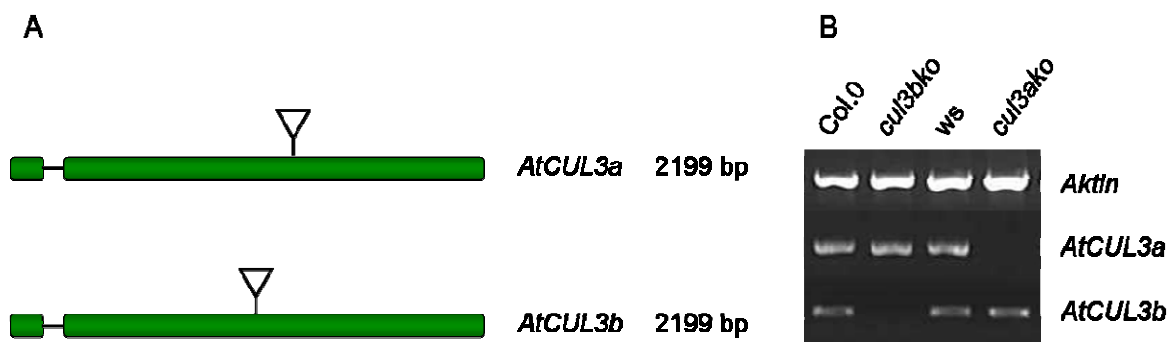


### 3 Ergebnisse

Über die biologische Funktion der Culline AtCUL3a und AtCUL3b aus *Arabidopsis thaliana* ist nur sehr wenig bekannt. Bisher konnte gezeigt werden, dass sie mit BTB/POZ-MATH-Proteinen *in vitro* und in Y2H-Ansätzen interagieren (Weber *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2005). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust beider Culline embryolethal wirkt (Figueroa *et al.*, 2005; Gingerich *et al.*, 2005). Darüber hinaus gibt es keine weiteren Erkenntnisse, welche Rolle diese beiden Culline in der Pflanze spielen.

Aus diesem Grund war eine generelle Charakterisierung der Proteine ein Ziel der Arbeit. Eine gängige Methode zur Untersuchung einzelner Proteine ist die Analyse von Nullmutanten (Knockoutmutanten), bei denen die Expression des jeweiligen Gens ausgeschaltet ist. Für AtCUL3a und AtCUL3b lagen solche Nullmutanten vor, die durch T-DNA Insertion aus den Ökotypen Wassilewskajia (WS) bzw. Columbia 0 (Col.0) entstanden sind und im Folgenden als *cul3ako* und *cul3bko* bezeichnet werden. Abb. 3-1 A zeigt schematisch die Struktur von AtCUL3a und AtCUL3b und die Lage der jeweiligen T-DNA Insertionen im Gen. Die Analyse homozygoter Mutanten durch RT-PCR zeigte einen vollständigen Verlust der Expression von AtCUL3a bzw. AtCUL3b (Abb. 3-1, B).



**Abb. 3-1:** Schematische Übersicht der für die Arbeiten verwendeten T-DNA Insertionsmutanten. A, Exons sind durch Balken repräsentiert, Introns durch eine Linie, die Lage der Insertion durch ein Dreieck. In beiden Fällen lagen Insertionen in Exonbereichen vor. B, RT-PCR homozygoter Nullmutanten, die den Verlust der jeweiligen Cullinexpression belegt.

### 3.1 Charakterisierung der *cul3ako*- und *cul3bko*-Nullmutanten

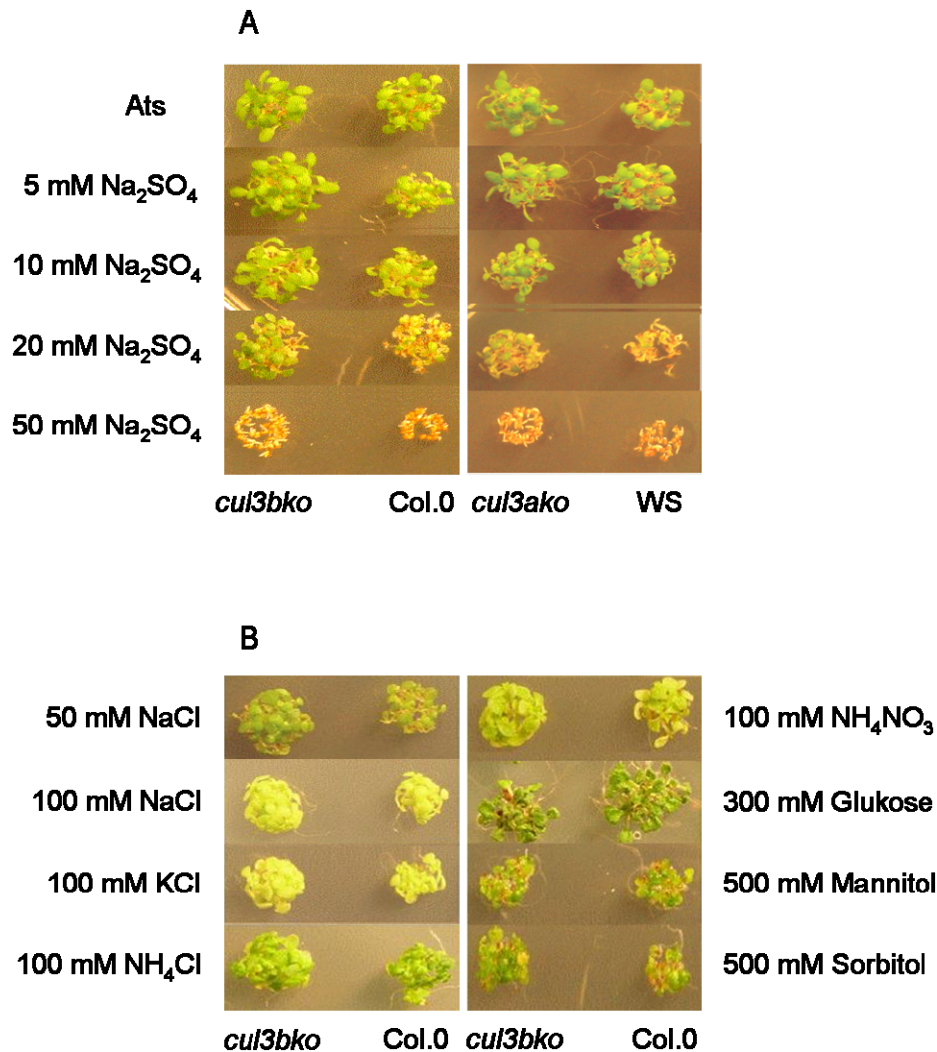
Aufgrund der hohen Identität zwischen AtCUL3a und AtCUL3b und des Fehlens eines klaren Phänotyps in *cul3ako*- und *cul3bko*-Mutanten unter normalen Wachstumsbedingungen, scheint eine funktionale Redundanz beider Culline wahrscheinlich. Um einen Phänotyp hervorzurufen, der sich vom Wildtyp unterscheidet, wurden die Nullmutanten verschiedensten Bedingungen ausgesetzt. Auf diese Weise sollten Rückschlüsse über funktionale Zusammenhänge zwischen den Cullinen gezogen und Aussagen über ihre biologische Rolle getroffen werden.

#### 3.1.1 Einfluss von Osmotica, Zuckern und Salzen auf die Keimung

Die mutanten Linien von AtCUL3a und AtCUL3b wurden unter verschiedenen Bedingungen keimen gelassen. Dabei wurden bei jedem Versuchsansatz die Konzentration eines der Salze Natrium-, Kalium-, Ammoniumchlorid, Ammoniumnitrat bzw. Natriumsulfat erhöht. In weiteren Versuchsansätzen wurde der Einfluss von Zucker (Glukose) und Osmotika (Mannitol, Sorbitol) auf die Keimung der Nullmutanten untersucht.

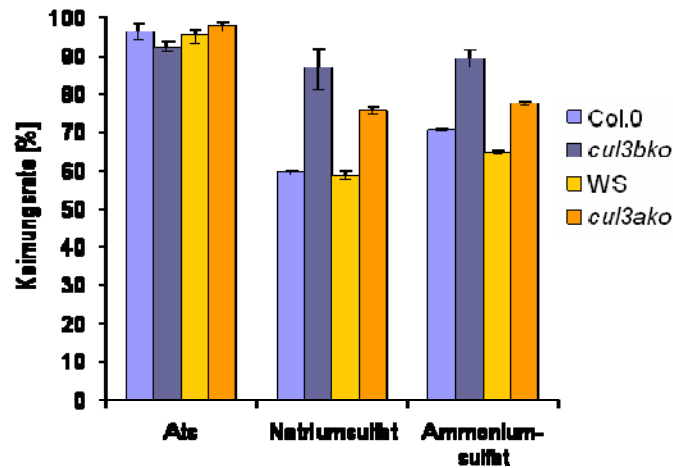
Bei erhöhten Sulfatkonzentrationen zeigte sich eine größere Keimungsaktivität von *cul3bko* im Vergleich zum Wildtyp. Die Untersuchung an *cul3ako*-Samen erbrachte ebenfalls eine Sulfattoleranz, die allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den *cul3bko*-Mutanten war. Abb. 3-2, A zeigt eine Konzentrationsreihe mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Sulfatquelle. Bis zu einer Konzentration von 10 mM keimten die Nullmutanten mit einer vergleichbaren Rate wie der Wildtyp. Ab 20 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> waren die ersten Abweichungen von *cul3bko* zu Col.0 festzustellen. In *cul3ako* dagegen machte sich ein Unterschied erst bei 50mM Sulfat bemerkbar.

Im Gegensatz zu Sulfatverbindungen hatten sowohl die erhöhten Konzentrationen der oben genannten Salze als auch Glukose und Osmotika keinen unterschiedlichen Einfluss auf das Keimungsverhalten von WT und Nullmutanten. (Abb. 3-2, B, *cul3bko* ist exemplarisch gezeigt).



**Abb. 3-2:** Vergleichendes Keimungsverhalten von Wildtyp mit *cul3ako*- und *cul3bko*-Nullmutanten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. A, 5 Tage nach der Keimung zeigten beide Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Toleranz auf 50 mM (*cul3bko*) bzw. 20 mM (*cul3ako*) Natriumsulfat. B, Die Verwendung anderer Zusätze im Medium wie Chlorid, Stickstoff, Zucker oder Osmotika (Sorbitol, Mannitol) beeinflusste die Keimung von WT und Nullmutanten vergleichbar.

Das Keimungsverhalten unter erhöhten Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- und (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentrationen wurde quantifiziert. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *cul3ko*-Nullmutanten unabhängig von der Art der dem Medium zugesetzten Sulfatquelle (Abb. 3-3). Während der Wildtyp nur noch eine Keimungsrate von 60 – 70% zeigte, konnten *cul3bko*- und *cul3ako*-Samen noch zu 80 – 95% keimen.



**Abb. 3-3:** Quantifizierung des Keimungsverhaltens von Wildtyp und *cul3ko* nach 4 Tagen auf Minimalmedium (Ats) bzw. mit unterschiedlichen Sulfat- und Stickstoffzusätzen. Als Keimungszeitpunkt wurde das Austreten der Radikula aus der Samenschale definiert.

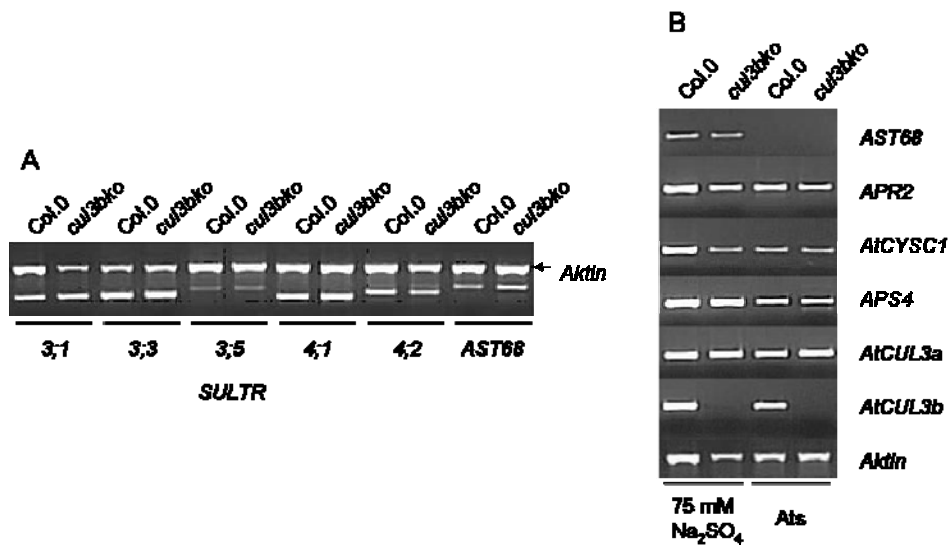
### 3.1.2 Untersuchung der Expression von Genen der Sulfatassimilation

Das veränderte Keimungsverhalten der Nullmutanten auf sulfathaltigem Medium war Anlass, einige Gene der Sulfatassimilation mittels semiquantitativer RT-PCR zu untersuchen.

Die Sulfataufnahme in die Zelle erfolgt über Sulfattransporter (14 in *A. thaliana*). Dort wird das Salz mittels ATP-Sulfurylasen (4, APS) an ATP gebunden und bildet APS (Adenosin-5'phosphosulfat). Dieses APS wird durch APS-Reduktasen (3, APR) reduziert und das entstandene Sulfid wird mit O-Acetylserin durch Cystein-Synthasen (9, CYS) zu Cystein verknüpft.

Für die RT-PCR wurden mehrere Sulfattransporter verschiedener Kategorien ausgewählt. AST68 ist ein niedrig affiner Transporter, der sowohl durch Sulfatzugabe als auch durch Sulfathunger induziert werden kann. Bei *SULTR3;5*, *SULTR4;1* und *SULTR4;2* handelt es sich um relativ schwach exprimierte Gene, während die Sulfattransporter *SULTR3;1* und *SULTR3;3* eine etwas stärkere Expression haben. Die ATP-Sulfurylasen, die APS-Reduktasen und die Cystein-Synthasen sind alle etwa gleich stark exprimiert, deshalb wurde beispielhaft aus jeder Enzymgruppe ein Gen ausgewählt. Da der Phänotyp bei *cul3bko* deutlich stärker ausgeprägt war als bei *cul3ako*, wurde nur die Expression der *cul3bko*-Pflanzen untersucht. Allerdings konnte bei den ausgewählten Genen

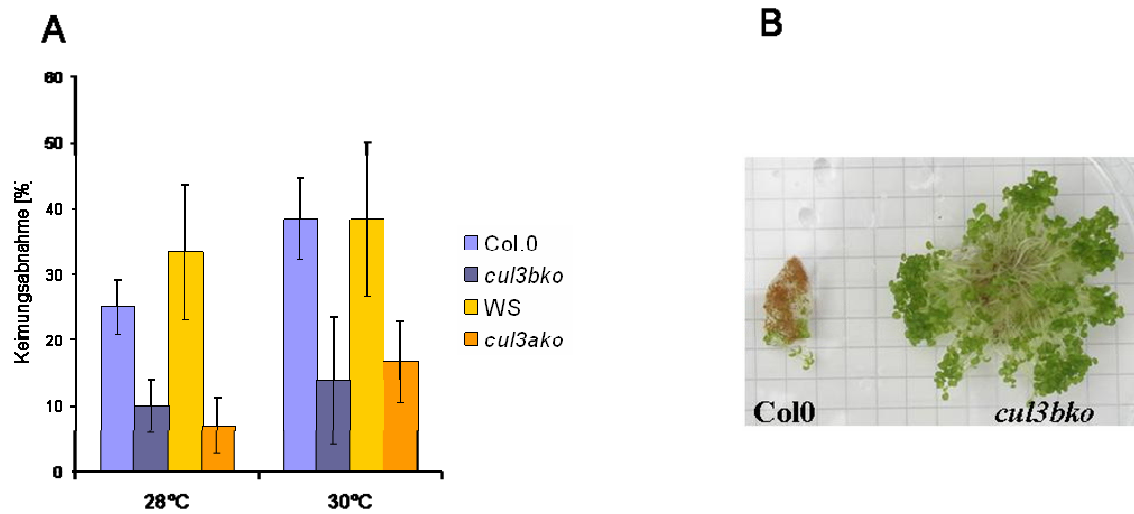
kein Unterschied in der Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3-4).



**Abb. 3-4:** Expressionsanalyse von Genen des Sulfatmetabolismus in Wildtyp Col.0 und *cul3bko*-Mutanten. Samen wurden in Sterilkultur auf sulfathaltigem (100 (A) oder 75 mM (B)) oder Minimalmedium (*Ats*) angezogen und drei Tage später auf eine veränderte Genexpression mittels RT-PCR überprüft. Es konnten keine veränderten Expressionen nachgewiesen werden. *SULTR*, Sulfattransporter; *AST68*, Sulfattransporter; *APS4*, ATP-Sulfurylase; *APR2*, APS-Reduktase; *AtCYSC1*, Cystein-Synthase.

### 3.1.3 Einfluss von erhöhten Temperaturen auf Keimung und Entwicklung

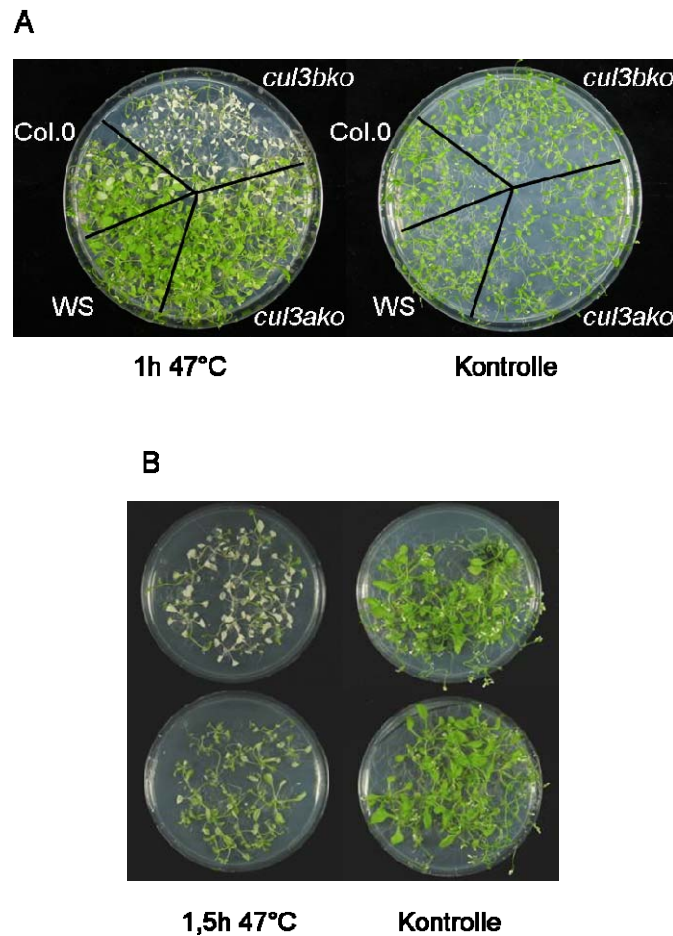
In einer weiteren Versuchsreihe wurde getestet, ob die Nullmutanten ein verändertes Verhalten gegenüber erhöhten Temperaturen oder Hitzeschock (HS) zeigten. Hierzu keimten Samen bei verschiedenen Temperaturen (20, 28, 30 und 37 °C) und die Abnahme der Keimungsrate wurde bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl *cul3ako* als auch *cul3bko* eine größere Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen hatte. Auch hier ließ sich eine größere Sensitivität von *cul3ako* beobachten (Abb. 3-5). Bei 37°C kam die Keimung im Wildtyp und in den Mutanten zum Stillstand.



**Abb. 3-5:** Keimungsverhalten der *cul3ko*-Nullmutanten und Wildtyp bei erhöhten Temperaturen. A, Die Inhibition der Keimung in Abhängigkeit ansteigender Temperaturen wurde für WS, *cul3ako*, Col.0 und *cul3bko* untersucht. Beide Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Abnahme der Keimungsrate bei Temperaturen zwischen 28-30°C. B, Phänotyp von *cul3bko* bei Wachstum bei erhöhten Temperaturen (28°C).

Das veränderte Keimungsverhalten von *cul3ako* und *cul3bko* bei erhöhten Temperaturen ist ein Hinweis auf eine mögliche Rolle von AtCUL3 bei einer Stresssignaltransduktion. Diesem Hinweis nachgehend wurde untersucht, ob die gestörte Stressantwort nur auf die Keimung beschränkt war oder ob auch ältere Pflanzen in ihrer Reaktion auf Hitze ein abweichendes Verhalten zeigten. Deshalb wurden 21 Tage alte Nullmutanten in einer folgenden Untersuchung einem Hitzeschock ausgesetzt.

Ein Hitzeschock bewirkt, ebenso wie starke Strahlung, eine Steigerung der Lipidperoxidation. Zusätzlich kommt es zu einer Schädigung des sehr temperaturempfindlichen Photosystems II. Um einen additiven Effekt von Hitze und Licht auszuschließen, wurden die Keimlinge in Sterilkultur für eine (*cul3bko*) bzw. 1,5 Stunden (*cul3ako*) bei einer Temperatur von 47°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden diese Pflanzen zur Regeneration für fünf Tage bei 22°C und einer Photoperiode von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit in einen Klimaschrank gestellt. Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass beide Nullmutanten sich nach diesem Hitzeschock nicht mehr erholen konnten und abstarben. Hier erwies sich *cul3bko* als sensitiver. Diese Pflanzen waren schon nach einer Stunde HS unter diesen Bedingungen nicht mehr überlebensfähig, während *cul3ako* erst nach 1,5 h bei 47°C einging. (Abb. 3-6).

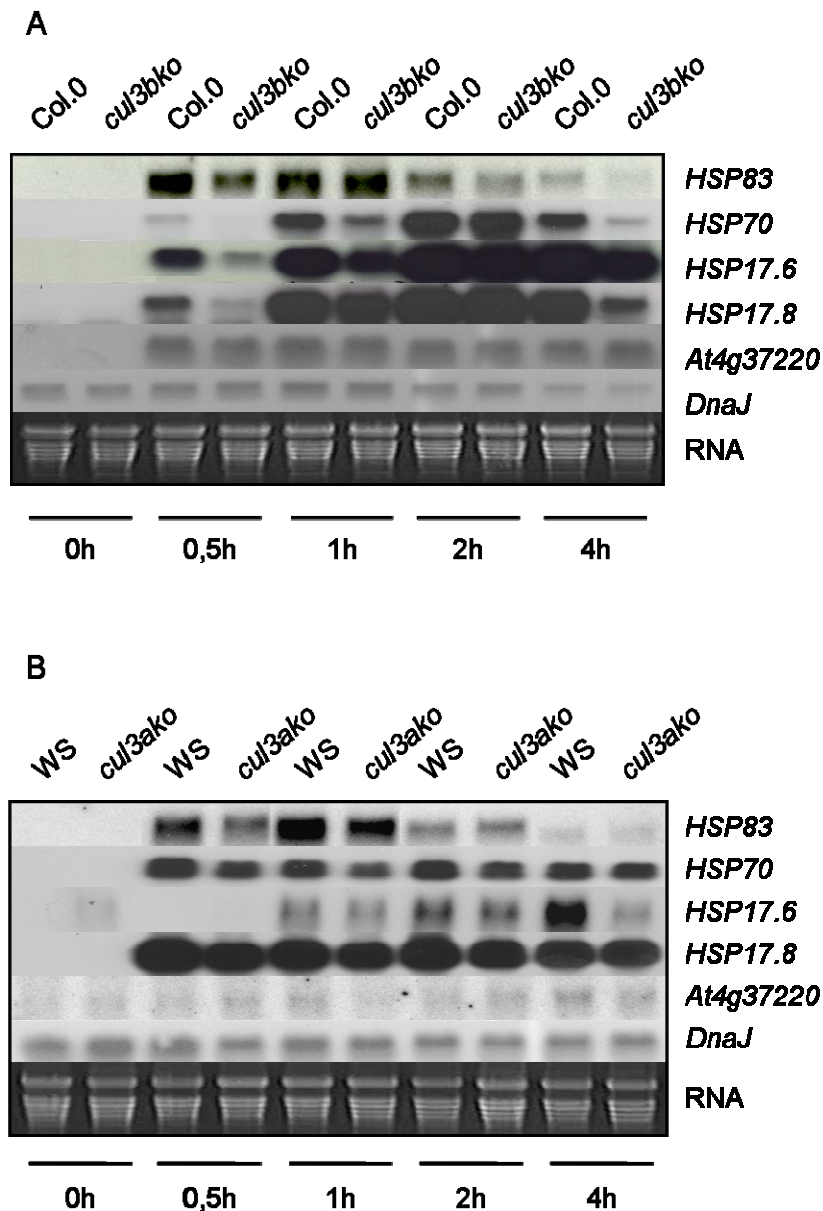


**Abb. 3-6:** Phänotyp von *cul3ko*-Pflanzen nach einem Hitzeschock bei 47°C. A, Absterben von *cul3bko* nach einem HS für 1h bei 47°C mit den überlebenden *cul3ako* und Wildtypen. B, Nach 1,5h konnte auch *cul3ako* den HS nicht mehr bewältigen.

### 3.1.4 Untersuchung der Expression von Hitzeschockgenen

Die Hitzeschockreaktion als spezielle Form einer zellulären Stressreaktion ist hochkonserviert. Die Zellen aller bisher untersuchten Organismengruppen reagieren auf subletalen HS mit einer schnellen, grundlegenden Umstellung ihrer Genexpression, die zur massiven Synthese von Hitzeschockproteinen (HSP) führt (zur Übersicht: Nover, 1991). Um zu untersuchen, ob dieses Schutzsystem gestört ist, wurden Northernblotanalysen durchgeführt. 11 Tage alte Pflanzen wurden in einer Zeitreihe einem HS von 37°C ausgesetzt, die Gesamt-RNA isoliert, diese in einem Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Für die anschließende Hybridisierung wurden Vertreter aus den unterschiedlichen Klassen der Hitzeschockproteine ausgewählt. Hierzu gehörten *HSP83* (*At5g52640*, HSP90-Klasse), *HSP70* (*At1g16030*, HSP70-Klasse), *HSP17.8Cl*

(*At1g07400*, small HSP) und *HSP17.6A* (*At5g12030*, small HSP). Zusätzlich wurden als Positivkontrolle das generell stressinduzierbare Gen *At4g37220* verwendet. Als Negativkontrolle diente ein *DnaJ*-Gen (*At4g13830*), dessen Protein zwar an HSP oder andere hitzeschockinduzierte Proteine bindet, aber nicht durch HS induziert wird.

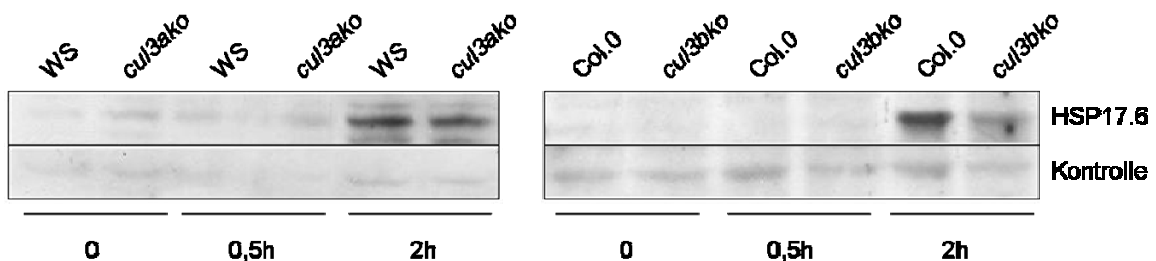


**Abb. 3-7:** Zeitabhängige Hitzeschockantwort von *cul3ko* nach 0,5h 1h, 2h und 4h Behandlung mit 37°C. A, *cul3bko*. B *cul3ako*. Nach 30 min war die Expression von *HSP83*, *HSP70*, *HSP17.6* und *HSP17.8* in den Mutanten deutlich geringer als bei den Wildtypen (WS und Col.0). Ausnahme *HSP17.6* in *cul3ako* und WS, hier zeigte sich erst nach 1 bis 2 h ein Unterschied. *At4g37220* und *DnaJ* zeigten keine oder nur sehr schwache Veränderungen.



Nach einem 30-minütigen Hitzeschock waren die *HSP*-Gene *HSP83*, *HSP70*, *HSP17.6*, *HSP17.8* und *At4g37220* deutlich hochreguliert. Nur *DnaJ* war durch einen Hitzeschock nicht induzierbar und zeigte über den gesamten Zeitraum des Experiments eine gleichmäßige Expression. *At4g37220* war zwar durch den HS induziert, es konnte aber kein Unterschied der Mutanten zum Wildtypen festgestellt werden. Die eigentlichen *HSP*-Gene waren in den Nullmutanten deutlich schwächer induzierbar. Bei der hitzesensitiveren *cul3bko* Nullmutante war dieser Effekt stärker ausgeprägt, als bei *cul3ako* (Abb. 3-7).

Die reduzierte Hitzeschockantwort konnte mittels eines spezifischen Antikörpers für *HSP17.6* auf Proteinebene bestätigt werden. Analog zur Analyse der *HSP*-Gene zeigte sich, dass die Expression von *HSP17.6* in *cul3bko* deutlich stärker beeinträchtigt war als in *cul3ako* (Abb. 3-8).

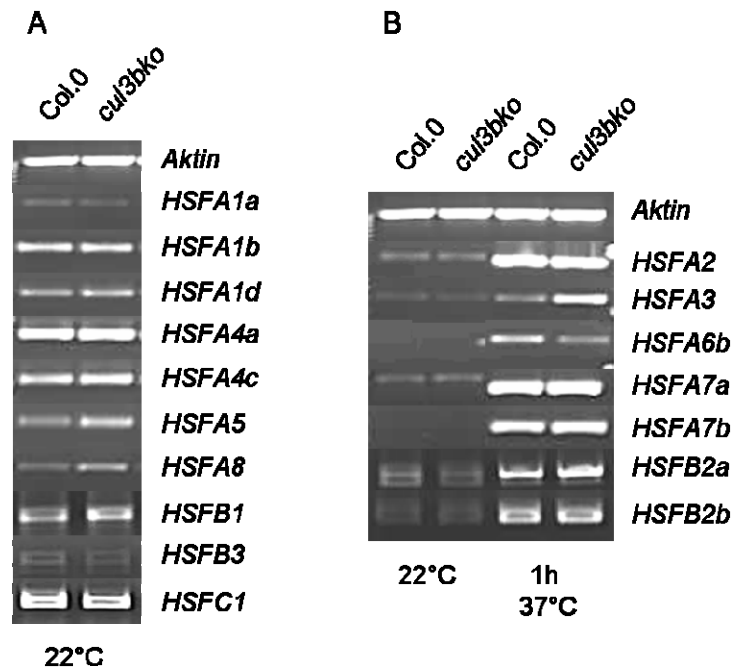


**Abb. 3-8:** Verzögerte Hitzeschockantwort bei *cul3ako* (links) und *cul3bko* (rechts) auf Proteinebene am Beispiel von *HSP17.6*.

### 3.1.5 Untersuchung der Expression von Hitzeschockfaktoren

Die Ursache für die gestörte Hitzeschockantwort könnte in einer veränderten Expression der Hitzeschockfaktoren (HSF) liegen. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression der *HSP*-Gene durch Anlagerung an sog. Hitzeschockelemente (HSE), die sich in deren Promotoren befinden.

Einige dieser HSF sind hitzeinduzierbar (Abb. 3-9, B), andere werden konstitutiv exprimiert (Abb. 3-9, A). Da die Unterschiede in der *HSP*-Expression bei *cul3bko*-Pflanzen deutlicher ausgeprägt waren als bei *cul3ako*-Pflanzen, wurden diese Mutanten zur Analyse der Expression der *HSF* herangezogen. In *Arabidopsis* sind bisher 21 Hitzeschockfaktoren identifiziert worden (Nover *et al.*, 2001), von denen HSFA1a, HSFA1b, HSFA1d, HSFA5, und HSFB1 zu den wichtigsten gehören. Es konnten 17 *HSF* mittels RT-PCR untersucht werden, für die fehlenden vier *HSF* (*HSFA1e*, *HSFA6a*, *HSFA9*, und *HSFB4*), konnte mit dieser Methode kein Ergebnis erzielt werden.



**Abb. 3-9:** RT-PCR Analyse von *HSF*-Genen in Wildtyp Col.0 und *cul3bko*. A, Nicht hitzeinduzierbare *HSFs*. B, Hitzeinduzierbare *HSFs* vor und nach einem HS bei 37°C.

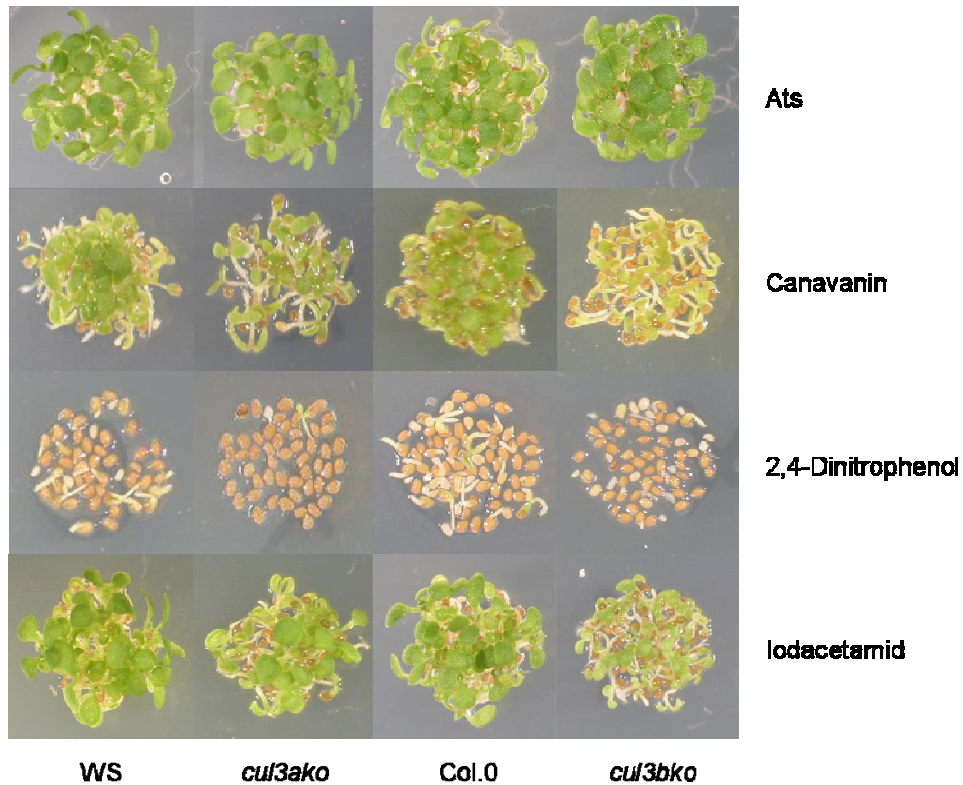
Die meisten Hitzeschockfaktoren in der Nullmutante zeigten eine dem Wildtyp vergleichbare Expression. Lediglich für die hitzeinduzierbaren *HSFA3* und *HSFA6b* wurde eine geringfügige Expressionsabweichung detektiert. Da diese beiden HSF nicht zu den Haupthitzeschockfaktoren gehören, ist es unwahrscheinlich, dass diese Expressionsänderung der Hauptgrund für die deutlichen Veränderungen der *HSP*-Genexpression und für den Phänotyp ist.

### 3.1.6 Spezifität der beobachteten Toleranz bzw. Sensibilität bei den *cul3ako*- und *cul3bko*-Mutanten

Die bisherigen Versuche hatten gezeigt, dass die Zugabe von Zuckern, Osmotika und hohe Konzentrationen von Salzen nicht generell zu einem veränderten Wachstum der *cul3ko* Nullmutanten führen. Dies konnte nur für Sulfat, Keimung bei erhöhten Temperaturen bzw. Hitzeschock beobachtet werden.

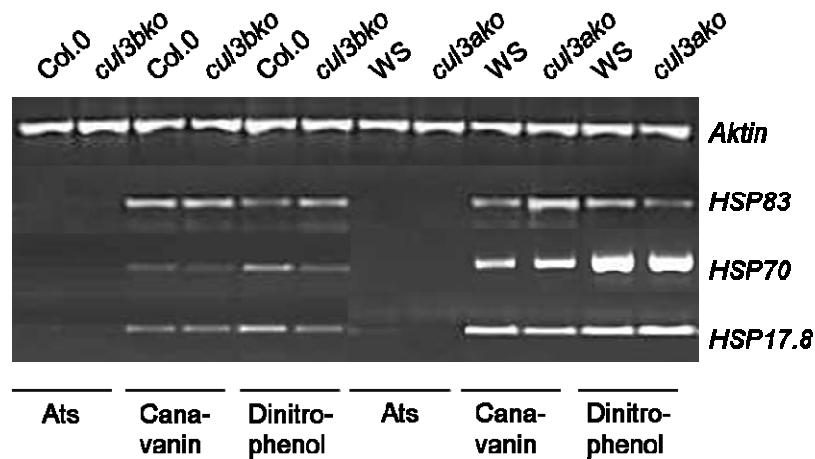
Es wurde daher der Frage nachgegangen, ob weitere Faktoren, die in Pflanzen als Auslöser für eine Expression der Hitzeschockgene beschrieben wurden, eine vergleichbare Toleranz bzw. Sensibilität auslösen. Hierzu zählen unter anderem Gifte der Atmungskette (Dinitrophenol) (Ashburner und Bonner, 1979), Aminosäureanaloge (Canavanin) (No-

ver, 1990), und Gifte gegen –SH Gruppen (Iodacetamid) (Nover, 1990). Die genannten Chemikalien führen – vergleichbar der Hitzeeinwirkung – zu Denaturierungen von Proteinen und können eine entsprechende Antwort des HSP-Schutzsystems auslösen.



**Abb. 3-10:** Wirkung verschiedener Chemikalien auf die Keimung von *cul3ko*-Samen. Für alle getesteten Substanzen konnte eine verringerte Keimung bei den Nullmutanten im Vergleich zu den Wildtypen beobachtet werden. Eingesetzte Konzentrationen: Canavanin: 115  $\mu$ M, 2,4-Dinitrophenol: 35  $\mu$ M, Iodacetamid: 33  $\mu$ M.

Für diesen Versuch wurden Samen der *cul3ko*-Mutanten parallel mit Wildtypsamensamen auf Ats-Platten unter Zusatz der oben genannten Verbindungen ausgebracht. Bei allen getesteten Substanzen war die Keimung der Nullmutanten stärker beeinträchtigt als bei den Wildtypsamensamen. Besonders bei Canavanin und Iodacetamid ist der Effekt stark ausgeprägt. Ähnlich der erhöhten Sensitivität gegenüber einer Hitzeschockbehandlung bei 47°C zeigte auch hier *cul3bko* eine größere Sensitivität im Vergleich zu *Col.0* und *cul3ako* (Abb. 3-10). Zur näheren Untersuchung der erhöhten Sensitivität wurde die Expression der *HSP*-Gene mittels RT-PCR analysiert.



**Abb. 3-11:** RT-PCR-Analyse der *HSP*-Gene in *cul3bko* nach Induktion mit Canavanin und 2,4-Dinitrophenol.

Eine Veränderung der Transkriptmenge an *HSP83*, *HSP70* und *HSP17.8* nach Induktion mit Canavanin und 2,4-Dinitrophenol in *cul3ko* im Vergleich zu Col.0 bzw. WS konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3-11). Es musste also eine generellere Störung in der Vermittlung von Stresssignalen vorliegen.

### 3.2 Erzeugung einer Doppelmutante mit *cul3bko* und *axr1-12* und deren Charakterisierung

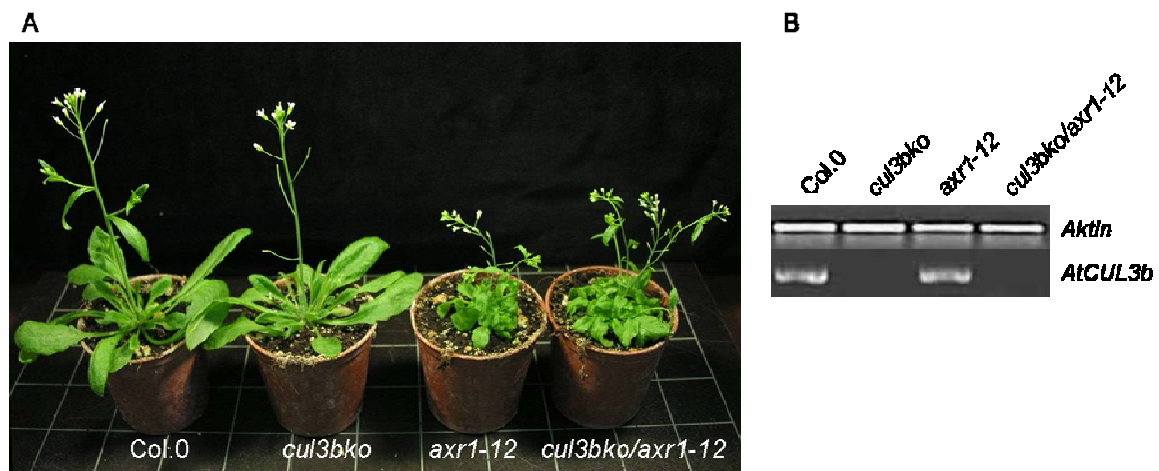
Beide Culline zeigen eine sehr hohe Identität auf Aminosäureebene. Darüber hinaus fehlt in den jeweiligen Nullmutanten ein klarer Phänotyp. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass eine funktionale Redundanz der beiden Proteine vorliegt. Die Erzeugung einer *cul3ko* Doppelnulmutante war jedoch nicht möglich, da der Verlust beider AtCUL3 Proteine embryoletal wirkt (Figuroa *et al.*, 2005; Gingerich *et al.*, 2005). Um eine Mutante zu erhalten, die sowohl in der Funktionalität von AtCUL3a als auch von AtCUL3b gestört ist, wurde ein alternativer Ansatz verfolgt und die *axr1-12*-Mutante in *cul3bko* eingekreuzt.

Axr1 bildet zusammen mit ECR1 ein Heterodimer, das für die Aktivierung von RUB im RUB-Modifikationsweg verantwortlich ist (vgl. 1.1.2; Dharmasiri *et al.* 2003a). Bei *axr1-12* wird diese Modifikation durch eine Punktmutation verhindert und führt zu einer gestörten AtCUL1-abhängigen Auxinantwort (del Pozo *et al.*, 2002). Da sowohl AtCUL3a als auch AtCUL3b durch RUB modifiziert werden, sollte ein Einkreuzen von *axr1-12* in eine Knockoutmutante das jeweils andere AtCUL3-Homolog in seiner Funktionalität beein-

trächtigen. Allerdings wirkt sich dieser Defekt auch auf AtCUL1 und wahrscheinlich AtCUL4 aus, da diese Proteine auch durch RUB modifiziert werden. Da *axr1-12* im Col.0-Hintergrund vorliegt, wurde die Kreuzung nur mit *cul3bko* vorgenommen. Wegen zu erwartender Heterosiseffekte ist das Einkreuzen in *cul3ako* (Ökotyp WS) nicht sinnvoll.

### 3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von *cul3bko/axr1-12* Doppelmutanten

Das Erscheinungsbild der Doppelmutanten gleicht der parentalen *axr1-12*-Linie. Typisch für diese Pflanze war ein deutlich kleinerer Wuchs und kleine eingerollte Rosettenblätter. *cul3bko/axr1-12* benötigen bis zu 12 Wochen bis zur Samenreife und produzieren, wie *axr1-12* auch, nur sehr wenig Samen. Abb. 3-12, A zeigt die Phänotypen von drei Wochen alten Doppelmutanten zusammen mit den parentalen Linien und Col.0. In Abb. 3-12, B ist eine RT-PCR dargestellt, die den vollständigen Verlust von *AtCUL3b* belegt.

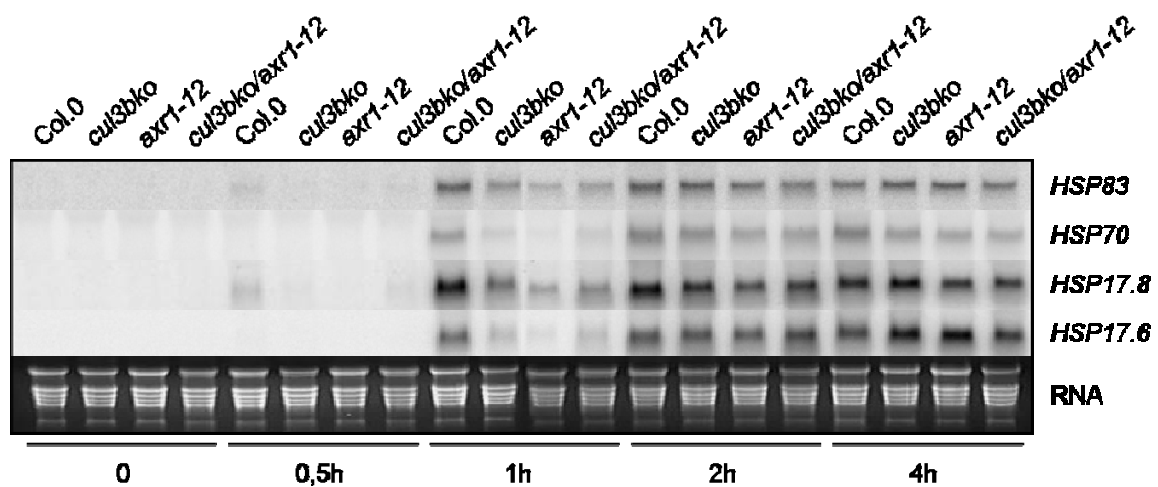


**Abb. 3-12:** Drei Wochen alte *cul3bko/axr1-12*-Pflanzen, die parentalen Linien und der Wildtyp Col.0. A, Phänotypische Erscheinung in Erde. B, Die RT-PCR zeigt den vollständigen Verlust der Expression von *AtCUL3b* sowohl in der Kreuzungsmutante als auch in *cul3bko*.

### 3.2.2 Analyse der HSP-Gene in *cul3bko/axr1-12*

Mit den Doppelmutanten und den parentalen Linien wurde ebenfalls eine Hitzeschockzeitreihe bei 37°C durchgeführt. Damit wurde überprüft, ob sich die Expression der *HSP*-Gene durch eine zusätzliche Störung des RUB-Modifikations-Wegs verändert. Die Northernblot-Analyse der verschiedenen *HSP*-Gene ist in Abb. 3-13 gezeigt. Die Röntgenfilme wurden in diesem Fall nur für kurze Zeit exponiert, um eventuelle Überstrahlungen zu vermeiden.

Im Allgemeinen beobachtete man, dass die Menge an Transkriptionsprodukt der *HSP*-Gene im Vergleich zum Wildtyp in den mutanten Pflanzen deutlich verringert war. Während die Expression in Wildtyppflanzen teilweise schon nach einer halben Stunde bei 37°C zu erkennen war, konnten die Gene der Hitzeschockproteine in den Mutanten erst nach einer Stunde HS und in deutlich geringerer Menge detektiert werden. Auffällig hierbei ist, dass bereits die *axr1-12*-Mutante eine gestörte *HSP*-Expression hatte. Es kam jedoch zu keiner Verstärkung dieses Effekts in der Doppelmutante. Nach zwei und vier Stunden hatten die Mutanten in etwa das gleiche Expressionsniveau wie Col.0 erreicht.



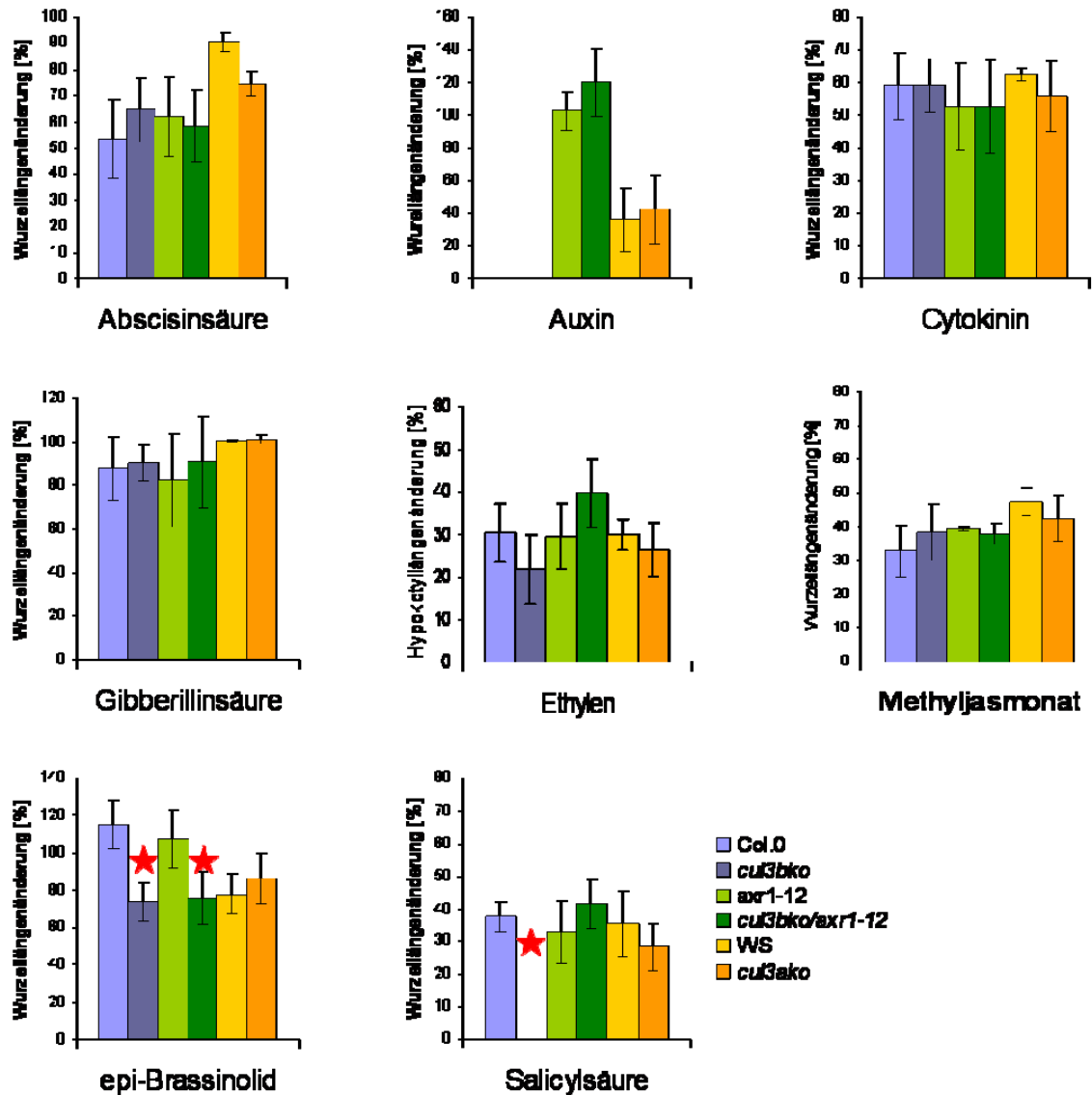
**Abb. 3-13:** Zeitabhängige Hitzeschockantwort von *cul3bko*, *axr1-12* und *cul3bko/axr1-12* nach 30 min, 1h, 2h und 4h Behandlung mit 37°C. Nach 1h Hitzeschock ist die Expression von *HSP83*, *HSP70*, *HSP17.6* und *HSP17.8* in den Mutanten deutlich geringer als beim Wildtyp Col.0.

### 3.2.3 Einfluss von Phytohormonen auf *cul3bko/axr1-12*

Zur weiteren Charakterisierung der Doppelmutanten wurde deren Wachstumsverhalten auf verschiedenen Phytohormonen getestet. Hierzu wurden Keimlinge, die vier Tage auf senkrechten Ats-Platten gewachsen waren, auf eine das jeweilige Phytohormon enthaltende Ats-Platte transferiert und nach fünf Tagen die Wurzellänge bestimmt. Es wurde der Einfluss der Phytohormone Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>), Abscisinsäure (ABA), Auxin (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 2,4-D) Cytokinin (Benzylaminopurin, BAP), Brassinosteroid (epi-Brassinolid), Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (Methyljasmonat, MeJA) auf die Wurzellängenzunahme und die Hypokotyllänge in Abhängigkeit von Ethylen (Aminocyclopropancarbonsäure, ACC) untersucht und anschließend graphisch dargestellt (Abb. 3-14). Diese Diagramme zeigen auch das Wachstumsverhalten der Mutante *cul3ako* im Vergleich zum Ökotypen WS. Um die Wirkung von Ethylen auf das Längenwachstum des Hypokotyls zu untersuchen, wurden Samen der jeweiligen Pflanzen für vier Tage im Dunkeln auf senkrechten, Ethylen enthaltende, Platten wachsen gelassen.

Die Phytohormone Abscisinsäure, Cytokinin, Gibberellinsäure, Jasmonsäure und Ethylen hatten keinen unterschiedlichen Einfluss auf das Wurzel- bzw. Hypokotyllängenwachstum der Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen. Wie erwartet, waren die *axr1-12*- und *cul3bko/axr1-12*-Pflanzen resistent gegen das Auxin 2,4-D, während die Wurzeln von Col.0 und *cul3bko* nach dem Transfer nicht mehr weiter wuchsen. Der Ökotyp WS und die Nullmutante *cul3ako* zeigten hier ebenfalls eine leichte Resistenz. Die anderen Hormone hatten keinen unterschiedlichen Einfluss auf *cul3ako* im Vergleich zu WS.

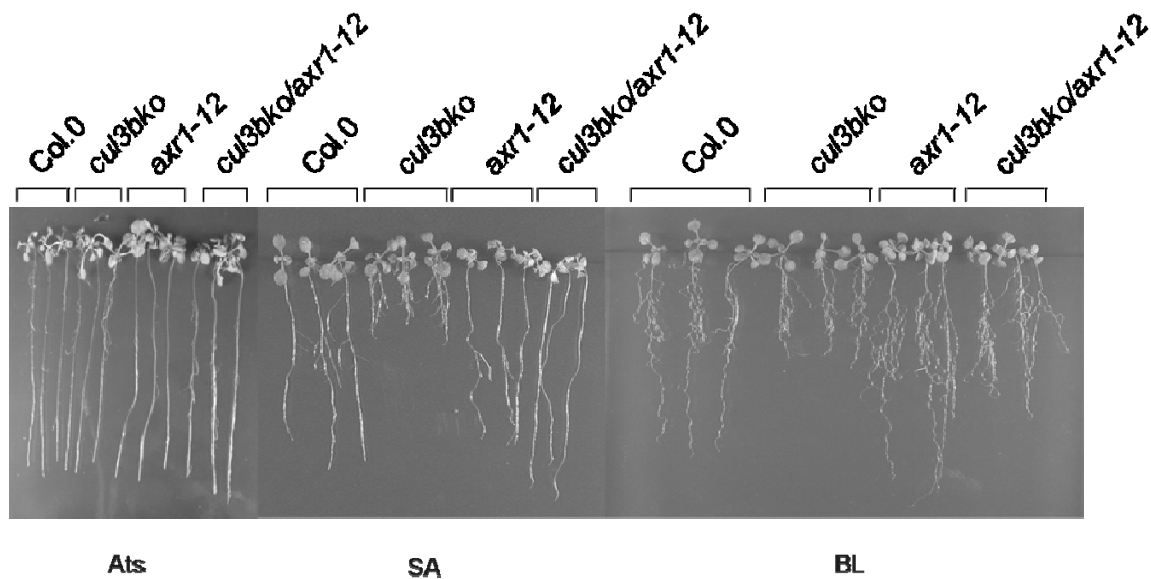
Ein ungleiches Wachstum war auf Salicylsäure ausschließlich für *cul3bko* festzustellen. Interessanterweise stoppte das Längenwachstum von *cul3bko* komplett nach dem Transfer der Keimlinge auf SA, während die Doppelmutante mit der gleichen Geschwindigkeit weiterwuchs wie der Wildtyp. epi-Brassinolid beeinträchtigte die Wurzellängenzunahme in der Einzelmutante *cul3bko* und der Doppelmutante *cul3bko/axr1-12*. Hier betrug das Längenwachstum im Vergleich zu Col.0 und *axr1-12* nur noch 73 bzw. 75%.



**Abb. 3-14:** Quantitative Darstellungen der Wirkung von Phytohormonen. Wurzellängenänderung in Abhängigkeit von ABA (1  $\mu$ M), 2,4-D (80 nM), BAP (100 nM), GA<sub>3</sub> (10  $\mu$ M), MeJA (15  $\mu$ M), SA (100  $\mu$ M), BL (10 nM) und Hypokotyllängenänderung in Abhängigkeit von Ethylen (10  $\mu$ M ACC). Die Änderungen sind in beiden Fällen auf die Werte für Ats-Medium (100%) normiert. Signifikante Unterschiede sind mit einem roten Stern gekennzeichnet.

Abb. 3-15 zeigt neun Tage alte Keimlinge unter den Bedingungen, bei denen signifikante Unterschiede zu Col.0 bestanden.



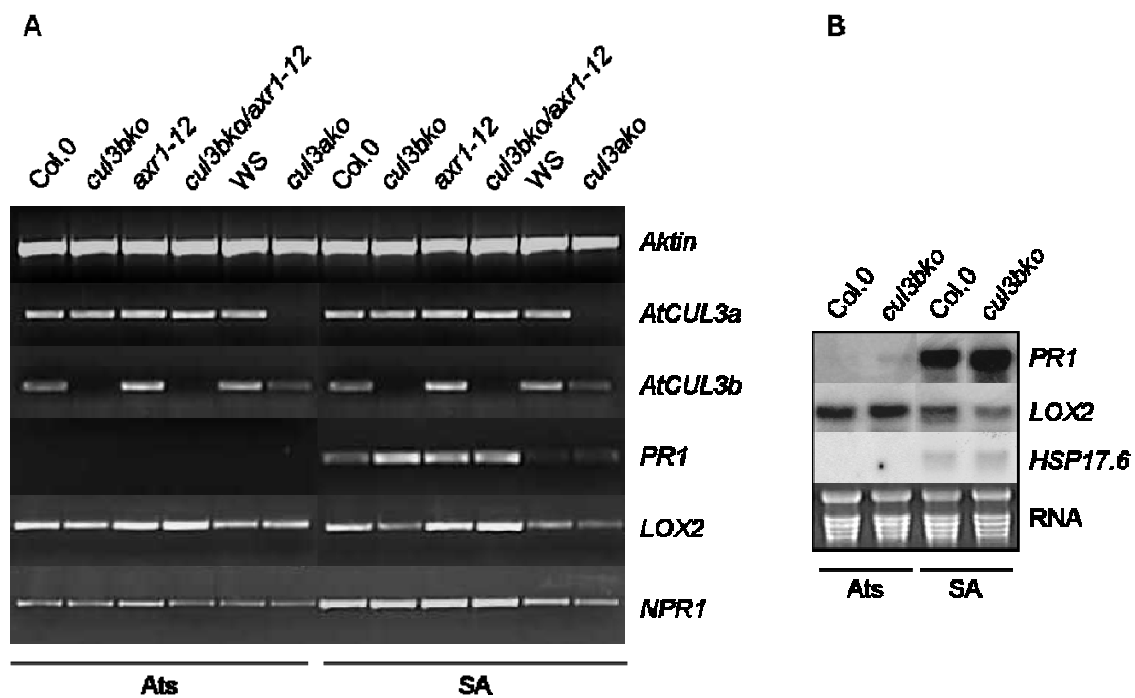


**Abb. 3-15:** Wurzellänge von *cul3bko/axr1-12*-Keimlingen nach neuntägigem Wachstum auf Ats, 100  $\mu$ M SA und 10 nM BL. Der Wildtyp und die parentalen Linien *cul3bko* und *axr1-12* dienen als Kontrolle.

### 3.2.4 Molekulare Analyse der Salicylsäureantwort

Zur molekularen Analyse der Einzel- und Doppelmutanten wurden 11 Tage alte Pflanzen für 24 h mit 100  $\mu$ M SA induziert, die RNA isoliert und für eine RT-PCR-Analyse von *PR1* (*At2g14610*) *NPR1* (*At1g64280*) und *LOX2* (*At3g45140*) verwendet. In einem unabhängigen zweiten Ansatz wurden 11 Tage alte *cul3bko*- und Col.0-Keimlinge für 24 h mit 500  $\mu$ M SA inkubiert. Die RNA aus diesen Pflanzen wurde für einen Northern-Blot-Versuch mit *PR1*, *LOX2* und *HSP17.6* als Sonde verwendet, um eventuelle Expressionsunterschiede mit einer anderen Methode zu bestätigen. *HSP17.6* wurde verwendet, da es sich um ein SA-induzierbares HSP handelt.

*PR1* kann als Indikatorgen für eine erfolgte SA-Induktion verwendet werden, da es durch dieses Phytohormon induzierbar ist. *NPR1* ist ebenfalls ein SA-induzierbares Gen, das als Schlüsselregulator bei der SAR gilt. *LOX2* ist eine Lipoxygenase, die bei der Jasmonsäurebiosynthese Linol- bzw. Linolensäure in die entsprechenden Fettsäurehydroperoxide umwandelt. In weiteren Schritten erfolgt die Oxidation zu Jasmonsäure. JA gilt als Antagonist zu SA und die Expression von JA-abhängigen Genen wird durch SA unterdrückt.



**Abb. 3-16:** Expressionsanalyse von *PR1*, *NPR1* und *LOX2* nach SA-Induktion. A, RT-PCR nach 24h 100  $\mu$ M SA. Eingesetzte RNA-Menge: 100 ng. B, Northern-Blot-Analyse nach 24h 500  $\mu$ M SA. Zusätzlich ist *HSP17.6* gezeigt. Eingesetzte RNA-Menge: 20  $\mu$ g.

Wie erwartet, wurde die Expression von *PR1* durch die Zugabe von Salicylsäure in allen untersuchten Pflanzen induziert (Abb. 3-16). Es bestand allerdings ein klarer Unterschied zwischen Col.0 und den mutanten Pflanzen. Die Menge an *PR1* war in *cul3bko* deutlich erhöht. In *axr1-12* und *cul3bko/axr1-12* wurde eine stärkere Induktion als in Col.0 detektiert, die allerdings nicht so ausgeprägt wie in *cul3bko* war. Besonders hervorzuheben ist, dass die *cul3ako* Mutante im Vergleich zu WS keine unterschiedliche Expression von *PR1* zeigte. Dies weist wiederum auf eine spezifische Rolle von At-CUL3b in diesem Signaltransduktionsweg hin.

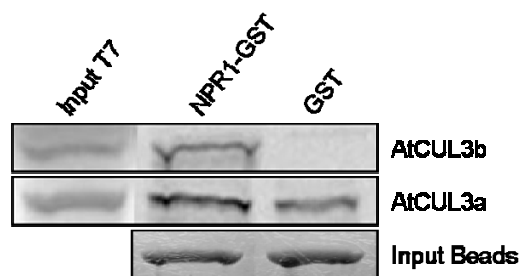
Die Repression von *LOX2* durch SA erfolgte für Col.0, *cul3bko*, WS und *cul3ako*, während in *axr1-12* und *cul3bko/axr1-12* keine Reduktion der Transkriptmenge festgestellt werden konnte. Es ist auffällig, dass *LOX2* in Col.0 nur sehr schwach reprimiert wird, während die Reduktion in der Nullmutante *cul3bko* deutlicher ausfiel. Bei der Northern-Blot-Analyse ist eine leichte Expression von *PR1* in *cul3bko* bereits ohne SA-Induktion zu erkennen. *NPR1* dagegen wurde in allen Pflanzen gleichmäßig induziert. Bei der Induktion von *HSP17.6* durch SA konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen Knockout und Col.0 festgestellt werden.

### 3.3 NPR1 als Substratadaptor

In Y2H-Versuchen und Pulldown-Assays sind für AtCUL3 bereits BTB/POZ-Proteine als Substratadaptoren identifiziert worden (Weber *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde nach einem weiteren geeigneten BTB-Protein gesucht, das mit AtCUL3 interagiert und als Substratadaptor im SA-Transduktionsweg fungieren kann.

Die bisher gefundenen Ergebnisse liefern entscheidende Hinweise, die auf NPR1 als geeigneten Kandidaten schließen lassen. Erstens reagiert *cul3bko* deutlich empfindlicher auf erhöhte Salicylsäurekonzentrationen. Zweitens wurde für die Nullmutanten eine erhöhte Sensitivität bei einem Hitzeschock festgestellt. Larkindale und Knight (2002) konnten zeigen, dass SA in der Lage ist Pflanzen vor hitzeinduzierten oxidativen Schäden zu schützen, so dass eine Verbindung zwischen diesen beiden Phänotypen möglich ist. Drittens zeigt die Nullmutante eine veränderte Expression von *PR1* vor und nach einer SA-Induktion, welche durch NPR1 reguliert wird.

Zusätzlich ist die Expression von *LOX2* verändert. Da JA der Antagonist zu SA ist und verschiedene Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass NPR1 auch bei diesem Mechanismus eine Rolle spielt (Reymond und Farmer, 1998; Rojo *et al.*, 2003; Mur *et al.*, 2006), wurde vermutet, mit NPR1 einen Substratadaptor für AtCUL3 gefunden zu haben. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein Pulldown-Versuch mit *in vitro* translatiertem AtCUL3 und einem GST-NPR1 Fusionsprotein durchgeführt (Abb. 3-17). Reines GST diente als Negativkontrolle.



**Abb. 3-17:** Pulldown-Versuch von AtCUL3a und AtCUL3b mit GST-NPR1 Fusionsprotein. InputT7 = 1µl *in vitro* translatiertes Protein. Input Beads: Coumassie gefärbtes SDS-Gel

Für AtCUL3b konnte eine eindeutige Interaktion mit NPR1 nachgewiesen werden. In diesem Fall war eine deutliche Bande für GST-NPR1 detektierbar und die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Anders liegt der Fall für AtCUL3a. Hier kann keine eindeutige Aussage über eine Interaktion gemacht werden, da zwar eine Bande für GST-NPR1

---

nachgewiesen werden konnte, allerdings wurde auch für die Negativkontrolle ein Signal detektiert.