Dunkelrotlichtfeld.

2.2.1.2 Anzucht unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium oder auf Agarplatten

Vor der Aussaat auf MS-Medium oder auf Agarplatten wurde zur Vermeidung von Pilzbefall eine Oberflächensterilisierung der Samen durchgeführt. Dazu wurden wenige bis 10 mg Samen für 3-10 h mit Chlorgas (Zugabe von 3 mL HCl zu 100 mL Natriumhypochlorid) im Exsikkator inkubiert. Für die Wurzelwachstumsexperimente wurden die Samen in 0,15% (w/v) Agarose homogen auf 0,5xMS-Platten (ohne Zugabe von Saccharose) verteilt und auf die Platten mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze pipettiert. Die Platten wurden für 14 Tage im konstanten Weisslicht inkubiert. Die Anzucht für die Kalluswachstumsanalyse, die Selektion transgener Keimlinge erfolgte auf 0,5xMS-Platten, wobei Antibiotika oder Hormone entsprechend zugegeben wurden.

2.2.1.3 Anzucht auf Erde in 9mm- oder 12 mm-Töpfen

Die Anzucht adulter Pflanzen auf Erde mit einer Stratifizierung und Keimungsinduktion wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Kurztag (8 h Licht) oder im Langtag (16 h Licht).

2.2.2 Physiologische Experimente

2.2.2.1 Messung der Hypokotyl- und Wurzellängen

Die Länge der Hypokotyle und Wurzeln von Keimlingen wurden manuell mit Hilfe einer beleuchteten Tischlupe und Millimeterpapier durchgeführt. Die Keimlinge für Hypokotyllängenbestimmung wurden auf Rundfilterpapier nach Stratifikation (4°C für zwei Tage) im Dunkeln für vier Tage angezogen.

2.2.2.2 Kalluswachstums-Assay

Oberflächensterilisierte Samen wurden auf MS-Platten ausgelegt und nach Stratifikation bei 4°C im Dunkeln in konstantes Weisslicht transferiert, um sechs Tage alte Keimlinge zu erhalten. Diese

wurden steril mit Hilfe eines Skalpell von Kotyledonen und Wurzeln befreit und die so erhaltenen Hypokotylsegmente wurden auf kallusinduzierenden Medienplatten transferiert. Es erfolgte eine Inkubation für 21 Tage im Langtag (16 h Licht). Den kallusinduzierenden Medienplatten wurden das Auxin 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) und das Cytokinin Kinetin in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen zugesetzt.

Konzentration an Kinetin

0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ng/mL

Konzentration an 2,4-D

0, 3, 10, 30, 100 ng/mL

Kallusinduzierendes Medium (1000 mL)

MS-Salze 4,302 g

5% MES pH 5,7 (mit KOH einstellen)

Saccharose 10 g

Inositol 0,1 g

Thiamin-HCl 0,01 g

Pyridoxin-Hcl 0,001 g

Nicotinsäure 0,001 g

Biotin (in Ethanol) 0,001 g

Agar 8 g

Ad 1000 mL mit A. bidest

Eine Kombination von allen Konzentrationen untereinander ergab 40 verschiedene Konzentrationskombinationen.

Literatur: Kubo und Kakimoto, 2000

2.2.2.3 Methoden zum Studium der Interaktion von *Botrytis cinerea* mit

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) angezogen, nach zwei Wochen in die Botrytis-Inkubationskammer versetzt (zwölf Pflanzen/Linie) und verbleiben dort für weitere zwei bis drei Wochen. Die Pflanzen wurden mit einer Sporenlösung von zwei verschiedenen Botrytis-isolaten (A-1-3, leicht virulent, 1.000.000 Sporen/mL; B05-10, stärker virulent, 500.000 Sporen/mL) besprüht und für drei bis sieben Tage inkubiert. Der Krankheitsindex wird makroskopisch festgelegt nach einer visuellen Begutachtung. Für die *Peronospora*-Behandlung wurden zehn Tage alte Keimlinge mit einer Sporenlösung (2×10^4 Sporen/mL) besprüht und für weitere sieben Tage bei 19°C unter einer Haube inkubiert. Danach wurden die Blätter geerntet und mit der Lactophenol-Trypanblau-Methode gefärbt. Die Blätter wurden in 70°C heisse Lactophenol-Trypanblau-Lösung eingelegt und für 5 min unter Vakuum gesetzt. Danach wurden sie in sprudelden Wasser für 2 min gekocht und Chloralhydrat-Lösung entfärbt. Abschließend erfolgte eine Äquilibrierung in 70% Glycerol.

Lactophenol-Tryptylblau-Lösung

25 mg/mL Trypanblau

25% Milchsäure

23% wassergesättigtes Phenol

25% Glycerol

A. bidest

Chloralhydrat-Lösung

25 g Chloralhydrat

10 mL A. bidest

2.2.2.4 Photoakustische Messung von Ethylen

Das Grundprinzip der photoakustischen Spektroskopie basiert auf einer Anregung von Gasmolekülen durch Absorption von Licht und anschließender Relaxation. Das bestrahlte Medium erfährt dabei eine Erwärmung und daraus resultierende Ausdehnung und eine Abkühlung und daraus sich ergebende Kontraktion. Wird dem System periodisch Licht zugeführt, entstehen durch Ausdehnung und Kontraktion Druckschwankungen, die in Form von Schall (bei akustischer Frequenz von Strahlmodulation) gemessen werden können (Gudi, 2002). Moleküle emittieren spezifische Wellenlängen, die als spezifische Anregungslinien für Laser genutzt werden können.

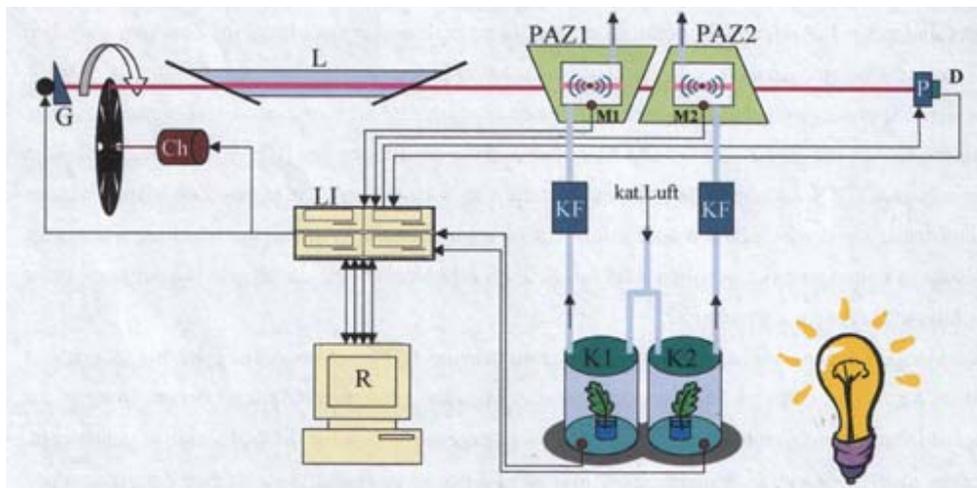


Abb. 2-1: Prinzipieller Messaufbau des photoakustischen Spektrometers zur Ethylenbestimmung

mit gasdichten Küvetten (K1/K2), einer Kühlfalle (KF), photoakustischen Zellen (PAZ1/PAZ2) mit Mikrofonen (M1/M2), einem Rechner zur Steuerung und Datenspeicherung, einem phaseneempfindlichen Verstärker (Lock-In LI), Detektorzellen (D), einem Piezo (P), dem CO₂-Laser (L), einem Lichtzerracker (Chopper C) und einem Gitter (G). Das Messprinzip ist ausführlich im Text erläutert.

Hiermit wird eine spezifische Anregung eines bestimmten Gases in einem Gasgemisch möglich. Bei dieser Methode entspricht das Ausgangssignal eines Mikrophons proportional der absorbierten Laserenergie und dadurch der Konzentration der Gase. Solange Sättigungseffekte vernachlässigbar sind, ist das Signal mit folgender Gleichung zu berechnen (Gudi, 2002):

$$S = C \cdot N \cdot \sigma \cdot P \cdot R$$

C → Proportionalitätsfaktor des Geräteaufbaus

S → akustisches Signal

N → Teilchendichte der absorbierenden Moleküle

σ → Absorptionsquerschnitt

P → mittlere Laserleistung

R → Empfindlichkeit des Mikrophons

Werden Photonen im optischen Wellenlängenbereich energetisch auf ein höheres Niveau angeregt wird die durch Relaxion abgegebene Energie in Form von Fluoreszenz freigesetzt. Um strahlungslose Relaxionsenergie in Form von Wärme zu produzieren, werden Laser im infraroten Spektralbereich verwendet, die eine Anregung durch Photonen zu diskreten Schwingungs-Rotations-Zuständen zur Folge haben. Ein CO₂-Laser ist in der Lage Ethylen sehr stark zu absorbieren und darum zum Nachweis von Spuren besonders gut geeignet. Eine Kombination von CO₂-Lasern und besonders rauscharmen Kondensatormikrophonen ermöglicht den sicheren Nachweis von Konzentrationen absorbierter Ethylenmoleküle im ppt-Bereich (10^{-12} relativer Konzentration) bei einem Gesamtdruck von 1 mbar bis 1 atm (Gudi, 2001) und ist darum in der Lage endogen produzierte Ethylenmengen von *Arabidopsis*-Pflanzen zu detektieren.

Zum Spurengasnachweis von Ethylen wurde das photoakustische Spektrometer mit CO₂-Laser und zwei Detektorzellen der Forschungsgruppe von Dr. F. Kühnemann im Institut für angewandte Physik der Universität Bonn verwendet. Die *Arabidopsis*-Keimlinge wurden in gasdichten Küvetten in einem Wasserbad plaziert und mit angefeuchteter Laborluft durchströmt, die vorher mit einem Platinkatalysator bis zu 400°C erhitzt wurde. Durch diese Behandlung wird die Luft von sämtlichen Kohlenstoff befreit. Wenn die Luft die Inkubationsküvette verlässt wird sie getrocknet und durch eine Flüssigstickstoff-Kühlfalle von anderen Gasen, die die Ethylenmessung beeinträchtigen könnten befreit. Das Schallsignal, das in den Messzellen durch die Anregung Ethylens mittels CO₂-Laser entsteht wird durch Mikrophone aufgenommen, durch einen phasenempfindlichen Verstärker amplifiziert und auf der Festplatte eines Rechners gespeichert. Beim sicheren Nachweis von Ethylen werden vier Laserlinien benötigt, die durch computergesteuertes Wechseln und Abstimmen auf die konkrete Laserlinie mittels einem drehbaren Gitter und einem Endpiezo sowie Frequenzregulation eines Strahlzerhackers entstehen (Gudi, 2001).

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Methoden zur Erzeugung und Analyse von rekombinanter DNA

2.2.3.1.1 Synthese von DNA mittels PCR

Mittels der PCR Methode (*polymerase chain reaction*) können spezifische Sequenzen, z.B. aus cDNA-Banken, amplifiziert werden. Die in den PCR-Reaktionen eingesetzten Oligonukleotide können zusätzlich zu der zur gewünschten Sequenz komplementären Nukleotidabfolge weitere Nukleotide an ihren jeweiligen 5' Enden enthalten (sog. *dangling ends*), die z.B. Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen darstellen können. Durch das Einführen spezifischer Schnittstellen kann das gereinigte PCR-Produkt (2.2.3.1.4) nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen und nochmaliger Aufreinigung in entsprechend behandelte Vektoren ligiert werden.

Die genauen Reaktionsbedingungen der PCR wurden für jede PCR individuell und abhängig von der verwendeten Polymerase, eingesetzter Templatmenge und -größe und Schmelztemperatur der Oligonukleotide optimiert. Hierbei wurde insbesondere die *annealing* Temperatur, die $MgCl_2$ Konzentration und die Länge der Polymerisationsphase modifiziert. Sowohl *Taq*- als auch *Pfu*-Polymerasen kamen zum Einsatz. Letztere verfügt im Gegensatz zu der ersteren über eine 3'-5' Exonuklease (sog. Korrektur-) Aktivität, kann aber aufgrund der fehlenden Terminalen Transferase Aktivität nicht zur Klonierung in sog. T-Vektoren eingesetzt werden. Als 10 x Puffer wurde der von der Herstellerfirma mitgelieferte, auf die entsprechende Polymerase abgestimmte, Puffer eingesetzt.

Standard PCR Ansatz

Template	ca. 10 - 50 ng (1 μ L)
5' Oligonukleotid	200 ng
3' Oligonukleotid	200 ng
Polymerase	1 unit (1 μ L)
10 x Puffer	5 μ L
10 mM dNTP	2,5 μ L
ad. 50 μ L	A. bidest.

Standard PCR Programm

Denaturierung	94°C, 45 s	} 25-35 Zyklen
Oligonukleotidbindung	58°C, 45 s	
Oligonukleotidverlängerung	72°C, 90 s	
Abschließende Verlängerung	72°C, 10 min	

Reinigung eines PCR Produktes

Die Reinigung eines PCR Produktes wurde mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Angaben des Herstellers (QIAquick Spin Handbook 01/97) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Adsorption von DNA an Silikat im sauren Milieu (pH < 7,5) in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die DNA wurde, nach mehreren Waschschritten, mit T-Puffer (geringe Salzkonzentrationen, pH > 7,5) eluiert.

2.2.3.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgt größenabhängig in Agarosegelen verschiedener Konzentration. Folgende Richtwerte fanden Verwendung:

- 1,5% (w/v) Agarose: DNA von 50 bis 500 bp
- 1,0% (w/v) Agarose: DNA von 500 bis 1000 bp
- 0,8% (w/v) Agarose: DNA größer 1000 bp

Die Agarosesuspension wurde aufgekocht (loser Deckel) und nach Abkühlen auf ca. 55⁰ C mit einer 1%igen Ethidiumbromidlösung versetzt (Abzug! 1 µL / 50 mL). Das vollständig polymerisierte Gel wurde in eine Kammer eingesetzt und mit Laufpuffer (1x TBE) überschichtet. Die Elektrophorese wurde je nach Agarosekonzentration, Gelvolumen und Fragmentgröße bei 80 – 200 V für 1 bis 2 h durchgeführt. Durch die Interkalierung des Ethidiumbromids zwischen einzelne Basenpaare der Nukleinsäuren können diese auf einem UV-Transilluminator bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden. Die Fragmentgrößen wurden über Standardgrößenmarker abgeschätzt.

10x TBE

0,5 m Tris/Hcl pH8,3

0,5 M Borsäure

10 mM EDTA

Literatur: Maniatis et al., 1982

2.2.3.1.3 Inkubation von DNA mit Restriktionsenzymen

Es wurden Restriktionsenzyme und Puffern von Gibco BRL, NEB oder GENAXON nach Angaben des Herstellers verwendet. Per Unit Enzym wurde nicht wesentlich mehr als 1 µg DNA inkubiert. Außerdem sollten nicht mehr als 10% des Reaktionsgemisches aus Restriktionsenzymlösung bestehen, da es ansonsten aufgrund des Glyceringehaltes der Enzymlösung zu unspezifischem Verhalten der Enzyme kommen kann. Falls der Restriktionsansatz mit einem zweitem Enzym geschnitten werden sollte, wurde er mittels Minidialysefilter ($\varnothing = 0,025 \mu\text{m}$; Millipore) für 20 min mit A. bidest gereinigt und mit dem Restriktionsenzym inkubiert.

2.2.3.1.4 Reinigung eines geschnittenen PCR Produktes oder eines Vektors mittels

Gelelektrophorese und nachfolgender Elution der DNA

Nach Inkubation einer DNA mit Restriktionsenzymen wurde die DNA gereinigt. Hierzu wurde der Restriktionsansatz auf ein präparatives Agarosegel geladen und nach erfolgter Gelelektrophorese die gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel wurde mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Auflösung des Gelstücks dient ein Salz, welches zunächst die Wasserstoffbrücken im Agarose Polymer zerstört. Die gelöste DNA bindet an die Matrix (siehe Reinigung eines PCR-Produkts) und wurde nach einigen Waschschritten mit A. bidest oder TE-Puffer eluiert.

2.2.3.1.5 Ligation von Vektor und Insert

Für eine Ligation sollte Vektor und Insert im ungefähren molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt werden. Um die Mengen abzuschätzen, können zuvor Aliquots auf einem Agarosegel aufgetragen werden. Die Ligation erfolgte bei 16⁰ C über Nacht oder bei RT für 3 - 6 h. Um die Effizienz der Ligation

(positive vs. negative Klone) abzuschätzen, wurde i.d.R. eine Kontrolle mit A. bidest anstelle des Inserts als Negativkontrolle angesetzt.

Standard-Ansatz

Vektor	1 molares Äquivalent
Insert	3 molare Äquivalente
10 x Ligase Puffer	1 µL
T4 Ligase	1 µL
A. bidest.	ad. 10µL

2.2.3.1.6 Transformation von Bakterien

Herstellung kompetenter Bakterien

Um eine hohe Transformationseffizienz zu gewährleisten, wurden Bakterien gemäß des Protokolls von Inoue et al. (1990) vorbehandelt und bei -80°C gelagert.

Dafür wurde wie folgt vorgegangen:

- 1 Bakterienzellen wurden aus dem DMSO-Stock (LB mit 7% DMSO) aufgetaut, auf entsprechenden Antibiotika haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- 2 Eine Vorkultur aus 2-5 mL LB-Medium wurde mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- 3 Mit der Vorkultur werden 100 mL LB-Medium angeimpft (Hauptkultur) und bei 37°C bei 200-250 rpm bis zu einer Dichte von 0,5 – 0,6 (OD 600) für ca. 2-2,5 h geschüttelt.
- 4 Die Zentrifuge mit dem GSA-Rotor wurde auf 4°C vorgekühlt und die Zentrifugenröhrchen und der Transformationspuffer auf Eis gestellt. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und dann in die eiskalten Zentrifugenröhrchen transferiert.
- 5 Die Zentrifugation erfolgte bei 4000 g für 10 min bei 4°C .
- 6 Das Pellet wurde mit 80 mL eiskalten Transformationspuffer resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert.
- 7 Die Zentrifugation erfolgte bei 4000 g für 10 min bei 4°C .
- 8 Das Pellet wurde vorsichtig mit 20 mL Transformationspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 7% DMSO vorsichtig gemischt.
- 9 Eine erneute Inkubation erfolgte für 10 min auf Eis.
- 10 Die Zellen wurden in 500µL Aliquots geteilt und sofort in Flüssigstickstoff transferiert.
- 11 Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -70°C .

Transformationspuffer

10 mM Pipes

15 mM CaCl₂,

250 mM KCl, pH 6.7

Zugabe von 55 mM MnCl₂,

Sterilfiltration und Lagerung bei 4°C

Nährmedien und Antibiotika

Das LB-Medium wurde autoklaviert und anschließend je nach Anforderung mit entsprechenden Antibiotika in folgenden Konzentrationen versetzt:

Ampicillin 50 µg/mL

Chloramphenicol 12,5 µg/mL

Gentamycin 25 µg/mL

Kanamycin 25 µg/mL

Rifampicin 100 µg/mL

Spectinomycin 100 µg/mL

Tetracyclin 15 µg/mL

Die Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Zugabe des Ligations-Ansatzes zu den vorsichtig aufgetauten kompetenten Bakterien
2. Inkubation für 30 min auf Eis
3. Hitzeschock (45 s im Wasserbad, 42°C) und erneute Inkubation im Eiswasserbad für 1 min
4. Zugabe von 400 µL LB zum Ansatz Inkubation bei 37°C im Schüttler bei 1000 rpm für 1 h

Es empfiehlt sich den Transformationsansatz eines Ligationsansatzes vor Ausplattierung zu konzentrieren:

Zentrifugation bei 3000 rpm für 1 min.

400 µL des Überstands verwerfen.

Pellet resuspendieren und auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausstreichen und über Nacht bei 37°C inkubieren.

DNA aus einzelnen Kolonien kann dann mit der sog. Minipräparations-Methode (2.2.3.1.7) isoliert werden und mittels Restriktionsanalyse (2.2.3.1.3) und Gelelektrophorese (2.2.3.1.2) daraufhin analysiert werden, ob das Insert im Vektor enthalten ist.

2.2.3.1.7 Plasmidisolierung aus *E. coli* im kleinen Maßstab (Minipröp)

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* im kleinen Maßstab basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Pelletierung der Zellbestandteile und der genomischen DNA. Die Plasmid DNA bleibt zunächst im löslichen Überstand und kann somit getrennt aufgereinigt werden.

1. 1,5 mL einer 4 mL Über-Nacht Kultur in selektivem Medium (37°C, 180 rpm) zentrifugieren (7.000 rpm, 5 min, RT). Überstand verwerfen (totautoklavieren).
2. Pellet in 150 µL des 4°C kalten Resuspensionspuffers aufnehmen und durch leichtes Schnippen lösen.
3. 150 µL Lysispuffer zugeben, einige Male wenden und 5 min bei RT inkubieren.
4. 150 µL Neutralisationspuffer (3 M Kaliumacetat, pH 5.5) zugeben und Gefäße einige Male wenden.
5. Zentrifugation (15.000 rpm, 4°C, 30 min). Überstand in frische Gefäße mit 1 mL 100%igem Ethanol (-20°C) geben. Dabei die eventuell sehr viskose obere Phase nicht mitabsaugen.
6. Proben bei 4°C zentrifugieren (15.000 rpm, 20 - 30 min) und Überstand verwerfen.
7. Pellet in kaltem 70%igen Ethanol (-20°C) aufnehmen und für 10 min zentrifugieren (4°C, 15.000 rpm).
8. Überstand verwerfen, Pellet ca. 10 min in einem Vakuum Konzentrator (Bachhofer, Reutlingen) unter Zentrifugation trocknen und in 30 µL A. bidest oder T-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0) aufnehmen.

Ein Aliquot der isolierten Plasmid DNA wird in einem restriktionsenzymatischen Test oder in einer PCR daraufhin überprüft, ob ein Fragment der gewünschten Länge aus dem Plasmid herausgetrennt bzw. amplifiziert werden kann. Ein positiver Klon wird dann, ggf. nach Sequenzierung, im präparativen Maßstab (2.2.3.1.8) isoliert.

Resuspensionspuffer

50 mM Tris/HCl pH 8.0

10 mM EDTA

100 µg/mL RNase A

Lysispuffer

200 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

2.2.3.1.8 Plasmidisolierung aus *E. coli* im großen Maßstab (Maxipräp)

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* in großem Maßstab (100 mL einer Bakterienkultur) basiert auf dem oben beschriebenen Prinzip. Im Unterschied zur Minipräp sind die Ausgangsmenge an Bakterien und die präparierte DNA-Menge um den Faktor 25 größer. Aufgrund einer großen Volumeneinsparung wird die Plasmidlösung mit Isopropanol (100%) und nicht mit Ethanol gefällt. Es wurden verschiedene Maxipräp-Systeme der Firmen Jetstar, Qiagen und Eppendorf verwendet.

2.2.3.1.9 *E. coli* Dauerkulturen

Um Bakterien für längere Zeit zu lagern wird das gewünschte Plasmid frisch in Bakterien transformiert und 930 µL einer Über-Nacht Kultur nach sehr gutem Vermischen mit 70 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei – 80°C gelagert. Das sehr hydrophile DMSO stabilisiert die Bakterienzellen derart, dass sie auch noch nach sehr langer Lagerung effizient in Flüssigkulturen oder auf Platten angezogen werden können. Hierzu wird ein kleiner Splitter der gefrorenen Dauerkultur direkt mit einer sterilen Spitze aus dem Lagerungsgefäß herausgekratzt und angeimpft bzw. ausgestrichen.

2.2.3.1.10 Fällung von DNA mittels Isopropanol

DNA kann mit Isopropanol wie folgt gefällt werden:

1. 0,6 bis 0,7 Volumen Isopropanol zur DNA-Lösung geben und gut mischen (kein kaltes Isopropanol verwenden um unnötige Salz-Kopräzipitation zu vermeiden)
2. Zentrifugation (10.000 g; 15 – 30 min bei 4°C)
3. Pellet mit 70%igem Ethanol waschen und an der Luft trocknen

2.2.3.1.11 Fällung von DNA mittels Natriumacetat

Sollte DNA aus verunreinigten Lösungen gefällt werden oder aufgereinigt und aufkonzentriert werden, so wurde die DNA mit Natriumacetat präzipitiert:

1. DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3M NaAcetat (pH 4,8) und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzen.
2. Inkubation für mindestens 1 h auf Eis (je länger, desto höhere Ausbeuten, z.B. über Nacht bei -20°C).
3. Zentrifugation mindestens für 30 min, 15.000 g, 4°C
4. Überstand verwerfen. Das Pellet mit 70%igem Ethanol waschen (mindestens gleiches Volumen wie der zuvor entfernte Überstand)
5. Zentrifugation 10 min, 15.000 g, 4°C
6. Waschen mit 100% Ethanol
7. Zentrifugation wie oben
8. DNA-Pellet in dem Vakuum Konzentrator (Bachhofer, Reutlingen) trocknen
9. Pellet in sterilem A. bidest oder 10 mM T-Puffer aufnehmen.

Anmerkung:

Bei DNA-Konzentrationen von größer als 250 ng/μL fiel die DNA bevorzugt bei höheren Temperaturen und nicht bei tiefen Temperaturen aus.

Die 2,5 Volumen Ethanol des Fällungsschrittes konnten auch durch Zugabe von 0,6-0,8 Volumen Isopropanol ersetzt werden (Volumenverringierung des Ansatzes).

2.2.3.1.12 Isolation genomischer DNA

Eine einfache und schnelle Methode zur Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis* ist die Fällung der DNA mittels Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Murray und Thomphson, 1980). Hierzu wurde frisch geerntetes Pflanzengewebe in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 200 μL CTAB-Puffer mechanisch zerkleinert (Potter, Braun, Melsungen). Nach Zugabe von weiteren 100 μL CTAB-Puffer wurde die Suspension für 30 min bei 60°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit 300 μL Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert (5 min, 10.000 rpm, RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA mit 300 μL Isopropanol bei RT für 15 min gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 10.000 rpm, RT), und das Pellet mit

70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation wie oben). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 30 µL T-Puffer oder A. bidest resuspendiert. Die so gewonnene DNA ist bei 4°C für zehn Tage lagerbar.

CTAB-Puffer

1,4 M NaCl
0,2% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch)
20 mM EDTA
100 mM Tris/HCl pH 8,0
3% CTAB, nach Autoklavieren zugeben

Quantifikation und Bestimmung der Reinheit wurde im Eppendorf BioPhotometers in UV-durchlässigen Küvetten durchgeführt. Diese quantifizierten Lösungen dienen als Template bei PCR-basierenden Experimenten zur Bestimmung des Genotyps individueller Pflanzen.

2.2.3.2 Herstellung transgener Pflanzen

Die gewünschte DNA-Sequenz wurde in einen Vektor kloniert, der neben dem Resistenzgen für Bakterien auch das Resistenzgen zur Selektion der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen (Basta oder Kanamycin) enthielt. Kompetente Agrobakterien (2.2.3.2.1) können direkt transformiert werden. Um sicher zu stellen, dass das Plasmid intakt auf die Agrobakterien übertragen wurde, wurde eine Plasmidisolierung mit anschließendem Restriktionsschnitt (2.2.3.1.3) oder eine Kontroll-PCR mit Genspezifischen Primern (2.2.3.1.1) durchgeführt.

2.2.3.2.1 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Herstellung elektrokompeter Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll.

1. 10 mL LB (mit den entsprechenden Antibiotika) wurden einer stationären Übernachtskultur des gewünschten Stamms (*A. tumefaciens* GV3101 pMP90 oder pMP90R (Koncz und Schell, 1986) inokuliert und bei 28°C über Nacht geschüttelt.
2. Eine 100 mL Kultur wurde 1:10 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen.
3. Die Zellen wurden pelletiert (5000 rpm, 4°C) und in 20 mL eiskaltem, sterilem CaCl₂ (150 mM) resuspendiert.
4. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 2 mL eiskaltem, sterilem CaCl₂ (20 mM) resuspendiert.
5. Die Zellen wurden in Aliquots von 100 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Zellen waren kompetent zur Aufnahme von Plasmid-DNA.

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV3101) erfolgte durch Elektroporation.

Zu 50 µL elektrokompetenten Agrobakterien wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. In einem Elektroporationsgerät (BioRad) erfolgte die Transformation bei 2,5 kV, 25 µF, 400 Ω. Nach direkter Zugabe von 1 mL YEB-Medium wurden die Zellen bei 28°C für 2 h unter Schütteln inkubiert, schließlich auf antibiotikahaltige YEB-Platten (Rif, Gent und gegebenenfalls Kan) ausplattiert und für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.3.2.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen (jeweils fünf Pflanzen in einem Topf, Ø 9 cm) erfolgt für drei bis fünf Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) in Phytokammern. Zur Induktion der Blütenbildung wurden die Pflanzen anschließend in Langtag-Bedingungen (16 h Licht) überführt.

Eine 5 mL YEB-Vorkultur mit entsprechenden Antibiotika wurde mit den Kolonien der transformierten Agrobakterien angeimpft und über ein bis zwei Tage bei 28°C unter Schütteln inkubiert. 500 mL YEB-Medium (Gent: 25 µg/mL, Rif: 100 µg/mL, Kan: 50 µg/mL) wurden mit der Vorkultur überimpft und 8-16 h bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (20 min, 6000 rpm, 10°C) und im Infiltrationsmedium resuspendiert. Die Töpfe mit den *Arabidopsis* Pflanzen wurden in einem Exsikkator in diese Suspension getaucht, so dass die Infloreszenzen vollständig eintauchten und dann wurde ein Vakuum für 2 x 2 min angelegt. Für 48 h verblieben die Pflanzen bei 100%iger Luftfeuchte gehalten (mit klarer Plastikfolie abgedeckte Pflanzenschalen, oder Abdeckhauben) und dann bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen (16 h Licht) im Gewächshaus. Die Samen wurden geerntet, für mindestens zwei Wochen bei 4°C gelagert und dann auf Erde (im Falle einer Basta-Resistenz) oder auf selektivem Medium (Resistenz gegen Kan) ausgesät (s.u.).

Infiltrationsmedium

0.5 x MS Salze

1 x B5 Vitamine.

5% Saccharose

44 µM BA (6-Benzylaminopurin).

Zum Schluss wurde 0,02% Silwet L-77 (Union Carbide) als Detergenz hinzugefügt (Whalen et al., 1991).

Literatur: Bechthold et al., 1993.

2.2.3.2.3 Selektion putativ transgener Pflanzen

Zur Selektion der transgenen Linien wurde die Samen auf Erde oder selektiven Platten ausgesät. Die Keimlinge wurden zur Analyse, ob eine bestimmte Linie homo- oder heterozygot bezogen auf das Transgen ist, wie unten geschildert auf Resistenz getestet.

Basta-Resistenz

Da die sog. Basta Resistenz eine Resistenz gegen eine Chemikalie (Glufosinat-Ammonium) vermittelt, die durch die oberirdischen Organe der Pflanze aufgenommen werden kann, wurde das Saatgut der infiltrierten Pflanzen auf Erde ausgesät und unter Langtagbedingungen (16 h Licht) angezogen. Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge zweimal innerhalb von 72 Stunden mit einer Glufosinat-Ammoniumlösung (Agrevo) besprüht. Die Keimlinge ohne Bastaresistenz starben innerhalb einer Woche.

Glufosinat-Ammoniumlösung

0,1% Glufosinat-Ammonium + 0,1% Tween 20

Kanamycin-Resistenz

Zur Überprüfung der Identität der Transposoninsertionslinien sowie der Frage, ob hetero- oder homozygote Linien vorlagen, wurden die entsprechenden Pflanzen auf MS-Platten mit Kanamycin (50 µg/mL) angezogen. Die Wildtyp Pflanzen überlebten zwar, bildeten aber gelbe Blätter aus und zeigten einen kümmerlichen Wuchs.

2.2.3.3 Methoden zur Analyse von RNA

2.2.3.3.1 RNA Isolierung aus Arabidopsis

Die RNA für diese Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Methoden hergestellt. Für den Mikroarray wurde das das RNAeasy Protokoll von Qiagen (Minden) laut Herstellerangaben verwendet. Für RT-PCR-Analysen wurde die RNA mit Hilfe von RNAwiz (Ambion) mit anschließender DNase-Inhibition (Ambion) isoliert. Für beide Methoden wurden alle Gefäße, Arbeitsgeräte und Lösungen vorher autoklaviert und mit DEPC behandelt. Es wurden 200 - 500 mg Frischmaterial in einen kleinen, griffigen Mörser überführt und in ständiger Anwesenheit von flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver gemahlen. Das Pulver wurde mit vorgekühltem Spatel in ein ebenfalls vorgekühltes 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt (max. $\frac{3}{4}$ Höhe) und im flüssigen Stickstoff gelagert bis alle Proben aufgearbeitet wurden. Die Proben wurden dem Stickstoff entnommen und für die RNAwiz-Methode mit dem RNAwiz-Reagenz versetzt. Bis zum vollständigen Auftauen wurde regelmäßig gevortext.

Das Pellet wurde in 55 µL DEPC-A. bidest resuspendiert.

Extraktionspuffer

50 mM Tris

10 mM EDTA

0,1 M NaCl

0,1% ATA

2% TNS

2% (w/v) SDS

(SDS und TNS, nach Autoklavieren zugeben)

T-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5

Fällungspuffer

5 M LiCl

50 mM Natrium-Acetat pH 5,5

Chloroform und 70% Ethanol

2.2.3.3.2 Nachweis der RNA

Zur RNA-Quantifizierung wurde eine spektroskopische Analyse der Proben bei 280 nm durchgeführt (BioPhotometer, Eppendorf). Des Weiteren wurde 1 µg/µL RNA in einem 2% Agarose-Gel gelelektrophoretisch aufgetragen, um eventuelle Degradation zu beurteilen.

2.2.3.3.3 Reverse Transkription

Zur Analyse der Genexpression wurden mittels genspezifischer Oligonukleotide Transkripte zuerst in einer reversen Transkription in eine cDNA umgeschrieben und dann spezifisch in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Um bei semiquantitativen Analysen zu überprüfen, ob im linearen Bereich der PCR gearbeitet wurde, wurden eine verschiedene Anzahl an Zyklen (18 bis 30) gewählt und unterschiedlich Mengen an cDNA eingesetzt. Beim Design der Oligonukleotide wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide eine *annealing* Temperatur von ca. 58°C hatten und genspezifisch nur ein Produkt lieferten. Als konstitutiv exprimierte Positivkontrolle diente das Transkript von Aktin-2. Das Pipettieren erfolgte auf Eis, und erst nach Vorheizen des Heizblockes der PCR-Maschine wurden die Proben in den Block gesetzt.

Das Protokoll für die cDNA-Synthese mit der SuperScript III (Invitrogen) lautete wie folgt:

Mastermix I

1,5 µg RNA

0,5 µg Oligo-dTs (Invitrogen)

50 ng Random Primer (Invitrogen)

2 µL dNTPs (10 mM each) werden in einem Gesamtvolumen von 25 µL gemischt und

→ bei 65°C für 5 min inkubiert.

→ Schnelles Abkühlen auf Ethanol-besprühtem Eis für 3 min verhindert erneute Formierung von Sekundärstrukturen der RNA.

→ Zugabe des Mastermix II

5 x Puffer für SuperScript III

0,2 M DTT (Invitrogen)

80 U Rnase Out (Invitrogen)

1 µg BSA

2 µL SuperScript III

→ nach sorgfältigem Mischen mit der Pipette wird jede Reaktion mit einem Tropfen Mineralöl versehen und kurz herunterzentrifugiert.

→ Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 25°C, eine 60-minütige Inkubation bei 50°C und abschließend eine 15-minütige Inkubation bei 70°C.

Die so hergestellte cDNA konnte bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.3.4 Mikroarray-Analyse

Aus Blattrosetten von vier 30 Tage alten unabhängig gewachsenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurde Gesamt-RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen,) mit Hilfe der entsprechenden Puffer nach Angaben der Hersteller extrahiert. Zur cDNA-Synthese wurde 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wurde markiert und nach Zhu et al., 2001 auf den *Arabidopsis whole exon GeneChip array* (26K-*Arabidopsis*-Gesamtgenomarray) hybridisiert. Der Chip verwendete ein Set aus 42 Affymetrix-Kontrollsonden, drei transgenen Kontrollsonden, vier QC Sonden und 26367 repräsentative *Arabidopsis*-Genom Sonden. Im Durchschnitt gibt es für jedes Gen 15 perfekt passende Sonden. Diese 25-mer Oligonukleotid-Sonden wurden von den 3'-Enden von 133397 Exons heraus selektiert (Zhu, 2003). Die Quantifizierung des Hybridisierungssignals erfolgte, indem von dem gewichteten Durchschnittswert eines Sondensets 5% der niedrigsten Werte der Durchschnittsintensität des gesamten Arrays subtrahiert wird. Die Gesamtintensität aller Sondensets eines jeden Arrays wurde weiter auf eine Zielintensität von 100 skaliert, damit die Hybridisierungsintensität aller Arrays äquivalent waren. Die korrespondierenden Gene einer Sonde mit einem Expressionsniveau von mindestens 50 und mindestens einer zweifach veränderten Expression wurden selektiert und als Gene mit einer signifikanten Änderung der Expression definiert. Die signifikante Schwelle des Expressionsniveaus von 50 basierte auf der Bestimmung des gesamten Hintergrundniveaus (100%) aller Negativkontrollen des Mikroarrays, bezogen auf das skalierte Ziel von 100. Die Reproduzierbarkeit des Mikroarrays wurde parallel durch den Vergleich von zehn Paaren der Gesamt-RNA-Proben charakterisiert. Die Detektionssensibilität und Spezifität des GenChip Mikroarrays wurde charakterisiert durch die Spitzen in einer seriellen Verdünnung von äquimolaren Transkript-Konzentrationen der Negativkontrollen von BioB, BioC und CreA zu 10 µg *Arabidopsis* cRNA und einer Hybridisierung des 26K-*Arabidopsis*-Gesamtgenomarrays. Die Daten sind für das Design des Arrays unter der Zutrittsnummer A-MEXP-79 und für das Experiment unter E-MEXP-125 bei ArrayExpress verfügbar.

2.2.3.4 Methoden zum Studium von Proteinen

2.2.3.4.1 Denaturierendes Gelsystem nach Schägger (SDS-PAGE)

Zur optimalen Trennung von Proteinen von 1 bis 80 kDa wurden Schägger Minigele (Apparaturen von BioRad, München) mit Glasplatten in der Größe von 7 x 9 cm verwendet (Geldicke: 1 mm).

Pipettierschema für vier Minigele:

	A. dest.	Lösung A	Lösung B	Gelpuffer	Glyzerin	APS	TEMED
Trenngel	2,6 mL	7,4 mL	3,6 mL	7,2 mL	2,4 mL	75 µL	15 µL
Sammelgel	7,5 mL	1,2 mL	0,5 mL	2,1 mL	-	100 µL	40 µL

APS und TEMED wurden zuletzt zum Reaktionsgemisch gegeben, da sie die Polymerisierung starten. Die Reaktionslösung wurde gut gemischt und mit einer Pipette zwischen die abgedichteten Glasplatten gegossen. Nach Gießen des Trenngels wurde eine Schicht Wasser aufgegeben, die die Ausbildung einer scharfen oberen Trennfläche zum später zu gießenden Sammelgel gewährleistet.

Zur Probenvorbereitung wurde die Proteinlösung mit wenigen μL Proteinprobenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und dann bei RT auf das Gel aufgetragen. Die Laufbedingungen für ein Minigel betragen ca. 1,5 -2 h bei 40 mA; max. 125 V.

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (PAA)

2 M Tris/HCl pH 8,9

Rotiphorese Gel A; Rotiphorese Gel B

Gelpuffer

3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3 % (w/v) SDS

10x Laufpuffer Kathode

1 M Tris/HCl pH 8,25; 1 M Tricine; 1 % (w/v)

SDS

APS –Lösung

Ammoniumperoxidsulfat 10 % (w/v)

10x Laufpuffer Anode

TEMED

Literatur: Schägger und von Jagow, 1987.

2.2.3.4.2 Färben von Proteingelen mit Coomassieblau

Das Proteingel wurde bis zum Erreichen tiefblauer Farbe (30 min bis 3 h) in Färbelösung geschüttelt. Zur Entfernung des unspezifisch eingelagerten Farbstoffes wurde das Gel anschließend solange in Entfärbelösung geschüttelt, bis sich die Proteinbanden deutlich von dem Hintergrund abgrenzten.

Färbelösung

0,25 (w/v) Coomassie Brilliant Blue

50% (v/v) Methanol

7% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

Literatur: Frazekas de St. Groth et al. (1963).

2.2.3.4.3 Strep-Peptid markierte Fusionsproteine

Die Aufreinigung von Strep-Peptid markierten Fusionsproteinen beruht auf der selektiven Bindung des Strep-Peptids ($\text{NH}_2\text{-WSHPQFEK-COOH}$) an StrepTacin, das an eine Matrix gebunden immobilisiert vorlag. Die spezifische Kompetition durch Desthiobiotin erlaubte eine schonende Elution des gereinigten rekombinanten Proteins von der Säule. Das Strep-Peptid System wurde insbesondere für die native Produktion rekombinanter Proteine benutzt. Das für die Expression verwendete Vektorsystem (pASK-IBA) war durch Anhydrotetracyclin (AHT) induzierbar. Die Durchführung der Expression und Aufreinigung der Proteine erfolgte nach Herstellerangaben (IBA, Göttingen). Der Aufschluss der Zellen erfolgte in der sog. French Press. Der French Press Aufschluss eignete sich zur Gewinnung eines nativen Rohextraktes in größeren Mengen am besten. Das Prinzip der French

Press-Extraktion beruht auf dem plötzlichen Druckabfall (1500 → 1 bar), der die Zellen beim Verlassen der Druckkammer zerriss. Die Zellen wurden pelletiert und im Verhältnis 1:2 in Extraktionspuffer resuspendiert. Der eigentliche Zellaufschluss fand in einer ca. 40 mL-fassenden, auf 4°C vorgekühlten, French Press-Kammer (SLM-AMINCO *French Press*; American Instrument, Silver Spring) bei ca. 1250 - 1500 bar statt. Die French Press-Extraktion wurde dreimal wiederholt. Das Lysat wurde abschließend von Zellwandresten durch Zentrifugation gereinigt (je nach Anwendung 10.000 oder nochmals 100.000 g, 4°C).

Extraktionspuffer

100 mM Tris/HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

1x Proteinaseinhibitor Mix (Boehringer)

ggf: 1 mM Dithiothreitol (DTT)

0,05% Tween 20

Die Expressionsbedingungen mussten im einzelnen für jedes Protein optimiert werden (Temperatur, Zeitpunkt/OD₆₀₀ der Induktion, Stärke der Induktion und Zeitraum der induzierten Expression). Um native Proteine in akzeptabler Menge zu isolieren wurden die Bakterien in den meisten Fällen bei 1,25 OD₆₀₀ induziert und unter Schütteln bei 25^o C für sechs Stunden kultiviert.

2.2.3.4.4 Affinitätspräzipitation von Proteinen

Zur Präzipitation von Proteinen wurden an Agarose oder Sepharose gekoppelte Antikörper gegen Affinitätspeptide verwendet. Etwa 1 bis 2 µg eines rekombinanten Fusionsproteins wurde für eine Stunde auf Eis mit 15 µL der entsprechenden Affinitätsmatrix (z.B. Strep Tactin Beads der Firma IBA) unter mehrmaligem sachten Schütteln in einem Volumen von 100 µL inkubiert (ad. 100 µL mit Waschpuffer). Die Matrix wurde pelletiert (2000 rpm, 1 min) und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins wurde mit dem entsprechenden Elutionsagens (z.B. Desthiobiotin im Falle Strep-Peptid markierter Proteine) durchgeführt. 30 µL des Überstandes wurden abgenommen, mit 6 µL Protein Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95^oC denaturiert. Je 15 µL der denaturierten Probe wurden in Proteingelen aufgetrennt und mittels Immunodetektion analysiert.

Waschpuffer

10 mM Tris pH 7,8

150 mM NaCl

1 x Proteaseinhibitor Mix (Boehringer)

Elutionspuffer für Strep-Peptid markierte Proteine

Desthiobiotin 1:10 mit Waschpuffer verdünnt

2.2.3.4.5 Protoplastierung von Arabidopsis Blattgewebe

Zur Protoplastierung konnten nur frische, gesund aussehende *Arabidopsis* Blätter verwendet werden. Die Pflanzen sollten 3-4 Wochen alt sein.

Pro Ansatz wurden 25 g (5 x 5g in Petrischalen) *Arabidopsis* Blätter in 0,5-1 mm breite Streifen geschnitten und mit 100 mL Verdauungslösung (20 mL pro Petrischale) versetzt. Es wurde für 1-4 min ein Vakuum angelegt. Der weitere Verdau fand für 60-90 min bei sanftem Schwenken (40 rpm Plattformschüttler) oder über Nacht im Dunkeln ohne Schütteln statt. Die Enzymlösung sollte danach eine grünliche Farbe angenommen haben, da die Protoplasten freigesetzt worden waren (Kontrolle der Protoplasten unter dem Lichtmikroskop; Größe der Protoplasten ~30-50 µm). Nach einem halbstündigem Schütteln der Platten bei 40 rpm sollten die restlichen Protoplasten freigesetzt worden sein.

Mittels Filtration durch ein 70 µm Nylonnetz konnten die Protoplasten vom restlichen Pflanzengewebe abgetrennt werden. Das Filtrat enthielt die Protoplasten, welche durch Zentrifugation in einem Swingout Rotor (Sigma, Rotor 11140) im Rundbodenröhrchen bei 100 g für 1-2 min (höhere Geschwindigkeit bzw. Zugabe von [50 mM] CaCl₂ erhöht die Ausbeute) pelletiert wurden.

Die pelletierten Protoplasten wurden vorsichtig in 15 mL Resuspensionspuffer resuspendiert und erneut zur Pellettierung der restlichen Protoplasten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit WI-Puffer (RT) gewaschen.

Enzymlösung (100 mL)

0,4 % (w/v) Macerozym R-10 (Yakult Honsha, Tokyo, Japan)

1 % (w/v) Zellulase R10 (Yakult "Onozuka R-10")

0,4 M Mannitol

20 mM MES-KOH (pH 5.5)

20 mM KCl

→ Lösen bei 55°C für 10 min

→ Zugabe von:

10mM CaCl₂

5mM β-Mercaptoethanol

0,1% BSA

→ Sterilfiltration durch 0,45 µm Filter

Resuspensionspuffer

1 Vol 500 mM Mannitol;

2 Vol 200 mM CaCl₂

WI-Puffer

0,5 M Mannitol

4mM MES, pH 5,7

20mM KCl

50 mM CaCl₂

2.2.3.4.6 Evakuolisierung

Zur Vorbereitung wurde 3,3 mL Percollgradient Lösung durch Zentrifugation in Beckmann Zentrifugenröhrchen (20 min, 35 000 rpm, 22°C, Sorvall Ultracentrifuge Combi mit einer Beschleunigung von 9, Swingout Rotor SW 60 Ti) vorzentrifugiert. Die Gradienten konnten im Bedarfsfall für max. einen Tag bei 4°C gelagert werden. Pro Percollgradient wurden höchstens 750 µL der Protoplastensuspension mit abgeschnittener Pipettenspitze appliziert.

Die Evakuolisierung erfolgte nach sorgfältigem Austarieren durch eine 20 minütige Zentrifugation mit 35000 rpm bei 22°C und gleichmässiger Beschleunigung

Nach Zentrifugation wurde die obere Vakuolenfraktion vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde die Bruchplattenfraktion (etwa 1 cm unterhalb der Vakuolenfraktion) vorsichtig abgenommen und in 15 mL Corex Röhrchen gesammelt. Mit dieser Fraktion waren neben Bruchstücken und unvollständig evakuolisierten Protoplasten auch vollständig evakuolierte Protoplasten assoziiert. Sie konnten noch ausgewaschen werden: Hierzu wurde das Corex Röhrchen mit 0,24 M CaCl_2 /0,24 M Saccharose aufgefüllt und der Inhalt vorsichtig durchmischt. Innerhalb der nächsten 30 bis 60 min setzten sich die Bruchstücke ab, während die Sedimentation der evakuolisierten Protoplasten deutlich langsamer verlief. Der Überstand wurde abgenommen und für 5 min bei 420 g und RT zentrifugiert. Die sich anschließende grüne Phase enthält die evakuolisierten Protoplasten (mikroskopische Kontrolle), die ebenfalls mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen und in ein 15 mL Corex Röhrchen überführt werden. Sie wurden mit einer 0,24 M CaCl_2 /0,24 M-Saccharose verdünnt und für 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert.

Die so entstandenen Protoplasten enthielten keine Vakuolen mehr mit deren störenden Inhaltsstoffen (Proteasen etc.) und konnten nun zur Herstellung des Proteinextrakts für den Phosphorelay-Assay in Eppendorfreaktionsgefäßen scharf abzentrifugiert werden. Der Proteinextrakt wurde sofort in flüssigen Stickstoff transferiert und konnte zur Lagerung bei -80°C aufbewahrt werden.

Phosphorylierungspuffer (5x TEDG):

250 mM Tris/HCl pH 8,0

2,5 mM EDTA

10 mM DTT

250 mM KCl

25 mM MgCl_2

25 mM MnCl_2

50 % Glyzerin

Percollgradienten-Lösung:

0,5 M Sorbitol;

0,1 M CaCl_2 ;

5 mM MOPS → in Percoll pH 7,0 mit MOPS einstellen

0,24 M CaCl_2 [2 H_2O]/0,24 M Saccharose

2.2.3.4.7 Zellfreier Phosphorelay-Assay: Proteinphosphorylierung *in vitro*

Für den zellfreien *in vitro* Proteinphosphorylierungs-Assay wurden evakuolierte Protoplasten aus *Arabidopsis* Mesophyllgewebe (siehe Kapitel 2.2.3.4.6) als Proteinextrakt mit 2 μg Strep-markiertem ARR2 in Gegenwart von 2 μL ^{32}P -markiertes γ -ATP (20 μCi , Amersham, Freiburg) in 1x TEDG-Puffer, 1mM Dithiothreitol (DTT), 1x Proteinaseinhibitoren in einem Gesamtvolumen von 75 μL auf Eis für 1 h inkubiert. Danach wurde das ARR2 von der Reaktionsmischung durch Affinitätsreinigung wiedergewonnen (siehe Kapitel 2.2.3.4.4). Die Equilibrierung der Proben erfolgte in 30 μL einer Matrix StrepTactin-Beads / Waschpuffer-Mischung von 1:1. Die Proteine mussten in einem Gesamtvolumen von 150 μL für 12 min in Gegenwart der Matrix auf Eis inkubieren, wobei nach jeweils 15 min die StrepTactin-Beads des Reaktionsgemischs durch vorsichtiges Schnippen verteilt wurden. Die Matrix wurde bei 2000 g für 1 min und 4°C pelletiert und 3 mal mit je 200 μL Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand restlos abgenommen ohne jedoch Affinitätsmatrix

mitzunehmen. Die gebundenen Proteine wurden mit 50 µL Elutionspuffer für 30 min auf Eis eluiert und anschließend in 5 µL Proteinprobenpuffer für 10 min bei 68°C denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Autoradiografie wurde das Gel für 20 min in H₂O gelegt um Hintergrundaktivität abzuschwächen und anschließend mit dem Gelrockner getrocknet.

Die Inkorporation von radioaktiven Phosphat wurde mittels Autoradiografie (2.2.5) analysiert.

Phosphorylierungspuffer (5x TEDG)

250 mM Tris/HCl pH 8,0

2,5 mM EDTA

10 mM DTT

250 mM KCl

25 mM MgCl₂

25 mM MnCl₂

50 % Glycerin

100 mM DTT (Stammlösung)

Waschpuffer für Strep-Peptid markierte

Proteine

100 mM Tris/HCl, pH 7.4

150 mM NaCl

1x Proteinaseinhibitor Mix von Boehringer

Elutionspuffer für Strep-Peptid markierte

Proteine

Desthiobiotin 1:10 mit Waschpuffer verdünnt

2.2.3.4.8 Transfer der Proteine auf eine Membran (Western-Blot)

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) wurde im halbtrockenen Verfahren (sog. Semidryblot mit der Transblot SD-Apparatur, BioRad, München) durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde für wenige Sekunden in 100% Methanol aktiviert, dann für mindestens 10 min im Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert. Das Blotting Papier (GB002 Chromatographie-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel) wurde vor Aufbau des „Sandwiches“ ebenfalls in Blotpuffer getränkt. Beim Aufbau des „Sandwiches“ muß darauf geachtet werden, dass die einzelnen Lagen luftblasenfrei aufeinander liegen. Hierzu empfiehlt sich, mit einem Reagenzglas mit leichtem Druck über die einzelnen Lagen des „Sandwiches“ zu rollen. Aufbau des „Sandwiches“ von unten (anodische Seite) nach oben (kathodische Seite):

Schicht: 6 Lagen Blotting Papier.

Schicht: PVDF-Membran.

Schicht: Polyacrylamidgel

Schicht: 6 Lagen Blotting Papier.

Der Elektrotransfer von Proteinen mittels der *Semidry Electrophoretic Transfer Cell* (Transblot SD-Apparatur, BioRad, München) erfolgte bei 25 V für 1,5 h bis 2 h.

2.2.3.4.9 Immundetektion von Proteinen

Die PDF-Membran wurde für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht unter Schütteln in Blockpuffer gesättigt, um unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Danach wurde die Membran für 10 min mit Waschpuffer geschüttelt, um den Antikörper vor Kontaminationen zu schützen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 bis 2 h unter Schütteln. Danach wurde die Membran jeweils für 10 min mit Waschpuffer dreimal gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war (Goat Anti-Rabbit - Verdünnung 1:5000 - von Biorad) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde dreimal jeweils für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion des Proteins erfolgte unter Zugabe der Entwicklungslösung ohne zu schütteln. Waren die Proteinbanden klar zu erkennen wurde durch fließendes Wasser (pH-Sprung – Alkaline Phosphatase) die Reaktion gestoppt.

Die Immunodetektion eines Proteins beruht in erster Linie auf der spezifischen Kopplung des primären Antikörpers an das jeweilige Protein. Der sekundäre Antikörper erkennt den ersten, spezifischen Antikörper an seinem für alle Antikörper eines bestimmten Organismus gemeinsamen Strukturkomponenten. Dieser sekundäre Antikörper liegt als Konjugat mit einem Enzym vor, welches die eigentlich sichtbare Detektion erlaubt. Im Falle von AP-Konjugaten (Kopplung mit dem Enzym Alkaline Phosphatase) beruht die Färbereaktion auf einer Redoxreaktion: Die AP dephosphoryliert das BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3- Indolylphosphat-p-Toluidinsalz), welches daraufhin oxidiert und dabei NBT (Nitroblau Tetrazolium) reduziert. Dadurch entsteht ein unlöslicher Farbstoff.

Zur Detektion spezifischer *Arabidopsis* Proteine wurden verschiedene Seren eingesetzt, deren Spezifität und Sensitivität zuvor getestet wurde.

Blockpuffer

100 mM Tris/HCl pH 7,4;
150 mM NaCl; 2,5 % (w/v)
BSA; 0,05 % (v/v)
Tween 20
50 mM MgCl₂

Waschpuffer (TBST)

50 mM Tris/HCl pH 7,4;
150 mM NaCl; 0,05 % (v/v)
Tween 20

BCIP-Stammlösung

50 mg/mL (w/v) BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- phosphat-p-Toluidinsalz) in 100 % (v/v)

Färbelösung (10 mL pro Blot)

4,4 µL NBT/mL Entwicklungspuffer und 3,3 µL
BCIP/mL Entwicklungspuffer

Entwicklungspuffer für die Alkaline Phosphatase

100 mM Tris/HCl pH 9,7;

100 mM NaCl;

NBT-Stammlösung

75 mg/mL (w/v) NBT (Nitroblau Tetrazolium) in 70% (v/v) Dimethylformamid

Primäre und sekundäre Antiseren

2.2.3.4.10 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Zur Proteinbestimmung wurden 1 Volumen Proteinlösung (z.B. 20 μ L Proteinextrakt in 180 μ L A. bidest, also 200 μ L Volumen) in 4 Volumina Fällungslösung (also 800 μ L) aufgenommen, gemischt und zentrifugiert (15.000 rpm, 20 min). Es sollte unbedingt eine Leerkontrolle (200 μ L A. bidest) mitlaufen.

Das gefällte Protein wurde in 1 mL Waschlösung aufgenommen, kräftig gevortext und zentrifugiert (15.000 rpm, 10 min).

Das luftgetrocknete Pellet wurde in 1 mL 0,2 M NaOH unter Vortexen gelöst.

Der Proteingehalt wurde durch Messen der Extinktion bei 615 nm photometrisch bestimmt und mit einer BSA-Kalibrierungskurve verglichen.

Waschlösung

10% (v/v) Essigsäure

90% (v/v) Methanol

Fällungslösung

10% (v/v) Essigsäure

90% (v/v) Methanol

eine Spatelspitze Amidoschwarz

2.2.4 Transiente Expressionsanalyse in Arabidopsis Protoplasten

Hwang et al. (2001) etablierten einen transienten Expressionsassay auf Basis der transkriptionellen Aktivierung des primären Cytokinin responsiven Gens ARR6 in Protoplasten aus *Arabidopsis*-Blättern. Dieser Assay ermöglichte funktionell genomische Analysen von Zwei-Komponenten Regulatoren und die Erforschung der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis*. Für die transiente Expressionsanalyse wurde der Promotor des ARR6 (Hwang et al., 2001) oder des *ERF1* (Hass et al., 2004b) zu der kodierenden Sequenz der Luciferase der Feuerfliege (*LUC*) fusioniert, um ein Reportergenkonstrukt zu erhalten. Die *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten wurden mit ARR2 bzw. ARR2^{D80E} als Effektor, *ERF1::LUC* als Reporter und der internen Kontrolle *UBQ10::GUS* co-transfiziert und für sechs Stunden bei konstantem Weißlicht inkubiert.

In transformierten Protoplasten wurde die *ARR6::LUC* bzw. die *ERF1::LUC* -Aktivität spezifisch durch Cytokinin (Hwang und Sheen, 2001) bzw. Ethylen induziert (Hass et al., 2004). Die *ARR6::LUC*-Aktivität konnte durch physiologische Konzentrationen der sog. aktiven Cytokinine induziert werden [1-100 nM Trans-zeatin (t-Zeatin), 2-Isopentenyladenin (2-IP) und 6-Benzyladenin (BA)]. Die *ERF1::LUC*-Aktivität wurde spezifisch durch 10 µL/L Ethylen induziert (Hass et al., 2004b)

Arabidopsis Bensheim Protoplasten wurden mit der Polyethylenglycolmethode (Abel und Theologis, 1994; Hwang und Sheen, 2001) isoliert und transformiert. Die Transformation erfolgte in der Regel bei einer Protoplastendichte von 2×10^4 mit 20 µg Plasmid-DNA in verschiedener Kombination an Reporter-, Effektor und interner Kontrolle. Die transformierten Protoplasten inkubierten dann mit einer Dichte von 1×10^4 per mL mit oder ohne exogener Hormonapplikation für 6 h unter Lichtbedingungen bei 23°C, bevor sie gesammelt wurden. Das *UBQ10::GUS*-Konstrukt diente als interne Kontrolle, wobei die Luciferaseaktivität des Lysats der transfizierten Protoplasten durch die Glucuronidaseaktivität (GUS) zur Normalisierung geteilt wurde. Damit wurde die Variation der Zellzahl von jeder Transformation, der Transformationseffizienz und der Zellebensfähigkeit normalisiert. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und danach der Mittelwert der relativen LUC-Aktivität bestimmt.

2.2.5 Autoradiografie

Zur Detektion schwacher Signale wurden Filme sehr hoher Empfindlichkeit (KODAK, BioMax, mit Intensifying Screen, Kodak, Stuttgart) verwendet. Die Exposition erfolgte bei -80°C je nach Signalstärke für einige Stunden bis mehrere Tage. Alternativ wurde das PhosphorImager System (PhosphorImager 445 SI, Molecular Dynamics) eingesetzt, das die autoradiographischen Signale direkt in digitalisierter Form auswertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Phänotypische Charakterisierung einer *arr2*- Transposoninsertionslinie

Die Isolierung und Analyse von Mutanten mit einer veränderten Antwort ist ein sinnvoller genetischer Ansatz zur Charakterisierung von Genprodukten, insbesondere bei Transkriptionsfaktoren. Durch das Fehlen eines Transkriptionsfaktors, der ein wichtiges Kontrollelement in der Regulation der Genexpression darstellt, kann es zur veränderten Expression von Genen kommen. Dies kann sowohl primäre als auch sekundäre Zielgene betreffen. Infolge dessen kann eine Störung pflanzlicher Prozesse stattfinden, die dann in entsprechenden mutanten Phänotypen resultieren (Sawa et al., 1999). Zur funktionellen Analyse von ARR2 wurde daher eine *arr2*-Transposoninsertionslinie (SGT4387) im Landsberg erecta (Ler) Hintergrund in der *Arabidopsis* IMA-Kollektion (Parinov et al., 1999) identifiziert, die eine Insertion des modifizierten Mais Transposons *Dissociation* (Ds) im 19. Kodon des ersten Exons des ARR2 Gens enthält (Lohrmann, 2001).

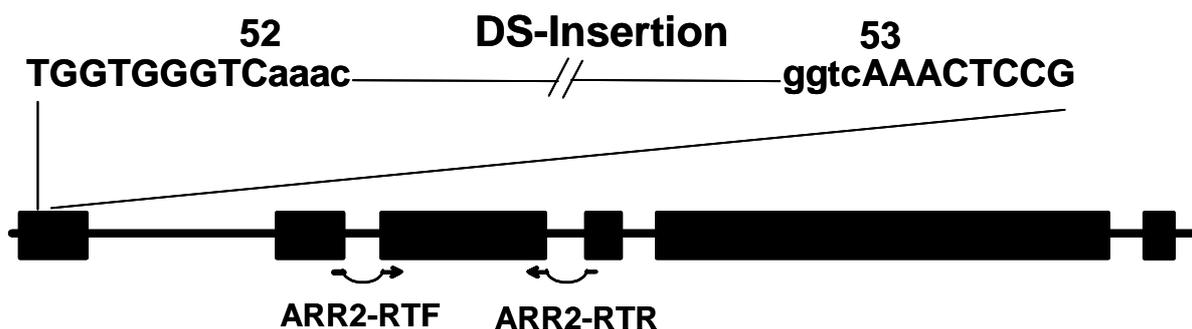


Abb. 3-1: Insertion des modifizierten Mais Transposons Dissociation (DS) im 19. Kodon des ersten Exons des ARR2 Gens (aus Hass et al., 2004). Dargestellt ist der geneue Lokus der DS-Insertion zwischen der 52 und 53 Base der genomischen Sequenz des ARR2. Die schwarzen Balken stellen Exons die dünnen Streifen die Introns des ARR2-Gens dar. ARR2-RFF und ARR2-RTR sind die Primer, die zum Nachweis der ARR2-Transkriptes verwendet wurden.

Southern Blot- und Co-Segregationsanalysen bestätigten die Anwesenheit einer einzelnen Transposon-Insertion im Genom der Linie SGT4387 im *ARR2* Lokus (Albrecht, 2002). Des Weiteren zeigten RT-PCR-Analysen, dass die Insertion zur vollständigen Abwesenheit des *ARR2*-Transkriptes führt, sodass es sich bei dieser Linie tatsächlich um eine Nullmutante handelte (Hummel, 2001; Albrecht, 2002 und Hass et al., 2004). Die *arr2*-Nullmutante wurde in ersten Versuchen auf einen morphologischen Phänotyp hin untersucht. Dazu wurden Pflanzen der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps Ler unter gleichen Wachstumsbedingungen angezogen und auf offensichtliche Unterschiede hin beobachtet. Homozygote Linien der *arr2*-Nullmutante zeigten einen gedrungenen Wuchs mit einer reduzierten Blattgröße (Abb. 3-2). Lohrmann et al. (2001) wies für diese Funktionsverlustmutante eine veränderte Blütenmorphologie nach. Im Gegensatz dazu zeigten Pflanzen die *ARR2* unter dem viralen 35S-Promotor ektopisch überexprimierten (*ARR2*-ox) keinen morphologisch erkennbaren Phänotyp (Hummel, 2001). Im Vergleich zum Wildtyp zeigten Pflanzen der *arr2*-Nullmutante einen früheren Blühzeitpunkt (Hass et al., 2004). Die morphologischen Unterschiede des Habitus lassen auf eine Veränderung des Wachstums und der Entwicklung der *arr2*-Pflanzen schließen. In Abbildung 3-2 ist der Habitus von 30 Tage alten Pflanzen der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps Ler abgebildet.



Abb. 3-2: Phänotyp der *arr2*-Transposoninsertionslinie und des Wildtyps Ler: Die Pflanzen wurden für 30 Tage unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) angezogen.

3.2 Physiologische Charakterisierung einer *arr2*-Nullmutante

Im letzten Jahrzehnt sind viele Mutationen in Genen der Hormon-Signaltransduktion identifiziert worden, indem mutagenisierte Populationen nach einer veränderten Antwort auf ein appliziertes Hormon durchsucht wurden. Auf diese Weise sind für die jeweiligen Hormone eine Anzahl von Funktionsverlust- oder Funktionsgewinn-Mutanten gefunden worden. Eine Pflanze ist nicht in allen Entwicklungsstadien und nicht in jedem gleichmäßig kompetent für ein gegebenes Hormon. Darum wurden für jedes Hormon verschiedene Assays entwickelt, die eine Identifikation der Hormon-spezifischen Antwort und ihre Quantifizierung möglich machen. Beispielsweise ermöglicht die Analyse der Triple Response in etiolierten Keimlingen eine Identifikation von Ethylenmutanten.

3.2.1 Einfluss von Cytokinin auf die *arr2*-Nullmutante

Das reduzierte Wachstum der *arr2*-Nullmutante ähnelte denen von Hormonmutanten. Des Weiteren haben Hwang und Sheen (2001), Hutchison und Kieber, (2002) und Kakimoto (2003) verschiedenen Responseregulatoren eine Funktion in der Cytokinin-Signaltransduktion zugeschrieben, wobei für ARR1, dem paralogen Response-regulator von ARR2, die Fähigkeit zur Cytokinin-abhängigen direkten Aktivierung des Cytokinin-responsiven ARR6 gezeigt werden konnte (Sakai et al., 2001). In den nachfolgend dokumentierten Experimenten wurde eine mögliche Veränderung der Cytokininantwort der *arr2*-Nullmutante und des korrespondierenden Wildtyps untersucht. Dafür wurden für die Cytokininantwort geeignete Analysemethoden gewählt: der Wurzelwachstums-Assay von Keimlingen, die Analyse der Kallusbildung aus Hypokotylsegmenten und die Bestimmung der Hypokotyllängen von etiolierten Keimlingen.

3.2.1.1 Wurzelwachstums- und Kalluswachstumsanalyse der *arr2*-Nullmutante

Cytokinine regulieren im Zusammenspiel mit Auxinen die vaskuläre Differenzierung (Aloni, 1993 ; Demura et al., 2002), wobei ein reduziertes Cytokininniveau in den benachbarten Region des Wurzelmeristems eine Vergrößerung des Meristems mit ansteigender Zellzahl bedingt (Werner et al., 2001 und 2003).

Zur Charakterisierung einer modulierten Cytokininantwort wurde 14 Tage alte Keimlinge des Wildtyps und der *arr2*-Nullmutante morphologisch charakterisiert. Die Keimlinge zeigten keine Unterschiede in der Wurzelelongation (Abb. 3-3). Die Anlage von Lateralwurzeln, war jedoch in Pflanzen der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (Abb. 3-3).

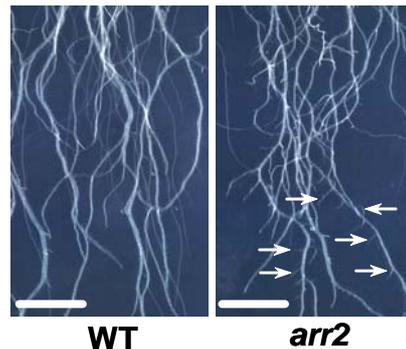


Abb. 3-3: Die *arr2*-Nullmutante weist im Vergleich zum Wildtyp ein verstärktes Lateralwurzelnwachstum auf: Keimlinge der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps wurden auf vertikal orientierten 0,5xMS-Platten ohne Saccharose nach Stratifikation bei 4°C für 14 Tage im konstanten Weißlicht angezogen. Der Balken entspricht 1cm.

Die erhöhte Lateralwurzelnbildung der *arr2*-Nullmutante könnte eine Reaktion auf eine verminderte Cytokininresponsivität sein.

Cytokinine sind nicht nur an der Regulation des Wurzelwachstums sondern auch an der Kallusbildung beteiligt, die im anschließenden Experiment genauer untersucht wurde. Die Kalluswachstumsanalyse ist ein anerkannter Assay, um eine Cytokininfunktion oder eine Auxinfunktion zu detektieren (Kubo und Kakimoto, 2000).

Die Kalluswachstumsanalyse wurde mit Hypokotylsegmente aus Keimlingen auf unterschiedlichen Konzentrationen an Cytokinin (Kinetin; 0-1000 µg/L) und Auxin (2,4-D; 0-100 µg/L) durchgeführt (2.2.2.2). Die Kallusbildung aus Hypokotylsegmenten wurde bei der *arr2*-Nullmutante und dem korrespondierendem Wildtyp im Konzentrationsbereich von 0-1000 ng/mL Kinetin und einer 2,4-D-Konzentration von mindestens 10 ng/mL im gleichen Ausmaß induziert. Die *arr2*-Nullmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung in der Kallus-induzierenden Cytokinin- bzw. Auxinantwort (Abb. 3-4).

Obwohl in Wurzeln ein Effekt zu sehen war, der möglicherweise auf eine veränderte Cytokinin-Responsivität zurückzuführen war, konnte in der Kalluswachstumsanalyse kein Unterschied zwischen der *arr2*-Nullmutante und dem Wildtyp detektiert werden.

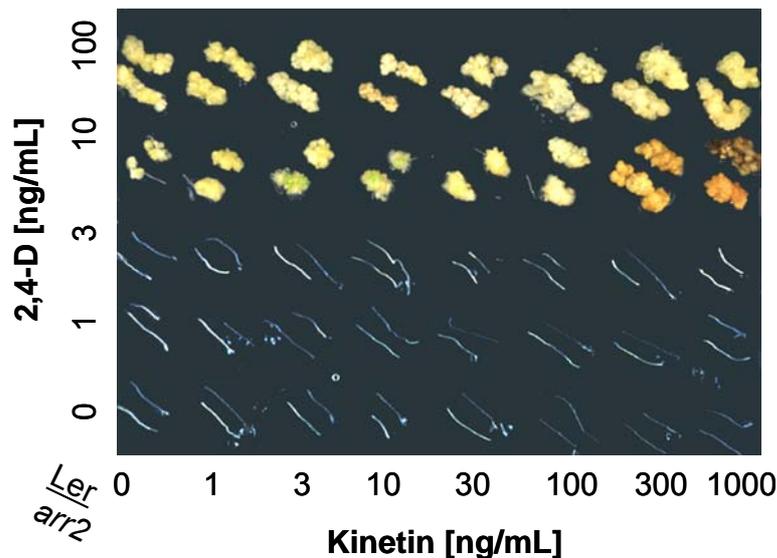


Abb. 3-4: Kalluswachstumsanalyse der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps Ler: Die Hypokotylsegmente wurden aus Keimlingen gewonnen, die für 6 Tage im Dunkeln auf 0,5xMS-Platten angezogen wurden. Danach wurden die Hypokotylsegmente auf Kallus induzierende Platten (zur Herstellung siehe 2.2.2.2) transferiert. Den Platten wurden unterschiedliche Konzentrationen an Cytokinin und Auxin beigefügt (Kinetin/Auxin [$\mu\text{g/L}$]: 0/0; 1/0; 3/0; 10/0; 30/0; 100/0; 300/0; 1000/0; 0/1; 1/1; 3/1; 10/1; 30/1; 100/1; 300/1; 1000/1; 0/3; 1/3; 3/3; 10/3; 30/3; 100/3; 300/3; 1000/3; 0/10; 1/10; 3/10; 10/10; 30/10; 100/10; 300/10; 1000/10; 0/100; 1/100; 3/100; 10/100; 30/100; 100/100; 300/100; 1000/100) (2,4-D; 0-100 $\mu\text{g/L}$). Nach 21-tägiger Kultivierung im Langtag (16 h Licht) wurde die Kallusbildung verglichen.

3.2.1.2 Analyse des Hypokotyllängenwachstum der *arr2*-Nullmutante unter exogener Cytokinin Applikation

Eine exogene Applikation von Cytokinin induziert die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von im Dunkeln angezogener Keimlinge (Su und Howell, 1992). Aus diesem Grund ist die Hemmung des Hypokotyllängenwachstums ein idealer Assay eine mögliche Veränderung der Cytokininantwort in Wildtyp und transgene Pflanzen unter exogener Hormonzugabe zu analysieren.

Es wurden vier Tage alte, im Dunkeln gewachsene Wildtyp und transgene Keimlinge unter Cytokinin-Applikation in Form einer Konzentrationsreihe (Dose-Response-Analyse) auf ihre Hypokotyllänge hin untersucht.

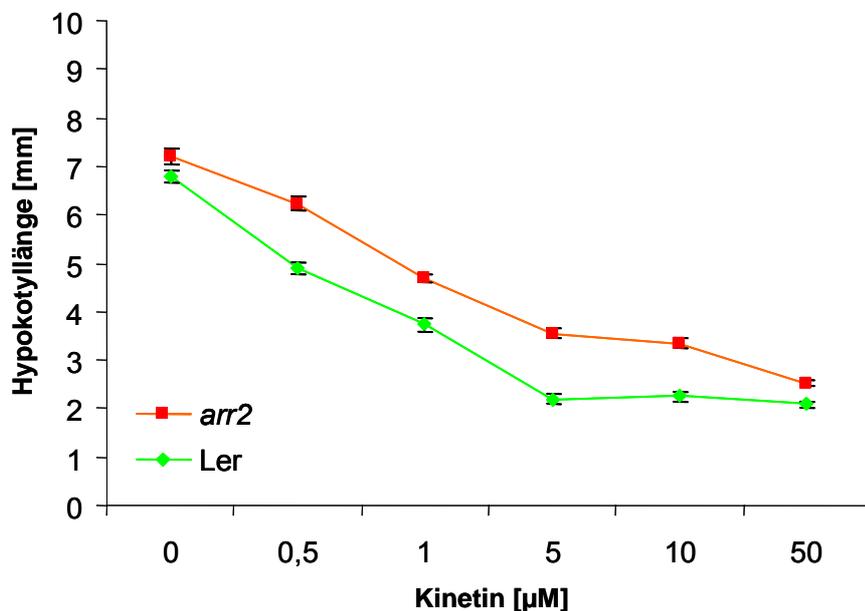


Abb. 3-5: Analyse des Hypokotyllängenwachstums unter exogener Cytokininapplikation: Vier Tage alte Keimlinge der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps Ler wurden bei 4°C stratifiziert und nach Keiminduktion für vier Tage im Dunkeln inkubiert. Gemessen wurde die Länge des Hypokotyls.

Die Dose-Response-Kurven der Hypokotyllängenanalyse zeigen, dass Keimlinge der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps Ler auf ansteigende Konzentrationen von Kinetin mit einer Verkürzung des Hypokotyls reagieren (Abb. 3-5). Die Kurven verliefen mit steigender Konzentration linear abfallend bis sie bei ca. 5 µM ein Plateau erreichten. Die *arr2*-Nullmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp Ler längere Hypokotyle und damit eine hyposensitive Reaktion gegenüber Kinetin.

Die verstärkte Lateralwurzelbildung und die verminderte Sensitivität gegenüber Kinetin der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp lassen vermuten, dass ARR2 eine Funktion in der Cytokininantwort hat.

3.2.2 Einfluss von Ethylen auf die *arr2*-Nullmutante

Die klassischen Komponenten der Ethylensignaltransduktion ETR1 und CTR1 sind zentrale Proteine dieses Signalweges. Es gibt allerdings einige Indizien für einen

weiteren Ethylensignalweg (reviewed in Hass et al., 2004). Obwohl die Histidinkinase Aktivität von ETR1 und CRE1 experimentell verifiziert wurde (Hass et al., 2004; Kakimoto, 2003), gibt es keinen Hinweis auf die exakte Art und Weise wie die Hormonantwort in Pflanzen über einen Mehrschrittphosphorelay funktioniert.

Die Responsivität von *Arabidopsis* Keimlingen gegenüber Phytohormonen wie z.B. Ethylen kann über das Hypokotyllängenwachstum charakterisiert werden. Exogen appliziertes Ethylen führt neben Änderungen im Genexpressionsmuster auch zu charakteristischen Wachstumsveränderungen in dunkelinkubierten Keimlingen: Ethylen bzw. die Biosynthesevorstufe ACC ruft die sogenannte Triple Response hervor (1.2.3.2). Das Hypokotyllängenwachstum wird unter gleichzeitiger Förderung des Radialwachstums stark gehemmt und der Hypokotylhaken krümmt sich stark ein (Bleecker et al., 1988).

3.2.2.1 Keimlinge der *arr2*-Nullmutante haben unter Einfluss exogen applizierter Hormone ein verändertes Hypokotyllängenwachstum

Etiolierte Keimlinge der *arr2*-Nullmutante, des Wildtyps Landsberg erecta (Ler) sowie Columbia (Col) und der Ethylensignaltransduktionmutanten *etr1-7* und *ein3-1* wurden auf ihre Hypokotyllänge analysiert und verglichen. Die Dose-Response-Kurven zeigten, dass alle Keimlinge auf steigende Konzentrationen von Ethylen oder der Ethylenbiosynthesevorstufe ACC mit einer Verkürzung des Hypokotyls reagieren (Abb. 3-6A und B). Die Kurven der Ethylen-behandelten Keimlinge der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps (Abb. 3-6A) zeigt einen Abfall der Hypokotyllänge bei Konzentration zwischen 4 und 28 pmol/mL. Die ACC-Behandlung der Keimlinge von *ein3-1* zeigte mit zunehmender Konzentration eine leichte Abnahme der Hypokotyllänge (Abb. 3-6B). Wohingegen die Kurve der Keimlinge von Col und *etr1-7* bei ACC-Konzentrationen zwischen 1 und 5 µM eine deutliche Reduktion von mehr als 3 mm in der Hypokotyllänge zeigten (Abb. 3-6B). Die *arr2*-Nullmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp Ler ein erhöhtes Hypokotyllängenwachstum bei einer Behandlung mit Ethylen (Abb. 3-6A). Obwohl quantitativ nicht so stark ausgeprägt, ähnelt die Hyposensitivität der *arr2*-Nullmutante gegenüber Ethylen der Signaltransduktionsmutante *ein3-1* (*ethylene insensitive 3*) und ist oppositär zu der Funktionsverlustmutante des Ethylenrezeptors *etr1-7* (*ethylene triple response 1*).

Diese zeigte eine schwache hypersensitive Reaktion gegenüber Ethylen (Abb. 3-6B; Cancel and Larson, 2002).

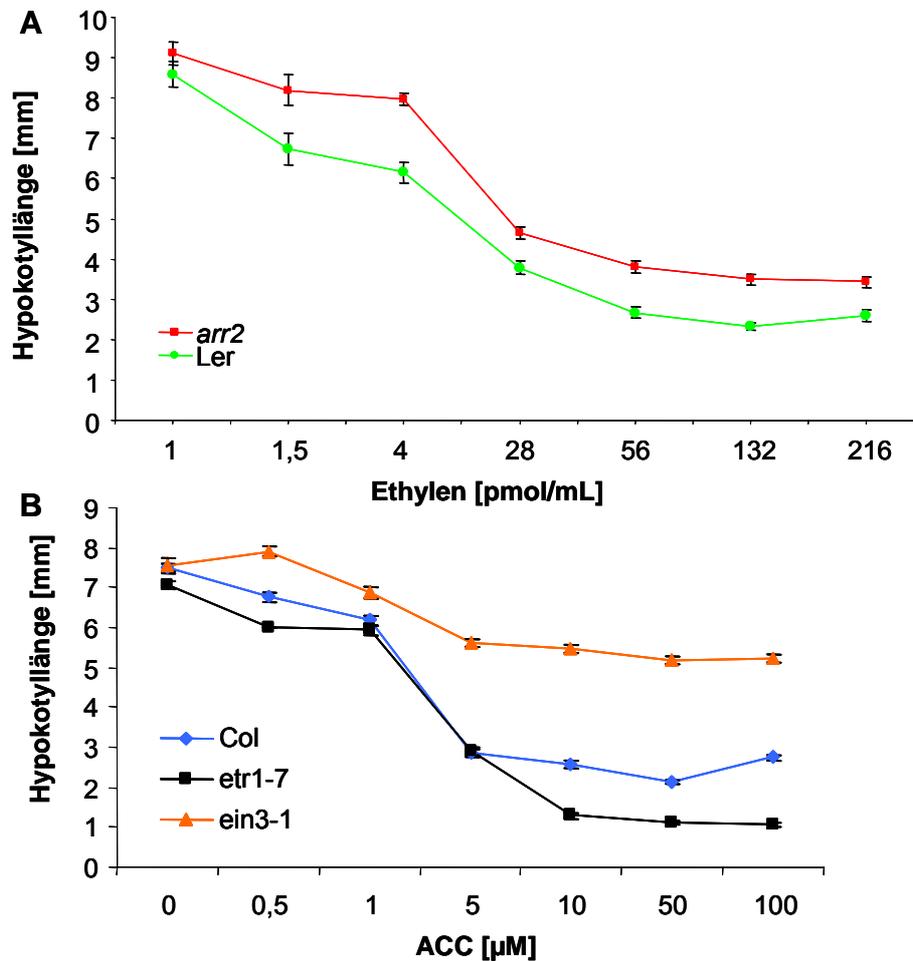


Abb. 3-6: Analyse des Hypokotyllängenwachstums unter exogener Hormonapplikation: Vier Tage alte Keimlinge wurden bei 4°C stratifiziert und nach Keiminduktion für vier Tage im Dunkeln inkubiert. Die Exposition von Ethylen (A) und Kinetin (B) erfolgte bei Keimlingen der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps Ler. Die Exposition von ACC erfolgte bei Keimlingen der Ethylensignaltransduktionsmutanten *etr1-7* (*ethylene triple response1*) und *ein3-1* (*ethylene insensitive 3*). Gemessen wurde die Länge des Hypokotyls nach Behandlung der Keimlinge mit den angegebenen Konzentrationen des Hormons.

Die Ergebnisse lassen für ARR2 eine ähnliche Funktion wie EIN3-1 in der Ethylensignaltransduktion vermuten.

3.2.2.2 Photoakustische Messung der Ethylenproduktion der *arr2*-Nullmutante

Weitere Informationen über den Einfluss von ARR2 im Ethylensignalweg sollten durch eine Analyse der endogenen Ethylenproduktion dokumentiert werden. Dazu

wurden Keimlinge der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps nach Stratifikation bei 4°C für vier Tage im Dunkeln auf wassergetränktem Rundfilterpapier angezogen.

Der Nachweis von Ethylen in Spurengaskonzentrationen erfolgte nach der photoakustischen Messmethode. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus und –prinzips ist im Kapitel 2.2.2.4 beschrieben.

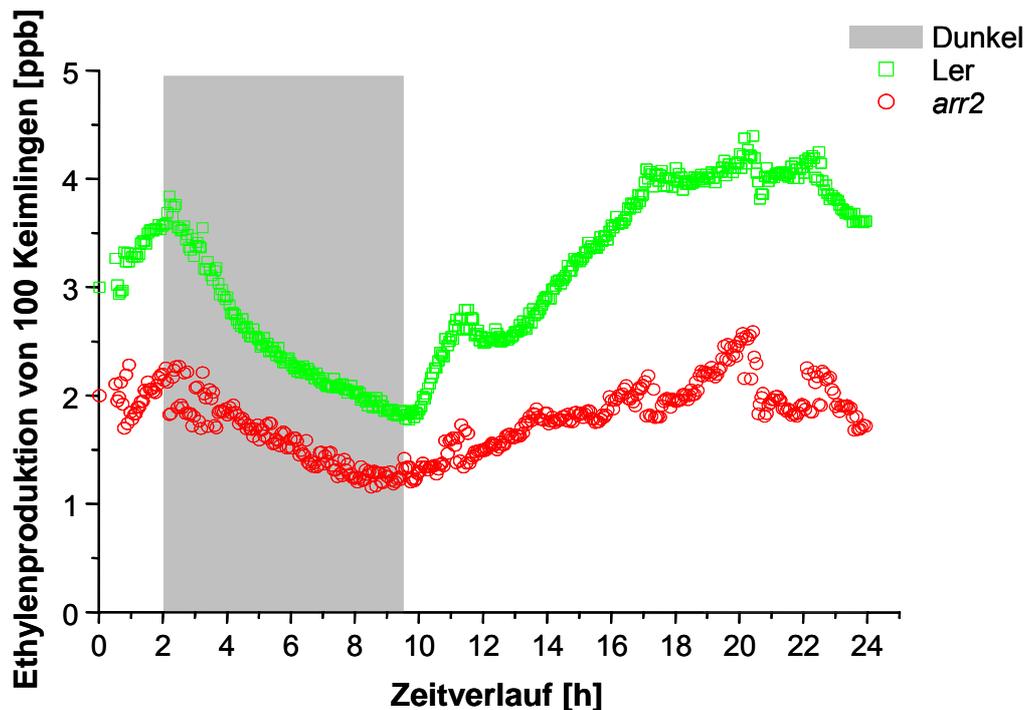


Abb. 3-7: Ethylenproduktion der *arr2*-Nullmutante und des korrespondierenden Wildtyps Ler: Im Verlauf von 24 Stunden mit einer achtstündigen Dunkelperiode wurde die Ethylenproduktion von sieben Tagen alten Keimlingen mit der photoakustischen Methode (Kapitel 2.2.2.4) detektiert.

Die Messung erfolgte unter Weißlichtbestrahlung mit einer achtstündigen Dunkelperiode in einer gasdichten, klimatisierten Messkuvette, die mit kohlenstofffreier, angefeuchteter Luft durchströmt wurde. Die Ethylenproduktion wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden dokumentiert (Abb. 3-7).

Nach einer achtstündigen Dunkelperiode produzierten die Keimlinge der beiden Linien im Licht zunehmend Ethylen, bis sie nach acht bis zehn Stunden ein Maximum erreichten, bei dem sich die produzierte Ethylenmenge einpendelte. Während der Dunkelperiode war ein konstanter Rückgang der Ethylenproduktion beider Linien zu beobachten. Die Keimlinge der *arr2*-Nullmutante produzierten im Vergleich zum Wildtyp weniger Ethylen (Abb. 3-7) und könnten demnach eine reduzierte Ethylenbiosynthese aufweisen.

3.2.3 Einfluss der Lichtqualität auf Entwicklungsprozesse in der *arr2*-Nullmutante

Pflanzen sind in der Lage mit drei Klassen an Photorezeptoren fast alle Facetten des Lichts inklusive der Richtung, Dauer, Quantität und Wellenlänge zu detektieren (Wang und Deng, 2003). Eine Klasse bilden die Phytochrome, die hauptsächlich rote und dunkelrote Wellenlängen im Bereich von 600-750 nm perzipieren. Wesentliche Reizantworten beim Übergang der Pflanze von der Skoto- zur Photomorphogenese, die hauptsächlich über Phytochrom A (Phy A) reguliert werden, sind die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums, die Entfaltung und Vergrößerung der Kotyledonen, sowie die Ergrünung der Pflanzen. Außerdem wird die Bildung von Anthocyan und die Entwicklung von Lateralwurzeln über Phy A reguliert (Vierstra 1993; Kendrick und Kronenberg, 1994). Die Signaltransduktion von Cytokinin und Licht können sich teilweise überlappen (3.2.1.2). Da die *arr2*-Nullmutante eine veränderte Sensitivität gegenüber Cytokinin zeigte (3.2.1), sollte eine potenzielle Funktion von ARR2 in der Lichtsignaltransduktion untersucht werden.

3.2.3.1 Analyse des Hypokotyllängenwachstums der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp

Zur Analyse einer modulierten Photoresponsivität wurden die Hypokotyllängen von Keimlingen des Wildtyps und der *arr2*-Nullmutante nach einer Bestrahlung für 72 Stunden im Rotlicht, Blaulicht, Dunkelrotlicht oder im Dunkeln bestimmt.

Im Dunkeln verhielten sich alle Keimlinge skotomorph. Sie waren farblos, die Hypokotyle elongiert, die Hypokotylhaken und die Kotyledonen geschlossen.

Kontinuierliche Bestrahlung mit Blau- und Rotlicht führte im Vergleich mit dem Wildtyp zu keinem signifikanten Unterschied des Hypokotyllängenwachstums (Abb. 3-8A). Hingegen führte eine Bestrahlung mit Dunkelrotlicht bei den *arr2*-Nullmutanten zu einer schwächeren Inhibierung des Hypokotylwachstums als beim Wildtyp (Abb. 3-8A). Diese Hyposensitivität wurde über einen weiten Bereich der Lichtintensität detektiert (Abb. 3-8B). Zwischen Dunkelrotlicht-Fluenzen von 10^{-4} und 10^{-2} mol/m²s waren die Hypokotyle der *arr2*-Nullmutante stets länger als die des Wildtyps (Abb. 3-8B).

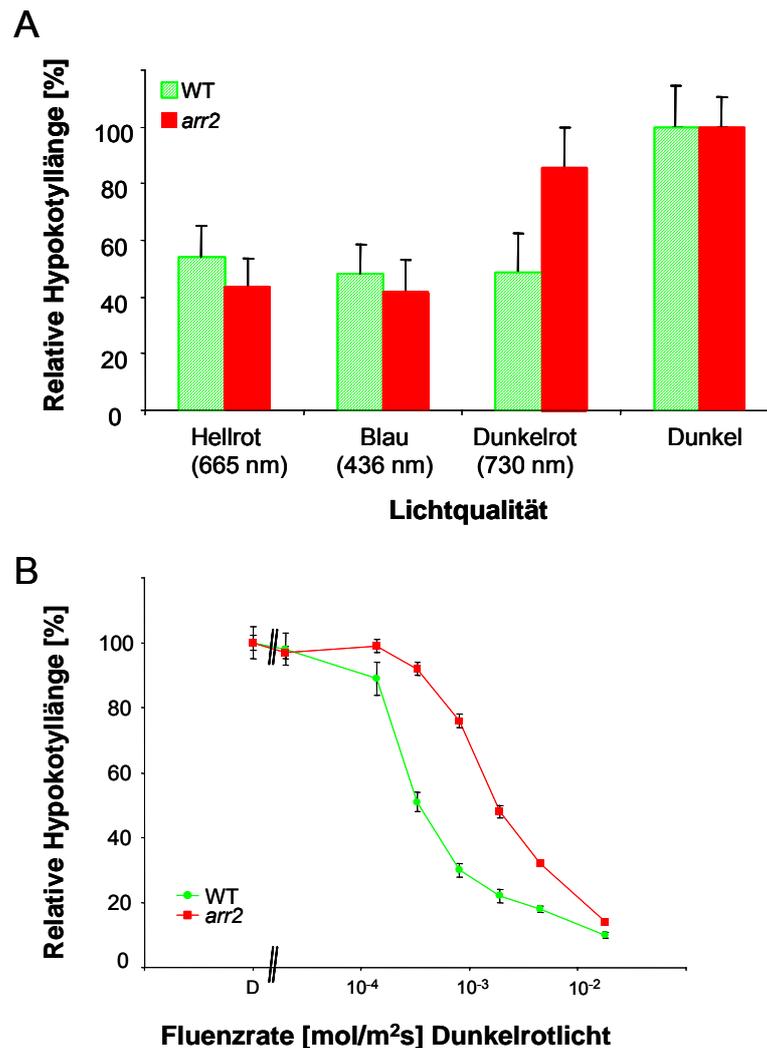


Abb. 3-8: Einfluss von verschiedenen Lichtqualitäten auf das Hypokotyllängenwachstum der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps *Ler*: Die Keimlinge wurden nach Stratifikation für 72 Stunden im Rotlicht ($5,5 \times 10^{-7}$ mol/m²s), Blaulicht, Dunkelrotlicht oder im Dunkeln (A) und im Fluenzbereich von 0 bis 10^{-2} mol/m²s im Dunkelrotlicht (B) angezogen (0 mol/m²s = D) und die relative Hypokotyllänge im Verhältnis zur Dunkelkontrolle (D) bestimmt. Die Hypokotyllängen wurden von mindestens 50 Hypokotylen bestimmt und die Experimente wurden mindestens drei mal wiederholt.

Die verminderte Sensitivität der *arr2*-Nullmutante gegenüber dunkelrotem Licht impliziert eine mögliche Funktion von ARR2 in der Phy A -abhängigen Signaltransduktion.

3.2.3.2 Analyse des molekularen Phänotyps der *arr2*-Nullmutante:

Quantifizierung der Transkriptmengen der Chalkonsynthese (*CHS*) und des Chlorophyll a/b bindenden Proteins (*CAB*)

Die durch Phy A vermittelte Reizantwort beinhaltet u. a. die Stimulation der Chloroplastenentwicklung und die Produktion von photoprotektiven Substanzen wie Anthocyan (Bowler und Chua, 1994). Um mögliche Änderungen in der Phy A-

Signaltransduktion auf Genexpressionsebene zu detektieren, wurde die Chalkonsynthase (*CHS*) und das Chlorophyll a/b bindende Protein (*CAB*) als Marker für die Flavonoidbiosynthese und die Chloroplastengenese verwendet. Die Transkriptmenge von *CHS* und *CAB* der *arr2*-Nullmutante wurde mit denen des Wildtyps Ler dabei mittels semiquantitativer RT-PCR verglichen (Abb. 3-9). Dabei diente eine Kontrollreaktion mit *Aktin-2* als Mengenstandard. Nach 0-, 2-, 4- und 12-stündiger Inkubation im Dunkelrotlicht wurden die Keimlinge geerntet, die RNA extrahiert und eine RT-PCR-Reaktion durchgeführt.

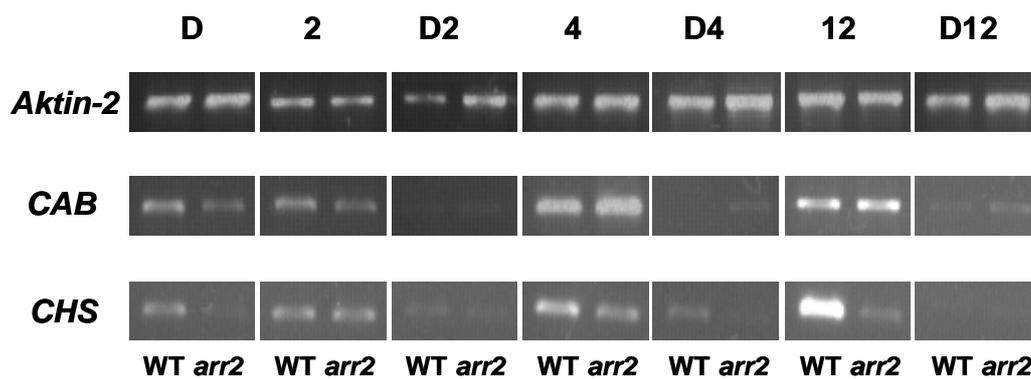


Abb.3-9: Expressionsanalyse des Wildtyps Ler im Vergleich zur *arr2*-Nullmutante mittels RT-PCR: 3 Tage alte Dunkel-inkubierte Keimlinge wurden für 0, 2, 4 und 12 Stunden mit Dunkelrotlicht bestrahlt (730 nm, Halbwertsbreite 128 nm; 3,5 W/m²) oder im Dunkeln inkubiert (D, D2, D4, D12). Die Gesamt-RNA wurde wie im Kapitel 2.2.3.3.1 beschrieben extrahiert und als Matrize für die RT-PCR-Analyse eingesetzt (2.2.3.3.3 und 2.2.3.1.1). Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µL und mit folgender Zyklenanzahl (Z) für die spezifischen Primerpaare durchgeführt: *Aktin-2* → 28 Z, für *CAB* und für *CHS* → 25 Z. Die Anlagerungstemperatur betrug 58°C. Die PCR-Produkte wurden in einem Ethidiumbromid-gefärbten 2,5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Bestrahlung fotografiert. Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge des *Aktin-2*.

Die im Dunkeln angezogenen Keimlinge akkumulierten bis auf den Startansatz (D, Abb. 3-9) sehr wenig *CAB*-Transkripte³. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied in der Transkriptabundanz des *CAB* zwischen der *arr2*-Nullmutante und den Wildtypkeimlingen festgestellt werden (Abb. 3-9), wobei die Transkript-Akkumulation nach vierstündiger Dunkelrotlicht Phy A bestrahlung (4, Abb. 3-9) im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten am stärksten war.

In den *CHS* Transkript-Analysen konnte bei den Dunkel-inkubierten Ansätzen eine Akkumulation beobachtet werden, diese nahm aber im zeitlichen Verlauf ab und war nach zwölf Stunden (D12, Abb. 3-9) vollständig verschwunden¹. Die Amplifikation der *CHS* nach vier und zwölf Stunden (4 und 12, Abb. 3-9) der Dunkelrotlicht-bestrahlten

³ Diese Transkript-Akkumulation von *CAB* und *CHS* im Dunkeln könnte durch die Keimungsinduktion vorgenommene Rotlichtbestrahlung induziert worden sein.

Keimlinge zeigte in den Wildtypkeimlingen eine deutlich stärkere Akkumulation der Transkripte als in der *arr2*-Nullmutante.

Die Analyse der Markergene *CAB* und *CHS* für Phy A lässt vermuten, dass ARR2 möglicherweise keine Funktion in der Chloroplastenentwicklung, aber in der Regulation der Phy A-vermittelten Flavonoidsynthese hat.

3.3 Phänotypische Charakterisierung der komplementierten *arr2*-Nullmutante

Die Verifizierung eines Phänotyps, der durch das Fehlen eines Gens hervorgerufen wurde, kann durch eine Komplementation der Nullmutante erfolgen. Eine Rettung sollte den wildtypischen Phänotyp wieder herstellen und dient somit als Nachweis, dass das Fehlen eines funktionellen Gens für den mutanten Phänotyp verantwortlich war. Aus diesem Grund wurden drei unabhängigen Komplementationslinien *arr2-I*; *arr2-III* und *arr2-IV*, die ARR2 cDNA unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors exprimierten, auf einen morphologischen Phänotyp hin untersucht. Dazu wurden Pflanzen der *arr2*-Nullmutante, des Wildtyps Ler und der Komplementationslinien unter gleichen Wachstumsbedingungen angezogen und auf offensichtliche Unterschiede hin beobachtet. Wie auch schon in Abb. 3-2 gezeigt, sind die Pflanzen der *arr2*-Nullmutante auch hier deutlich kleiner im Wuchs als die Wildtyppflanzen (Abb. 3-10). Homozygote Komplementationslinien beispielsweise *arr2-IV* (Abb. 3-10) haben dagegen im Vergleich zum Wildtyp und der *arr2*-Nullmutante eine intermediäre Größe. Es ist möglich, dass die Expression von ARR2 unter dem 35S-Promotor nicht in der Lage ist, das Expressionsmuster des nativen ARR2-Promotors zu etablieren und darum nur in einer partiellen Komplementation resultierte.

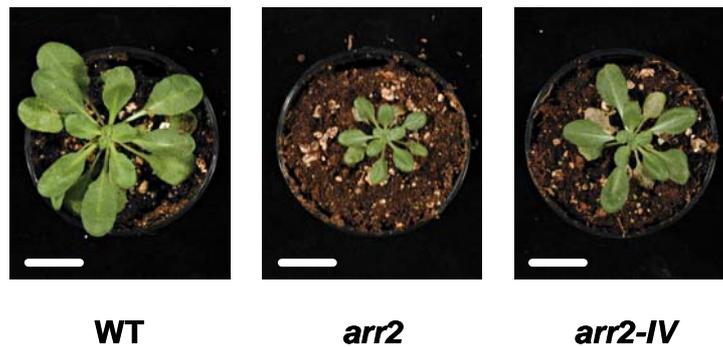


Abb. 3-10: Phänotypische Analyse der Komplementation der *arr2*-Nullmutante: 30 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps, der *arr2*-Nullmutante und einer komplementierten *arr2*-Transposoninsertionslinie *arr2-IV* wurden unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht) angezogen. Der Balken entspricht 2,5 cm.

Die partielle Komplementation des *arr2*-mutanten Phänotyps durch die konstitutive Expression von *ARR2* cDNA lieferte erste Hinweise, dass das Fehlen des funktionellen Responseregulators *ARR2* für den beobachteten Phänotyp verantwortlich war. Zur detaillierteren Studie der Komplementation wurden weitere physiologische Experimente durchgeführt.

3.3.1 Hypokotyllängenwachstum der Komplementationslinien der *arr2*-Nullmutante unter Einfluss exogen applizierter Hormone

Zur Verifizierung der Funktion von *ARR2* in der Hormonantwort wurde die Hypokotyllängen von Keimlingen der *arr2*-Komplementationslinien im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die Keimlinge wurden unter 0,5 μ M Kinetin- und 10 μ M ACC-Exposition angezogen. Eine Behandlung der Keimlinge mit ACC zeigte einen wie auch schon für Ethylen im Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen hyposensitiven Phänotyp der *arr2*-Nullmutante (Abb. 3-11A). Die Keimlinge der Komplementationslinien zeigten ähnliche Hypokotyllängen wie die des Wildtyps (Abb. 3-11A). Die Hypokotyle waren im Gegensatz zur *arr2*-Nullmutante deutlich verkürzt (Abb. 3-11A). Auch bei Zugabe von Kinetin waren die Hypokotyllängen der Keimlinge von den Komplementationslinien *arr2-I*, *arr2-III* und *arr2-IV* im Gegensatz zur *arr2*-Nullmutante deutlich reduziert und gleichten denen des Wildtyps (Abb. 3-11B). Die Ergebnisse bestätigten, dass der beobachtete hyposensitive Phänotyp bei Hormonapplikation durch das Fehlen des *ARR2* Genprodukts hervorgerufen wurde.

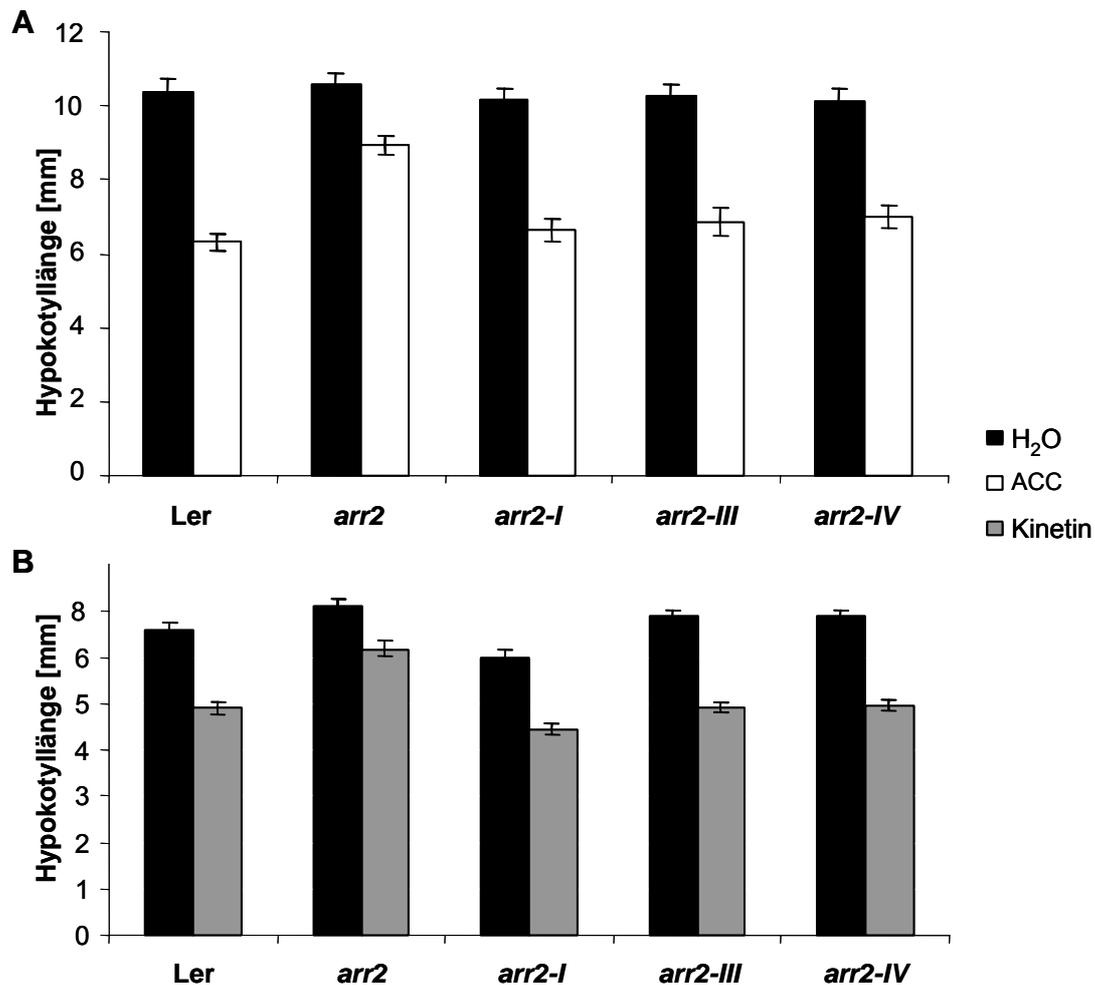


Abb. 3-11: Hypokotyllängenwachstum der *arr2*-Nullmutante, des Wildtyps Ler und drei unabhängiger komplementierter Linien *arr2-I*, *arr2-III*, *arr2-IV*: Die Keimlinge wurden nach Stratifikation für vier Tage im Dunkeln entweder 10 μ M ACC (A) oder 0,5 μ M Kinetin (B) exponiert. Schwarze Balken repräsentieren eine H₂O-Behandlung, weiße Balken einer ACC-Applikation und graue Balken einer Kinetin-Applikation. Die Hypokotyllängen wurden von mindestens 50 Hypokotylen bestimmt und die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

In den folgenden Experimenten sollte eine potentielle Funktion von ARR2 in der abiotischen Stresssignaltransduktion durch Exposition der *arr2*-Nullmutante, des Wildtyps und der Komplementationslinien auf Trockenheit, hohen Salzkonzentrationen und Osmolyten untersucht werden.

3.3.2 ARR2 hat eine Funktion in der Austrocknungstoleranz

Es sollte die Trockenstress-Reaktion der *arr2*-Nullmutante und der drei unabhängigen Komplementationslinien *arr2-I*, *arr2-III* und *arr2-IV* in mehreren

Parallelexperimenten genauer charakterisiert werden. Dafür wurden Pflanzen des Wildtyps, der *arr2*-Nullmutante und der Komplementationslinien für sechs Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen (8 h Licht) und nach zehn Tagen ohne Wasserzufuhr charakterisiert.



Ler

*arr2**arr2-I**arr2-III**arr2-IV*

Abb.3-12: Trockenstressanalyse der Komplementation der *arr2*-Nullmutante: *Arabidopsis*-Pflanzen der *arr2*-Transposoninsertionslinie (*arr2*), des Wildtyps und der Komplementationslinien *arr2-I*, *arr2-III* und *arr2-IV* wurde für sechs Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) angezogen. In der oberen Reihe sind die normal gewässerten Kontrollpflanzen dargestellt. In der unteren Reihe wurden die Pflanzen einem zehntägigem Wasserentzug ausgesetzt.

Die Kontrollpflanzen des Wildtyps Ler zeigen nach zehntägigem Wasserentzug einen sehr deutlichen Austrocknungsstress (Abb. 3-12, Ler). Die Blätter waren welk und stark entwässert und die Pflanzen starben trotz anschließender Wasserzufuhr (Daten nicht gezeigt). Pflanzen der *arr2*-Nullmutante zeigten zwar Symptome des Welkens, wie das Einrollen der Blattränder, aber deutlich weniger als die des Wildtyps (Abb. 3-12, *arr2*). Die *arr2*-Nullmutante wies eine deutlich gesteigerte Resistenz gegenüber Austrocknung als die Wildtyppflanzen auf. Die Komplementationslinien hatte in der Reihenfolge *arr2-III*, *arr2-IV* und *arr2-I* zunehmend starke Austrocknungserscheinungen, wobei von Pflanzen der *arr2-I*-Linie ca. 50% der Blätter stark entwässert und welk waren (Abb. 3-12). Die Austrocknung der Wildtyp-Pflanzen waren aber deutlich weiter fortgeschritten als die der Komplementationslinien (Abb. 3-12). Die drei Komplementationslinien zeigten einen unterschiedlich stark ausgeprägten Trockenresistenzphänotyp, also eine abgestufte Komplementation. Alle Pflanzen erholten sich nach anschließender Wasserzufuhr und entwickelten sich

zu adulten Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ARR2 die Trockentoleranz in *Arabidopsis* beeinflusst.

Der intermediäre Habitus der Komplementationslinien, die Rettung der Cytokinin- und Ethylenantwort sowie die partielle Komplementation bei Exposition durch Trockenheit zeigen deutlich, dass das Fehlen von ARR2 in *Arabidopsis thaliana*, in ein verändertes Wachstum und eine veränderte Entwicklung resultiert. Dies lässt einen Einfluss von ARR2 in der Hormonhomöostasis vermuten.

3.4 ARR2 und die Ethylensignaltransduktion

3.4.1 Funktion von ARR2 in der ERF1-vermittelten Genregulierung

Die sequenzspezifische Bindung von ARR2 an die Zentralsequenz WGATW⁴ (GAT-Box) konnte *in vitro* mit einem DNA-„footprint“ Experiment und *in vivo* im heterologen Hefe-Ein-Hybridsystem gezeigt werden (Lohrmann et al., 2001). Interessanterweise trägt das primäre Ethylen responsive (PER) Element des *ERF1*-Promotors zwei GAT-Boxen, welche für die Ethylen regulierte *ERF1*-Expression essentiell sind (Solano et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor ERF1 bindet an GCC-Box-enthaltene Promotorelemente und vermittelt die Expression von Ethylen regulierten Zielgenen (vergl. Kapitel 1.2.3.2).

Im Rahmen einer Dissertation konnte Lohrmann (2001) tatsächlich die Bindung von ARR2 an das PER-Element des *ERF1*-Promotors *in vitro* zeigen (Hass et al., 2004b).

⁴ W (weak): Adenin oder Thymin.

3.4.1.1 *In vivo* Studien zur Interaktion von ARR2 mit dem *erf1* Promotor

Es wurde eine transiente Expressionsanalyse in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten in Kooperation mit Hwang (Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Korea) durchgeführt, um die Funktion von ARR2 in der Ethylen regulierten Transkription von *ERF1 in planta* aufzuklären. Hwang und Sheen (2001) etablierten ein System zum Studium der Cytokininsignaltransduktion. Es basiert auf Expression eines für Cytokinin spezifische Reportergen, welches neben einem Kontrollkonstrukt auch mit einem Effektorkonstrukt co-transfiziert wird. (2.2.4). Dieser Assay konnte auch für Ethylen angepasst werden, indem der Promotor des Ethylen-spezifischen *ERF1* fusioniert mit LUC als Reportergenkonstrukt diente (Hass et al., 2004). In der Analyse wurde die relative *ERF1::LUC*-Aktivität bestimmt.

Die Aktivität des *ERF1::LUC*-Reportergenkonstrukts befand sich in den Protoplasten auf niedrigem Niveau und konnte durch Ethylenbehandlung in etwa verdoppelt werden (Abb. 3-13, Kontrolle). Die zusätzliche Expression von ARR2 in diesem System erhöhte die Aktivität des *ERF1::LUC*-Reporters um das 20-fache (Abb. 3-13, ARR2, schwarzer Balken). Wurde jedoch bei Expression von ARR2 zusätzlich Ethylen zugegeben führte dies nicht wie in der Kontrolle zu einer Erhöhung, sondern zur signifikanten Reduzierung der *ERF1::LUC* Reporteraktivität (Abb. 3-13).

Dies führte zur Erkenntnis, dass ARR2 an der Regulation der *ERF1*-Genexpression in *Arabidopsis*-Protoplasten beteiligt ist.

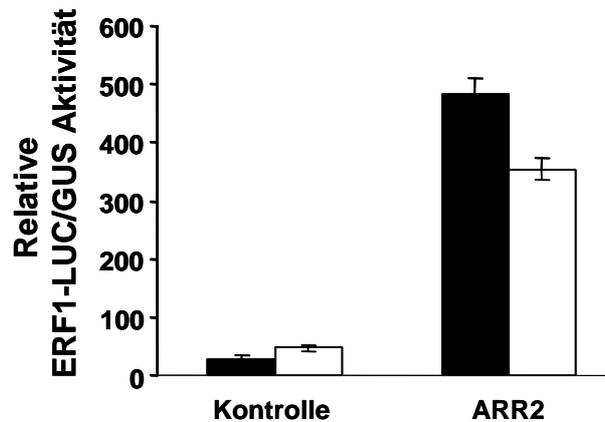


Abb. 3-13: Induktion des Ethylen-responsiven Reportergens *ERF1::LUC* im transienten Mesophyllprotoplastenassay: *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten der Linie Bensheim wurden mittels Polyethylenglycolmethode mit einem internen Kontrollkonstrukt *UBQ10::GUS*, einem *ERF1::LUC*-Reportergenkonstrukt und entweder mit ARR2 oder nicht-funktionellem GFP (Negativkontrolle) als Effektor transformiert (Abel und Theologis, 1994; Hwang und Sheen, 2001). Die Luciferaseaktivität des Lysats der transformierten Protoplasten wurde mit Hilfe der Glucuronidaseaktivität normiert. Der Reaktionsansatz wurde mit (schwarzer Balken) und ohne 10 µM Ethylen (weißer Balken) inkubiert.

3.4.2 Beteiligung von *ETR1* an der Regulation der Phosphorylierung von *ARR2*

Ethylen wird von Mitgliedern der membranassoziierten Hybridkinasen der Ethylenrezeptorfamilie perzipiert (Sakai et al., 1998; Chang et al., 1993; Hua et al., 1998). Aus diesem Grund konnte eine direkte Interaktion des kernlokalisierten ARR2 mit ETR1 ausgeschlossen werden. HPt-Proteine vermitteln in Hefe und Bakterien das Signal zwischen einer Hybridkinase und einem Responseregulator (1.1 und 1.3). Jens Lohrmann (2001) und Christopher Grefen (2002) untersuchten die *Arabidopsis* HPt-Proteine 1 und 2 (AHP) bezüglich einer entsprechenden Mittlerfunktion zwischen der membranassoziierten Hybridkinase ETR1 und dem kernlokalisierten Responseregulator ARR2. Die Interaktion von AHP1 und 2 sowohl mit ETR1 als auch mit ARR2 konnte mittels eines modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren, dem Hefe-Brücken-Assay, verifiziert werden (Lohrmann, 2001 und Grefen, 2002). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass in Hefe innerhalb eines Mehrschrittphosphotransfersystems ein oder mehrere HPt-Proteine die Übertragung eines Phosphats des konservierten Histidins der Hybridkinase auf den Responseregulator ARR2 ermöglichen (Lohrmann, 2001 und Grefen, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit pflanzlichen Extrakten analysiert, ob die Sensorhistidinkinase ETR1 der Ursprungsort eines auf den Responseregulator ARR2 transferierten Phosphats sein könnte. Dafür wurden Proteinfractionen der Ethylenrezeptormutante *etr1-7* sowie einer transgenen Linie, welche ETR1 unter dem endogenen Promotor im *etr1-7* Hintergrund exprimiert ($P_{ETR1}::ETR1/etr1-7$; Gamble et al., 2002) aus evakuolisierten *Arabidopsis*-Protoplasten (*Arabidopsis thaliana* Evacuolated Protoplasts AtEP) hergestellt. Die AtEP-Proteinfractionen der Linien *etr1-7*, $P_{ETR1}::ETR1/etr1-7$ und des Wildtyps wurden mit Strep-markiertem ARR2 und [γ - 32 P]-ATP inkubiert und dem zellfreien Phosphorelay-Assay wie im Kapitel 2.2.3.4.8 beschrieben ausgesetzt. Die rekombinanten ARR2-Proteine wurden über Affinitätsreinigung (2.2.3.4.4) präzipitiert und der Einsatz von gleichen Mengen an ARR2-Protein wurde mittels ARR2-Serum in einer Western-Blot-Analyse überprüft (Abb. 3-14 II). Außerdem wurde eine nahezu gleich starke Phosphorylierungsaktivität der Extrakte mit einem repräsentativen Protein nachgewiesen (Abb. 3-14 III).

Wurde dem Reaktionsgemisch aus Wildtyp Extrakten kein [γ - 32 P]-ATP zugesetzt (Negativkontrolle; Spalte 1, Abb. 3-14) ist kein phosphoryliertes Protein der Größe von ARR2 detektiert worden. Das Fehlen von ARR2 im Wildtyp Reaktionsansatz führte ebenso zu keinem phosphoryliertes ARR2 (Negativkontrolle; Abb. 3-14 I, Spalte 2). Durch Zugabe von [γ - 32 P]-ATP und Strep-markiertem ARR2 erfolgte eine Phosphorylierung des ARR2 im Reaktionsansatz aus Wildtyp-Extrakten (Abb. 3-14 I, Spalte 3). Im Vergleich zum Wildtyp war bei der Zugabe der *etr1-7* Fraktion die ARR2-Phosphorylierung stark reduziert (Abb. 3-14, Spalten 4). Im Gegensatz dazu, konnten AtEP-Extrakte der $P_{ETR1}::ETR1/etr1-7$ Pflanzen die ARR2-Phosphorylierung wieder herstellen (Abb. 3-14, Spalte 5).

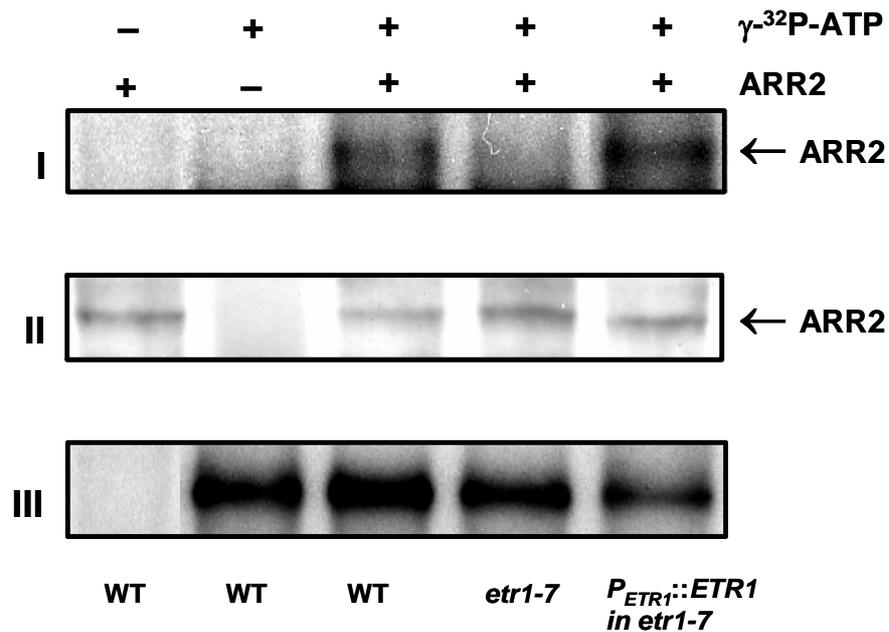


Abb. 3-14: Die Phosphorylierung von ARR2 im pflanzlichen zellfreien Phosphorelay-System hängt von funktionellem ETR1 ab. Pflanzliche Extrakte wurden gemäß Kapitel 2.2.3.4.7 aus evakuolisierten *Arabidopsis*-Protoplasten (*AtEP*), des Wildtyps sowie der Ethylenrezeptormutante *etr1-7* und einer Komplementationslinie von *etr1-7* (*P_{ETR1}::ETR1* in *etr1-7*) hergestellt. Sie wurden mit Strep-markiertem ARR2 und [γ -³²P]-ATP co-inkubiert. Nach Koaffinitätsreinigung wurde die Phosphorylierung von ARR2 via Autoradiographie (I) analysiert. Eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse zeigt, dass gleiche Mengen an ARR2 im Reaktionsgemisch wieder isoliert wurden (II; Detektion des Proteins mit ARR2-Serum). Die Phosphorylierung eines phosphorylierbaren Proteins des *AtEP*-Extraktes wurde verifiziert (III).

Das Ergebnis identifizierte die Membran-assoziierte Ethylenrezeptorkinase ETR1 als eine stromaufwärts liegende Regulationskomponente der ARR2-Phosphorylierung und ihre biochemische Verbindung zum Responseregulator.

3.4.2.1 Pathogenresistenz der *arr2*-Nullmutante

Bei der Anzucht der *arr2*-Nullmutante im Gewächshaus konnte gelegentlich auf den Blättern sporadisch auftretende Läsionen beobachtet werden, welche an die Hypersensitive Reaction (HR), einer typische Reaktion der Pathogenabwehr, erinnerten (Abb. 3-15A). Die Läsionsbildung der Blätter der *arr2*-Nullmutante blieb aus, wenn die Pflanzen unter sterilen Bedingungen angezogen wurden (Abb. 3-15B).

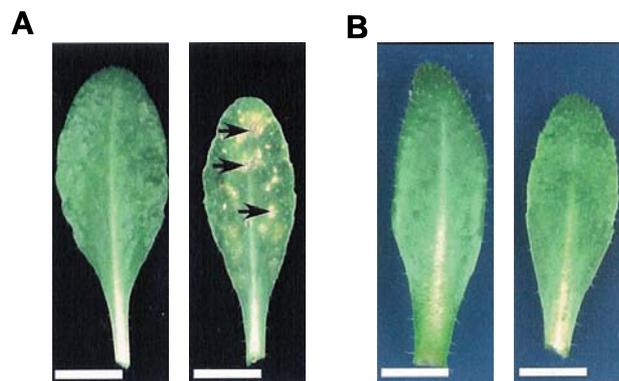


Abb. 3-15: Rosettenblätter der *arr2*-Nullmutante zeigen sporadisch auftretende Läsionen bei Anzucht auf Erde: Rosettenblätter von 45 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen, die entweder unsteril auf Erde (A) oder steril auf 0,5xMS-Medium (B) angezogen wurden. Die Pfeile markieren Läsionen auf den Blättern der *arr2*-Nullmutante, die an Symptome der sog. Hypersensitive Response (HR) erinnern. Der Balken entspricht 1 cm.

Eine reduzierte Sensitivität gegenüber Ethylen in *Arabidopsis* führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber *Botrytis cinerea* (Thomma et al., 1999). In dem nachfolgend dokumentierten Experiment sollte untersucht werden, ob die Hyposensitivität der *arr2*-Nullmutante einen Einfluss auf die Pathogenantwort ausübt.

Dazu wurde eine Kooperation mit Dr. Petra Epple (Labor Dangl, University of North Carolina, USA) eingegangen, weil in diesem Labor die Arbeit mit Pathogenen etabliert ist. Pflanzen der *arr2*-Nullmutante und des korrespondierenden Wildtyps Ler (Abb. 3-16) wurden mit dem biotrophen Pilz *Peronospora parasitica* (*P.p.*) behandelt. Zehn Tage alte Keimlinge wurden Pflanzen mit einer *Peronospora*-Sporenlösung besprüht und für sieben Tage inkubiert. Danach wurden die Blätter gerntet und mit Lactophenol-Trypanblau gefärbt. Die Blätter der *arr2*-Nullmutante wiesen deutlich verminderte Nekrosebildung und auch vermindertes Wachstum und Sporulation von *Peronospora* als die des Wildtyps (Abb. 3-16).

Der Farbstoff Trypanblau färbt ausschließlich abgestorbene Zellen an, da er nicht durch die Zellwände lebender Zellen eindringen kann. Bei den unbehandelten Kontrollpflanzen der gleichen Linien zeigte die *arr2*-Nullmutante wenige Läsionen auf den Blättern im Gegensatz zu den Blättern von Ler, die keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigten (Abb. 3-16, unbehandelt). Die Ergebnisse deuten eine erhöhte Toleranz von der *arr2*-Nullmutante gegenüber den biotrophen Pilz *Peronospora* an.

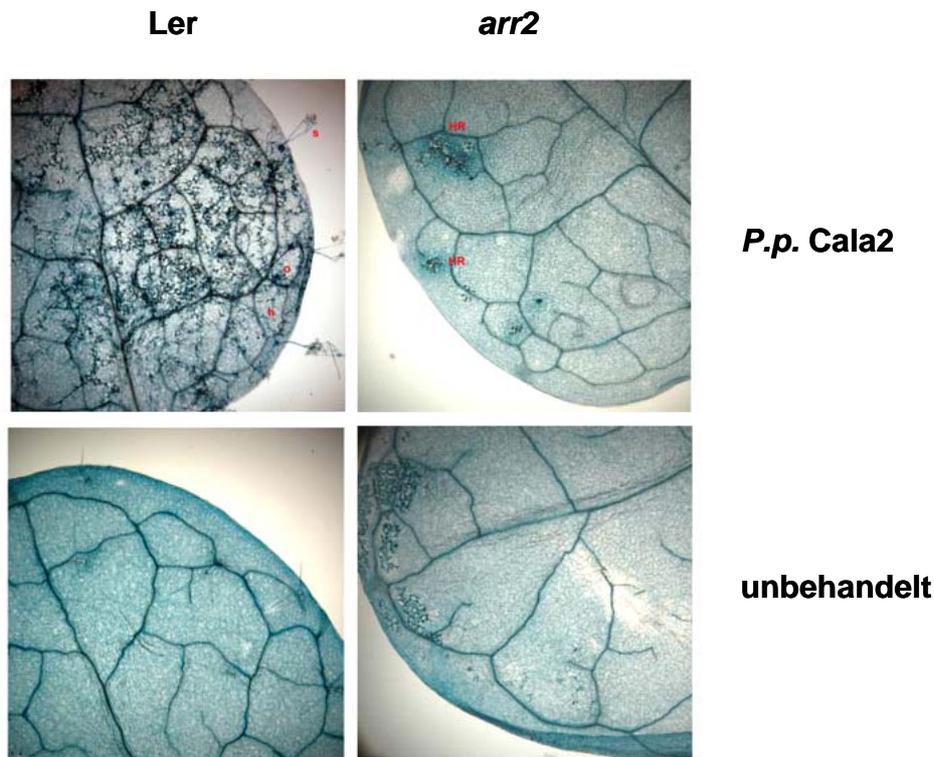


Abb. 3-16: *Peronospora*-Behandlung von Ler und der *arr2*-Nullmutante: Nach vierwöchiger Anzucht unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer Sporenlösung eines *Peronospora*-Isolates (Cala2) besprüht, für weitere sieben Tage inkubiert und mit Lactophenol-Trypanblau gefärbt (2.2.2.3).

Pflanzen der *arr2*-Nullmutante (Abb. 3-17, *arr2*) und der Wildtypen Col und Ler (Abb. 3-17, Col bzw. Ler) wurden dem Befall der nekrotrophen Pilzart *Botrytis cinerea* ausgesetzt. Im Alter von fünf Wochen wurden die Pflanzen mit einer Sporenlösung von zwei verschiedenen *Botrytis*-Isolaten (Abb. 3-17, A und B) besprüht und für sieben Tage inkubiert. Kontrollpflanzen der gleichen Linien wurden nur mit Wasser besprüht und zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten (Daten nicht gezeigt).

Die *Arabidopsis*-Pflanzen der beiden Wildtypenlinien zeigen schon einen unterschiedlich stark ausgeprägten Befall von *Botrytis cinerea* mit vermehrten Läsionen auf den Blättern der Ler-Pflanzen im Vergleich zu den Col-Pflanzen (Abb. 3-17A und B, Ler und Col). Das impliziert Unterschiede in der Empfindlichkeit der beiden verschiedenen Ökotypen. Die Pflanzen der *arr2*-Nullmutante zeigten einen noch stärkeren Läsionsphänotyp als der korrespondierende Wildtyp Ler (Abb. 3-17, *arr2*). Das stärker ausgeprägte Krankheitsbild der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zu

den Wildtypen belegte eine deutlich verstärkte Empfindlichkeit gegenüber *Botrytis cinerea*.

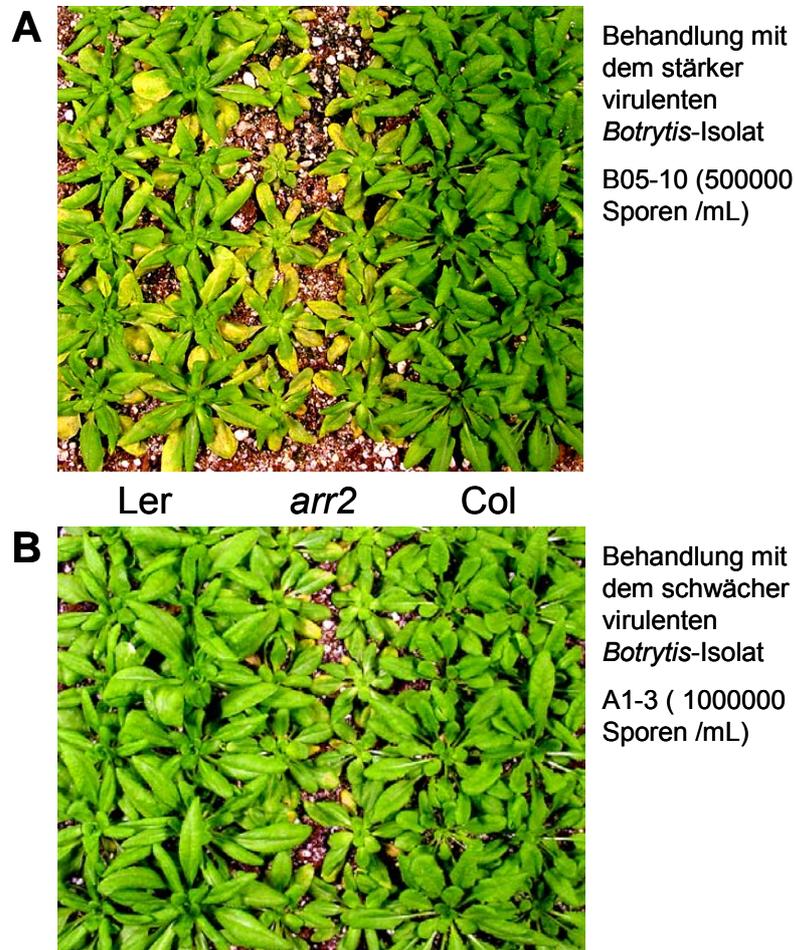


Abb. 3-17: *Botrytis*-Behandlung von Ler, Col und der *arr2*-Nullmutante : Nach fünfwöchiger Anzucht unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer Sporenlösung von zwei verschiedenen *Botrytis*-Isolaten (A: A-1-3, leicht virulent, 1 000 000 Sporen/mL ; B: B05-10, stärker virulent, 500 000 Sporen/mL) besprüht und für weitere sieben Tage inkubiert.

Die veränderte Reaktion der Pathogenresistenz der *arr2*-Nullmutante gegenüber *Botrytis cinerea* könnte die Folge einer gestörten Ethylensignaltransduktion sein. Ebenso impliziert die in *Arabidopsis*-Protoplasten nachgewiesene ARR2-induzierte *ERF1*-Genexpression und die ETR1-vermittelte ARR2-Phosphorylierung eine Verbindung von ARR2 mit der Ethylensignaltransduktion.

3.4.3 *ARR2* erfüllt eine Funktion bei der Integration und Interaktion von verschiedenen Signaltransduktionswegen

Die bislang dokumentierten Ergebnisse belegen eine Funktion von *ARR2* in der Cytokinin-, Licht- und Ethylensignaltransduktion. In der folgenden Studie sollten zusätzlich zu *ERF1*, dem in dieser Arbeit nachgewiesenen Target von *ARR2* (3.4.1.1) generelle Veränderungen des Expressionsmusters identifiziert werden, die auf das Fehlen von *ARR2* zurückzuführen sind. Dies sollte erste Hinweise liefern, wie ein Ausfall von *ARR2* den beobachteten physiologischen Phänotyp bewirkt.

3.4.3.1 Expressionsanalyse der *arr2*-Nullmutante

Eine Mikroarray-Analyse mit dem Affimetrix Genome Genechip, der ungefähr 26370 Gene von *Arabidopsis* repräsentiert (Zhu, 2003), ermöglichte den Vergleich der Genexpression der *arr2*-Nullmutante mit dem Wildtyp. Nach Normalisierung und statistischer Auswertung konnten signifikant verändert exprimierte Gene identifiziert werden (2.2.3.3.4). Ungefähr 390 Gene zeigten signifikante Veränderungen im Expressionsniveau in der *arr2*-Nullmutante verglichen mit dem Wildtyp. Für 20% dieser Gene liegt keine funktionelle Annotierung vor (Anhang, CD). In Abbildung 3-18 ist zur Veranschaulichung eine Auswahl von elf funktionellen Gruppen verändert exprimierter Gene dargestellt, die besonders auffällig waren.

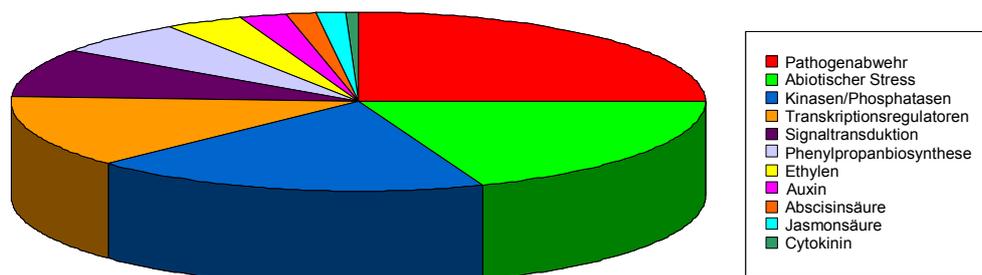


Abb. 3-18: Die vergleichende Transkriptomanalyse der *arr2*-Nullmutante zum Wildtyp deckte verändert-exprimierte Gene in elf funktionellen Gruppen auf: Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von jeweils vier unabhängig gewachsenen, 30 Tage alten Pflanzen gemischt, extrahiert und der Mikroarray-Analyse unterzogen. Die Hybridisierung erfolgte mit dem Affimetrix Genome Genechip (ca. 26370 *Arabidopsis* Gene; Zhu, 2003). Dargestellt ist eine Auswahl verändert-regulierter Transkripte, wobei die nicht funktionell-annotierten und hypothetischen Gene nicht dargestellt sind. Unterschiedliche Gruppen sind farblich, wie in der Legende angegeben, voneinander abgegrenzt.

Das gehäufte Auftreten einer veränderten Expression in diesen Gruppen, lässt vermuten, dass sie durch das Fehlen von ARR2 nicht mehr adäquat reguliert werden. Die Gruppen konnten noch weiter zusammengefasst werden. So bilden Ethylen, Auxin, Abscisinsäure, Jasmonsäure und Cytokinin den Bereich der Phytohormone (Tab. 2). Die verändert exprimierten Gene der Signaltransduktion wurden mit den Kinasen/Phosphatasen und den Transkriptionsregulatoren zusammengefasst und die Gene der Pathogenabwehr, des abiotischen Stress und der Phenylpropanoidbiosynthese bildeten den Bereich der Stressgene (Tab. 3). Die Hormon-regulierten Gene der Stressantwort beispielsweise das vegetative Speicherprotein Vsp2, ein Markergen für Jasmonsäurefunktion, wurden der Gruppe der Phytohormone zugeteilt (Tab. 2).

Die Gene der Pathogenabwehr, des abiotischen Stress und der Phenylpropanoidbiosynthese bildeten den Bereich der Stressgene (Tab. 3). Die Mehrheit der genannten Gene ist in der *arr2*-Nullmutante verglichen zum Wildtyp im Expressionsniveau herunterreguliert (Tab. 2 und 3 und Anhang, CD). Beispielsweise sind alle Gene der Phytohormone bis auf das des ABA-responsiven Proteins herunterreguliert. Allerdings traten auch parallel herunter- und hochregulierte Gene innerhalb der gleichen Kategorie auf (z.B. Gene der Pathogenabwehr und der Stressantwort; Tab. 2 und II). Die Transkriptmenge des von Oñate-Sánchez und Singh (2002) identifizierten Pathogen-responsiven Proteins AtERF13 (At2g44840, Tab. 3) war 3,4-fach reprimiert und die von *RAP2.3/AtEBP* (At3g16770 Tab. 3) war 2,3-fach hochreguliert. Dieses Phänomen ist für Komponenten der Signaltransduktion typisch, den die Regulation erfolgt dem spezifischen Signal entsprechend aktivierend oder reprimierend. Ein konkretes Beispiel dafür boten die WRKY-Transkriptionsfaktoren, die an vielfältigen Stress- und Pathogen-abhängigen Signalübertragungswegen beteiligt sind (Eulgem et al., 2000; Hara et al., 2000; Dong et al., 2003). Ihre Expression war bei einem Mitglied hoch- und bei anderen herunterreguliert (Tab. 3).

Tab. 2: Expression Hormon-regulierter Gene der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp Ler

AGI-Nr.	Annotierte Funktion	Fache Änderung im Vergleich zu Ler
Ascisinsäure (ABA) verwandt		
At4g24960	ABA-induziert - ähnliches Protein	-2,1
At4g01600	ABA-responsives Protein	2,4
At5g15960	Kälte und ABA induzierbares Protein kin1	-2,2
Auxin verwandt		
At1g51760	IAA-Ala Hydrolase (IAR3)	-3,2
At1g78370	2,4-D induzierbare Glutathion S-Transferase	-3,0
At1g05670	Indole-3-Acetatbetaglukosyltransferase	-3,0
At4g15490	Indole-3-Acetatbetaglukosyltransferase ähnliches Protein	-2,1
At5g13370	Auxin reponsives – ähnliches Protein	-3,9
Cytokinin verwandt		
At1g03740	CDC2-ähnliche Proteinkinase	-2,4
At4g29740	Cytokinin-Oxidase	-2,9
At5g07010	Steroidsulfotransferase-ähnliches Protein	-4,9
Ethylen verwandt		
At1g28370	Ethylen responsives Element bindendes Protein (EREBP)	-2,5
At1g05010	ACC Oxidase (ACO)	-2,8
At2g31230	Ethylen responsives Element bindendes Protein (EREBP)	-2,7
At3g24500	Ethylen responsivser transkriptioneller Co-Aktivator	-2,2
At3g23240	Ethylen responsives Element bindender Faktor 1 (ERF1)	-2,0
At3g23150	Ethylenrezeptor, (ETR2)	-2,2
At4g11280	ACC Synthase (AtACS-6)	-2,8
Jasmonsäure verwandt		
At1g17420	Lipoxygenase	-4,1
At5g24770	vegetatives Speicherprotein Vsp2	-4,5
At3g16470	Lektin, ähnlich zum Jasmonsäure induzierbaren Protein	-4,3
^a Durchschnittliche Kanalintensität des Signals der Probe der <i>arr2</i> -Nullmutante bezogen zur Probe des Wildtyps; positive Werte zeigen Induktion und negative Werte Reprimierung		

Die gravierendste Änderung der Expression mit 19,8-facher Stärke wurde bei dem PR1-ähnlichem Gen (*pathogenesis related1*) der Pathogenabwehr beobachtet, das mit noch weiteren 20 Resistenzgenen ein Mitglied der Kategorie Pathogenabwehr

war (Tab. 3). Außerdem wurde bei allen Genen, die mehr als fünffach höher exprimiert waren eine Funktion in der Stressantwort vermutet (Tab. 3, *kursiv* hervorgehoben).

Tab. 3: Expression von Genen der Stressantwort der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp Ler

AGI-Nr.	Annotierte Funktion	Fache Änderung im Vergleich zu Ler
Abiotischer Stress bezogen		
At2g42540	Precursor des Kälte-regulierten Protein <i>cor15a</i>	-3,0
<i>At3g12580</i>	<i>Hitzeschockprotein 70</i>	-5,8
At3g47440	Aquaporin Protein	-2,5
<i>At3g25760</i>	<i>ERD12</i>	-8,5
At4g30650	Niedrigtemperatur und Salz responsives Protein	-3,3
<i>At4g11650</i>	<i>Osmotinprecursor</i>	7,4
At5g15960	Kälte und ABA induziertes Protein kin1	-2,2
At4g37220	Kälteakklimationsprotein	2,7
At5g56010	Hitzeschockprotein 90	-2,8
<i>At3g50970</i>	<i>Dehydrin Xero2</i>	-5,8
At2g22330	Cytochrome P450	-4,7
Phenylpropanbiosynthese verwandt		
At1g74100	Flavonolsulfotransferase	3,7
At2g37040	Phenylalaninammoniumlyase (PAL1)	3,6
<i>At2g38240</i>	<i>Anthocyanidinsynthase</i>	6,5
At3g21230	4-Coumarat:CoA Ligase 2	2,8
<i>At3g53260</i>	<i>Phenylalaninammonium-Lyase</i>	5,5
^a Durchschnittliche Kanalintensität des Signals der Probe der <i>arr2</i> -Nullmutante bezogen zur Probe des Wildtyps; <i>kursiv dargestellte Gene</i> ≥ 5-fach veränderte Regulation; positive Werte zeigen Induktion und negative Werte Reprimierung		

Fortsetzung von Tab. 3: Expression von Genen der Stressantwort der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp Ler

AGI-Nr.	Annotierte Funktion	Fache Änderung im Vergleich zu Ler
Pathogenabwehr bezogen		
At1g33950	AIG1-ähnliches Protein	2,5
<i>At1g33960</i>	<i>AIG1</i>	5,1
<i>At1g72900</i>	<i>Virusresistenz Protein</i>	-5,8
AT1G77810	Avr9 Elicitor Antwort-Protein	-2,0
<i>At1g80840</i>	<i>WRKY Transkriptionsfaktor</i>	-5,1
<i>At1g73260</i>	<i>Trypsininhibitor</i>	6,8
At2g38470	putatives WRKY-typisches DNA Bindeprotein	-3,6
At2g29470	Glutathion S-Transferase	3,0
<i>At2g14610</i>	<i>PR-1-ähnliches Protein; Pathogenese-verwandt</i>	19,8
At2g44840	Pathogen responsives Protein AtERF13	-3,4
<i>At2g46400</i>	<i>putatives WRKY-typisches DNA Bindeprotein</i>	-5,8
At3g04670	gleich dem Elicitor Antwortelement Bindeprotein WRKY3	-2,5
At3g16770	Pathogen-responsives Protein AtEBP/RAP2.3	2,3
At3g57260	Beta-1,3-Glukanase 2 (PR-2)	4,7
At3g04720	Precursor des Hevein-ähnlichen Proteins (PR-4)	2,8
At4g18170	SPF1, WRKY Proteinfamilie	-2,9
At4g12880	blaues Kupfer-bindendes Protein	-2,7
At4g39410	putatives WRKY Protein	-2,0
At1g60270	Beta-Glukosidase	-3,5
At5g13080	WRKY-ähnliches Protein	3,8
At5g44420	pflanzliches Defensin Protein (PDF1.2)	3,5
^a Durchschnittliche Kanalintensität des Signals der Probe der <i>arr2</i> -Nullmutante bezogen zur Probe des Wildtyps; <i>kursiv dargestellte Gene</i> ≥ 5-fach veränderte Regulation; positive Werte zeigen Induktion und negative Werte Reprimierung		

Die Ergebnisse des Mikroarrays wurden für selektierte Gene mittels semiquantitativer RT-PCR verifiziert (Abb. 3-19). Auch hier zeigte sich in den Pflanzen der *arr2*-Nullmutante eine Akkumulation der Transkripte des pflanzlichen Defensin Proteins *PDF1.2* und des *PR1*-ähnlichem Gen (Abb. 3-19). Die Transkripte von *PDF1.2* zeigten ebenfalls eine besonders starke Akkumulation in der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-19). Die Transkriptmenge des Faktors 1 des Ethylenbindenden Element *ERF1* war in der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp in der RT-PCR leicht herunterreguliert (Abb. 3-19).

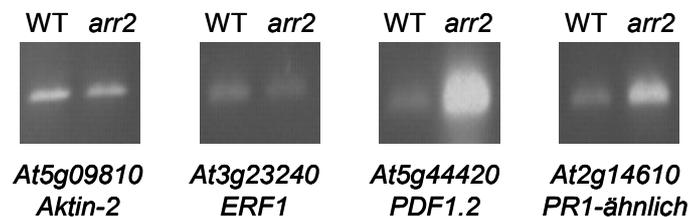


Abb. 3-19: Expressionanalyse der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps Ler: Rosettenblätter von jeweils vier unabhängig gewachsenen, 30 Tage alten Pflanzen wurden gemischt, um anschließend die Gesamt-RNA zu extrahieren, die das Ausgangsmaterial einer RT-PCR-Analyse darstellte (2.2.3.3.3 und 2.2.3.1.1). Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 μ L und mit optimierter Zyklanzahl (Z) für die spezifischen Primerpaare durchgeführt: *Aktin-2* \rightarrow 28 Z, *ERF1* \rightarrow 33 Z, *PDF1.2* \rightarrow 37 Z, *PR1*-ähnlich \rightarrow 32 Z. Eine Anlagerungstemperatur von 58°C wurde für die Primer von *Aktin-2*, *ERF1* und *PDF1.2* gewählt. Die Primer für das *PR1*-ähnliche Gen benötigten eine Anlagerungstemperatur von 50°C. Die PCR-Produkte wurden in einem Ethidiumbromid-gefärbten 2,5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Bestrahlung fotografiert. Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge des *Aktin-2*.

Die Ergebnisse der RT-PCR bestätigen die des Mikroarrays. Die Zusammengehörigkeit der signifikant verändert regulierten Genen in mehreren funktionellen Gruppen führt zur Vermutung, dass *ARR2* in *Arabidopsis* eine Rolle in der Integration von verschiedenen Signaltransduktionswegen, insbesondere der Stressantwort einnimmt.

3.5 Die Aktivität von ARR2 wird über die Aspartat-Phosphorylierung an der Aminosäureposition 80 reguliert

Im Zweikomponentensystem führt ein Aminosäureaustausch von dem hochkonservierten, phosphorylierbaren Aspartat zu Glutamat innerhalb der Receiverdomäne von Responseregulatoren in der Regel zum Verlust der Phosphorylierung (Stock et al. 2000). Für ARR2 konnte mit Phosphorylierungs-Experimenten die für prokaryotische Responseregulatoren typische Aspartat-Phosphorylierung der Aminosäure 80 (Asp80) des Receivermoduls *in vitro* gezeigt werden (Lohrmann, 2001; Hass et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte die funktionelle Relevanz der Phosphorylierung des Asp80 bezüglich der ARR2-Aktivität untersucht werden, in der Aspartat zu Glutamat an der Position 80 (ARR2^{D80E}) ausgetauscht war.

3.5.1 Charakterisierung der Aminosäuresubstitutionsmutante ARR2^{D80E}

Arabidopsis-Pflanzen, die ARR2^{D80E} unter der Kontrolle des konstitutiven viralen 35S-Promotors (ARR2^{D80E}-ox) exprimierten zeigten pleiotrope phänotypische Veränderungen, wie extreme Veränderungen der Blattform und eine reduzierte Blattrosette (Abb. 3-20; Hass et al. 2004b). Die starken Wachstums- und Entwicklungsstörungen resultierten vermutlich durch Störungen des primären vegetativen Meristems. Weiterhin erreichten ca. 50% der Primärtransformanten von ARR2^{D80E}-ox nicht die generative Phase (Hummel, 2002; Hass et al. 2004). *Arabidopsis*-Pflanzen, die ARR2^{D80E} unter der Kontrolle des konstitutiven, viralen 35S-Promotors (ARR2^{D80E}-ox) exprimierten zeigten pleiotrope phänotypische Veränderungen, wie extreme Veränderungen der Blattform mit eingerollten Blatträndern und eine reduzierte Blattrosette (Abb. 3-20). Die starken Wachstums- und Entwicklungsstörungen resultierten vermutlich durch Störungen des primären vegetativen Meristems. Weiterhin erreichten ca. 50% der Primärtransformanten von ARR2^{D80E}-ox nicht die generative Phase (Hummel, 2002; Hass et al. 2004).

In dieser Arbeit sollte in physiologischen und molekularbiologischen Analysen die funktionelle Relevanz der konservierten Phosphorylierungsstelle für die Funktion von ARR2 mittels Pflanzen der ARR2^{D80E}-ox-Linie weiter charakterisiert werden.

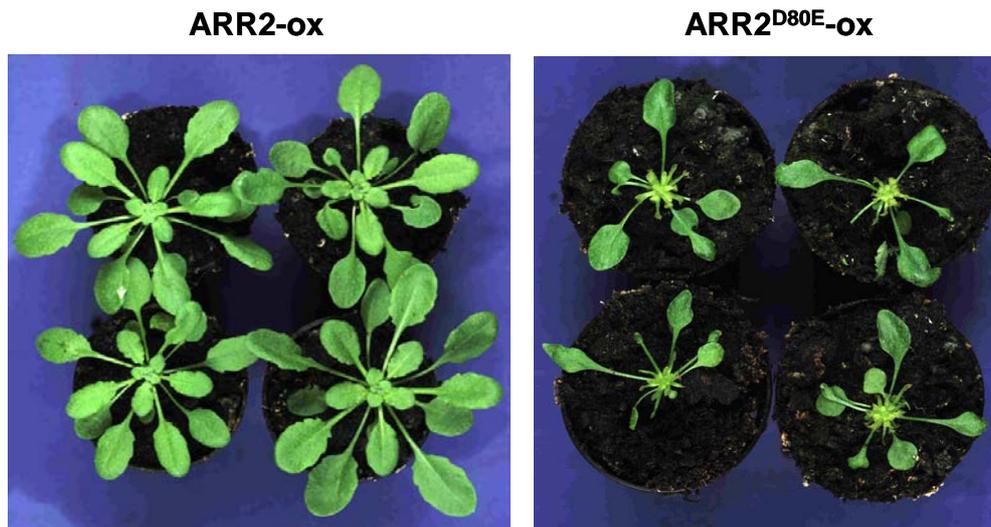


Abb. 3-20: Phänotyp ARR2D80E-überexprimierender Linien (ARR2^{D80E}-ox) im Vergleich zu Wildtyp ARR2-überexprimierenden (ARR2-ox) Pflanzen: Die Pflanzen wurden für 30 Tage unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) angezogen.

In dieser Arbeit sollte in physiologischen und molekularbiologischen Analysen die funktionelle Relevanz der konservierten Phosphorylierungsstelle für die Funktion von ARR2 mittels Pflanzen der ARR2^{D80E}-ox-Linie weiter charakterisiert werden.

3.5.1.1 Analyse der Hypokotyllängen von ARR2^{D80E}-überexprimierenden Keimlingen unter exogener Hormonapplikation

Wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben führt das Fehlen des funktionellen ARR2 zu einer Veränderung in der Ethylenantwort. Daraus ergab sich die naheliegende Frage, ob die Hormonantwort von *Arabidopsis*-Pflanzen ARR2^{D80E}-ox-Linie ebenfalls beeinträchtigt und die Funktion von ARR2 somit phosphorylierungsabhängig ist. Dafür wurden die Hypokotyllängen von Dunkel-inkubierten Keimlingen des Wildtyps Col, der Ethylen-überproduzierenden 1-Mutante *eto1-1* (*ethylene overproducer 1*), der Ethylen-Signaltransduktionsmutante *ctr1-8* (*constitutive triple response1*) und von ARR2^{D80E}-ox unter Applikation der Ethylenbiosynthesevorstufe ACC und dem Ethylenbiosyntheseinhibitor Aminoethoxyvinylglycin (AVG) analysiert. Die Wildtypkeimlinge entwickelten beim Wachstum auf Wasser einen etiolierten Phänotyp (Abb. 3-21, Col). Eine Applikation von 10 mM AVG resultierte in noch längeren Hypokotyle (Abb. 3-21, Col). Im Gegensatz dazu induzierte eine Zugabe von 50 µM ACC die

Symptome der Triple Response: ein stark verkürztes und verdicktes Hypokotyl und eine Krümmung des Hypokotylhakens (Abb. 3-21, Col). *eto-1-1*-Keimlinge zeigten auch ohne Zugabe von ACC eine Triple Response (Abb. 3-21, *eto1-1*). Bei Anzucht der Keimlinge auf ACC, konnte eine noch stärkere Ausprägung der Triple Response beobachtet werden (Abb. 3-21, *eto1-1*). Das Wachstum auf AVG hingegen führte auch bei *eto1-1* zu etiolierten Keimlingen (Abb. 3-21, *eto1-1*).

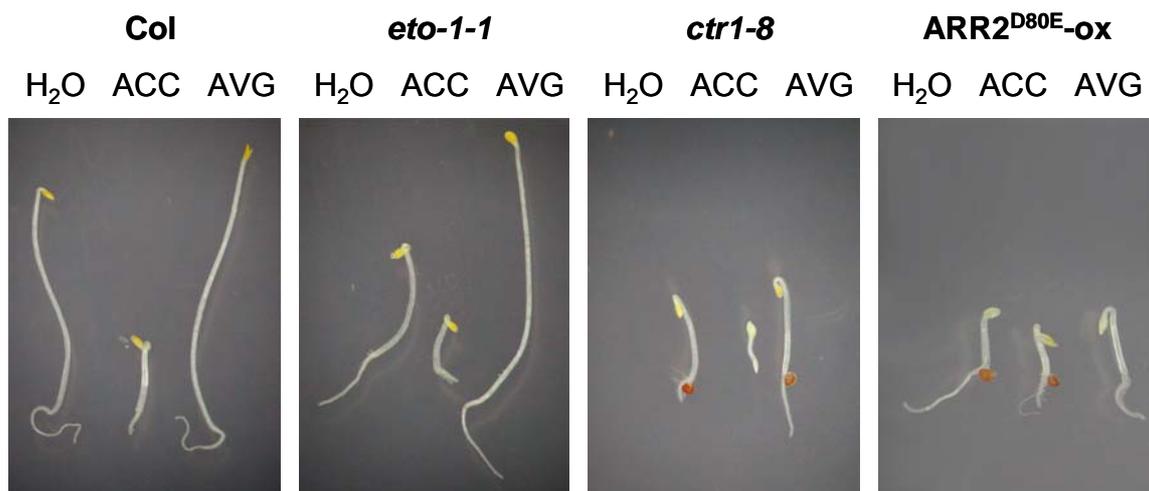


Abb. 3-21: Analyse der Hypokotyllängen von *Arabidopsis*-Keimlingen unter Exposition der Ethylenbiosynthesevorstufe Amino (ACC) und des Ethylenbiosyntheseinhibitors Aminoethoxyvinylglycin (AVG): Es wurden Keimlinge des Wildtyps Columbia (Col), eines Ethylenüberexprimierers *eto-1-1* (*ethylene overproducer*), der Ethylensignaltransduktionsmutante *ctr1-8* (*constitutive triple response*) und der ARR2^{D80E}-ox-Linie analysiert. Die Keimlinge wurden auf H₂O, 50 µM ACC oder 10 mM AVG nach Stratifikation für vier Tage im Dunkeln angezogen.

ctr1-8-Keimlinge hingegen zeigten bei allen drei verschiedenen Behandlungen eine konstitutiven Triple Response, wobei die Hypokotyllänge im ACC-Ansatz stärker reprimiert waren als bei Anzucht auf H₂O (Abb. 3-21, *ctr1-8*). Die ARR2^{D80E}-ox Keimlinge entwickelten verkürzte Hypokotyle auch ohne Zugabe von ACC (Abb. 3-21, ARR2^{D80E}-ox). Eine Behandlung der Keimlinge der ARR2^{D80E}-ox Linie mit ACC ergab keine signifikant stärkere Reaktion (Abb. 3-21, ARR2^{D80E}-ox). Der Zusatz von 10 µM AVG war nicht in der Lage die Triple Response der ARR2^{D80E}-ox Keimlinge zu supprimieren (Abb. 3-21, ARR2^{D80E}-ox). Es handelte sich also auch hier um eine konstitutive Triple Response Das Hypokotyllängenwachstum der Aminosäuresubstitutionslinie ARR2^{D80E}-ox war ähnlich wie das der Ethylen-Signaltransduktionsmutante *ctr1-8* und gegensätzlich zur Reaktion von Keimlingen des

Wildtyps und des Ethylen-Überexprimierers *eto1-1*, welche durch die Inhibierung der Ethylenbiosynthese keine Triple Response zeigten (Abb. 3-21). Der identifizierte Phänotyp von $ARR2^{D80E}$ -ox Keimlingen war also nicht ein Folge einer verstärkten Ethylenproduktion.

Mit diesen Ergebnissen kann eine Funktion von ARR2 und $ARR2^{D80E}$ stromabwärts in der Ethylen-Signaltransduktion vermutet werden.

3.5.1.2 Expressionsanalyse von $ARR2^{D80E}$ -überexprimierenden Pflanzen

Eine weitere Mikroarray-Analyse diente der Aufklärung des Transkriptmusters von $ARR2^{D80E}$ -ox-Pflanzen (2.2.3.3.4 und 3.4.3.1), welche den im Kapitel 3.5.1 beschriebenen, stark pleiotrophen Phänotyp zeigten. Pflanzen, die das wildtypische ARR2 unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors ($ARR2$ -ox) exprimierten dienten als Kontrollpflanzen. Es wurden die Transkripte von Pflanzen der $ARR2^{D80E}$ -ox- und $ARR2$ -ox-Linien verglichen. Die transgenen Pflanzen exprimierten *ARR2* oder $ARR2^{D80E}$ im gleichen Ausmaß (Abb. 3-22).

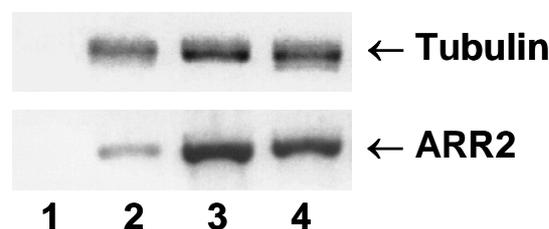


Abb. 3-22: Transkriptmengen von *Arabidopsis*-Keimlingen: Es wurde Gesamt-RNA aus rosettenblättern 50 Tage alter Pflanzen des Wildtyps Col (2), der $ARR2$ -ox (3) und der $ARR2^{D80E}$ -ox (4) extrahiert und in einer RT-PCR-Analyse als Matrize verwendet (2.2.3.3.3 und 2.2.3.1.1). In Spalte 1 wurde eine Kontroll-PCR ohne reverse Transkription aufgetragen. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 μ L und mit einer Anlagerungstemperatur von 58°C, spezifischen Primerpaaren für Tubulin und ARR2 und 28 Zyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem Ethidiumbromid-gefärbten 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Bestrahlung fotografiert.

Nach Normalisierung und statistischer Auswertung der Mikroarray-Analyse von Pflanzen der $ARR2^{D80E}$ -ox im Vergleich zu $ARR2$ -ox konnten ca. 1.500 Gene identifiziert werden (2.2.3.3.4). Im Vergleich von $ARR2^{D80E}$ -ox mit $ARR2$ -ox hatten 37% der verändert regulierten Gene keine funktionelle Annotierung. Die Gruppen der verändert regulierten Gene ähnelten denen der vergleichenden Mikroarray-Analyse *arr2*-Nullmutante mit dem Wildtyp (3.4.3.1). Die Anzahl der besonders auffällig

verändert regulierten Genen in 21 funktionellen Gruppen war hier jedoch erheblich größer als bei der vergleichenden Mikroarray-Analyse der *arr2*-Nullmutante mit dem Wildtyp (Abb. 3-18 und Abb. 3-23).

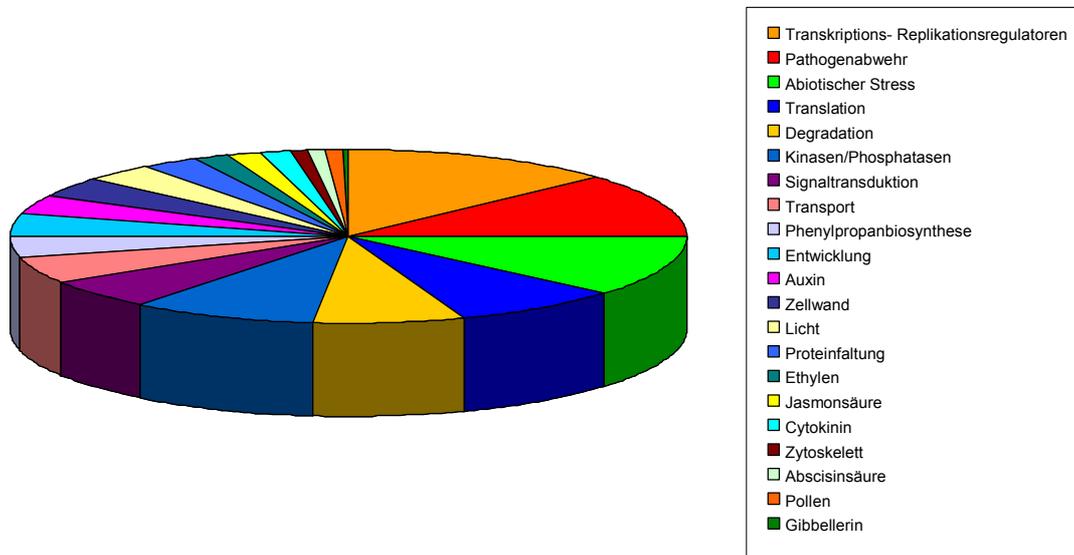


Abb. 3-23: Vergleichende Mikroarray-Analyse von *Arabidopsis*-Pflanzen der $ARR2^{D80E}$ -ox zu $ARR2$ -ox-Linien: Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von jeweils vier unabhängig gewachsenen, 30 Tage alten Pflanzen gemischt, extrahiert und der Mikroarray-Analyse unterzogen. Die Hybridisierung erfolgte mit dem Affimetrix Genome Genechip (ca. 26370 *Arabidopsis* Gene; Zhu, 2003). Dargestellt sind die 21 besonders auffälligen Gruppen fehlregulierter Transkripte, wobei die nicht bekannten und hypothetischen Gene nicht dargestellt sind.

Im Vergleich von $ARR2^{D80E}$ -ox mit $ARR2$ -ox waren von der Deregelung folgende Gene betroffen: 51 Gene der Signaltransduktion verschiedener Phytohormone (Tab. 4 und Anhang) und 21 bzw. 62 Gene mit einer Funktion in der Signaltransduktion biotischer und abiotischer Stressantworten (Tab. 5 und Anhang, CD). Zusätzlich waren 18 Gene der Lichtsignaltransduktion in ihrer Expression verändert beispielsweise das Substrat 1 der Phytochromkinase und HY5 (PKS1: At1g14280 und HY5: At5g11260; Anhang CD). Es waren 39 bzw. 16 Gene der Proteindegradation und -faltung, 22 Gene der Entwicklung, sowie der 71 Gene der Replikation und Transkription und 43 Gene der Translation von einer Deregelation betroffen (Abb. 3-23 und Anhang, CD). Des Weiteren konnten im Vergleich von $ARR2^{D80E}$ -ox mit $ARR2$ -ox 36 Transkripte verschiedener Kinasen und 30 verschiedene der allgemeinen Signaltransduktion als verändert reguliert detektiert werden (Abb. 3-23 und Anhang, CD). Besonders auffällig waren die Änderung der Transkriptmengen solcher Gene, die normalerweise durch Behandlungen mit Auxin (z.B. Aux/IAA Gene), Cytokinin (z.B. Cytokininoxidase Gene) und Ethylen (z.B. EREBP Gene) reguliert werden (Tab. 4).

Tab. 4: Hormon-regulierte Gene der vergleichenden Transkriptomanalyse von Pflanzen der ARR2^{D80E}-ox im Vergleich zu der ARR2-ox zeigten eine veränderte Expression

AGI Nr.	Putative Funktion	Fache Änderung ^a
Ascisinsäure (ABA) verwandt		
At5g59220	ABA induzierte Proteinphosphatase (PP2C)	6,4
Auxin verwandt		
At1g04250	Auxin induziertes Protein	2,7
At1g19840	Auxin induziertes Protein	3,6
At1g23080	Auxin Transportprotein	-2,6
At1g29440	Auxin induziertes Protein	-3,0
At1g75580	Auxin induziertes Protein	3,9
At1g80390	Auxin responsives Protein IAA2	-3,6
At2g21210	Auxin reguliertes Protein	-2,6
At4g27260	GH3 ähnliches Protein	2,8
At4g34750	Auxin reguliertes Gen	3,3
At4g34810	kleine Auxin up RNA (SAUR-AC1)	5,7
At4g37390	Auxin responsives GH3 ähnliches Protein	5,0
At4g38840	Auxin induziertes Protein	-2,9
At4g38860	Auxin induziertes Protein	-2,4
At5g13320	Auxin-responsive protein	6,2
At5g18010	Auxin induziertes Protein	-3,2
At5g18050	Auxin induziertes Protein	-4,5
At5g18080	Auxin induziertes Protein	-3,2
Cytokinin verwandt		
<i>At1g19050</i>	<i>Zwei-Komponenten Responseregulator (ARR7)</i>	2,0
<i>At1g74890</i>	<i>Zwei-Komponenten Responseregulator (ARR15)</i>	3,8
<i>At2g07440</i>	<i>Zwei-Komponenten Responseregulator (ARR24)</i>	2,6
<i>At2g40670</i>	<i>Zwei-Komponenten Responseregulator (ARR16)</i>	10,7
<i>At2g41310</i>	<i>Zwei-Komponenten Responseregulator (ARR8)</i>	2,4
<i>At3g48100</i>	<i>Zwei-Komponenten Responseregulator (ARR5)</i>	9,2
<i>At3g56380</i>	<i>Zwei-Komponenten Responseregulator (ARR4)</i>	6,0
At5g56970	Cytokinin-Oxidase	14,1
At3g56400	WRKY-Typ DNA bindendes Protein 4 (WRKY4)	4,0
At5g13080	WRKY-Typ DNA bindendes Protein	6,1
At5g14930	disease resistance protein EDS1	3,0
At5g26170	WRKY-Typ DNA bindendes Protein 1 (WRKY1)	3,3
At5g44420	antifungales Protein (PDF1.2)	-2,6
^a Durchschnittliche Kanalintensität: Signals der Probe ARR2 ^{D80E} -ox bezogen zur Probe ARR2-ox die <i>kursiv</i> dargestellten Gene sind Elemente des Zwei-Komponentensystems; positive Werte zeigen Induktion und negative Werte Reprimierung		

Fortsetzung von Tab. 4: Hormon-regulierte Gene der vergleichenden Transkriptomanalyse von Pflanzen der ARR2^{D80E}-ox im Vergleich zu der ARR2-ox zeigten eine veränderte Expression

AGI Nr.	Putative Funktion	Fache Änderung^a
Ethylen verwandt		
At3g12500	basische Chitinase	2,7
At3g16050	Ethylen induzierbares Protein	2,5
At3g23150	Ethylenrezeptor (ETR2)	2,4
At3g23240	Ethylenresponse Faktor 1 (ERF1)	3,9
At3g50260	EREBP-3 ähnlich	2,9
At4g23340	ACC Oxidase	-2,6
At4g26200	ACC Synthase	2,4
At5g20400	Ethylen formende Enzymdioxygenase	2,9
At5g43410	EREBP-3 ähnlich	-3,1
Gibberellin verwandt		
At1g22690	GAST1 ähnliches Protein	-4,5
Jasmonsäure verwandt		
At1g55020	Lipoxygenase	8,8
At3g16400	Jasmonsäure induzierbares Protein	6,0
At3g16420	Jasmonsäure induzierbares Protein (Lectin)	5,5
At3g16430	Jasmonsäure induzierbares Protein	5,1
At3g16450	Jasmonsäure induzierbares Protein (Lectin)	31,0
At3g16460	Jasmonsäure induzierbares Protein (Lectin)	11,4
At5g48180)	Jasmonsäure induzierbares Protein	3,0
^a Durchschnittliche Kanalintensität: Signals der Probe ARR2 ^{D80E} -ox bezogen zur Probe ARR2-ox die <i>kursiv</i> dargestellten Gene sind Elemente des Zwei-Komponentensystems; positive Werte zeigen Induktion und negative Werte Reprimierung		

Tab. 5: Veränderte Expression von Komponenten der Stressantwort der Pflanze der ARR2^{D80E}-ox im Vergleich zu der ARR2-ox

AGI Nr.	Putative Funktion	Fache Änderung ^a
Abiotischer Stress		
At1g67970	Hitzeschocktranskriptionsfaktor (HSF)	2,7
At2g17820	<i>Histidinkinase (AtHK1)</i>	2,2
At2g46140	Desikkation verwandtes Protein	3,1
At3g53800	Hsp70 bindendes Protein HspBP1	-2,7
At4g09350	Hitzeschockprotein (HSP)	-3,0
At4g16660	Hitzeschockprotein (HSP)	2,9
At4g18880	Hitzeschocktranskriptionsfaktor (HSF)	3,2
At4g24190	Hitzeschockprotein 90 (HSP90)	2,8
At4g25100	Superoxid-Dismutase	-2,7
At4g36680	Salz induzierbares Protein	2,3
At4g36990	Hitzeschocktranskriptionsfaktor 4 (HSF4)	6,2
At5g59610	Hitzeschockprotein 40 (HSP40)	-3,1
At5g05410	DREB2A	3,8
At5g60950	Phytochelatin-Synthetase	3,5
Pathogenabwehr		
At1g05850	Klasse I Chitinase	-3,3
At1g65390	Pathogenresistenz Protein RPS4	-4,5
At1g72930	flax Rost Resistenzprotein	3,3
At1g73260	Trypsininhibitor	13,2
At2g1461	PR1-ähnliches Protein	6,9
At2g21900	WRKY-type DNA binding protein	3,1
At2g26010	antifungales Protein	-2,6
At2g40740	WRKY-Typ DNA bindendes Protein	3,2
At2g43570	Endochitinase	13,4
At2g46400	WRKY-Typ DNA bindendes protein	5,4
At3g01970	WRKY-Typ DNA bindendes protein	9,0
At3g48720	Hypersensitivität verwandtes hsr201 Protein	-2,9
At3g57260	Beta-1,3-Glukanase 2 (PR-2)	6,8
At3g55470	Elicitor responsives Protein (FIERG2)	2,6
At3g56400	WRKY4	4,0
At5g13330	AP2 Domänen Protein	39
At5g13080	WRKY-Typ DNA bindendes Protein	6,1
At5g14930	Pathogenresistenz Protein EDS1	3,0
At5g26170	WRKY1	3,3
At5g44420	antifungales Protein (PDF1.2)	-2,6
At5g46350	WRKY-Typ DNA bindendes Protein	2,7
At5g62740	hypersensitiv induziertes Responseprotein HIR3	3,2
^a Durchschnittliche Kanalintensität: Signals der Probe ARR2 ^{D80E} -ox bezogen zur Probe ARR2-ox das <i>kursiv</i> dargestellte Gen ist ein Element des Zwei-Komponentensystems; positive Werte zeigen Induktion und negative Werte Reprimierung		

Außerdem waren Gene hochreguliert, die dem Zwei-Komponentensystem zugeordnet werden. Dies betraf z.B. die Hybridkinase AtHK1, aber im besonderen Maß Responseregulatoren des Typs A beispielsweise ARR16, das mehr als zehnfach höher reguliert war (Tab. 4 und Tab. 5). Bemerkenswerterweise waren mit fast 60% ein hoher Prozentsatz der Typ A Responseregulatoren (sieben von zwölf) in der ARR2^{D80E}-ox im Vergleich zu ARR2-ox verstärkt exprimiert.

Diese Analyse zeigte, dass der Asp80-zu-Glu Austausch in der Reverteindomäne eine dominant-aktive Form von ARR2 kreiert, welche bei den transgenen Pflanzen Reaktionen hervorruft, die teilweise unabhängig von exogen applizierten Hormonen sind.

Die Ergebnisse des Mikroarrays wurden für selektierte Gene mittels semiquantitativer RT-PCR verifiziert (Abb. 3-24).

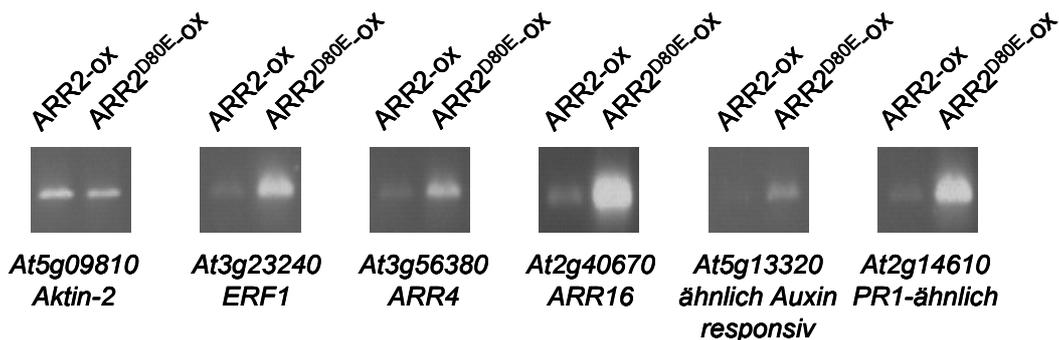


Abb. 3-24: Expressionanalyse einer ARR2-Überexpressionslinie (ARR2-ox) und einer ARR2^{D80E}-Überexpressionslinie (ARR2^{D80E}-ox): Vergleich des Expressionsmusters mittels RT-PCR der ARR2-ox (linke Bande) mit der ARR2^{D80E}-ox (rechte Bande). Rosettenblätter von jeweils vier unabhängig gewachsenen, dreißig Tage alten Pflanzen wurde gemischt und daraus wurde Gesamt-RNA extrahiert, die als Matrize für die RT-PCR diente (2.2.3.3.3 und 2.2.3.1.1). Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µL mit optimierter Zyklenanzahl (Z) und Anlagerungstemperaturen für die spezifischen Primerpaare durchgeführt: *Aktin-2* → 28 Z, *ERF1* → 33 Z, *ARR4* → 28 Z, *ARR16* → 30 Z, *Auxin-responsiv*-ähnlich → 32 Z, *PR1*-ähnlich → 32 Z. Eine Anlagerungstemperatur von 58°C wurde für die Amplifikation von *Aktin-2*, *ERF1*, *ARR4* und von 50°C für *ARR16* und das *PR1*-ähnliche Gen gewählt. *Aktin-2* diente als konstitutiv exprimierter Mengenstandard. Die PCR-Produkte wurden in einem Ethidiumbromid-gefärbten 2,5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Bestrahlung fotografiert.

Die Akkumulation der Transkripte von Pflanzen der ARR2^{D80E}-ox-Linie war bei allen untersuchten Genen stärker als die der ARR2-ox-Linie (Abb. 3-24), wobei die Transkriptmenge bei *ARR16*, dem *PR1*-ähnlichem Gen und *ERF1* besonders erhöht

war. Die Transkriptmenge der ARR2-ox-Linie befand sich bei allen untersuchten Genen auf einem niedrigem Niveau (Abb. 3-24). Damit können die Expressionsdaten der RT-PCR die Mikroarray-Ergebnisse bestätigen.

Diese Resultate der Expressionsanalysen der ARR2^{D80E}-ox-Linie zeigten eine große Anzahl an verändert regulierten Genen aus allen Bereichen der Pflanzenentwicklung und Signaltransduktion. Das lässt vermuten, dass der Responseregulator ARR2 einen Verknüpfungspunkt von verschiedenen Signalwegen in der Pflanze darstellt.

3.5.1.3 Lokalisation von ARR2, ARR2^{D80E} und ARR2^{D80N}

Transkriptionsfaktoren liegen in der Regel in niedrigen Konzentrationen in der Zelle vor und können effektiv und schnell durch Aktivierung eine Genexpression induzieren. Durch Degradation und negative Rückkopplungsmechanismen wird die Aktivität von Transkriptionsfaktoren streng kontrolliert. Die Regulation der Aktivität von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren wird durch die subzelluläre Lokalisation, die Bindung an DNA und die Transaktivität moduliert. Auch ARR2 als Transkriptionsfaktor könnte solchen Regulationsmechanismen unterliegen.

In biochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindungsaktivität von ARR2 nicht durch Phosphorylierung reguliert wird, da ARR2 und die Aspartatsubstitutionsmutante ARR2^{D80E} vergleichbare Affinität zu DNA haben (Lohrmann, 2001; Hass et al., 2004). Die Phosphorylierung von ARR2 spielt in der Regulation der DNA-Bindung vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Zur Studie der Phosphorylierungs-abhängigen Regulation der subzelluläre Verteilung von ARR2 wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die funktionelles ARR2-GFP, ARR2^{D80E}-GFP und ARR2^{D80N}-GFP unter dem konstitutiven viralen 35S-Promotor exprimierten, analysiert (Abb. 3-25). Da die Aspartatsubstitutionsmutanten ARR2^{D80E} und ARR2^{D80N} nicht mehr am konservierten Aspartat phosphoryliert werden können, ist es möglich durch Fluoreszenzstudien der transgenen Pflanzen die Frage zu beantworten, ob die Phosphorylierung die subzelluläre Verteilung von ARR2 beeinflusst.

Die GFP-markierten Pflanzen zeigten keinen Unterschied im Wachstum und der Entwicklung zu Pflanzen die ARR2, ARR2^{D80E} oder ARR2^{D80N} ohne das GFP-Fusionspeptid exprimieren (Hass et al., 2004b).

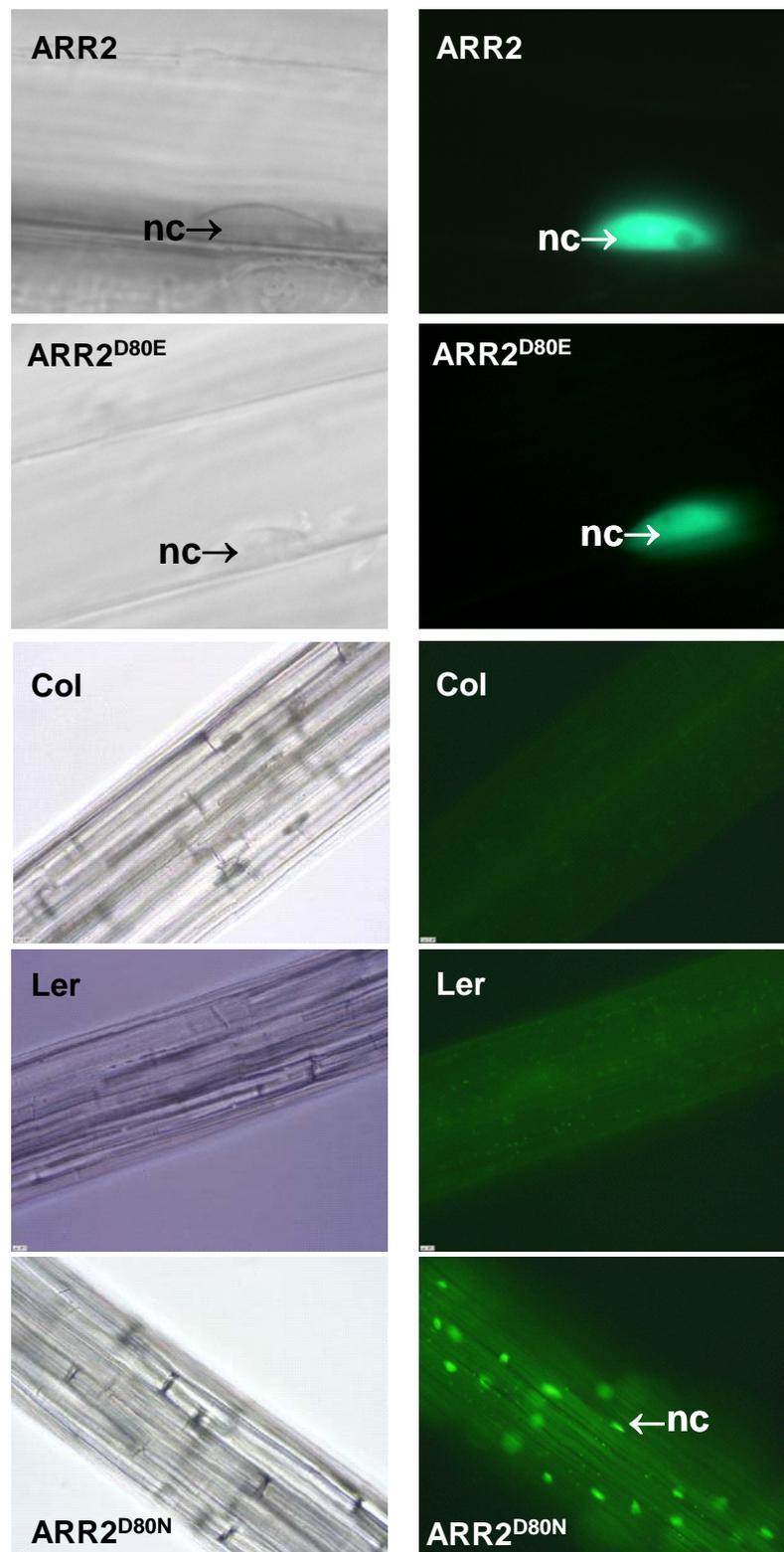


Abb. 3-25: Lokalisation von ARR2-GFP, ARR2^{D80E}-GFP und ARR2^{D80N}-GFP in *Arabidopsis*: Durchlicht- (links) und Fluoreszenzaufnahmen (rechts) von Hypokotylzellen der *Arabidopsis* - Keimlinge, die mittels Agrobakterien-Transformation stabil transformiert wurden (2.2.3.2.1-2.2.3.2.3); nc markiert den Nukleus.

Mikroskopische Analysen von Hypokotylzellen der transgenen GFP-markierten Pflanzen zeigten eine ausschließliche Kernlokalisierung von ARR2-GFP, ARR2^{D80E}-GFP und ARR2^{D80N}-GFP (Abb. 3-25). Dieses Ergebnis bestätigte transiente Expressionsexperimente in Petersilieprotoplasten und Zwiebelzellen bei denen eine ausschließliche Kernlokalisierung von ARR2, ARR2^{D80E} und ARR2^{D80N} beobachtet (Hummel, 2001). Diese deuten darauf hin, dass die Asp80-Phosphorylierung der Receiverdomäne von ARR2 keine veränderte subzelluläre Lokalisation induziert.

3.5.1.4 Transaktivierungs-Analyse von ARR2 und ARR2^{D80E}

Die DNA-Bindung (Lohrmann, 2001) sowie die subzellulären Lokalisation (3.5.5) von ARR2 werden nicht durch Phosphorylierung reguliert. Die Analysen von Pflanzen der ARR2^{D80E}-ox bewiesen aber eindeutig eine funktionelle Relevanz der Asp80-Phosphorylierung (3.5.1 – 3.5.3). Aus diesem Grund sollte analysiert werden, ob die Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität von ARR2 verändert. Die Untersuchung der Transaktivierungskapazität von ARR2 erfolgte mittels transienter Analyse in *Arabidopsis*-Protoplasten, die wie im Kapitel 3.4.1.1 beschrieben durchgeführt wurde. Die Protoplasten wurden entweder mit dem *ERF1::LUC*-Reportergenkonstrukts und der internen Kontrolle *UBQ10::GUS* zur Normalisierung und zusätzlich mit ARR2 sowie ARR2^{D80E} als Effektoren transformiert. Wie bereits in Abb. 3-13 dargestellt konnte im Kontrollansatz nur eine basale *ERF1::LUC* Reporterexpression detektiert werden (Abb. 3-26A, Kontrolle). Die zusätzliche Expression von ARR2 in diesem System erhöhte die Aktivität des *ERF1::LUC*-Reportergenkonstrukts um das 20-fache. Die Gegenwart von Ethylen reduziert die Aktivität von ARR2 auf die *ERF1*-Genexpression signifikant (3.4.1.1, Abb. 3-13 und Abb. 3-26A, ARR2). Die Anwesenheit von ARR2^{D80E} im Assay führte zu einer starken Reprimierung des *ERF1::LUC*-Reportergenkonstrukts (Abb. 3-26A, ARR2^{D80E}). Eine weitere Behandlung der Protoplasten mit Ethylen reduzierte die Expression von *ERF1::LUC* weiter (Abb. 3-26A, ARR2^{D80E}). Da die beobachtete Repression auf eine differenzielle Stabilität der eingesetzten Protein zurückzuführen sein konnte, wurden die Degradation von ARR2 und ARR2^{D80E} in den Protoplasten bestimmt. Die Proteinmenge wurde in Westernblotanalysen in einem Zeitraum von vier Stunden in Ab- und Anwesenheit von Ethylen verfolgt. Während die ARR2-Menge von Ethylen

nicht beeinflusst wird, scheint $ARR2^{D80E}$ etwas weniger stabil als $ARR2$ zu sein (Abb.3-26B).

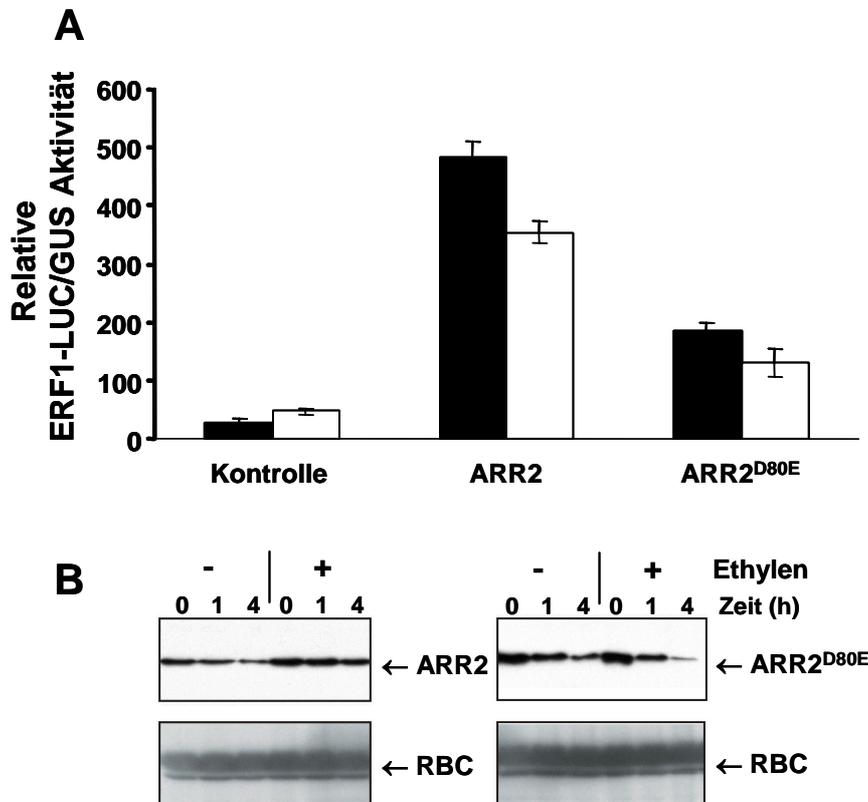


Abb. 3-26: Induktion des Ethylen responsiven Reporter-gen-Konstrukts $ERF1::LUC$ im transienten Mesophyllprotoplastenassay: *Arabidopsis*-Protoplasten der Linie Bensheim wurden mittels Polyethylenglycolmethode (Abel und Theologis, 1994; Hwang und Sheen, 2001) mit einem internen Kontrollkonstrukt $UBQ10::GUS$, einem $ERF1::LUC$ -Reporter-gen-Konstrukt und entweder mit $ARR2$, $ARR2^{D80E}$ oder nicht-funktionellen GFP (Negativkontrolle) als Effektoren transformiert. Die Luciferaseaktivität des Lysats der transformierten Protoplasten wurde durch die Glucuronidaseaktivität (GUS) zur Normalisierung geteilt. Die transformierten Protoplasten inkubierten mit (weißer Balken) oder ohne (schwarzer Balken) exogener Applikation von Ethylen für 6 h unter konstantem Weißlicht bei 23°C bevor sie geerntet wurden. Der Mittelwert der relativen LUC-Aktivität wurde aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten bestimmt. (B) Bestimmung der Proteinmenge von $ARR2$ und $ARR2^{D80E}$ in den *Arabidopsis*protoplasten mittels Western-Blot. Ribulosebisphosphat-carboxylase/Oxygenase (RBC) diente als Beladungskontrolle. Die erste Probe (Zeitpunkt 0) wurde 30 min nach der Protoplasten-Transformation entnommen. Der Nachweis der $ARR2$ -Derivate erfolgte mit einem HA-spezifischen Antikörper und für RBC mit einem spezifischen Antiserum.

Eine weitere Transktivierungs-Analyse wurde außerdem mit dem Cytokinin-induzierbaren $ARR6::LUC$ -Reporter-gen-Konstrukt durchgeführt. Auch hier führte die Anwesenheit von $ARR2$ zu einer Zunahme der Aktivität des $ARR6::LUC$ -Reporter-gen-Konstrukts, die durch exogene Applikation von Cytokinin noch weiter gesteigert werden konnte (Abb. 3-27, $ARR2$). Eine Expression von $ARR2^{D80E}$ induzierte eine signifikante, im Vergleich zu $ARR2$ dreifach stärkere Aktivität des

Reporters, die mit der von Wildtyp ARR2 bei exogener Applikation von Cytokinin vergleichbar war (Abb. 3-27, ARR2^{D80E}). Eine Cytokinin-Behandlung der ARR2^{D80E}-exprimierenden Protoplasten erhöhte die *ARR6::LUC*-Aktivität noch weiter (Abb. 3-27A, ARR2^{D80E}).

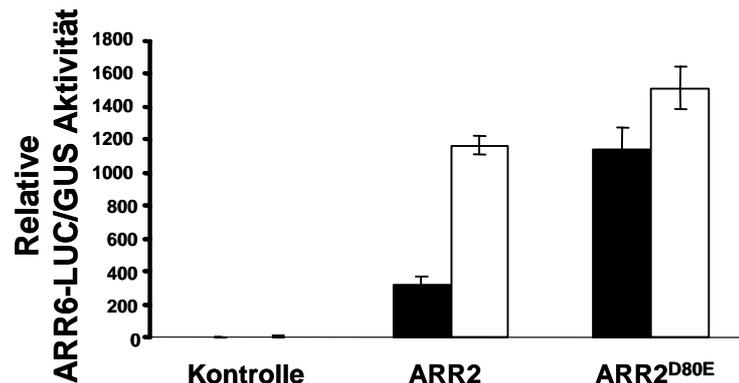


Abb. 3-27: Induktion des Cytokinin-responsiven Reportergens *ARR6::LUC* im transienten Mesophyllprotoplastenassay: *Arabidopsis*-Protoplasten der Linie Bensheim wurden mittels Polyethylenglycolmethode (Abel und Theologis, 1994; Hwang und Sheen, 2001) mit einem internen Kontrollkonstrukt *UBQ10::GUS*, einem *ARR6::LUC*-Reportergenkonstrukt und entweder mit HA-markierten *ARR2*, *ARR2^{D80E}* oder nicht-funktionellen *GFP* (Negativkontrolle) als Effektoren transformiert. Die Luciferaseaktivität des Lysats der transformierten Protoplasten wurde durch die Glucuronidaseaktivität (*GUS*) zur Normalisierung geteilt. In den Protoplasten wurde die *LUC*-Aktivität spezifisch durch trans-Zeatin induziert (Hwang und Sheen, 2001). Die Transformation bei einer Protoplastendichte von 2×10^4 mit $20 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA in verschiedener Kombination an Reporter-, Effektor und internen Kontrolle. Die transformierten Protoplasten inkubierten mit (weißer Balken) oder ohne (schwarzer Balken) exogener Applikation von trans-Zeatin für 6 h unter konstantem Weißlicht bei 23°C bevor sie geerntet wurden. Der Mittelwert der relativen *LUC*-Aktivität wurde aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Da intrazelluläre Lokalisation sowie die DNA-Bindeaktivität unverändert bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass die transkriptionelle Aktivität des Responseregulators *ARR2* durch die Phosphorylierung des Aspartat80 reguliert wird.

3.6 Funktion von Arabidopsis HPt-Proteinen für ARR2 und in einem Zwei-Komponentennetzwerk

Die *Arabidopsis* HPt-Proteine (AHP) vermitteln im Zwei-Komponentensystem den Phosphotransfer von der Hybridkinase zum Responseregulator. Um die Funktion der AHP-Proteine in der ARR2-vermittelten Signaltransduktion und deren Spezifität *in planta* zu analysieren, wurden RNAi-Linien (RNA interference) der AHP-Gene in *Arabidopsis thaliana* (RNAi-Linien) hergestellt.

Das Phänomen des RNAi wurde in Pflanzen, Tieren und Pilzen unabhängig voneinander beschrieben. Es handelt sich dabei um eine Regulation der Genaktivität über eine Verminderung der RNA-Menge, u. a. zur Unterdrückung von Transposons und RNA-Viren als Schutzmechanismus der Wirtsorganismen. Der RNAi-Grundmechanismus kann generell in zwei Schritte unterteilt werden, den Initiations- und den Effektorschritt. Während der Initiation wird eine lange doppelsträngige RNA von dem hochkonservierten Enzym Dicer bzw. einem Dicerhomolog der RNaseIII-Enzymfamilie unter ATP-Verbrauch in kurze Stücke zerlegt (small interfering RNA, siRNA), die eine Länge von ca. 21-25 Nukleotiden aufweisen. Die so entstandenen Fragmente der mRNA sind nun wahrscheinlich ein Substrat für den katalytischen Abbau durch Exoribonukleasen (Zamore et al., 2000).

RNAi wird heutzutage als Werkzeug zur Herstellung von Nullmutanten genutzt. Das Einbringen eines Transgens resultiert in einem Rückgang der Transkriptmenge sowohl des Transgens, wie auch des homologen endogenen Gens (*cosuppression*; Napoli et al., 1990). Bereits geringe Dosen der dsRNA reichen aus, einen dauerhaften und ausbreitenden Effekt zu bewirken (Fagard und Vaucheret, 2000).

Für die AHP-RNAi-Linien wurde eine 75 Basen lange Nukleotidsequenz synthetisiert, die in 25 Basen Identität zur cDNA der fünf AHP-cDNA-Sequenzen zeigte. Dieses RNAi-Konstrukt wurde in Sinn- und Gegensinn-Orientierung in den RNAi-Vektor pFGC5941 (Invitrogen) kloniert. Die Sinn- und Gegensinn-Positionen des Vektors sind durch eine Verbindungsregion voneinander getrennt, sodass bei der Replikation in der mRNA eine Haarnadelkonformation zwischen der Sinn- und der Gegensinnsequenz gebildet wurde. Somit konnte doppelsträngige RNA entstehen, welche RNAi induzierte und dann im optimalen Fall den Abbau der gesamten AHP-Transkripte zur Folge hat.

*Arabidopsis*pflanzen des Ökotyps Ler wurden mit Agrobakterien stabil transformiert und mittels der BASTA-Resistenz selektiert (2.2.3.2.1-2.2.3.2.3). Pflanzen der T2-Generation wurden phänotypisch charakterisiert.

Die RNAi-Linien (Abb. 3-28B: Ler-RI-4 und Ler-RI-5) zeigten eine starke Verzögerung des Wachstums und der Entwicklung mit einem späteren Blühzeitpunkt im Vergleich zu den Ler-Linien, die nur mit dem Leervektor transformiert wurden (Ler-L1-2 und Ler-L1-1). Dies deutet darauf hin, dass die Expression der AHP-Proteine in diesen Pflanzen vermindert ist, und diese Reduktion den Phänotyp verursacht. Dieses Ergebnis wird in naher Zukunft mit Real-Time-PCR verifiziert werden.

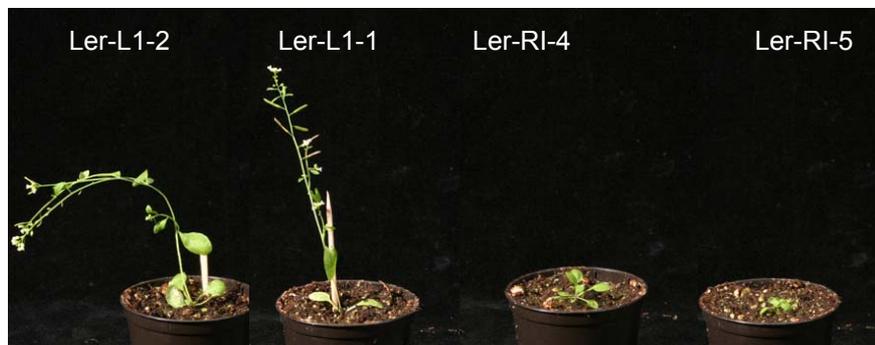


Abb. 3-28: Phänotypische Charakterisierung der AHP-RNAi-Linien: (A) T3-Generation von Pflanzen der *arr2*-Transposoninsertionslinie, die mit dem AHP-RNAi-Konstrukt (*arr2*-RI-1, *arr2*-RI-2, *arr2*-RII-1, *arr2*-RII-2 und *arr2*-RII-3) und dem Leervektor (*arr2*-L4 und *arr2*-L-2) transformiert wurden. (B) T2-Generation von Ler-Pflanzen, die mit dem AHP-RNAi-Konstrukt (Ler-RI-4 und Ler-RI-5) und dem Leervektor (Ler-L1-2 und Ler-L1-1) transformiert wurden.

Zurzeit erfolgt die Generation der T3-Linien. Homozygote RNAi-Linien der *AHP*-Gene eröffnen neue Perspektiven zur Analyse der Funktion von ARR2 im Zwei-Komponentensystem. Es wird davon ausgegangen, dass die physiologische und molekulare Analyse einer abgestuften Reihe des *AHP*-Funktionsverlustphänotyps eine schrittweise Annäherung der Funktion des Zwei-Komponentensystems im allgemeinen und des Responseregulators ARR2 im speziellen ermöglichen wird.

4 DISKUSSION

Das Zwei-Komponentensystem ist ein zentraler Mechanismus der Signaltransduktion in Prokaryoten. In den letzten Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen die Bedeutung des Zwei-Komponentensystems auch in höheren Pflanzen zeigen (Brandstatter und Kieber, 1998; Imamura et al., 1998; Lohrmann, 1998; D'Agostino und Kieber, 1999b; Lohrmann et al., 1999 und 2001; Schaller, 2000; Stock et al., 2000; Urao et al., 2000; Sweere et al., 2001). Insbesondere die Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms ermöglichte die Identifizierung der genannten Elemente des Zwei-Komponentensystems in dieser Modellpflanze, die dem Genom des prokaryotischen Plastidenvorläufers entstammen. Es ist denkbar, dass das Zwei-Komponentensystem in Pflanzen im Laufe der Evolution beibehalten bzw. erweitert wurde, um die Pflanze besser in die Lage zu versetzen, eine Vielfalt von exogenen und endogenen Stimuli besser zu verarbeiten (Wilmotte, 1994; Bleecker, 1999; Rodriguez et al., 1999; Schaller, 2000). Elemente des Zwei-Komponentensystems sind Responseregulatoren, von denen ARR2 alle Kriterien eines funktionellen Elements erfüllt (1.1.1). Über seine Funktion in *Arabidopsis* ist aber nur wenig bekannt. Lohrmann et al. (2001) zeigten, dass ARR2 in der Lage ist, Pollenspezifische Gene des mitochondrialen Atmungskomplex I in Hefe zu transaktivieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Einblicke in die Funktionsweise pflanzlicher Zwei-Komponentensysteme am Beispiel von ARR2 gewonnen werden. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Integration der bereits vorhandenen Information (Lohrmann et al., 2001) in bestehende Modelle der Hormonsignaltransduktion gelegt. Dazu wurden transgene Pflanzen charakterisiert sowie Phosphorylierungs-, Transaktivierungs- sowie Expressionsanalysen durchgeführt. Es wurde einerseits die Reaktion auf ein Fehlen und andererseits auf eine konstitutive Aktivierung von ARR2 analysiert. Dafür wurde eine Form von ARR2 verwendet, die eine Aminosäuresubstitution von Aspartat an Position 80 zu Glutamat (ARR2^{D80E}) beinhaltet. Begründet auf Beobachtungen in Bakterien bedingt der Aminosäureaustausch eine Konformationsänderung in der Struktur des ARR2, die eine Phosphorylierung nachstellt (gain of function; Stock et al., 2000). Die nachfolgend diskutierten Ergebnisse bestätigen, dass durch den Asp80-zu-Glu-Austausch eine dominant aktive Form von ARR2 kreiert worden war, welche

beispielsweise in transgenen Pflanzen Reaktionen hervorruft, die teilweise unabhängig von exogen applizierten Hormonen sind.

4.1 ARR2 ist ein Element der Cytokininsignaltransduktion

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Funktion und Bedeutung des Responseregulators ARR2 in der Hormonsignaltransduktion in *Arabidopsis*. Dazu wurden die *arr2*-Nullmutante und drei ARR2-Komplementationslinien, welche eine cDNA unter der expressionellen Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors tragen, analysiert.

Die *arr2*-Nullmutante zeigte eine zwergwüchsige Morphologie auf, welche an Mutanten mit einer gestörten Hormonantwort erinnert (Abb. 3-2), wie beispielsweise die Auxin-Mutante *aux1*, die Gibberillin-Mutanten *ga1-ga5* und die Brassinosteroid-Mutanten *dwf1-dwf8* (Kende und Zeevaart, 1997; Reid und Howell, 1995; Feldmann et al., 1989). Erste Hinweise auf eine Implikation von ARR2 in der Cytokininantwort zeigten Hwang und Sheen (2001) im transienten Transaktivierungsassay. Sie wiesen eine ARR2-induzierte Aktivierung eines Cytokinin-responsiven Zielgens nach. Werner et al. (2001) zeigten, dass *Arabidopsis*-Pflanzen mit verringertem Cytokininingehalt einen Zwergwuchs aufweisen, weil sie im Gegensatz zu Wildtyp-pflanzen nur einen Bruchteil an Sprosszellen bilden. Es war deshalb denkbar, dass die Regulierung der Cytokininantwort in der *arr2*-Nullmutante gestört ist, was zu Zwergwüchsigkeit führt. Die Analyse der Hypokotyllängen etiolierter Keimlinge bestätigte eine hyposensitive Reaktion gegenüber Cytokinin (3.2.1.2). Der Wildtyp Phänotyp konnte in den Komplementationslinien wieder hergestellt werden (3.3.1). Die physiologischen Experimente zur Charakterisierung der Funktion von ARR2 bestätigten eine Implikation in der Cytokininantwort in Keimlingen.

Die physiologischen Experimente wurden durch die vergleichende Expressionsanalyse der *arr2*-Nullmutante mit dem Wildtyp untermauert. Differenziell regulierte Gene sind putative Zielgene und geben Hinweise auf die mögliche molekulare Funktion von ARR2. Bei den Cytokinin-bezogenen Genen zeigte die Proteinkinase *cdc2* eine 2,4-fach reprimierte Expression (Tab. 2). Menges et al. (2002) konnte zeigen, dass exogenes Cytokinin die Zellzyklusgene *cdc2* und *CycD3* hochreguliert. Die gestörte Cytokininsignaltransduktion in der *arr2*-Nullmutante

könnte demnach ihre Ursache in der verminderten Transkriptakkumulation der Proteinkinase *CDC2* haben. Möglicherweise könnte *ARR2* über Cytokinin eine Funktion in der Regulierung von Zellzyklusgenen ausüben. Es wird vermutet, dass eine Regulierung von Cytokinin in der Differenzierung des Sprossapikalmeristems durch lokale Gradienten des Hormons oder in der unterschiedlichen Verteilung von verschiedenen Cytokinin-Metaboliten erfolgen könnte (Werner et al., 2001). Dabei wird für Cytokinin eine duale Funktion in der Kontrolle Sprossapikalmeristem-Proliferation vermutet (Werner et al., 2001). Einerseits könnte es benötigt werden, um den Zellteilungszyklus aufrecht zu erhalten und andererseits könnte es die Differenzierung von undifferenzierten Stammzellen fördern (Werner et al., 2001). Möglicherweise erfolgt der Aufbau eines Cytokiningradienten oder die unterschiedliche Verteilung der Cytokinin-Metaboliten durch Regulierung von *ARR2*. Die vergleichende Expressionsanalyse der *arr2*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp zeigte eine 2,9-fache Reprimierung einer Cytokinin-Oxidase (*CKK*; At4g29740; Tab. 2). Cytokinin-Oxidasen inaktivieren Cytokinine irreversibel, wobei vermutet wird, dass dieser katabolische Schritt eine wichtige Regulation der Cytokinin-Aktivität *in planta* darstellt (Eckardt, 2003). Die vergleichende Expressionsanalyse der *ARR2*^{D80E}-*ox*-Mutante mit der Pflanzen der *ARR2-ox*-Linie belegt außerdem eine 14,1-fach verstärkte Transkriptakkumulation einer weiteren Cytokinin-Oxidase (*CKK*; At5g56970; Tab.III). Werner et al. (2001) konnten durch die transgene konstitutive Expression von *CKK*-Genen in *Arabidopsis* einen geringeren Cytokiningehalt in diesen Pflanzen nachweisen. Der verminderte Abbau von Cytokinin durch diese Oxidase ließe ein erhöhtes Cytokininniveau in *arr2*-Nullmutanten erwarten. Die Diskrepanz zwischen der physiologischen Analyse in etiolierten Hypokotylen sowie Protoplasten gegenüber der Expressionsanalyse ist mit einer redundanten Funktion der Cytokinin-Oxidasen erklärbar. Es gibt sieben Cytokinin-Oxidasen in *Arabidopsis* und bei verminderter Funktion einer können eine oder mehrere andere Cytokinin-Oxidasen deren Funktion übernehmen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass *ARR2* in der Cytokinin-signaltransduktion zusätzliche Einflussmöglichkeiten zur Feinregulierung beispielsweise zum Auf- und Abbau von Cytokiningradienten oder deren Metabolite ausübt. So könnte es eine Aufgabe von *ARR2* sein, die hier reduziert exprimierte Cytokinin-Oxidase (*CKK*; At4g29740; Tab. 2) zu aktivieren, um einen Abbau von Cytokinin zu induzieren. Dadurch könnte eine über einen lokalen Bereich sich veränderte Cytokininkonzentration in Form eines Cytokiningradienten entstehen.

Auf diese Weise könnte ein Fehlen des Responseregulators ARR2 die Ursache für eine verminderte Transkriptmenge der Proteinkinase *cdc2* und der Cytokinin-Oxidase erklären. Die folgende Hypothese ist auch wahrscheinlich: Die Hyposensitivität der *arr2*-Nullmutante gegenüber Cytokinin resultiert in eine Hochregulierung der Cytokininbiosynthese. Die Pflanze steuert adaptiv mit einer verstärkten Expression von Cytokinin-Oxidasen dagegen, um das Cytokininniveau wieder abzusenken. Diese Hypothese könnte auch die hyposensitive Reaktion der verstärkten Lateralwurzelbildung der *arr2*-Nullmutante erklären (Abb. 3-3). Auxine und Cytokinine stimulieren Zellteilung und bestimmen in Abhängigkeit von der Kompetenz des Gewebes für diese Hormone das Zellschicksal während der Differenzierung (Kubo und Kakimoto, 2000). Aus diesem Grund wurde die Wirkung dieser beiden Hormone durch die Induktion von Kalli aus *Arabidopsis*-Hypokotylsegmenten im Detail untersucht. Hypokotylsegmente sind in der Lage empfindlich auf das Verhältnis dieser beiden Phytohormone zueinander zu reagieren (Kubo und Kakimoto, 2000). Die Kalluswachstumsanalyse deckte jedoch keine veränderten Reaktionen der *arr2*-Nullmutante durch exogene Auxin- und Cytokininapplikation auf und weist darauf hin, dass ARR2 in der Cytokinin-vermittelten Kallusinduktion keine Rolle spielt.

Die vergleichende Expressionsanalyse der *arr2*-Nullmutante und des Wildtyps zeigte bei dem Steroidsulfotransferase-ähnlichem Protein (Tab. 2, At5g07010), welches ähnlich zu dem primären Cytokinin-Antwortgen Steroidsulfotransferase 1 (*SST1*) ist, eine 4,9-fach reprimierte Expression. Es konnte aber keine Expressionsänderung bei weiteren schnell durch Cytokinin induzierten Genen, wie beispielsweise den Typ A Responseregulatoren, detektiert werden (Tab. 2). Entweder hat das Fehlen von ARR2 in Cytokinin unbehandelten Pflanzen nur einen geringen Einfluss auf die Expression von schnell Cytokinin-induzierten Genen, wie die Typ A-Responseregulatoren, oder die Veränderungen im Cytokininniveau sind zu gering, um sie im Mikroarray zu detektieren. Des Weiteren wäre es möglich, dass die Regulierung der Cytokininantwort durch posttranskriptionale Mechanismen reguliert und nur wenige Gene unter der direkten expressionellen Kontrolle von ARR2 stehen. Im Gegensatz dazu wurden in der vergleichenden Expressionsanalyse der ARR2^{D80E}-ox- mit den ARR2-ox-Pflanzen bei sieben ARR Typ A-Genen signifikante Unterschiede detektiert (3.5.1.2, Tab. 4). Das Fehlen einer Reprimierung der Typ A Responseregulatoren in *arr2*-Nullmutanten und die Induktion der Expression in den ARR2^{D80E}-ox-Linien weist darauf hin, dass die Typ A ARR Responseregulatoren eher

in einem Adaptationsmechanismus wirken als ein primäres Cytokininsignalereignis darstellen. Die Ergebnisse des Transaktivierungsassay mit dem *ARR6::LUC* als Reporter gen bestätigen eine ARR2-vermittelte Regulierung der Typ A Response-regulatoren (3.5.1.4). Eine Expression von ARR2^{D80E} in dem System induzierte eine Reporter genaktivität, die mit der von Wildtyp ARR2 unter exogener Applikation von Cytokinin in diesem System vergleichbar war (Abb. 3-27). Diese Reaktion lässt vermuten, dass ARR2^{D80E} in diesem Reaktionsansatz keiner Induktion durch Cytokinin benötigt, also konstitutiv aktiv ist. Eine zusätzliche Cytokininapplikation erhöht die Aktivität von *ARR6::LUC* noch weiter (3.5.1.4). Die zusätzliche Aktivitätssteigerung durch Cytokinin wird wahrscheinlich durch eine entsprechende parallele Regulierung des endogenen ARR2 bzw. des ARR2-paralogen ARR1 vermittelt (Sakai et al., 2001).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit durch physiologische und molekulare Experimente eine Funktion von ARR2 in der Cytokininsignaltransduktion nachgewiesen werden.

4.2 *arr2*-Nullmutanten zeigen eine veränderte Phytochrom A Signaltransduktion

Schon vor mehr als zehn Jahren wurden Publikationen veröffentlicht, die eine teilweise Verknüpfung von Cytokinin und Licht nahe legten (Chory et al. 1993, Su und Howell, 1995). Analysen an der *amp1*-Mutante (*altered meristem program*) zeigten einen sechsfach erhöhten endogenen Cytokininspiegel (Chaudhury et al. 1993; Chin-Atkins et al. 1996). Hou et al. (1993) identifizierte die *amp1*-Mutante als allelisch zu *cop2*. Eine detaillierte Untersuchung der *amp1*-Mutante zeigte, dass in der Mutante die Expression lichtregulierter Gene im Licht im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist (Chin-Atkins et al. 1996). In ARR4-überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen, geht eine erhöhte Photoresponsivität auf Rotlicht einher mit einer verringerten Reaktivität auf Cytokinin (Sweere, 2001). Diese Aspekte dienen als Grundlage auch nach einer Funktion von ARR2 in der Lichtsignaltransduktion zu suchen. In Bestrahlungsexperimenten unter Einsatz von Licht verschiedener Wellenlängen, zeigten die *arr2*-Nullmutanten eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Dunkelrotlicht (3.2.3.1, Abb. 3-8A). Zusätzliche Expressionsanalysen des Phytochrom A (*phyA*) Markergens Chalkonsynthese (*CHS*) zeigten eine reduzierte

Menge an Transkript im Vergleich zum Wildtyp (3.2.3.2, Abb. 3-9). Die Beobachtungen in der *arr2*-Nullmutante lassen auf eine spezifische Beeinträchtigung der phyA-vermittelten high irradiance reaction (HIR)-Signalantwort schließen. Diese physiologischen Ergebnisse werden durch die vergleichende Expressionsanalyse der ARR2^{D80E}-überexprimierenden Linie gestützt. Beispielsweise ist die Expression von PKS1, einem *in vitro* Substrat der phyA-Kinase, reprimiert (At1g14280, 3.5.1.2, Anhang CD) während HY5 (At5g11260, 3.5.1.2, Anhang CD), welches normalerweise durch Dunkelrotlicht aktiviertes phyA abgebaut wird, eine verstärkte Transkriptakkumulation zeigt. Die Gemeinsamkeit von phyA und ARR2 liegen in ihrer Funktion als Phosphoproteine. Phytochrom ist *in vivo* mit radioaktivem ³²P phosphorylierbar (Quail et al. 1978). Außerdem zeigten biochemische Studien, die lichtabhängige Phosphorylierung von Serinresten im phyA (Watson 2000). Ob phyA mit ARR2 oder anderen Typ B Responseregulatoren interagiert, ist bisher nicht getestet worden. Wie ARR2 in die HIR eingreift, liegt deshalb momentan noch völlig im Dunkeln. Es ist aber denkbar, dass Phytochrom nach Induktion in den Nukleus wandert und dort, obwohl kein Phosphotransfer erfolgen kann, über Protein-Protein-Interaktion mit ARR2 wechselwirken könnte.

Sweere (2001) zeigte, dass ARR4 spezifisch mit Phytochrom B (phyB), nicht jedoch mit phyA interagiert und dabei die aktive Pfr-Form des Photorezeptors stabilisiert. Dies führt dazu, dass *Arabidopsis*-Pflanzen, die ARR4 überexprimieren, eine Hypersensitivität gegenüber Bestrahlung mit Rotlicht aufweisen. Da in Abwesenheit von ARR2 die Aktivität von phyA reduziert war, hat ARR2 eine positive Funktion auf die phyA-Signaltransduktion. Möglicherweise erfüllt ARR2 für phyA eine ähnliche Funktion wie ARR4 zu phyB. Diese Hypothese eröffnet für weitere Studien neue Ansatzpunkte. So erscheint es sinnvoll in Zukunft mit Interaktionsstudien die physikalische Interaktion zwischen diesen beiden Proteine zu untersuchen.

4.3 ARR2 als Komponente der Ethylensignaltransduktion

Zur molekularen Aufklärung einer Funktion von ARR2 in der Ethylensignaltransduktion wurden verschiedene Ansätze gewählt. Die im Hefe-Drei-Hybridsystem beobachteten Interaktion zwischen ETR1, AHP2 und ARR2 (Lohrmann, 2001; Grefen, 2002), sollte mittels des zellfreien pflanzlichen Phosphotransfersystem biochemisch überprüft werden und damit eine funktionelle Verbindung des Ethylenrezeptors ETR1 mit dem Responseregulator nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der Signalübertragung im Zwei-Komponentensystem ist eine Phosphatübertragung über Histidin zu Aspartat. Zur Analyse der Bedeutung der Phosphorylierung und seiner Funktion, wurde die dominant aktive Form des ARR2 (ARR2^{D80E}) sowie Pflanzen, die ARR2^{D80E} ektopisch exprimierten (ARR2^{D80E}-ox) charakterisiert. Die Aktivitätsmodulation von ARR2 und deren Bedeutung im Signalleitungsnetz sollte mittels Expressionsanalysen aufgeklärt werden.

4.3.1 ARR2-defiziente Keimlinge reagieren vermindert auf Ethylen / ARR2 transaktiviert ERF1

Der Vergleich der Hypokotyllängen von Keimlingen des Wildtyps und der *arr2*-Nullmutante zeigte, dass ein Fehlen von ARR2 in *Arabidopsis*-Pflanzen auch eine verminderte Sensitivität gegenüber Ethylen vermittelt (3.2.2.1). Während der Keimung ist eine Ethylenproduktion in der Region des Apikalhakens detektiert worden (Guzman und Ecker, 1990). Exogene Applikation von Cytokinin führt ebenfalls zur Triple Response bei etiolierten Keimlingen, da es indirekt über Ethylen wirkt, indem es die Ethylenbiosynthese in ihrem ersten Schritt induziert (Vogel, et al., 1998a und b). Ethylen und auch Cytokinin regulieren negativ das Hypokotyllängenwachstums und phänotypieren auf diese Weise Teile einer lichtregulierten Entwicklung (Vogel, 1998; Chae et al, 2003). Im Keimling erfolgt also eine Verknüpfung der Licht-, Ethylen- und Cytokininsignaltransduktion. Durch die genetische Komplementation konnte bestätigt werden, dass die Hyposensitivität der *arr2*-Nullmutante gegenüber Cytokinin und Ethylen ARR2-spezifisch ist (3.3.1). Der hyposensitive Phänotyp der *arr2*-Nullmutante gegenüber Ethylen ist mit der Signaltransduktionsmutante *ein3-1* vergleichbar (3.2.2.1). Der Transkriptionsfaktor EIN3, trägt über *ERF1* zur Regulierung der Ethylenantwort bei (Chao et al., 1997; Solano et al., 1998). Des Weiteren reagiert die *arr2*-Nullmutante oppositär zu *etr1-7* (3.2.2.1),

einer Funktionsverlust-Ethylenrezeptormutante, die eine schwache hypersensitive Reaktion gegenüber Ethylen zeigt (Cancel und Larson, 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ARR2 positiv zu der Ethylenantwort in etiolierten Keimlingen beiträgt und vermutlich stromabwärts von ETR1 agiert.

4.3.2 ARR2 hat eine Funktion in der Signaltransduktion von Ethylen

Die Hyposensitivität der *arr2*-Nullmutante gegenüber Ethylen kann entweder durch eine Störung der Ethylensignaltransduktion oder der Ethylenbiosynthese hervorgerufen werden. Um diese beiden Hypothesen zu untersuchen, wurden physiologische Experimente mit dem Ethylenbiosyntheseinhibitor AVG unternommen. Die Analyse etiolierter Keimlinge des konstitutiv aktiven ARR2^{D80E}-Überexprimierers (ARR2^{D80E}-ox) unter Zugabe des AVG zeigt, dass die Verkürzung des Hypokotyls nicht auf eine gestörte Ethylenbiosynthese zurückzuführen ist, da die AVG-Applikation den mutanten Triple Response-Phänotyp nicht aufheben kann (3.5.1.1, Abb. 3-21). Die Ethylen-überproduzierende Mutante *eto1-1* (*ethylene overproducing1*) hingegen, zeigte im Gegensatz zu der Ethylensignaltransduktionsmutante *ctr1-8* (*constitutive triple response1*) nach AVG-Applikation ein elongiertes Hypokotyl (3.5.1.1, Abb. 3-21). Eine der *ctr1-8*-ähnliche Reaktion der *arr2*-Nullmutante lässt auf eine regulatorische Funktion von ARR2 in der Ethylensignaltransduktion schließen. Diese Möglichkeit sollte durch eine Transaktivierungsanalyse mit dem Ethylen-regulierten *ERF1* analysiert werden. *ERF1* gehört zu der Klasse der EREBPs (*ethylene response element binding protein*). Die EREBP-Transkriptionsfaktoren binden an Promotorelemente, die für die koordinierte Expression Ethylen-induzierter Gene verantwortlich sind (Solano et al., 1998; Lorenzo et al., 2003). Erste Hinweise auf eine potenzielle Funktion von ARR2 in der Ethylensignaltransduktion lieferten Bindungsstudien, in denen eine Interaktion von ARR2 mit dem *PER* Promotorelement des *ERF1* Gens (*ethylene response factor*) nachgewiesen werden konnten (Lohrmann, 2001). Mit dem transienten Transaktivierungsassay in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten konnte die Fähigkeit von ektopisch exprimiertem ARR2 zur Transaktivierung des *ERF1::LUC*-Reportergenkonstrukts in Abwesenheit von Ethylen nachgewiesen werden (3.4.1.1, Abb. 3-13). Interessanterweise resultierte eine zusätzliche Applikation von exogenem Ethylen in diesem System in einer Repression der *ERF1::LUC*-Aktivität, die aber nicht das Kontrollniveau erreichte (3.4.1.1, Abb. 3-13). Damit wurde zum ersten Mal

gezeigt, dass ein Typ B Responseregulator ein Ethylen-responsives Gen Hormon-abhängig reguliert. Die Gesamtheit dieser Daten können so interpretiert werden, dass ARR2 in *Arabidopsis*-Protoplasten negativ mit Komponenten der Ethylensignaltransduktion interferiert. Dem Gegenüber stehen die Ergebnisse von Keimlingen der *arr2*-Nullmutante, in denen eine positive Regulierung von ARR2 zur Ethylenantwort nachgewiesen wurde (4.3.1). Dieser gegensätzliche Effekt wird auch deutlich beim Vergleich der Aktivität von ARR2^{D80E} in Protoplasten und in transgenen Pflanzen. Während ARR2^{D80E} in Protoplasten die *ERF1::LUC*-Aktivität reprimiert (3.5.1.4, Abb. 3-26A), steigt in der ARR2^{D80E}-ox-Linie die *ERF1*-Transkriptmenge an (3.5.1.2). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine positive oder negative Regulierung von Zielgenen durch ARR2 von den Gewebe-, Zell- und Entwicklungsspezifischen Kofaktoren abhängt. Diese Kofaktoren tragen vermutlich zur Spezifität und Aktivität von ARR2 bei und damit wäre ein komplexer Regulierungsmechanismus über ARR2 als Schaltpunkt denkbar. Eine weitere Ursache der reduzierten *ERF1::LUC*-Aktivität könnte in dem methodischen Ansatz liegen. Protoplasten produzieren Ethylen und sind darum *per se* responsiv gegenüber dem Hormon (Yanagisawa et al., 2003). Applikation von zusätzlichem Ethylen könnte in einem negativen Rückkopplungsmechanismus resultieren, welcher auf molekularer Ebene zur Inhibition der ARR2-Transkriptionsfaktoraktivität durch einen interagierenden Repressor führen könnte. Außerdem ist es möglich, dass das endogen vorliegende, Wildtyp ARR2 eine negative Regulierung induziert, die zu einer verminderten *ERF1*-Antwort führen könnte. Analysen im bakteriellen Systemen zeigten, dass trotz funktioneller Spezifität einer bestimmten Histidinkinase zu einem bestimmten Responseregulator eine Beeinflussung durch weitere Histidinkinasen und Response-regulatoren wahrscheinlich ist (Stock et al. 1989). Durch die ektopische Expression von dominant aktiven ARR2 in den Protoplasten ist es möglich, dass dieser Responseregulator mit weiteren Elementen des Zwei-Komponentensystems interagiert und somit das endogene, funktionelle Zwei-Komponentensystem aus dem Gleichgewicht bringt.

Hinzu kommt die Möglichkeit, dass ARR2 direkt in den klassischen Ethylensignaltransduktionweg eingreift. Interaktionsstudien in Hefe zeigten eine spezifische Interaktion von ARR2 mit den MAP-Kinasekinasen MPKK4 und MPKK5. Diese Interaktion scheint sich *in planta* auf die Aktivität der MAPK6 auszuwirken, die nach gegenwärtiger Vorstellung als positiver Regulator von EIN2 gilt (H. Hirt,

persönliche Mitteilung). Durch diese Studien ist es denkbar, dass eine zusätzliche Funktion von ARR2 in der Feinregulierung des klassischen Ethylen-signaltransduktionswegs liegt.

Die photoakustische Messung zeigte eine verminderte Ethylenproduktion in der *arr2*-Nullmutante im Gegensatz zum Wildtyp (3.2.2.2, Abb. 3-7). Diese Reaktion könnte auf eine gestörte Biosynthese von Ethylen hinweisen. Außerdem konnte bei der vergleichenden Expressionsanalyse der *arr2*-Nullmutante mit dem Wildtyp eine Reduzierung der Transkripte sowohl der ACC-Oxidase als auch der ACC-Synthase beobachtet werden (Tab. 2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ARR2 zusätzlich zur Regulierung der Ethylen-signaltransduktion auch eine bisher nicht bekannte Funktion in der Ethylenbiosynthese hat, die aber nicht den in diesem Kapitel diskutierten Phänotyp bedingt. Interessanterweise reduzierte sich die Ethylenproduktion in Keimlingen des Wildtyps als auch der *arr2*-Nullmutanten im gleichen Ausmaß mit Eintritt in die Dunkelphase (Abb. 3-7). Eine periodische Produktion von Ethylen wird durch das Verhältnis von Rotlicht zu Dunkelrotlicht (R:FR) hervorgerufen (Pierik et al., 2004). Begründet durch diesen Sachverhalt ist eine mögliche Verbindung von ARR2 zu phyA und der Ethylenproduktion denkbar. Die reduzierten Ethylenmengen der *arr2*-Nullmutanten könnten durch ein anderes R:FR-Verhältnis resultieren, da ARR2 wie in Kapitel 4.2 diskutiert zu einer verminderten phyA-Antwort führt.

4.3.3 Die Regulierung von ARR2 hängt von der

Ethylenrezeptorhistidinkinase ETR1 und der Phosphorylierung ab

Die Regulierung der Aktivität eukaryotischer Transkriptionsfaktoren kann sowohl die subzelluläre Lokalisation als auch ihre Fähigkeit zur Bindung an DNA umfassen. Des Weiteren kann ihre Transaktivität moduliert werden. Die Analyse der subzellulären Verteilung des mit GFP-fusionierten ARR2, ARR2^{D80E} und ARR2^{D80N} offenbarte eine strikte Kernlokalisation (3.5.1.3, Abb. 3-25). Da der Austausch des konservierten Aspartat, der putativen Phosphorylierungsstelle von ARR2, durch Glutamat oder Arginin die Kernlokalisation von ARR2 nicht veränderte, scheint der Phosphorylierungszustand keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation zu haben. Das pflanzliche zellfreie Phosphotransfersystem ermöglichte eine

Identifikation des Phosphotransfers von ATP zum konservierten Asp80 der Receiverdomäne von ARR2 (Lohrmann, 2001; Hass et al., 2004b). Dabei konnte eine erfolgreiche Phosphorylierung von ARR2 nur erfolgen, wenn dem Reaktionsansatz neben der Membran-Fraktion auch die cytosolische Fraktion beigefügt wurde. Die notwendige Aktivität einer Membran-assoziierten Fraktion stammt wahrscheinlich von Membran-assoziierten Histidinkinasen. Der Bedarf der löslichen, cytosolischen Fraktionen zur erfolgreichen Phosphorylierung des ARR2 und damit seiner Regulierung könnte die Implikation von HPt-Proteinen reflektieren. Es wird vermutet, dass HPt Proteine den Phosphotransfer von Membran gebundenen Histidinkinasen zu den kernlokalisierten Responseregulatoren vermitteln (Lohrmann and Harter, 2002, Hwang *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit ermöglichte das zellfreie pflanzliche Phosphotransfersystem, das funktionelle Zusammenspiel von ARR2 und ETR1 zu untersuchen. Subzelluläre Fraktionen der *etr1-7* Ethylenrezeptormutante konnten im Vergleich zum Wildtyp signifikant weniger effizient ARR2 phosphorylieren (Abb. 3-14). Das Phosphorylierungsdefizit des ARR2 konnte durch Inkubation mit subzellulären Fraktionen aus *Arabidopsis* Pflanzen, die Wildtyp ETR1 im *etr1-7* Hintergrund exprimierten aufgehoben werden (Abb. 3-14). Die *in vitro*-Komplementation der Phosphorylierung indiziert, dass der Transfer der Phosphorylgruppe von ATP zum Asp80 des ARR2 von der Gegenwart des Ethylenrezeptors ETR1 abhängt. Mit diesen Ergebnissen könnte zum ersten Mal ein stromaufwärtsliegendes, spezifisch einem Signaltransduktionsweg zugeordnetes Element von ARR2 identifiziert worden sein.

4.3.4 ARR2 vermittelt Signale der Pathogenantwort

Eine frühe, sichtbare Reaktion von Pflanzen auf Pathogenbefall ist die Bildung von Läsionen durch aktiven, lokalen Zelltod. Der aktive, genetisch kontrollierte Sterbeprozess der Zellen beginnt bereits wenige Stunden nach der Infektion und ist von spezifischen Transkriptions- und Translationsprozessen begleitet (Yang et al., 1993; He et al., 1994). Diese Läsionen treten im Bereich um die Infektionsstelle auf und man spricht dabei von der hypersensitiven Reaktion (HR, Matthews, 1991). Bei der Ausbildung der HR kommt es neben der Produktion von ROS (*reactive oxygen species* z.B. O_2^- und H_2O_2) zu genetisch kontrollierten biochemischen und molekularen Veränderungen beim Stoffwechsel, wie etwa zur Verstärkung der Zellwand, zur Aktivierung von Abwehr-bezogenen Genen und zur Bildung von

antimikrobiell wirksamen Phytoalexinen (Hammond-Kosack und Jones, 1996). Die lokale Abtötung des Zellgewebes ermöglicht der Pflanze die Eingrenzung der Infektion und verhindert damit eine Etablierung des Pathogens.

Die *arr2*-Nullmutante zeigte bei Anzucht auf Erde auch sporadisch auftretende Läsionen auf den Blättern, die an eine HR bei der Pathogenantwort erinnern (Abb. 3-15). Im vorherigen Kapitel wurde diskutiert, dass ARR2 positiv in die Ethylensignaltransduktion eingebunden ist und zur Transaktivierung des Ethylen-induzierbaren *ERF1*-Gens beiträgt. Da *Arabidopsis*-Mutanten (z.B. *ein3-1*, *ein2-5*) mit einer reduzierten Sensitivität gegenüber Ethylen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* zeigten (Berrocal-Lobo et al., 2002; Thomma et al., 1999), sollte dieser Aspekt auch in der *arr2*-Nullmutante untersucht werden. Die Behandlung mit *Botrytis cinerea* beweist eine erhöhte Empfindlichkeit von Pflanzen der *arr2*-Nullmutante gegenüber dem Wildtyp (3.4.2.1). Eine erhöhte Resistenz gegenüber *Botrytis* wird in *Arabidopsis* durch eine konstitutive Expression von *ERF1* erreicht (Berrocal-Lobo et al., 2002). Da wie im Kapitel 4.3.2 diskutiert ARR2 ein Regulator des *ERF1*-Gens darstellt, unterstützen diese Ergebnisse eine Implikation von ARR2 in der Pathogenantwort. Die hier gezeigten Ergebnisse sowie diejenigen von Berrocal-Lobo et al. (2002) legen die Notwendigkeit einer intakten Ethylensignaltransduktion in der Pathogenantwort gegen *Botrytis cinerea* nahe. In der *arr2*-Nullmutante könnte somit die Induktion der Pathogenantwort zur Abwehr von *Botrytis* über eine Steigerung der *ERF1*-Expression nur noch im reduzierten Umfang erfolgen.

Die Pathogenexperimente mit dem biotrophen Pilz *Peronospora parasitica* lassen, im Gegensatz zu der verstärkten Empfindlichkeit gegenüber *Botrytis*, eine erhöhte Toleranz der *arr2*-Nullmutante erkennen (3.4.2.1). Diese entgegengesetzten Reaktionen der *arr2*-Nullmutante wurden auch bei Pflanzen der Ethylen-insensitiven EIN2-Mutante beobachtet, die gegenüber dem biotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae* eine verstärkte Toleranz aber gegenüber nekrotrophen Pathogenen wie beispielsweise *Botrytis* eine erhöhte Empfindlichkeit aufweist (Buchanan et al., 2000). Ethylen könnte zur Modulation der Resistenz gegenüber der kompatiblen Interaktion von pilzlichen biotrophen Pathogenen mit der Wirtspflanze benötigt werden (Buchanan et al., 2000). Eine verminderte Sensitivität der *arr2*-Nullmutante gegenüber Ethylen könnte deshalb zu einer verstärkten Toleranz gegenüber *Peronospora* führen. Die vergleichende Expressionsanalyse von der *arr2*-

Nullmutante und der dominant aktiven ARR2^{D80E}-Linie zeigt zudem mehr als 40 gegenüber dem Wildtyp verändert regulierte Gene der Pathogenabwehr (Anhang, CD), deren Produkte eine Beteiligung in der Pathogenabwehr zugesprochen werden. Die Konsequenz der unterbrochenen Signaltransduktion wäre in der Summe eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber *Botrytis cinerea*, wie es in den Pflanzen der *arr2*-Nullmutante tatsächlich der Fall ist (Abb. 3-17). Es wäre deshalb denkbar, dass die über ARR2 verlaufende Pathogensignaltransduktion folgendermaßen aufgebaut ist: Pathogenbefall → Ethylenproduktion → Ethylenperzeption über ETR1 → Induktion von ARR2 → Induktion von ERF1 → Reaktion und Begegnung des Pathogenbefalls durch Erhöhung von Ethylen-regulierten Genen.

4.3.5 ARR2 agiert in der abiotischen Stressantwort in Arabidopsis

Ethylen spielt eine wichtige Rolle in der abiotischen und biotischen Stressantwort. Ethylen vermittelt Stresssignale wie Verwundung, extreme Temperaturen und Trockenheit (Guo und Ecker, 2004). Neben seinen vielfältigen physiologischen Funktionen in Wachstum und Entwicklung der höheren Pflanzen galt Ethylen darum auch ursprünglich als Stresshormon. Die Stress-induzierte Ethylenproduktion ist typischerweise durch eine verstärkte ACC-Synthese reguliert (Wang et al., 2002). In *Arabidopsis* gibt es eine Anzahl an Transkriptionsfaktoren, welche die Stresssignaltransduktion beeinflussen. Sie gehören überwiegend den Klassen der WRKY, bZIP sowie HD-ZIP an und induzieren oder reprimieren stromabwärtsliegende Stress-reaktive Gene. Eine Veränderung der Expression und Aktivität solcher Transkriptionsfaktoren vermittelt letztendlich die Stresstoleranz (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Chen et al., 2002; Schenk et al., 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten abiotischen Stressexperimente belegen eine Funktion von ARR2 in der Trockenstressantwort (3.3.2, Abb. 3-12). Dem Stress durch Austrocknung konnten *arr2*-Nullmutanten deutlich besser begegnen als die korrespondierenden Wildtyppflanzen (3.3.2, Abb. 3-12). Die Ergebnisse der vergleichende Expressionsanalyse der *arr2*-Nullmutante stehen scheinbar im Widerspruch zu den physiologischen Daten. So lässt sich beispielsweise eine verminderte Transkriptakkumulation von verschiedenen Trockenstress-induzierten Genen beobachten (Tab. 3). Womöglich induziert ARR2 Trockenresistenz über noch nicht näher charakterisierte Gene, die bisher nicht diesem Resistenzmechanismus zugeordnet werden konnten. Wie oben diskutiert, ist des Weiteren ist eine

Verbindung zur MAP-Kinasekaskaden denkbar, die als frühe Antwort innerhalb Minuten durch Verwundung, einem osmotischen Schock, hohe Salzkonzentrationen, Trockenheit, UV-Strahlung, Ozon, extremen Temperaturen und Pathogeninfektion induziert wird (Kim et al., 2003).

4.4 Existenz eines alternativen ARR2-abhängigen Ethylensignaltransduktionswegs

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde angenommen, dass die Ethylensignaltransduktion stromabwärts der Rezeptoren ausschließlich über CTR1 vermittelt wird (Clark et al., 1998; Huang et al., 2003). Die verbleibende Responsivität gegenüber Ethylen von *ctr1*-Nullmutanten, sowie die unvollständige Aktivierung von Ethylen regulierten Antworten (Kieber et al., 1993; Hua und Meyerowitz, 1998; Guo and Ecker, 2004; Potuschak et al., 2003) lassen jedoch die Existenz eines zusätzlichen, CTR1-unabhängigen Ethylensignaltransduktionsweg vermuten. Außerdem wurde die Einbindung weiterer, noch unbekannter Transkriptionsfaktoren in die Ethylen-abhängige Regulierung der Genexpression vermutet (Lawton et al., 1994; Chao et al., 1997; Stepanova und Ecker, 2000). In unabhängigen Experimenten konnte nahe gelegt werden, dass ARR2, reguliert über Asp80-Phosphorylierung, eine Funktion in der Ethylensignalleitung in *Arabidopsis* einnimmt. Da eine effektive Phosphorylierung von ARR2 nur in Gegenwart von ETR1 erfolgt, lässt die sich vermuten, dass ein Zwei-Komponentenphosphorelay der ARR2-abhängigen Signaltransduktion zu Grunde liegt.

Die folgende Hypothese eines alternativen ARR2-abhängigen Ethylensignaltransduktionswegs wäre deshalb denkbar: Durch Ethylenbindung wird die Histidinkinase ETR1 aktiviert und Autophosphorylierung induziert. Das ETR1 würde über ein bewegliches HPT-Protein, das zwischen membranständigen und kernlokalisierten Komponenten vermittelt, eine Phosphorelay-Kaskade initiieren. Letztlich resultierte der Phosphotransfer in einer posttranslationalen Regulierung von ARR2 im Nukleus (Lohrmann und Harter, 2002). In diesem Szenario hätte ETR1 eine duale Funktion bei der Initiierung der Ethylensignaltransduktion. Während der CTR1-vermittelte Signalweg negativ reguliert ist (Cancel und Larsen, 2002; Wang et al., 2002), initiiert die ARR2-abhängige Signaltransduktion eine positive Regulierung.

Der CTR1-unabhängige, ARR2-vermittelnde Signalweg könnte für die vollständige Ausprägung derjenigen Ethylenreaktionen verantwortlich sein, auf die der Vergleich der CTR1-Mutante und der Vierfachmutante der Ethylenrezeptoren hinweist. Der vorgeschlagene Phosphotransfer widerspricht unter Umständen den Beobachtungen, dass eine Histidinkinaseaktivität von ETR1 und ERS1 nicht für die Ethylensignaltransduktion benötigt wird (Guo und Ecker, 2004), weil eine Transformation mit Histidinkinase-inaktiviertem ETR1 von *ers1/etr1*-Doppelmutanten unter saturierender Ethylenkonzentration in einer Wiederherstellung von normalem Hypokotyl- und Wurzelwachstum resultierte (Wang et al., 2003). Trotzdem ist es von Interesse, dass Ethylenrezeptoren mit nachgewiesener (ETR1) und angenommener (ERS1) Histidinkinaseaktivität eine vorherrschende Rolle in der Regulierung von Ethylenantworten spielt (Gamble et al., 2002; Zhao et al., 2002; Wang et al., 2003). Die relativ große Bedeutung von ETR1 und ERS1 könnte potenziell erst durch die Fähigkeit, eine Histidinkinaseaktivität ausüben zu können, entstanden sein. Des Weiteren ist es unmöglich, einen ARR2 involvierten Zwei-Komponentenmechanismus in allen denjenigen ETR1 und ERS1 mutierten Pflanzen zu detektieren, in denen der Rezeptor durch entsprechende Mutationen in seiner Transphosphorylierungskapazität gestört ist. Die intramolekulare Transphosphorylierung der Transmitterdomäne ist die Grundvoraussetzung für Histidinkinasen einen Phosphotransfermechanismus zu initiieren (Stock et al., 2000; Ames et al., 2002).

4.5 ARR2 vermittelt verschiedene Signale in einem Expressionsnetzwerk

Die Steuerung der Genexpression durch ein bestimmtes Signal kann durch die Funktion des korrespondierenden Proteins in einem spezifischen Signaltransduktionsweg widergespiegelt werden (Yamamoto et al. 1998).

Zur Untersuchung eines ARR2-regulierten Expressionsnetzwerks wurden Mikrray-Analysen durchgeführt. Dazu wurde zuerst das Expressionsmuster der *arr2*-Nullmutante mit dem korrespondierenden Wildtyp verglichen. Neben den Unterschieden in der Expression von Genen der Ethylensignaltransduktion (z.B. ERF1 und weiteren EREBPs), konnten außerdem verändert regulierte Gene detektiert werden, die in der Auxin-, Abscinsäure-, Jasmonsäure- und Gibberillin-Perzeption und Signaltransduktion agieren (3.4.3.1, Abb. 3-18). Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass ARR2 direkt oder indirekt an der Integration verschiedener Hormon-Signaltransduktionswege mitwirkt. Das würde auch den pleiotrophen Phänotyp der *arr2*-Nullmutanten erklären, der nicht allein durch eine beeinträchtigte Ethylen- und Cytokininsignaltransduktion erklärt werden kann (Abb. 3-20). Die vergleichende Expressionsanalysen von *Arabidopsis*-Pflanzen, die entweder Wildtyp ARR2 oder ARR2^{D80E} unter der Kontrolle des konstitutiven viralen 35S-Promotors exprimierten, zeigt eine Veränderung in einer Vielzahl von Hormon-regulierten Genen. Das dominant aktive ARR2^{D80E}-Protein scheint demnach einen globalen Effekt auf das gesamte Zwei-Komponenten-Signaltransduktionsnetzwerk in *Arabidopsis* auszuüben. Man kann jedoch nicht völlig ausschließen, dass das ektopisch exprimierte, dominant aktive ARR2^{D80E}-Protein Gene reguliert, die normalerweise nicht zum gegebenen Entwicklungszustand im entsprechenden Gewebe im regulatorischem Rahmen des Transkriptionsfaktor liegen würden. Als Folge davon ist in ARR2^{D80E}-exprimierenden Pflanzen, die hormonell aufrecht erhaltene Homöostasis des Genexpressionsmusters komplett zerstört. Diese fundamentalen Änderungen der Hormonhomöostasis resultiert in Expressionsunterschieden von einer einer Vielzahl von Genen, die mit unterschiedlichsten Signalwegen verknüpft sind. Diese Tatsache könnte den ARR2^{D80E}-induzierten Phänotyp erklären, der sich so signifikant von dem der *arr2*-Verlustmutante unterscheidet.

4.6 Das Zweikomponentensystem ermöglicht eine Vernetzung und damit den Cross talk verschiedener Signaltransduktionswege

Die in diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass neben dem klassischen CTR1-abhängigen Ethylensignaltransduktionweg, noch ein zusätzlicher ARR2-vermittelter vorliegt, der durch Interaktionen im Zweikomponentensystem eine komplexere Reaktion von Pflanzen auf veränderte Umweltbedingungen ermöglicht und zur Feinregulierung von verschiedenen Signalwegen dient. In Pflanzen wäre auf diese Weise die für das Wachstum und die Entwicklung notwendige Ethylensignaltransduktion über zwei nicht-lineare, aber durch gemeinsame Komponenten, sich gegenseitig beeinflussende Signalwege sichergestellt.

Die bisher diskutierten Ergebnisse und schon bekannte Signalmechanismen ermöglichen die Postulierung eines komplexen Modells eines ARR2-integrierten Signaltransduktionsnetzwerks (Abb. 4-1). Die vernetzte Signaltransduktion um ARR2 lässt sich dabei in verschiedene Ebenen gliedern. Sromaufwärts von ARR2 gibt es in dem Modell neben der Signalebene, eine Rezeptorebene und eine Transferebene zum Responseregulator ARR2. Die Signalebene bilden Cytokinin, dunkelrotes Licht, Stress und Ethylen. Die Rezeptorebene umfasst zumindest AHK4, phyA und ETR1 (Inoue et al., 2001; Ueguchi et al., 2001; 4.2; 4.3.3; Schaller und Bleeker, 1995; Rodriguez et al., 1999), welche die entsprechenden Signale perzipieren und an die Transferebene, die die AHP-Proteine beinhaltet, weiterleiten. Die AHP-Proteine sind in der Lage die gegebenen Signale von den membrangebundenen Rezeptoren zu empfangen und, bedingt durch ihre geringe Größe, in den Nukleus zu transportieren (Suzuki et al., 1998, 2001b und 2002; Stock et al., 2000; Imamura et al., 2001; Hwang und Sheen, 2001; Grefen und Harter, 2004). Damit bilden sie eine Signalbrücke zwischen der Membran und nukleären Responseregulatoren, die im Falle von Typ B Responseregulatoren, wie ARR2, Transkriptionfaktoren sind (Lohrmann et al., 2001). Die molekulare „Auswertung“ der Signale erfolgt durch die Regulation der ARR2-Aktivität sowie Komponenten unterhalb von ARR2 in der Integrationsebene. ARR2 induziert die Expression Cytokinin-responsiven Typ A Responseregulatoren, die eine reprimierende Funktion auf die Cytokininantwort haben (To et al., 2004) sowie beispielsweise durch Interaktion von ARR4 mit phyB eine Modulation der Hellrotlichtantwort ausüben (Sweere et al., 2001). Ein weiterer

ARR2-involvierter Regulierungsmechanismus besteht für die Dunkelrotlichtantwort (4.2), wobei der Mechanismus bisher noch unbekannt ist. In der Signaltransduktion von Ethylen überlappt die Rezeptorebene und die Integrationsebene von ARR2 mit dem klassischen Signaltransduktionsweg. Der Ethylenrezeptor ETR1 übernimmt vermutlich in beiden Signalwegen die Funktion der Ethylenperzeption (4.3.3; Schaller und Bleeker, 1995; Rodriguez et al., 1999). Die Transferebene auf ARR2 verläuft parallel zur klassischen Ethylensignaltransduktion, in der das Raf-ähnliche CTR1 (Huang et al., 2003) ein Gegenstück zu den AHP-Proteinen darstellt. In der Integrationsebene besteht erneut eine Verknüpfungsmöglichkeit des ARR2-vermittelten mit dem klassischen Ethylensignaltransduktionsweg. Diese Verknüpfung wird wahrscheinlich über die MAP-Kinasenkinasen MAPKK4 und MAPKK5 vermittelt, die in Hefe mit ARR2 interagieren können (4.3.2). Diese MAP-Kinasenkinasen aktivieren in *Arabidopsis* wahrscheinlich die MAP-Kinase MAPK6, die auf noch unbekannte Art und Weise positiv auf die Aktivität von EIN2 Einfluss nimmt (Wang et al., 2002; Ouaked et al., 2003). Die Interaktion von ARR2 mit MAPKK4 und MAPKK5 könnte die Aktivität der MAPK6 modulieren und dient dann möglicherweise der Feinregulierung des klassischen Ethylensignaltransduktionswegs (4.3.2). Im klassischen Ethylensignaltransduktionsweg erfolgt vermittelt über EIN2 in einem noch nicht bekannten Mechanismus die Induktion von EIN3, einem spezifischen Transkriptionsfaktor in der Ethylenantwort (Chao et al., 1997), der eine Induktion des Ethylen-responsiven *ERF1*-Gen bewirkt und damit eine Ethylenantwort induziert. Parallel dazu kann ARR2 direkt die Genexpression von *ERF1* regulieren (4.3.1 und 4.3.2).

Es wäre möglich, dass Pflanzen das Signaltransduktionsnetz des Zwei-Komponentensystems dafür nutzen, auf sich ändernde Umweltbedingungen adäquat reagieren zu können. In diesem Signaltransduktionsnetz können verschiedene Signalwege von Hormonen, Pathogenabwehr und Stress miteinander verknüpft werden und zur Feinregulierung und Anpassung an eine gegebene Situation genutzt werden. Diese Erkenntnisse eröffnen für zukünftige Forschung des Zwei-Komponentensignalsystems neue Ansatzpunkte.

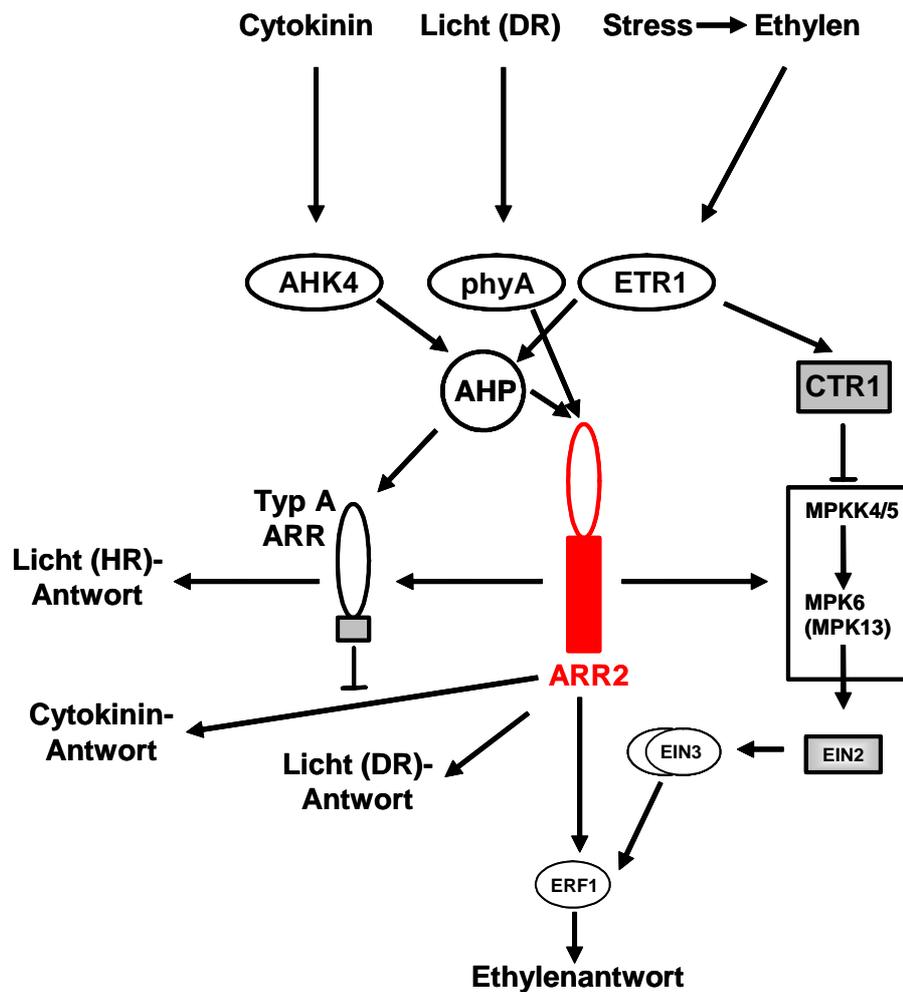


Abb. 4-1: Modell einer ARR2-vermittelten ARR2 Verschaltung verschiedener Signaltransduktionswege: Die Cytokinin-signaltransduktion erfolgt hauptsächlich über die Hybridkinase (AHK4), *Arabidopsis* HPT-Proteinen (AHP) und den Responseregulatoren des Typs B beispielsweise ARR1 und ARR2. Dabei erfolgt eine ARR2-abhängige Induktion der Typ A ARR-Proteine, wobei eine negative Regulierung der ARR2-vermittelten Regulation der Cytokininantwort durch die Typ A ARR-Proteine möglich ist. Eine Interaktion von ARR4 und phyB führt zur Modulation der phyB-Antwort. Außerdem hat ARR2 eine positiv regulierende Funktion in der Phytochrom A (phyA)-Antwort, wobei der Mechanismus bislang noch ungeklärt ist (HR: hellrotes Licht). Die Ethylensignaltransduktion kann über zwei parallele Signalwege verlaufen, die auch Verknüpfungspunkte, wie eine gemeinsame Ethylenrezeptorkinase ETR1 und eine MAP-Kinasekaskade aufweisen. Der klassische Ethylensignalweg verläuft über die Perzeption des Ethylensignals durch die Rezeptorhybridkinase ETR1, einer Induktion von CTR1, welches durch negative Regulierung eine MAP-Kinasekaskade, möglicherweise über MAPKK4/5 und MAPK6 induziert. Diese aktiviert über EIN2 den Transkriptionsfaktor EIN3, welcher durch *ERF1*-Induktion zur Ethylenantwort führt. Der ARR2-vermittelte Ethylensignalweg beginnt auch mit der gemeinsamen Rezeptorhybridkinase ETR1, welche über AHP-Proteine ARR2 aktiviert. ARR2 induziert genau wie EIN3 über *ERF1* die Transkription von Ethylen-regulierten Genen. Ein Stresssignal führt dabei indirekt über Ethylenproduktion zur ETR1-Induktion. Eine Interaktion von ARR2 mit MPKK4/5 und eine abgeschwächte Basisaktivität von MAPK6 könnten die CTR1-vermittelte Signaltransduktion modulieren.

5 AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass ARR2 nicht nur in der Ethylensignaltransduktion agiert, sondern dass diese Regulierung über einen Zwei-Komponentenphosphorelay erfolgt. Der Regulationsmechanismus über das Zwei-Komponentensystem hat dadurch in der pflanzlichen Signaltransduktion an Bedeutung gewonnen. Zukünftige Analysen können klären, ob andere Hybridkinasen als ETR1 den Responseregulator ARR2 phosphorylieren und ob es tatsächlich AHP-Proteine sind die den Phosphotransfer von den extranukleären Hybridkinasen zum kernlokalisierten ARR2 vermitteln. Als sich hier anschließende Experimente sind weitere Phosphorelayassays mit Extrakten aus Protein-defizienten Pflanzen einiger Komponenten des Zwei-Komponentensystems beispielsweise AHP2, AtHK1, AHK5 und AHK4 geplant, die auch schon teilweise begonnen wurden. Die hier gewonnenen Hinweise von ETR1 als möglicher Signalgeber von ARR2 könnten mit weiteren *etr1*-Mutanten, deren Transmitterdomäne zerstört ist, verifiziert werden. Die Aufklärung der Beziehung von der CTR1- und der ARR2-vermittelten Ethylensignaltransduktion könnte durch weitere biochemische und genetische Experimente erfolgen. Die Analyse von *ctr1/arr2*-Doppelmutanten könnte eine Verbindung zwischen der CTR1-abhängigen und der ARR2-vermittelten Ethylensignaltransduktion klären. Für die Mehrheit der Rezeptor-ähnlichen Histidinkinasen sind bis heute noch keine Liganden identifiziert worden. Außerdem ist der Mechanismus Signalvermittlung von den Rezeptorkinasen zu den stromabwärtsliegende Komponenten größtenteils unbekannt. Dies gilt auch für die Substrate von pflanzlichen Kinasen und Phosphatasen. Diese Arbeit deckte eine mögliche Kommunikation zwischen verschiedenen Phosphorylierungskaskaden als weiteren wichtigen Aspekt des Zwei-Komponentensystems auf. Im Fall der Zwei-Komponentensignaltransduktion ist eine offene Frage, ob die durch verschiedene Hybridkinasen initiierten Signalwege sich an bestimmten Verknüpfungsstellen separieren oder konvergieren. Die ersten Hinweise von einer Funktion von ARR2 in der Modulation einer MAPK-Kaskade durch Interaktion von ARR2 mit MPKK4 und MPKK5 lassen eine Kommunikation zwischen dieser und der Zwei-Komponentensystem-vermittelten Signaltransduktion vermuten. Ein zellfreier Phosphorelay könnte beispielsweise Aufschluss darüber geben, ob ARR2 eventuell eine Phosphorylierung von MAPK6 vermittelt. Wobei die regulatorische Funktion von ARR2 in einer transienten

Transaktivierungsanalyse mit *MAPK6* als Reporter sowie MPKK4 bzw. MPKK5 als induzierende Komponenten getestet werden könnte.

Die Entstehung und Intensität der Kreuzkommunikation hängt stark vom Expressionsniveau der dabei beteiligten Kinasen und Phosphatasen ab. Jedoch ist das Wissen des gewebe- und zellspezifischen Expressionsniveaus der Mehrzahl der pflanzlichen Proteinkinasen und Phosphatasen sehr limitiert. Diese Arbeit führte zur Identifizierung von Typ A Responseregulatoren und ERF1 als Zielgene von ARR2. Ein grosses Interesse liegt in den Identifizierung weiterer direkter *in vivo* Zielgene von ARR2, um damit die Komplexität des Zwei-Komponentensystems bestätigen. Die Ergebnisse der vergleichenden Expressionsanalyse des dominant aktiven ARR2^{D80E} in der vorliegenden Form waren decken nicht nur die direkten Zielgene von ARR2 auf sondern aufgrund der konstitutiven Expression auch die sekundären und noch weiter stromabwärtsliegende Zielgene. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit transgene Pflanzen, die ARR2 unter einem Alkohol-induzierbaren Promotor exprimieren generiert. Diese Pflanzen sind nun für entsprechende Analysen vorhanden, die aber aus zeitlichen Gründen nicht mehr abgeschlossen werden konnten. Es wäre sinnvoll eine Expressionsanalyse in Form einer Kinetik mit frühen Erntezeitpunkten von Pflanzen zu wiederholen die ARR2^{D80E} unter einem induzierbaren Promotor exprimieren, damit die Transkriptionsfaktoraktivität und somit die direkten Zielgene der schnellen Signaltransduktion unabhängig von endogener Aktivierung dieses Responseregulators detektiert werden können. Diese Aspekte zusammenfassend führen zur Sachlage, dass das Verstehen der Komplexität des phosphorylierungs- und dephosphorylierungs-abhängigen Signalnetzwerks in Pflanzen eine herausfordernde Aufgabe für die Zukunft ist und kombinatorische Ansätze in der funktionellen Genomanalyse, der Zellbiologie, Biochemie und der Physiologie fordert.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte mittels physiologischer Experimente, Expressionsanalysen, Phosphorylierungsassays und Transaktivierungsanalysen eine komplexe Funktion von ARR2 in verschiedenen Signaltransduktionswegen von *Arabidopsis* aufgedeckt werden. Die Analyse von Keimlingen in der *arr2*-Nullmutante zeigt eine hyposensitive Reaktion auf Cytokinin. Mit transienten Transaktivierungsanalysen in Protoplasten konnte die Induktion Cytokinin-responsiver Gene durch ARR2 und ARR2^{D80E} nachgewiesen werden. Zusammenfassend führen diese Ergebnisse zur Hypothese, dass ARR2 eine regulierende Funktion in der Cytokininantwort einnimmt. Die vergleichende physiologische Analyse von Dunkelrotlicht-bestrahlten Keimlingen sowie die Expression des Chalkonsynthasegens identifizieren ARR2 als einen positiven Regulator in der phyA-vermittelten „high irradiance response“. Der Nachweis, dass ARR2 in die Ethylensignaltransduktion involviert ist, wurde in verschiedenen Ansätze erbracht. Durch physiologische Analysen unter Verwendung einer *arr2*-Nullmutante sowie ARR2^{D80E}-überexprimierenden Linien wurde ARR2 als regulierende Komponente der Ethylensignaltransduktion identifiziert. Dies wurde mittels transients Transaktivierungsanalysen in *Arabidopsis*-Protoplasten bestätigt. Der zellfreie Phosphorelayassay identifizierte die Ethylenrezeptorhybridkinase ETR1 als putative, stromaufwärtsliegende, phosphorylierende Komponente von ARR2. Die Untersuchungen unter Einsatz der pathogenen Pilze *Botrytis cinerea* und *Peronospora parasitica* sowie Trockenstress-Exyperimente lassen eine Rolle von ARR2 in der Pathogen- und dieser abiotischen Stressantwort vermuten. Auf Mikroarrays-basierende Expressionsanalysen der *arr2*-Nullmutante und ARR2^{D80E}-Pflanzen deuten darauf hin, dass das Zwei-Komponentennetzwerk direkt oder indirekt verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen kann. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das Zwei-Komponentensystem nicht nur einen primären Signalmechanismus darstellt, sondern zusätzlich das molekulare Grundgerüst für ein komplexes Signaltransduktionsnetzwerk bildet, welches die Feinabstimmung von Signalen übernimmt und die Kommunikation von verschiedenen Signalwegen untereinander ermöglicht.

SUMMARY

This work revealed through physiological experiments, phosphorelays, global expression and transactivation analysis a complex function of ARR2 in various signal transduction pathways of *Arabidopsis*. Analysis of *arr2* null mutant seedlings showed a hyposensitive reaction to cytokinin. The ARR2 and ARR2^{D80E} mediated induction of cytokinin-responsive genes was proven by transient transactivation analysis in *Arabidopsis* protoplasts. In summary these results lead to the hypothesis of an ARR2 regulating function in the cytokinin response. The comparative physiological analysis of far-red irradiated seedlings as well as the chalcon synthase gene expression pattern identified ARR2 as a positive regulator in the phyA-mediated high irradiance response (HIR). The proof of ARR2 being involved in ethylene signal transduction was furnished by different experimental approaches. Physiological analysis of an *arr2* null mutant as well as ARR2^{D80E} overexpressing plants identified ARR2 as a regulating component of the ethylene response pathway. Transient transactivation analysis in protoplasts confirmed these results. The cell free phosphorelay assay identified the downstream ethylene receptor kinase ETR1 as a putative phosphorylating component of ARR2. Examination of the pathogen fungi *Botrytis cinerea* and *Peronospora parasitica* as well as drought experiments suggest a role of ARR2 in the response to pathogens and abiotic stress. Based on microarray analysis of *arr2* null mutant and ARR2^{D80E} plants, two component system is thought to influence different signalling pathways directly or indirectly. In conclusion, these data demonstrate that two component systems appear to be not only primary signalling mechanisms but serve as molecular backbone for a complex signal transduction network mediating fine tuning of signals and cross talk between different signal pathways.

7 LITERATUR

- Abel S und Theologis A. 1994: Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: A versatile experimental system to study gene expression. *Plant J* 5:421-427.
- Abeles FB, Morgan PW und ME Saltveit. 1992: Ethylene in plant biology. 2. Auflage. Academic press, New York.
- Albrecht V. 2002: Molekulare Funktionsanalyse von Signaltransduktionssystemen in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universität Ulm.
- Ames P, Studdert CA, Reiser RH, Parkinson J S. 2002: Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7060-7065.
- Anantharaman V, Aravind L. 2001: The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* 26: 579-582.
- Appleby JL, Parkinson JS und RB Bourret. 1996: Signal transduction via the multi-step-phosphorelay: Not necessarily a road less travelled. *Cell* 86: 845-848.
- Aravind L, Ponting CP. 1999: The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* 176: 111-116.
- Bechthold N, Ellis J und G Pelletier. 1993: In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci Paris, Life Sci* 316: 1194-1199.
- Becker D, Kemper E, Schell J und R Masterson. 1992: New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20: 1195-1197.
- Bent AF. 2001: Plant mitogen-activated protein kinase cascades: Negative regulatory roles turn out positive, *Proc Nat Acad Sci USA* 98: 784-786
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. 2002: Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* 29: 23-32.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C und H Kende. 1988: Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241: 1086-1089.
- Bleecker AB. 1999: Ethylene perception and signalling: An evolutionary perspective. *TIPS* 4: 269-274.

- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua N-H. 1994: Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 77: 73-81.
- Bowler C und Chua NH. 1994: Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* 6-11: 1529-41.
- Boylan MT, Quail PH. 1996: Are the phytochromes protein kinases? *Protoplasma* 195: 12-17.
- Brandstatter I und Kieber JJ. 1998: Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1009-1020.
- Camprubi P und Nichols R. 1979: Ethylene-induced growth of petals and styles in the immature carnation inflorescence. *J. Hortic. Sci.* 54: 225-228.
- Cancel JD und Larsen PB. 2002: Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 causes enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 1557-1567.
- Cary AJ, Liu W, Howell SH. 1995: Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol* 107: 1075-1082.
- Chae HS, Faure F, Kieber JJ. 2003: The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15: 545-559.
- Chamovitz DA, Deng X-W. 1996: Light signaling in plants. *Crit Rev Plant Sci* 15: 455-478.
- Chang C und Stewart RC. 1998: The two-component system. Regulation of diverse signalling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol* 117: 723-731.
- Chang C., 2003: Ethylene signaling: the MAPK module has finally landed. *Trends Plant Sci* 8-8: 365-368.
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W und Ecker J. 1997: Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144.
- Chaudhury AM, Letham S, Craig S, Dennis ES. 1993: *amp1*: a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J* 4: 907-916.
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Kaatgiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, 2002: Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factors genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-574.

- Chin-Atkins AN, Craig S, Hocart CH, Dennis ES, Chaudhory AM. 1996: Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis* amp1 mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta* 198: 549-556.
- Chory J 1992: A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Development* 115: 337-354.
- Chory J 1993: Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet* 9: 167-172.
- Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C. 1998: Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS1 ethylene receptors. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 5401-5406.
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ. 2000: Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* 124: 1706-1717.
- D'Agostino IB und Kieber JJ. 1999: Molecular mechanisms of cytokinin action. *Curr Opin Plant Biol* 2: 359-364.
- Dahnous K, Vigue GT, Law AG, Konsak CF und Miller DG. 1982: Height and yield response of selected wheat, barley and triticale cultivars to ethephon. *Agro J* 74: 580-582.
- Daris SJ und Vierstra RD. 1996: Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* 36: 521-528.
- Dong J, Chen C, Chen Z. 2003: Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51(1): 21-37.
- Ecker JR. 1995: The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000: The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5: 199-206.
- Feldmann KA, Marks MD, Christianson ML, Quatrano RS 1989: A dwarf mutant in *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science* 243: 1245-1408.
- Frank M, Guivarch A, Krupkova E, Lorenz-Meyer I, Chriqui D, Schmülling T. 2002: Tumorous shoot development (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. *Plant J* 29-1: 73-85.
- Frazekas de St. Groth S, Webster RG und A Datyner. 1963: Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic stripes. *Biochem Biophys Acta* 71: 377-391.
- Gamble RL, Qu X, and Schaller GE. 2002: Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. *Plant Physiol* 128: 1428-1438.

- Gamble RL, Coonfield ML und GE Schaller. 1998: Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7825- 7829.
- Gao Z, et al. 2003: Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. J Biol Chem 278: 34725-34732.
- Georgellis D, Lynch AS und ECC Lin. 1997: In vitro phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of E. coli. J Bacteriol 179: 5429-5435.
- Grefen C, Harter K. 2004: Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. Planta 219-5: 733-42. Epub 2004 Jul 01.
- Grefen, 2002: Funktionelle und molekulare Analyse des Zweikomponentensystems in *Arabidopsis thaliana* am Beispiel der Ethylensignaltransduktion. Staatsexamensarbeit. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
- Gudi G. 2002: Photoakustische Untersuchung und mathematische Modellierung der rhythmischen Ethylenemission mehltaubefallener Gurkenpflanzenpflanzen. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Guo H und Ecker JR. 2004: The ethylene signalling pathway: new insights. Curr. Opin Plant Biol 7: 40-49.
- Guzman P und Ecker J. 1990: Exploiting the Triple Response of *Arabidopsis* To Identify Ethylene-Related mutants. Plant Cell 2: 513-523.
- Eckardt NA.: A new classic of Cytokinin Research: Cytokinin-Defizient *Arabidopsis* Plant provide New Insights into Cytokinin. Plant Vol 15: 2489-2492.
- Hall AE, Chen QGC, Findell JL, Schaller GE und Bleecker AB. 1999: The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. Plant Phys. 121: 291-299.
- Hammond-Kosack KE und Jones JDG. 1996: Resistance gene-dependent plant defense response. The Plant Cell 8: 1773-1791.
- Hara K, Yagi M, Kusano T, Sano H. 2000: Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. Mol Gen Genet, 263: 30-37.
- Hass C, Weini S, Harter K, Kudla J. 2004a: Functional genomics of protein phosphorylation in *Arabidopsis thaliana*. In: Leister D. (ed.) Plant Functional Genomics; The Haworth Press, Binghampton, NY. Im Druck.
- Hass C, Lohrmann J, Albrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schafer E, Kudla J, Harter K. 2004b: The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. EMBO J. 23-16: 3290-302. Epub 2004 Jul 29.

- He SY, Bauer DW, Collmer A, Beer SV. 1994: Hypersensitive response elicited by *Erwinia anglovora* requires active plant metabolism. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 289-292.
- Hou Y, von Arnim AG, Deng XW. 1993: A new class of *Arabidopsis* constitutive photomorphogenic genes involved in regulating cotyledon development. *Plant Cell* 5: 329-339.
- Hua J und Meyerowitz EM. 1998: Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261-271.
- Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ. 2003: Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 33: 221-233.
- Hughes JE, Lamparter T, Mittmann F, Hartmann E. 1997: A procaryotic phytochrome. *Nature* 386: 663.
- Hummel F. 2001: Phänotypische Charakterisierung des Responseregulators ARR2 Diplomarbeit. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
- Hunt MD und Ryals JA. 1996: Systemic acquired resistance signal transduction. *Crit Rev Plant Sci* 15: 538-606.
- Hutchison CE und Kieber JJ. 2002: Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Suppl* 14: S47-S59
- Hwang I, Chen H-C, Sheen J. 2002: Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 500-515.
- Hwang I und Sheen J. 2001: Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389.
- Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C und Mizuno T. 1998: Response regulators implicated in his to asp phosphotransfer signalling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2691-2696.
- Imamura A, Yoshino Y, Mizuno T. 2001: Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2113-2117.
- Inoue H, Nojima H und H Okayama. 1990: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K und Kakimoto T. 2001: Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Johnson PR und Ecker JR. 1998: The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu Rev Genet* 32: 227-254.

- Kakimoto T 1996: CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985.
- Kakimoto T. 2003: Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev., Plant Biol* 54: 605-627.
- Kende H und Zeevaart JAD. 1997: The five „classical“ plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.
- Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds.). 1994: *Photomorphogenesis in Plants* (2nd Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London.
- Khurana JP, Kochhar A, Tyagi AK. 1998: Photosensory perception and signal transduction in higher plants - molecular genetic analysis. *Critical Rev Plant Sci* 17: 465-539.
- Kiba T et al. 1999: Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 40: 767-771.
- Kieber JJ 1997: The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 277-296.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, and Ecker JR. 1993: CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.
- Kim CY, Liu Y, Thorm ET, Yang H, Fukurshide. Aktivation of a Stress-responsive Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Induces the Biosynthesis of Ethylene in plants. *Plant Cell* 15: 2707- 2003-2718.
- Krauss G. 1997: *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Wiley-VCH. Weinheim.
- Kubo M und Kakimoto T. 2000: The *CYTOKININ-HYPERSENSITIVE* genes of *Arabidopsis* negatively regulate the cytokinin-signaling pathway for cell division and chloroplast development. *Plant J* 23 (3): 385-394
- Larsen PB, Cancel JD. 2003: Enhanced ethylene responsiveness in the *Arabidopsis* *eer1* mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A A regulatory subunit, RCN1. *Plant J* 34: 709-718.
- Larsen PB und Chang C. 2001: The *Arabidopsis eer1* Mutant Has Enhanced Ethylene Responses in the Hypocotyl and Stem. *Plant Phys* 125: 1061-1073.
- Lawton K, Potter SL, Uknes S und Ryals J. 1994: Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6: 581-588.

- Lohrmann J, Buchholz G, Keitel C, Sweere U, Kircher S, Bäurle I, Kudla J, Schäfer E und Harter K. 1999: Differential expression and nuclear localization of response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* 1: 495-505.
- Lohrmann J, Sweere U, Zabaleta E, Bäurle I, Keitel C, Kozma-Bognar L, Brennicke A, Kudla J, Schäfer E und Harter K. 2001a: The response regulator ARR2: A pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear-encoded mitochondrial complex I genes. *Mol Gen Genomics* 265: 2-13.
- Lohrmann J und Harter K. 2002: Plant two-component signalling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol* 128: 363-369.
- Lohrmann J. 2001: *Arabidopsis* B-Typ Responseregulatoren sind Transkriptionsfaktoren – Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von ARR2, ARR10 und ARR11. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2003: ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM und H Saito. 1994: A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369: 242-245.
- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Biidonen M, Benfey PN und Helarriutta Y. 2000: A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Develop* 14: 2938-2943.
- Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguche M, Ueguche C, Sugiyama T, Mizuno T. 2000: Genes encoding pseudo-response regulators: insight into his-to-asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 791-803.
- Maniatis T, Fritsch EF und J Sambrook. 1982: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Mas P, Alabadi D, Yanovsky MJ, Oyama T, Kay SA. 2003: Dual Role of TOC1 in the Control of Circadian and Photomorphogenesis Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 223-236.
- Matthews RER. 1991: *Plant Virology*, 3rd Edition. 3 San Diego: Academic Press.
- McCourt P. 1999: Genetic analysis of hormone signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 219-243.
- Menges M, Hennig H, Gruissem W, Murray AH. 2002: CellCycle-regulated Gene Expression in *Arabidopsis*. *J BiolChem*: 277-44: 41987-42002.
- Michael TP, Salome PA, Yu HJ, Spencer TR, Sharp EL, McPeck MA, Alonso JM, Ecker JR, McClung CR. 2003: Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* 302-5647: 1049-53.

- Miller CO. 1958: The relationship of the kinetin and red light promotions of lettuce seed germination. *Plant Physiol* 33: 115-117.
- Miyata S, Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K und K Shinozaki. 1998: Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domaine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 437: 11-14.
- Mok DW und Mok MC. 2001: Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118.
- Møller SG, Chua NH. 1999: Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J Mol Biol* 293: 219-234.
- Mougel C, Zhulin IB. 2001: CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci* 26: 582-584.
- Nagy F, Schäfer E. 2000: Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants. *EMBO J* 19: 157-163.
- Nakamura A, Kakimoto T, Imamura A, Suzuki T, Ueguchi C und T Mizuno. 1999: Biochemical characterization of a putative cytokinin-responsive His-kinase, CKI1, from *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 9: 1627-1630.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C. 2004: Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 1365-77. Epub 2004 May 21.
- Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H. 2000: Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J* 22-1: 29-38.
- Oñate-Sánchez L und Singh KB. 2002: Identification of *Arabidopsis* Ethylene-Responsive Element Binding Factors with Distinct Induction Kinetics after Pathogen Infection. *Plant Phys* 128: 1313-1322.
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. 2003: A MAPK pathway mediates ethylene signalling in plants. *EMBO J* 22: 1282-1288.
- Parinov S, Sevugan M, Ye D, Yang WC, Kumaran M, Sundaresan V. 1999: Analysis of flanking sequences from Dissociation insertion lines: A database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2263-2270.
- Parkinson JS und Kofoid EC. 1992: Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu Rev Genet* 26: 71-112.

- Pischke MS, Jones LG, Otsuga D, Fernandez DE, Drews GN. 2002: An Arabidopsis histidine kinase is essential for megagametogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 99-24: 15800-15805.
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. 1996: Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorely mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 'two component' osmosensor. Cell 86: 865-875.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P. 2003: EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F Box proteins: EBF1 and EBF2. Cell 115: 679-689.
- Quail PH, Briggs WR, Pratt LH. 1978: In vivo phosphorylation of phytochrome. Carnegie Institution Yearbook 77: 342-344.
- Quail PH. 1997: An emerging molecular map of the phytochromes. Plant Cell Environ 20: 657-665.
- Quirino BF, Noh Y-S, Himelblau E, Amasio RM. 2000: Molecular aspects of leaf senescence. Trends Plant Sci 5: 278-282.
- Rashotte M, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ. 2003: Expression profiling of cytokinin action in Arabidopsis. Plant Physiol. 132: 1998-2011.
- Reid JB und Howell SH. 1995: Hormone mutants and plant development. In: Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. P. Davis, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 448 – 485.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C-Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu, G-L. 2000: Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290 (5499): 2105-2110.
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Mejean V und M Foglino. 2000: Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: Why so many? TIM 8: 498-504.
- Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB. 1999: A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. Science 283: 996-998.
- Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A 2001: ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. Science 294: 1519-1521.
- Sakai H, Aoyama T, Oka A. 2000: Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. Plant J 24: 703-711.
- Sawa S, Watanabe K, Goto K, Liu YG, Shibata D, Kanaya E, Morita EH, Okada K. 1999: FILAMENTOUS FLOWER, a meristem and organ identity gene of

- Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes Dev* 13-9: 1079-88. Erratum in: *Genes Dev* 1999: 13-17: 2337.
- Schägger H, von Jagow G. 1987: Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379.
- Schaller GE und Bleecker AB. 1995: Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science* 270: 1809-1811.
- Schaller GE. 2000: Histidine kinases and the role of two-component systems in plants. *Adv Bot Res* 32: 109-148.
- Schneider-Poetsch HAW. 1992: Signal transduction by phytochrome: phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterial sensor proteins. *Photochem Photobiol* 56: 839-846.
- Shinozaki K und Yamaguchi-Shinozaki K. 1997: Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115: 327-334.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000: Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3-3: 217-23.
- Singh KB 1998: Transcriptional regulation in plants: The importance of combinatorial control. *Plant Physiol* 118: 1111-1120.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q und JR Ecker. 1998: Nuclear events in ethylene signalling: a transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive3 and ethylene-response-factor1. *Genes and Develop* 12: 3703-3714.
- Stepanova AN und JR Ecker. 2000: Ethylene signalling: from mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 353-360.
- Stock AM, Robinson VL und PN Goudreau. 2000: Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183-215.
- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. 1989: Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53: 450-490.
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA und SA Kay. 2000: Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *toc1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289: 768-771.
- Su W, Howell SH. 1995: A single genetic locus, *ckr1*, defines *Arabidopsis* mutants in which root growth is resistant to low concentrations of cytokinin. *Plant Physiol* 99: 1569-1574.
- Suzuki T, Ishikawa K, Yamashino T, Mizuno T. 2002: An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (HPT) factor implicated in phosphorelay signal

- transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant Cell Physiol* 43: 123-129.
- Suzuki K, Suzuki N, Ohme-Takagi M, Shinshi H. 1998a: Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting. *Plant J* 15: 657-665.
- Suzuki T, Imamura A, Ueguchi C und T Mizuno 1998b: Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 39: 1258-1268.
- Suzuki T, Miwa K, Ishiwaka K, Yamada H, Aiba H und T Mizuno 2001b: The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* 42: 107-113.
- Suzuki T, Sakurai K, Ueguchi C, Mizuno T. 2001a: Two types of putative nuclear factors that physically interact with Histidine-containing phosphotransfer (HPT) domains, signalling mediators in His-to-Asp Phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42: 37-45.
- Sweere U (2001): Der Responsregulator ARR4: Eine integrierende Komponente von licht- und hormonabhängigen Signaltransduktionswegen in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Bäurle I, Kudla J, Nagy F, Schäfer E, Harter K. 2001: Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 294-5544: 1108-11.
- Tajima Y, Imamura A, Kiba T, Amano Y, Yamashino T, Mizuno T. 2004: Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45: 28-39.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Thomma BP, Eggermont HJ, Tierens K, KFM-J, Broekaert WF. 1999: *Plant Phys* 121: 1093-1101.
- To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, Deruere J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ. 2004: Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 658-671.
- Ueguchi C, Sato S, Kato T, Tabata S. 2001: The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42: 751-755.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2001: Plant histidine kinases: An emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Science STKE* 109:RE18: 1-4.

- Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K und K Shinozaki 2000: Possible his to asp phosphorelay signalling in an *Arabidopsis* two-component system. FEBS Lett 478: 227-232.
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T und K Shinozaki 1999: A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell 11: 1743-1754.
- van Zhong G und Burns JK. 2003: Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. Plant Mol Biol 53: 117-131.
- Vierstra RD. 1993: Illuminating Phytochrome functions - There is light at the end of the tunnel. Plant Physiol 103: 679-684.
- Vogel JP, Schuerman P, Woeste K, Brandstatter I und JJ Kieber 1998a: Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. Genetics 149: 417-427.
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A und JJ Kieber 1998b: Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. Proc Natl Acad Sci USA 95: 4766-4771.
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR. 2002: Ethylene biosynthesis and signaling Networks. Plant Cell: 131-151.
- Wang H, und Deng XW. 2003: Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. Trends Plant Sci 8 (4): 172-178.
- Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleecker AB. 2003: Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. Proc Natl Acad Sci USA 100: 352-357.
- Watson JC. 2000: Light and protein kinases. Adv Bot Res 32: 149-184.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T. 2001: Regulation of plant growth by cytokinin. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10487-10492.
- Whalen MC, Innes, RW, Bent AF, Staskawicz BJ. 1991: Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. Plant Cell 3: 49-59.
- Wilmotte A. 1994: Molecular evolution und taxonomy of the cyanobacteria. In: Bryant DA (Ed.): The molecular biology of Cyanobacteria. 1-25.
- Wilson AK, Pickett FB, Turner JC, Estelle M. 1990: A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. Mol Gen Genet 222: 377-383.

- Wong Y-S, Cheng H-C, Walsh DA, Lagarias JC. 1986: Phosphorylation of Avena phytochrome in vitro as a probe of light-induced conformational changes. *J Biol Chem* 261: 12089-12097.
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Mizuno T. 2001: The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* 42: 1017–1023.
- Yamamoto YY, Matsui M, Deng XW. 1998: Positive feedback in plant signaling pathways. *Trends Plant Sci* 3: 374-375.
- Yanagisawa S, Yoo S-D, Sheen J. 2003: Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425: 521-525.
- Yang HS, Huang HC, Collmer A. 1993: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive resistance in plants. *Cell* 73: 1255-1266.
- Yeh K-C, Murphy JT, Lagarias JC. 1997: A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277: 1505-1508.
- Yeh K-C, Lagarias JC. 1998: Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13976-13981.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33.
- Zhu T. 2003: Global analysis of gene expression using GeneChip microarrays. *Curr Opin Plant Biol* 6-5: 418-425.

Dankeschön

Die vorliegende Arbeit wurde im April 2001 am Institut für Biologie II im Fachbereich Botanik/Pflanzenphysiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in den Räumen von Prof. Dr. Eberhard Schäfer, unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Harter begonnen. Herrn Prof. Dr. Klaus Harter, der einen Ruf an die Universität zu Köln an den Lehrstuhl II des Botanischen Instituts erhielt, folgend, setzte ich dort meine Doktorarbeit bis zum Dezember 2004 fort.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Eberhard Schäfer für die zeitweilige Bereitstellung des Arbeitsplatzes in Freiburg, die guten Arbeitsbedingungen und das Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Klaus Harter danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die fantastischen Arbeitsbedingungen. Besonders dankbar bin ich über seine fröhliche Gelassenheit mit der er mittleren Katastrophen begegnet und sie in positive Energien umwandelt. Die besten Experimente sind die, welche man gar nicht geplant hat. Das kreative Umfeld und die wissenschaftliche Freiheit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte es mir die Ergebnisse dieser Arbeit zu erbringen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Harter und Herrn Prof. Dr. Martin Hülskamp danke ich für die Übernahme des Prüfungsausschusses und Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth für die Leitung der Prüfung.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eberhard Schäfer danke ich für die wertvollen Diskussionen, und Anregungen, Hilfestellungen und das großartige Miteinander. Florian, Uta, Martina, Jan, Markus, Rebecca, Madhu, Virtudes, Tim, Thomas, Birgit, Doris und Inge, euch allen möchte ich für das fröhliche Betriebsklima danken – ich werde nie unsere Lachorgien, Grillfeste, Sraußenbesuche, Betriebs- und CIWE-Ausflüge vergessen!

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe in Köln danken. *Hart, Harter am Hartersten!* Liebe Gabi, Christina, Katia, Ingo, Dierk, Christopher und Jakub, mit euch waren auch in stressigen Zeiten ein erfolgreiches Arbeiten und entspannende Doppelkopf- und Fußballabende sowie nasse Betriebsausflüge und Tanzabende im Gewächshaus möglich. Ich habe viel Spaß mit Euch gehabt.

Ich bedanke mich auch bei Dierk Wanke für seine Diskussionsbereitschaft und Gabi Fiene, deren tatkräftige Unterstützung wertvoll für meine Arbeit war.

Allen Freunden und Familienmitgliedern danke ich für fortwährendes Interesse an meiner Arbeit, was auch dazu beitrug, die anfänglichen Dürreperioden der Laborarbeit zu überwinden.

Wichtig für das Gelingen dieser Arbeit war auch der Einsatz von Dr. Ulrich Siewers und Martina Tang, die meine Rechtschreibung und andere Sprachschwierigkeiten unter die Lupe genommen hatten. Danke, ihr Lieben, für die sehr zügigen und professionellen Korrekturen. Den Doktoren Ingo Ciolkowski und Dierk Wanke danke ich auch für Verbesserungen, insbesondere für Eure wertvollen inhaltlichen Vorschläge, die mir geholfen haben, meine Arbeit auch für andere verständlich darzustellen.

Einen ganz lieben Dank an Gjon, der mich in allen Lebenslagen unterstützt und damit die Freude an der Arbeit verstärkt.

Und zu guter Letzt möchte ich meiner lieben Mutter danken. Ihre bedingungslose Unterstützung und der feste Glaube an mich ermöglichten erst die Fertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name, Vorname	Haß, Claudia
Adresse	Pellenzstr. 25 50823 Köln
Geburtsdatum, -ort	11.11.1968 in Bremen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Ulrike Haß, geb. Tuma und Walter Haß

Schulausbildung

1975- 1979	Grundschule Achim
1979 - 1981	Orientierungsstufe Ottersberg
1981 - 1989	Gymnasium Achim
08.05.1989	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Beruflicher Werdegang

01.08.1989 – 18.06.92	Ausbildung zur Floristin in Achim Abschluss: Floristengesellin
19.06.1992 – 30.04.93	Floristin bei dem "Ueser Blumenkorb" in Achim
03.05.93 – 30.09.94	Briefzustellerin bei der Deutschen Bundespost in Bremen
01.10.93 – 30.04.94	Arbeitslos
01.05.94 – 30.06.94	Zeitangestellte bei der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe im Referat B4.13 in Hannover
01.07.1994 – 30.9.94	Arbeitslos

Studium

01.10.1994 – 1996	Grundstudium Biologie an der Universität Bremen
24.01.97	Diplomvorprüfung
1997 – 1998	Hauptstudium Biologie an der Universität Bremen Hauptfach: Mikrobiologie 1. Nebenfach: Zell- und Molekularbiologie 2. Nebenfach: Botanik
1998 – 1999	Studium der Zell- und Molekularbiologie an der University of Glasgow (Schottland)
1999 - 2000	Fortsetzung des Hauptstudiums Biologie an der Universität Bremen

Fortsetzung des Lebenslaufs

- 2000 Prüfungen in Haupt- und Nebenfächern an der Universität Bremen, Fachbereich 2
Biologie/Chemie
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Fischer an der Universität Bremen im UFT, Leobener Str.
29. 01. 2001 Abgabe der Diplomarbeit
Titel: "UV-Schutzstrategien bei marinen Cyanobakterien der Ordnung Oscillatoriales"
- 29.03.2001 Abschluss: Diplom in Biologie
- Promotion**
- 01.04 2001 Beginn der Doktorarbeit unter der Anleitung von Dr. Klaus Harter an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- 01.04. 2003 Fortführung der Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Harter am Botanischen Institut, Lehrstuhl II an der Universität zu Köln.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von den unten aufgeführten Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klaus Harter betreut worden.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Hass C, Lohrmann J, Albrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schafer E, Kudla J, Harter K. 2004: The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in Arabidopsis. EMBO J. 23-16: 3290-302. Epub 2004 Jul 29.