

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung
des Cytokininrezeptors CRE1/AHK4
aus *Arabidopsis thaliana*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaas Wulfetange
aus Diepholz

2009

Diese Arbeit wurde von April 2005 bis Dezember 2009 am Lehrstuhl für „Molekulare Entwicklungsbiologie der Pflanzen“ des Instituts für Biologie/ Angewandte Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Schmülling angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Disputation am 15.01.2010

„Viele sind hartnäckig in Bezug auf den einmal eingeschlagenen Weg, wenige in Bezug auf das Ziel.“

Friedrich Nietzsche

1	Einleitung	1
1.1	Cytokinin – Geschichte, Struktur und biologische Bedeutung	1
1.2	Cytokininbiosynthese und -metabolismus	3
1.3	Cytokinintransport.....	5
1.4	Cytokininisignaltransduktion	6
1.4.1	<i>Arabidopsis</i> -Histidin-Kinasen (AHKs)	9
1.4.2	<i>Arabidopsis</i> Histidin-Phosphotransfer-Proteine (AHPs).....	15
1.4.3	<i>Arabidopsis</i> Response Regulator-Proteine (ARRs)	15
1.5	Proteinstrukturen von (Rezeptor-)Histidin-Kinasen	16
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Chemikalien.....	19
2.1.2	Reaktionskits	19
2.1.3	Enzyme	19
2.1.4	Organismen	20
2.1.4.1	<i>Bakterienstämme</i>	20
2.1.4.2	<i>Pflanzen</i>	20
2.1.5	Nährmedien	21
2.1.5.1	<i>Nährmedien für Bakterien</i>	21
2.1.5.2	<i>Nährmedien für Pflanzen</i>	21
2.1.6	Oligonukleotide.....	22
2.1.7	Plasmide	23
2.2	Methoden	25
2.2.1	Mikrobiologische und gentechnische Arbeiten	25
2.2.1.1	<i>Kultur von Bakterien</i>	25
2.2.1.2	<i>Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen</i>	26
2.2.1.3	<i>Transiente Transformation von Arabidopsis Mesophyllprotoplasten</i>	27
2.2.1.4	<i>Transiente Transformation von N. benthamiana Blattepidermiszellen</i>	27

2.2.1.5	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli bzw. A. tumefaciens</i>	28
2.2.1.6	<i>Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren</i>	28
2.2.1.7	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung</i>	29
2.2.1.8	<i>Standardmethoden zur DNA-Klonierung</i>	29
2.2.1.9	<i>Gateway-Klonierung</i>	29
2.2.1.10	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	29
2.2.1.11	<i>Ortsgerichtete Mutagenese</i>	30
2.2.1.12	<i>Klonierungsstrategien</i>	30
2.2.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	32
2.2.2.1	<i>Colorimetrische Proteinbestimmung</i>	32
2.2.2.2	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	32
2.2.2.3	<i>Western Blot und Immunodetektion</i>	33
2.2.2.4	<i>Proteinexpression in E. coli</i>	33
2.2.2.5	<i>Proteinexpression in Nicotiana benthamiana (Magnifektion)</i>	34
2.2.2.6	<i>Zellfreie Proteinexpression mit E. coli S30 Extrakt</i>	35
2.2.2.7	<i>Reinigung und Rückfaltung der löslichen CHASE Domäne aus inclusion bodies aus E. coli</i>	38
2.2.2.8	<i>Chromatographische Reinigung nativer Proteine</i>	39
2.2.2.9	<i>In vivo Cytokininbindungsassay mit Bakterienzellen</i>	39
2.2.2.10	<i>In vitro Cytokininbindungsassay mit Filtermembranen</i>	40
2.2.3	<i>Biophysikalische Methoden</i>	40
2.2.3.1	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS)</i>	40
2.2.3.2	<i>CD-Spektroskopie (Circulardichroismus)</i>	41
2.2.3.3	<i>Kernmagnetresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie)</i>	42
2.2.4	<i>Zellbiologische Methoden</i>	43
2.2.4.1	<i>Subzelluläre Lokalisation mittels Green Fluorescent Protein (GFP)-Fusionsproteinen</i>	44
2.2.4.2	<i>Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)</i>	44
2.2.5	<i>Programme und Datenbanken zur in silico Analyse</i>	45

3	Ergebnisse	46
3.1	Funktionelle Charakterisierung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4	46
3.1.1	<i>In vivo</i> Cytokininbindung der CHASE Domäne in <i>E. coli</i>	46
3.1.2	Eine evolutionäre Analyse der CHASE Domäne offenbart potentiell Cytokininbindende Aminosäurereste.....	50
3.1.3	Der Austausch spezifischer Aminosäuren resultiert in signifikanten Änderungen der Hormonbindung	53
3.2	Präparative Expression und Aufreinigung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4	54
3.2.1	Expression und Reinigung der löslichen CHASE Domäne von CRE1/AHK4.....	55
3.2.1.1	<i>Die CHASE Domäne wird in E. coli in inclusion bodies exprimiert.....</i>	55
3.2.1.2	<i>Nach Säulen-basierter Rückfaltung weist die CHASE-Domäne keine spezifische Cytokininbindungsaktivität auf.....</i>	56
3.2.1.3	<i>Expression der CHASE Domäne im zellfreien System</i>	59
3.2.2	Expression und Reinigung der unlöslichen CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4.	60
3.2.2.1	<i>Die CHASE-TM Domäne wird in E. coli möglicherweise nur schwach expremiert.....</i>	60
3.2.2.2	<i>Das zellfreie System ermöglicht eine präparative native Expression der CHASE-TM Domäne.....</i>	64
3.2.2.3	<i>Die CHASE-TM Domäne kann im nativen Zustand mit dem Detergenz β-DDM zu hoher Reinheit gebracht werden.....</i>	67
3.2.3	Experimente zur Expression des Volllängenrezeptors CRE1/AHK4.....	72
3.2.4	Magnifektion als mögliches alternatives Proteinexpressionssystem	74
3.3	Charakterisierung der affinitätsgereinigten CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4 ...	77
3.3.1	Identifizierung des gereinigten Proteins mittels MALDI-Massenspektrometrie ...	77
3.3.2	CD-spektroskopische Analyse offenbart eine charakteristische Faltung der Domäne.....	80
3.3.3	Nachweis der spezifischen Cytokininbindung an die gereinigte Domäne.....	81
3.3.4	Vorexperimente zur Lösung der räumlichen Struktur der CHASE-TM Domäne	82
3.4	Subzelluläre Lokalisation der Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 mittels GFP-Fusion.....	85

3.4.1	Transiente Expression in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten deutet auf eine weitgehend endomembranständige Lokalisation der Rezeptoren hin.....	85
3.4.2	Transiente Expressionsstudien in <i>N. benthamiana</i> weisen auf eine BFA-insensitive Lokalisation von AHK3 und CRE1/AHK4 vorzugsweise im endoplasmatischen Retikulum hin	87
3.4.2.1	Analysen zur subzellulären Lokalisation von AHK3	87
3.4.2.1	Analysen zur subzellulären Lokalisation von CRE1/AHK4	92
3.5	<i>In planta</i> Analysen zur Homo- und Heterodimerisierung zeigen eine generelle Fähigkeit zur Interaktion innerhalb der Rezeptorfamilie.....	95
4	Diskussion	98
4.1	CHASE als Bindungsdomäne der Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 ..	98
4.2	Eine bioinformatische Analyse CHASE-Domäne von CRE1/AHK4 führt zur Identifizierung für die Cytokininbindung essentieller Aminosäurereste.....	102
4.3	Ein zellfreies Expressionssystem erlaubt die Überexpression einer funktionellen CHASE-TM Domäne	107
4.4	Die Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4 und AHK3 sind ER-lokalisierte Proteine und bilden Homo- und Heterodimere in <i>planta</i>	110
4.5	Ausblick.....	114
5	Zusammenfassung.....	117
6	Summary	119
7	Bibliographie	121
8	Publikationen	146
9	Danksagung.....	147
10	Anhang.....	148
10.1	Vektorkarten	148
10.2	Abkürzungen.....	150

Abbildung 1: Struktur repräsentativer natürlich vorkommender Cytokinine..	1
Abbildung 2: Model des Metabolismus isoprenoider Cytokinine	4
Abbildung 3: Modell von Zwei-Komponenten-Systemen.	7
Abbildung 4: Modell der Cytokininsignaltransduktion.	8
Abbildung 5: Schema zur in planta Rekombination viraler Provektormodule für die Expression heterologer Gene in <i>N. benthamiana</i>	34
Abbildung 6: Schematische Darstellung der gekoppelten <i>in vitro</i> Transkription/ Translation in einem auf kontinuierlichem Austausch basierenden zellfreien Expressionssystem (CECF)	35
Abbildung 7: Prinzip der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation.	44
Abbildung 8: Domänenstruktur von CRE1/AHK4	46
Abbildung 9: <i>In vivo</i> Bindung von <i>trans</i> -[2- ³ H]Zeatin an CRE1/AHK4 bzw. an verschiedene Domänen des Rezeptors.	47
Abbildung 10: Wahrscheinlichkeit hydrophober Helices in den Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3	48
Abbildung 11: <i>In vivo</i> Bindung von Cytokinin an die CHASE-TM Domänen von CRE1/AHK4, AHK2 und AHK3.	49
Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum und Proteinsequenzabgleich der CHASE Domänen.	51
Abbildung 13: <i>In vivo</i> Cytokininbindung ausgewählter CRE1/AHK4-Mutanten	54
Abbildung 14: Expression der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 in <i>E. coli</i> .	55
Abbildung 15: Expression der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 in <i>E. coli inclusion bodies</i> ...	56
Abbildung 16: Chromatogramm der Säulen-basierten (<i>On-column</i>) Rückfaltung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4.	57
Abbildung 17: SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der Säulen-basierten Rückfaltung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4.	58
Abbildung 18: Zellfreie Expression der CHASE-Domäne von CRE1/AHK4.	59
Abbildung 19: Expressionsversuch der CHASE-TM Domäne in <i>E. coli</i> bei 30°C und Raumtemperatur.	60
Abbildung 20: Fraktionierung von Bakterienzellen und Ni-NTA Reinigung der löslichen Membranfraktion nach Induktion der Expression von CHASE-TM.	61
Abbildung 21: Versuch zur denaturierenden Reinigung der CHASE-TM Domäne aus <i>E. coli</i> ...	62
Abbildung 22: Expressionsversuch der CHASE-TM Domäne mit den Vektoren pET-21b bzw. pET-30b in <i>E. coli</i> .	63

Abbildung 23: Detergenzscreen I für die lösliche Expression der CHASE-TM Domäne im zellfreien System	64
Abbildung 24: Detergenzscreen II für die lösliche Expression der CHASE-TM Domäne im zellfreien System	65
Abbildung 25: Optimierte zellfreie Expression der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4 im löslichen Zustand.	66
Abbildung 26: Native Reinigung der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4.....	68
Abbildung 27: Größenausschlusschromatographie der affinitätsgereinigten CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4.	69
Abbildung 28: Optimierte native Reinigung der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4.....	71
Abbildung 29: Expressionsversuche des Rezeptors CRE1/AHK4 in <i>E. coli</i>	72
Abbildung 30: Fraktionierung von Bakterienzellen und Ni-NTA Reinigung der löslichen Membranfraktion nach Expression des Rezeptors CRE1/AHK4.....	73
Abbildung 31: Detergenzscreen für die lösliche Expression des Rezeptors CRE1/AHK4 im zellfreien System	74
Abbildung 32: Test auf Überexpression von GFP bzw. der CHASE und der CHASE-TM Domäne mittels Magnifektion in <i>N. benthamiana</i>	75
Abbildung 33: Experiment zur Überexpression von GFP bzw. der CHASE, der CHASE F304A und der CHASE-TM Domäne mittels Magnifektion in <i>N. benthamiana</i>	76
Abbildung 34: Proteinbanden, die nach nativer Reinigung der CHASE-TM Domäne massenspektrometrisch charakterisiert wurden.....	78
Abbildung 35: MALDI-MS Spektren von koeluierten Proteinen der Reinigung der CHASE-TM Domäne.	79
Abbildung 36: CD-spektroskopische Analyse der gereinigten CHASE-TM Domäne.....	80
Abbildung 37: Nachweis der spezifischen Bindung von <i>trans</i> -[2- ³ H]Zeatin an die gereinigte CHASE-TM Domäne in einem Filtrationsassay.	82
Abbildung 38: ¹ H-NMR-Spektrum der gereinigten CHASE-TM Domäne	84
Abbildung 39: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Cytokininrezeptorfamilie in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten.....	86
Abbildung 40: Subzelluläre Lokalisation von AHK3-GFP (pB7FWG2-AHK3) in transient transformierten Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i>	88
Abbildung 41: Kolokalisation von AHK3-GFP mit mCherry-HDEL in transient transformierten Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i>	89
Abbildung 42: Expression von AHK3-GFP in <i>N. benthamiana</i> und Anfärbung der Plasmamembran mit FM4-64.....	90
Abbildung 43: Lokalisation von AHK3-GFP in <i>N. benthamiana</i> nach Inkubation mit Brefeldin A (BFA).....	91

Abbildung 44: Subzelluläre Lokalisation von GFP-CRE1/AHK4 (pB7WGF2-CRE1/AHK4) in transient transformierten Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i>	93
Abbildung 45: Kolokalisation von GFP-CRE1/AHK4 mit mCherry-HDEL in transient transformierten Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i> nach Inkubation mit Brefeldin A (BFA)	94
Abbildung 46: BiFC-Analyse zum Nachweis einer <i>in planta</i> Dimerisierung innerhalb der Cytokininrezeptorfamilie in <i>N. benthamiana</i>.	95
Abbildung 47: BiFC-Analyse zur Interaktion der Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 mit dem Saccharose-Transporter SUT1 aus <i>Lycopersicon esculentum</i> in <i>N. benthamiana</i>	96
Abbildung 48: Sekundärstrukturvorhersage für die CHASE Domäne von CRE1/AHK4.....	103
Abbildung 49: Strukturvorhersage der CHASE Domäne von CRE1/AHK4.	104

Tabelle 1: Reaktionskits	19
Tabelle 2: Enzyme.....	19
Tabelle 3: Bakterienstämme	20
Tabelle 4: Antibiotika	21
Tabelle 5: Oligonukleotide (Primer)	22
Tabelle 6: Plasmide.....	23
Tabelle 7: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes	30
Tabelle 8: Temperaturprogramm einer Standard-PCR.....	30
Tabelle 9: Zusammensetzung eines 10% SDS-Trenngels (Σ 10 ml)	32
Tabelle 10: Zusammensetzung eines 10% SDS-Sammelgels (Σ 5ml).....	32
Tabelle 11: Stammlösungen für die zellfreie Proteinexpression	36
Tabelle 12: Internetdatenbanken und Analysetools	45
Tabelle 13: Prozentualer Anteil an Sekundärstrukturelementen in der CHASE-TM Domäne ohne und mit Cytokinin.....	81

1 Einleitung

1.1 Cytokinin – Geschichte, Struktur und biologische Bedeutung

Etwas mehr als 50 Jahre sind seit der Entdeckung der Cytokinine vergangen. Schon 1913 entdeckte Haberlandt eine Substanz im Phloem, die einen stimulierenden Effekt auf die Teilung von Pflanzenzellen ausübte (Haberlandt, 1913). Im Jahre 1941 beobachtete van Overbeek einen wachstumsfördernden Effekt von Kokosnussmilch (*Cocos nucifera*) auf Embryonen des Gemeinen Stechapfel (*Datura stramonium*) (van Overbeek *et al.*, 1941). Erst Miller und Skoog isolierten, kristallisierten und charakterisierten schließlich 1955 eine Substanz (6-Furfurylaminopurin) aus Heringssperma, die sie aufgrund der Fähigkeit, die Zellteilung in Tabakgeweben zu stimulieren, Kinetin nannten (Miller *et al.*, 1955a; 1955b) und die später einer Gruppe von Pflanzenhormonen zugeordnet wurde, die als Cytokinine bekannt geworden sind (Skoog *et al.*, 1965). Ein Jahr nach der Entdeckung gelang es ihnen, diese Substanz auch synthetisch herzustellen (Miller *et al.*, 1956).

Zahlreiche natürlich vorkommende Cytokinine wie z. B. *trans*-zeatin (Letham, 1963) und solche mit aromatischer Seitenkette (Horgan *et al.*, 1973; Ernst *et al.*, 1983; Strnad, 1997) sowie synthetische Cytokinine wie Diphenylharnstoff (Shantz and Steward, 1955) und Thidiazuron (Mok *et al.*, 1982) wurden seitdem identifiziert und charakterisiert.

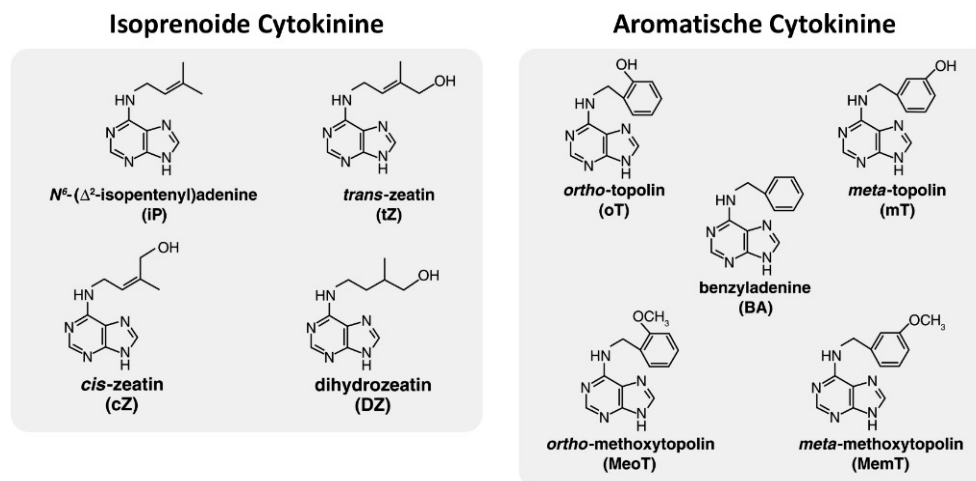


Abbildung 1: Struktur repräsentativer natürlich vorkommender Cytokinine. Nur die Trivialnamen sind angegeben und jeweils in Klammern die gebräuchliche Abkürzung (Abb. aus Sakakibara, 2006).

Chemisch betrachtet handelt es sich bei den natürlich vorkommenden Cytokinin um Adeninderivate, die anhand der Konfiguration ihrer *N*⁶-Seitenkette als isoprenoide oder aromatische Cytokinine eingeordnet werden (Abb. 1; Mok und Mok, 2001), wobei erstgenannte häufiger in Pflanzen zu finden

sind. Unter den in Abb. 1 dargestellten Cytokininen stellen *trans*-Zeatin (tZ) und Isopentenyladenin (iP) die in *Arabidopsis* häufigsten Formen dar, wohingegen in Mais (Veach *et al.*, 2003) und Reis (Izumi *et al.*, 1988) *cis*-Zeatin (cZ) in substantiellen Mengen gefunden wurde. Die aromatischen Vertreter sind dagegen nur in wenigen Pflanzenspezies anzutreffen (Strnad, 1997).

Im Allgemeinen existieren für alle natürlich vorkommenden Cytokinine die korrespondierenden Nucleoside, Nucleotide und Glykoside durch Modifikationen des Adeninringes an seiner 3-, 7- oder 9-Position, wobei klassische Bioassays mit Pflanzen zeigten, dass die freien Cytokinin-Nucleobasen die aktive Form darstellen (Schmitz *et al.*, 1972; Spiess, 1975), wobei für die Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4 und AHK3 auch zum Teil hohe Affinitäten für die Riboside festgestellt wurden (z. B. K_D für tZR zwischen 15 und 50 nM) (Romanov *et al.*, 2006), was eine physiologische Relevanz auch für die Riboside vermuten lässt. Obwohl die physiologische Bedeutung der verschiedenen Strukturvarianten der isoprenoiden Cytokinine noch nicht endgültig geklärt werden konnte, sind Differenzen in ihrer biologischen Aktivität, die durch Bindungsaffinitäten zu den Rezeptoren CRE1/AHK4 und AHK3 gemessen wurden, *in vivo* und *in vitro* beobachtet worden. In diesen Bindungsstudien hatten iP und tZ eine wesentlich stärkere Affinität als cZ oder Dihydrozeatin (DZ) (Inoue *et al.*, 2001; Romanov *et al.*, 2006; Spíchal *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). In Bioassays mit Salatgurken und *Amaranthus caudatus* wies tZ im Vergleich mit iP und cZ die höchste biologische Aktivität auf, während cZ nur eine schwache Aktivität zeigte (Kamínek *et al.*, 1979). Trotz der allgemein angenommenen nur schwachen Aktivität von cZ wird dieses Derivat vom zu CRE1/AHK4 homologen Rezeptor in Mais (ZmHK1) mit vergleichbarer Affinität gebunden wie tZ (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004).

Neben der bereits von Miller und Skoog beschriebenen Beobachtung, die Zellteilung in Pflanzen zu stimulieren, konnten für Cytokinine in den letzten Jahren Funktionen bei einer Vielzahl von Prozessen des pflanzlichen Wachstums und der Entwicklung beobachtet werden wie z. B. ein Einfluss auf die Meristemfunktion in Spross und Wurzel (z. B. Dello Ioio *et al.*, 2007; Kurakawa *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2003; 2001), die Verzögerung der Blattseneszenz (Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Gan and Amasino, 1995), Apikaldominanz (Shimizu-Sato *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2006a), Differenzierung der Leitgewebe (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008; Nieminen *et al.*, 2008) und Stresstoleranz (Rivero *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2007) (folgende Übersichtsartikel seien an dieser Stelle empfohlen: Argueso *et al.*, 2009; Werner and Schmölling, 2009; Heyl and Schmölling, 2003; Mok, 1994). Darüber hinaus spielen Cytokinine eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Wurzelknöllchen und anderen Pflanze-Mikrobe-Interaktionen (Frugier *et al.*, 2008).

1.2 Cytokininbiosynthese und -metabolismus

Die vergangenen Jahre erbrachten einen enormen Wissenszuwachs über die Biosynthese der Cytokinine und deren Metabolismus. Begründet auf der Tatsache, dass die isoprenoiden Cytokinine wesentlich stärker in Pflanzen verbreitet sind als die aromatischen Vertreter, konzentrierte man sich insbesondere auf die Entschlüsselung der Stoffwechselwege der isoprenoiden Cytokinine (Kamada-Nobusada und Sakakibara, 2009; Werner *et al.*, 2006) (Abb. 2). Die Biosynthese und der Abbau der aromatischen Cytokinine sind hingegen bis heute noch nicht verstanden, obwohl diese Derivate außer in höheren Pflanzen wie Pappel (Strnad, 1997) und *Arabidopsis* (Tarkowská *et al.*, 2003) auch in Moosen (von Schwartzberg *et al.*, 2007) und einzelligen Algen (Ordog *et al.*, 2004) gefunden worden sind.

Die Identifizierung verschiedener an der Cytokininbiosynthese beteiligter Gene in *Arabidopsis* und Reis (Kurakawa *et al.*, 2007; Sakamoto *et al.*, 2006; Takei *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2001a; Kakimoto, 2001) war dabei ein entscheidender Schritt zum besseren Verständnis, wohingegen die Aufreinigung und biochemische Charakterisierung pflanzlicher Cytokininbiosyntheseenzyme möglicherweise aufgrund von Enzyminstabilitäten oder geringer Ausbeuten bisher nur wenige Informationen lieferte (Sakakibara, 2004; Mok und Mok, 2001).

Der erste und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmende Schritt der isoprenoiden Cytokininbiosynthese ist die N^6 -Prenylierung von ATP/ADP/AMP mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als Prenyldonor, die durch Adenosinphosphatisopentenyltransferasen (IPT) katalysiert wird (Abb. 2). In *Arabidopsis* wurden insgesamt sieben *IPT* Gene identifiziert (*AtIPT1*, *AtIPT3-8*) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001a). Ein Mitglied dieser Enzymfamilie, *IPT3*, wird durch Farnesylierung in seiner Lokalisation und Aktivität reguliert (Galichet *et al.*, 2008) und ist verantwortlich für die Nitrat-abhängige Cytokininbiosynthese (Takei *et al.*, 2004). *AtIPT7* wird positiv durch ein KNOX Protein (*Knotted1-like homeobox*) reguliert, welches bei der Bildung und Erhaltung des sprossapikalen Meristems beteiligt ist (Jasinski *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005).

Die bei der IPT-katalysierten Reaktion vorrangig entstehenden Produkte iPRTP und iPRDP (da IPTs ATP und ADP als Prenylakzeptoren gegenüber AMP bevorzugen) werden im Weiteren durch mehrere Dephosphorylierungsschritte oder durch Hydrolysierung des Nucleosid-5'-monophosphats, katalysiert durch eine LONELY GUY (LOG) genannte Phosphoribohydrolase, direkt in die freie Nucleobase (iP, iZ) umgewandelt (Kurakawa *et al.*, 2007). Die Expression von *LOG* konzentriert sich auf das sprossapikale Meristem. Der Name LOG geht zurück auf den Phänotyp der *log*-Mutante, welche ein gestörtes sprossapikales Meristem und einen veränderten Blütenaufbau mit nur einem Staubblatt und fehlendem Stempel besitzt. Daher wurde dem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Meristemaktivität zugeordnet (Kurakawa *et al.*, 2007).

Für die vermutlich zweistufige enzymatische Reaktion vom Cytokininnukleosid-5'-monophosphat zur freien Base wurden die notwendigen Gene, die für eine Nukleotidase bzw. Nukleosidase kodieren, bisher noch nicht identifiziert, obwohl entsprechende Enzymaktivitäten in Weizenkeimen gemessen worden sind (Chen und Kristopeit, 1981a; 1981b).

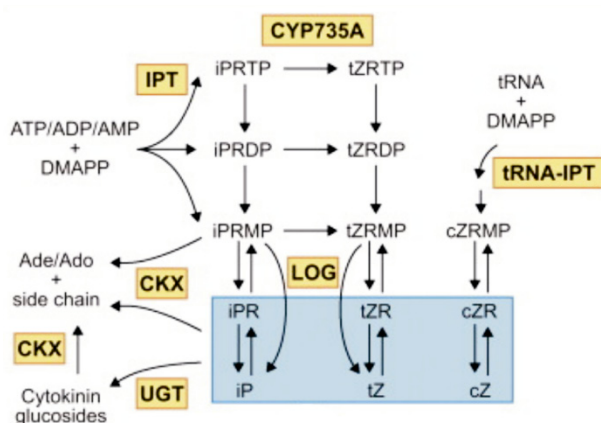


Abbildung 2: Model des Metabolismus isoprenoider Cytokinine. Die Biosynthese der iP- und tZ-Cytokinine beginnt mit der Bildung von iP-Nukleotiden durch die Reaktion von ATP/ADP/AMP mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als Prenyldonor, welche durch Adenosinphosphatisopentenyltransferasen (IPT) katalysiert wird. Die korrespondierenden tZ-Nukleotide entstehen durch die von Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP735A) gesteuerte Umwandlung der iP-Nukleotide. iPRTP, iPRDP und die entsprechenden tZ-Nukleotide werden durch Phosphatasen dephosphoryliert, und iPRMP und tZRMP können durch die Cytokininnukleosid-5'-monophosphat-phosphoribohydrolasen (LOG) direkt in die aktiven freien Nucleobasen (iP und tZ) umgewandelt werden. cZ-Cytokinine werden in *Arabidopsis* ausschließlich durch tRNA-IPT katalysierte Prenylierung von tRNAs und anschließende Dephosphorylierung von cZRMP gebildet. Die Inaktivierung der biologisch aktiven Nucleobasen (in blau hervorgehoben) erfolgt zum einen durch Cytokininoxidasen/dehydrogenasen (CKX) und zum anderen durch Glykosylierung mittels Glykosyltransferasen (UGT) (modifizierte Abb. aus Werner und Schmülling, 2009). iPRTP, iP-Ribosid-5'-triphosphat; iPRDP, iP-Ribosid-5'-diphosphat; iPRMP, iP-Ribosid-5'-monophosphat.

Ein weiterer Biosyntheseweg für isoprenoide Cytokinine stellt die Prenylierung von tRNAs durch tRNA-IPTs dar, für die in *Arabidopsis* zwei Gene codieren (*AtIPT2*, *AtIPT9*) (Miyawaki *et al.*, 2006). Untersuchungen an einer tRNA-IPT defizienten Mutante ergaben, dass die cZ Biosynthese in *Arabidopsis* ausschließlich über diesen Weg verläuft (Abb. 2). Strukturuntersuchungen am Protein *Trans-zeatin-synthesizing* (Tzs) (Sugawara *et al.*, 2008), einer IPT aus *Agrobacterium*, sowie tRNA-IPTs aus *Pseudomonas aeruginosa* (Xie *et al.*, 2007) und *Saccharomyces cerevisiae* (Zhou und Huang, 2008) bestätigten zudem für alle Enzymvarianten einen identischen Reaktionsmechanismus und eine starke Konservierung essentieller Aminosäuren.

Das Gleichgewicht zwischen biologisch aktivem Cytokinin und inaktiven Cytokininderivaten wird *in planta* bestimmt durch die Produktion der Cytokininnukleobasen auf der einen Seite und durch den Abbau bzw. die Glykosylierung derselben auf der anderen Seite. Glykosylierung der Nukleobasen erfolgt zum einen an den N^3 , N^7 und N^9 Positionen des Purinringes (*N*-Glucoside) und an der Hydroxylgruppe der Seitenkette von tZ, cZ und DZ (*O*-Glucoside). Die Degradation von Cytokinin infolge einer irreversiblen Abspaltung der Seitenkette und Freisetzung von Adenin/Adenosin wird durch Cytokininoxidasen/dehydrogenasen (CKX) katalysiert (Abb. 2). Das *Arabidopsis*-Genom beinhaltet sieben *CKX* Gene (*AtCKX1* - *AtCKX7*) (Werner *et al.*, 2003; 2001). *CKX* Gene wurden außerdem z. B. in Reis, Gerste, Weizen sowie Mais gefunden und zum Teil bereits charakterisiert (Galuszka *et al.*, 2004; Massonneau *et al.*, 2004; Schülling *et al.*, 2003). Eine biochemische Analyse aller *CKX*-Enzyme aus *Arabidopsis* offenbarte starke Unterschiede in der Spezifität für bestimmte Cytokinine (Galuszka *et al.*, 2007). Während *AtCKX2* und *AtCKX4* die freien isoprenoiden Cytokinine als Substratmoleküle bevorzugen, zeigen die anderen *CKX* Enzyme für Glucoside und Nukleotide eine erhöhte Aktivität. Die Aktivität einiger *CKX* Gene wird durch Cytokinin reguliert (Brenner *et al.*, 2005; Kiba *et al.*, 2005) und eine Expression konnte für *AtCKX1* und *AtCKX2* im Sprossmeristem, für *AtCKX4* in der Wurzelspitze und in den Stomata, für *AtCKX5* im Prokambium des Wurzelmeristems und für *AtCKX6* in den Stomata und im Leitgewebe nachgewiesen werden (Werner *et al.*, 2006). Experimentelle Studien konnten eine subzelluläre Lokalisation der *CKX* Proteine in der Vakuole (*AtCKX1* und *AtCKX3*) bzw. im Endoplasmatischen Retikulum (*AtCKX2*, *AtCKX4* und *AtCKX6*) zeigen (Werner *et al.*, 2006; 2003; Bilyeu *et al.*, 2001). *AtCKX7* lokalisiert im Cytoplasma (Köllmer, 2009). Die Überexpression von *CKX* Genen führt zu einer starken Reduktion der endogenen Cytokininkonzentration, was u. a. in einem verkürzten Sproßwachstum, kleineren Blättern und einem ausgeprägteren Wurzelsystem resultiert (Werner *et al.*, 2003; 2001). In ihrer Gesamtheit werden diese phänotypischen Merkmale als Cytokinindefizienzsyndrom bezeichnet.

1.3 Cytokinintransport

Die räumlichen Expressionsmuster für Gene der Cytokininbiosynthese (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004), -degradation (Werner *et al.*, 2006; 2003) und -signaltransduktion (Ishida *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2005; 2004; Tajima *et al.*, 2004; Kiba *et al.*, 2002; D'Agostino *et al.*, 2000) unterstützten die Hypothese, dass lokal synthetisierte Cytokinine als autokrine oder parakrine Signale fungieren können (Tanaka *et al.*, 2006a; Nordström *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2002; Faiss *et al.*, 1997. Auf der anderen Seite lässt die Beobachtung einer Translokation von tZ-Ribosiden von der Wurzel in den Spross im Xylem und der Translokation von iP-Ribosiden vom Spross in die Wurzel im Phloem vermuten, dass Cytokinine auch über eine räumliche Entfernung ihre Funktion ausüben (Corbesier *et al.*, 2003; Takei *et al.*, 2001b; Emery *et al.*, 2000; Beveridge *et al.*, 1997; Lejeune *et al.*, 1994; Weiler und Ziegler, 1981). Auf Grund dessen sind zelluläre Import- bzw. Exportproteine nötig,

um einen gezielten Transport von Cytokinin zum Wirkort zu ermöglichen. Gillissen *et al.* (2000) und Bürkle *et al.* (2003) identifizierten zwei hochaffine Transportproteine (AtPUP1, AtPUP2) für Cytokininnukleobasen in *Arabidopsis*, die der Purin-Permease Familie (PUP) zugeordnet wurden und integrale Membranproteine sind. Nach Expression in Hefezellen vermittelten AtPUP1 und AtPUP2 die Aufnahme von tZ und wiesen eine Affinität für tZ auf ($K_i = 20\text{-}35 \mu\text{M}$), die vergleichbar mit der anderer Cytokinin-metabolisierender Enzyme war. Generell zeigten die PUPs eine breite Substratspezifität für verschiedene Cytokinine wie tZ, iP und Kinetin (PUP1) bzw. tZ, cZ, iP, BA und Kinetin (PUP2) sowie Adenin.

Promotor-Reporterstudien konnten *AtPUP1* Expression im Epithem der Hydathoden und auf der Stigmaoberfläche zeigen, was auf eine Rolle im Transport von Cytokininen aus dem Xylemsaft hindeutet, um einen Verlust infolge von Guttation zu verhindern. *AtPUP2* Expression im Phloem von *Arabidopsis* Blättern deutet hingegen auf eine Funktion von PUP2 in der Phloembeladung und im Transport von Cytokininen und Adeninen über größere Entfernung hin (Bürkle *et al.*, 2003).

Neben den Purin-Permeasen wurden darüber hinaus mögliche Transporter für Cytokininnukleoside, die zur Familie der *Equilibrative* Nukleosid Transporter (ENT) gehören, in Reis (*OsENT1 – OsENT4*) und *Arabidopsis* (*AtENT1 – AtENT8*) identifiziert und charakterisiert (Hirose *et al.*, 2008; 2005; Sun *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2003). Wachstumsanalysen mit Hefezellen, die *OsENTs* expremierten, konnten zeigen, dass *OsENT2* einen Transport von Adenosin und anderen Nukleosiden wie iP- und tZ-Ribosid vermittelt (Hirose *et al.*, 2005). Aufgrund der Expressionsdomäne im Leitbündel von Blättern und im Phloemgewebe, kann für *OsENT2* eine Transportfunktion von Cytokininnukleosiden im Leitgewebe vermutet werden. In *Arabidopsis* konnte für *AtENT3*, *AtENT6* und *AtENT8* ein spezifischer Transport von Cytokinin-Nukleosiden wie iP-Ribosid beobachtet werden (Hirose *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2005; Wormit *et al.*, 2004). Promotor-GUS Analysen für *AtENT6* offenbarten Expression in der Wurzel, im Spross, Leitgewebe der Blüten und in den Stomata, was einen Einfluss von *AtENT6* auf den Transport von Nukleosiden über größere Distanzen vermuten lässt (Hirose *et al.*, 2008).

Abschließend betrachtet ist die Cytokinin-Translokation im Vergleich zu den Mechanismen, die am polaren Transport der Auxine beteiligt sind (Tanaka *et al.*, 2006b; Wiśniewska *et al.*, 2006; Sabatini *et al.*, 1999), noch wenig verstanden. Die Analyse weiterer *Knockout*(KO)-Mutanten ist nötig, um die physiologische Relevanz der angesprochenen Transportproteine weiter aufzuklären.

1.4 Cytokininsignaltransduktion

Die Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis* weist generell eine große Ähnlichkeit zu Zwei-Komponenten-Systemen in Prokaryoten auf. Zwei-Komponenten-Systeme sind modular aufgebaut und bestehen mindestens aus zwei Proteinen, einer Histidin-Kinase mit einer Sensor- bzw. *Input*-Domäne und einer Transmitter-Domäne sowie einem *Response*-Regulatorprotein, das eine sogenannte

Receiver- und eine Effektor-Domäne beinhaltet (Abb. 3A). In eukaryotischen Organismen findet man hingegen ein mehrstufiges System, bei dem der Sensor eine Hybrid-Histidin-Kinase mit einer zusätzlichen *Receiver*-Domäne darstellt. Zusätzlich partizipieren Histidin-Phosphotransferproteine in mehrstufigen Zwei-Komponenten-Systemen an der Signaltransduktion (Abb. 3B) (Kakimoto, 2003).

Es dauerte etwa 40 Jahre von der ersten Beschreibung der Cytokinine durch Miller *et al.* (1955a) bis zur experimentellen Beobachtung, dass Histidin-Kinasen an der Cytokininerkennung bzw. -signaltransduktion in *Arabidopsis* beteiligt sind (Inoue *et al.*, 2001; Kakimoto, 1996). Insgesamt kodiert das *Arabidopsis*-Genom für acht bis auf eine Ausnahme transmembranständige Histidin-Kinasen (AHK2, AHK3, CRE1/AHK4, AtHK1, CKI1, AHK5/CKI2, ETR1, ERS1), wobei nur die drei erstgenannten als Cytokininrezeptoren fungieren.

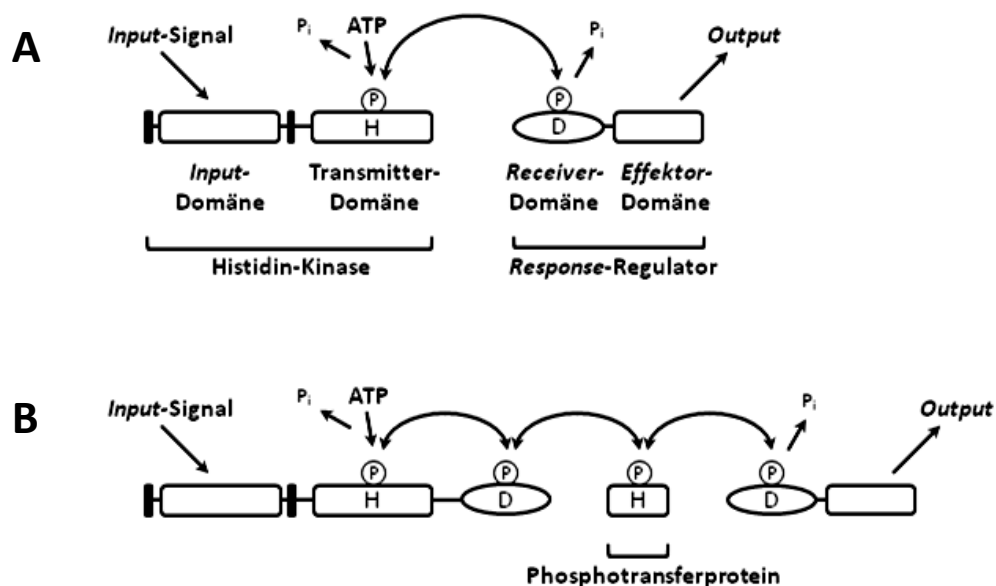


Abbildung 3: Modell von Zwei-Komponenten-Systemen. (A) Das einfache Zwei-Komponenten-System besteht aus zwei Proteinen, einer Histidin-Kinase und einem *Response*-Regulatorprotein. Wenn die Histidin-Kinase mit ihrer *Input*-Domäne ein Signal wahrnimmt, wird ein konservierter Histidinrest in der Transmitter-Domäne phosphoryliert. Der Phosphatrest wird im Anschluss auf ein konserviertes Aspartat in einem *Response*-Regulatorprotein übertragen, welches mit seiner *Output*-Domäne eine molekulare Antwort (z. B. transkriptionelle Aktivierung) vermittelt. (B) In einem mehrstufigen Zwei-Komponenten-System (Phosphorelais) partizipieren zusätzlich Histidin-Phosphotransferproteine am Phosphotransfer zwischen Histidin-Kinase und *Response*-Regulator. Schwarze vertikale Balken markieren membranständige Bereiche; H und D, konservierte Histidin- bzw. Aspartatreste; P_i , anorganisches Phosphat; umkreistes P, Phosphorylgruppe (nach Kakimoto, 2003).

Die *Arabidopsis thaliana* Histidin-Kinase 1 (AtHK1) ist hingegen ein Osmosensor, da sie als positiver Regulator von Salz- und Trockenstressantworten fungiert und die ABA-Signaltransduktion beeinflusst

(Wohlbach *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2007; Urao *et al.*, 1999). Untersuchungen an der Histidin-Kinase Cytokinin insensitiv 1 (CKI1) gaben erste Hinweise, dass Cytokininsignale durch ein Zwei-Komponenten-System vermittelt werden. Kallusgewebe CKI1 überexprimierender Linien zeigten Cytokininantworten wie Zellteilung und Sprossbildung in Abwesenheit von Cytokinin (Kakimoto, 1996). Ferner führte die Überexpression von CKI1 zu einer cytokininunabhängigen Induktion von A-Typ *Response-Regulator*genen (Hwang und Sheen, 2001). Beide Untersuchungen deuten auf eine Rolle von CKI1 im Cytokininsignaltransduktionsweg hin. CKI1 konnte im speziellen eine Funktion bei der weiblichen Gametophytenentwicklung (Hejátko *et al.*, 2003; Pischke *et al.*, 2002) und der Entwicklung des oberirdischen vaskulären Gewebes zugeordnet werden (Hejátko *et al.*, 2009).

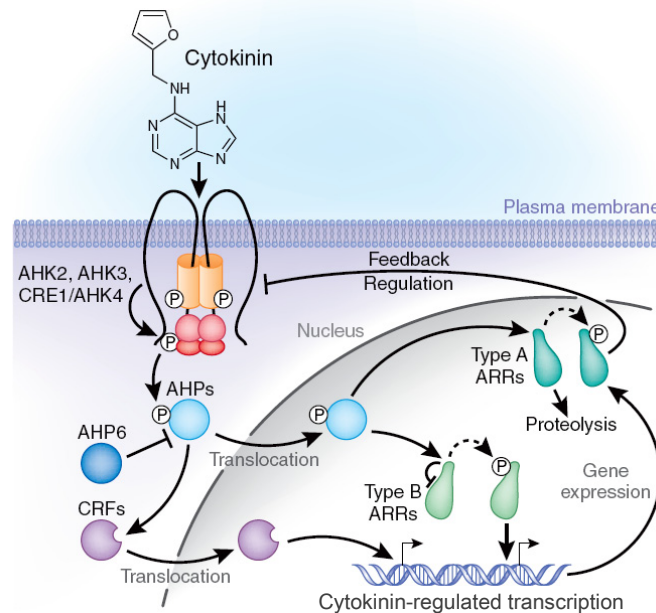


Abbildung 4: Modell der Cytokininsignaltransduktion. Vermutlich plasmamembranständige Rezeptoren (AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4) autophosphorylieren nach Bindung von Cytokinin und transferieren das Phosphat letztendlich auf AHP Proteine. Diese translozieren in den Zellkern und aktivieren durch Phosphorylierung Typ-A und Typ-B ARR. Erstere wirken dabei als Repressoren der Cytokininsignaltransduktion, während letztere als transkriptionelle Aktivatoren die Expression von primären Cytokinin-Antwortgenen regulieren. Gene für CRF Proteine und A-Typ ARR stellen dabei u. a. primäre Zielgene der B-Typ ARR dar. *Cytokinin Response Factor* (CRF) Proteine fungieren wiederum als transkriptionelle Aktivatoren für Cytokinin-Antwortgene (Abb. aus Santner *et al.*, 2009).

Bisherige Arbeiten zur cytoplasmatischen *Arabidopsis* Histidin-Kinase 5 (AHK5/CKI2) lassen für dieses Protein eine Rolle als negativer Regulator bei der ETR1-abhängigen Regulation der Wurzelelongation durch Ethylen und ABA vermuten (Iwama *et al.*, 2007). Ferner hat das Protein eine Rolle in Schließzellen bei der Antwort auf abiotische Stimuli, die zu einer H₂O₂ Synthese führen

(Desikan *et al.*, 2008). Die letzten beiden der insgesamt acht Histidin-Kinasen in *Arabidopsis* (*Ethylene Response 1* (ETR1) und *Ethylene Response Sensor 1* (ERS1)) wurden schließlich als zwei von insgesamt fünf Ethylenrezeptoren beschrieben (Benavente und Alonso, 2006).

Im Modell der Cytokininsignaltransduktion kommt es nach Bindung des Hormons an die Sensor-Domäne und Dimerisierung des Rezeptors zu einer Autophosphorylierung eines hochkonservierten Histidinrestes in der Transmitter-Domäne. Die Phosphorylgruppe wird zunächst auf einen Aspartatrest in der C-terminalen *Receiver*-Domäne des Rezeptors übertragen und weiter auf ein Histidin-Phosphotransferprotein (AHP-Protein) (Abb. 4). Nach Phosphorylierung translozieren die AHP-Proteine in den Zellkern und aktivieren B-Typ *Response*-Regulatorproteine (B-ARR), die als Transkriptionsaktivatoren Cytokinin-Antwortgene aktivieren, zu denen die A-Typ *Response*-Regulatoren (A-ARR) gehören.

Die A-Typ ARR üben wiederum nach Phosphorylierung durch die AHPs eine negative Regulation auf die Cytokininsignaltransduktion aus (To *et al.*, 2004). Weitere primäre Zielgene der B-Typ ARR umfassen drei der *Cytokinin Response Factors* (*CRF1*, *CRF*, *CRF5*), die ebenso Cytokininantworten auf transkriptioneller Ebene vermitteln (Rashotte *et al.*, 2006). Die Entschlüsselung des *Arabidopsis*-Genoms führte letztendlich zur Identifizierung von insgesamt 6 Genen für AHPs, 11 für B-Typ ARRs und 10 für A-Typ ARRs (To und Kieber, 2008).

1.4.1 *Arabidopsis*-Histidin-Kinasen (AHKs)

Die Analyse des *Arabidopsis*-Genoms ergab, wie bereits oben erwähnt, dass insgesamt sechs Gene neben den zwei für die Ethylenrezeptoren ETR1 und ERS1 für Histidin-Kinasen kodieren: AHK2, AHK3, CRE1/AHK4, AtHK1, CKI1 and AHK5/CKI2. Dabei bestehen die N-terminalen Bereiche von AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 aus zwei bis vier Transmembrandomänen und einer vermutlich extrazellulären CHASE-Domäne (*cyclases/histidine-kinase-associated sensor extracellular*), die als mögliche Bindungsdomäne für Cytokinin in Frage kommt (Anantharaman und Aravind, 2001; Mougel und Zhulin, 2001). Eine Funktion der CHASE-Domäne für die Cytokininerkennung wurde aber bisher nicht experimentell bestätigt. AtHK1 und CKI1 haben einen ähnlichen strukturellen Aufbau, besitzen aber keine CHASE-Domäne. AHK5/CKI2 fehlen die N-terminalen Transmembrandomänen sowie die CHASE-Domäne. Im vermutlich cytoplasmatischen Bereich aller angesprochenen Proteine befinden sich die Histidin-Kinase- und *Response*-Regulator-Domänen, die für die Signalweiterleitung innerhalb des Zwei-Komponenten-Systems eine essentielle Funktion einnehmen. Für CRE1/AHK4 wurde neben der Kinase- auch eine Phosphataseaktivität beobachtet, die in Abwesenheit von Cytokinin zu einer Dephosphorylierung der Histidin-Phosphotransferproteine (AHPs) führt und möglicherweise so eine schnelle und vollständige Abschaltung des Signalweges gewährleistet (Mähönen *et al.*, 2006a).

Identifiziert wurde CRE1/AHK4 im Rahmen eines Screens von *Arabidopsis*-Mutanten auf eine gestörte Cytokininantwort. Inoue *et al.* (2001) untersuchten dabei Hypokotyl-Explantate mutierter *Arabidopsis*-Linien auf eine veränderte Zellproliferation und Sprossbildung. Sie isolierten eine cytokininresistente Mutante (*cre1-1*), die im Gegensatz zum Wildtyp auch bei steigender Kinetinkonzentration keine Zellproliferation oder Knospenbildung zeigte. Auch hinsichtlich des Wurzelwachstums wies *cre1-1* eine verringerte Sensitivität gegenüber BA auf, was sich in einer längeren Primärwurzel im Vergleich zum Wildtyp ausdrückte (Inoue *et al.*, 2001). Der *CRE1* Locus wurde auf Chromosom 2 kartiert, und durch die Identifizierung des Gens wurde festgestellt, dass *CRE1* identisch zu *AHK4* (Ueguchi *et al.*, 2001a) und zu *WOODEN LEG (WOL)* ist. Die Mutation des *WOL* Gens bewirkt eine gestörte Entwicklung vaskulären Gewebes und letztendlich ein verzögertes Wurzelwachstum (Mähönen *et al.*, 2000). Die molekulare Funktion von CRE1/AHK4 wurde durch Komplementationsexperimente einer *SLN1*-defizienten Hefemutante (*Saccharomyces cerevisiae*) weiter ergründet. Das *SLN1*-Gen kodiert für die einzige (osmosensitive) Histidinkinase in *S. cerevisiae*. Die entsprechende *sln1*-Deletionsmutante ist letal für Hefe, da ein funktioneller Phosphotransfer von *SLN1* über *YPD1* (Phosphotransferprotein) zu *SSK1* (*Response-Regulatorprotein*) nicht mehr gewährleistet ist (Posas *et al.*, 1996). Dies führt letztendlich zu einer gestörten MAPK-Signaltransduktion und nicht-reguliertem Zellwachstum. Die Expression von CRE1/AHK4 in dieser Mutante konnte den Phänotyp komplementieren und führte zu einem Cytokinin-abhängigen Wachstum, was ein zwingender Nachweis für die Funktion von CRE1/AHK4 als Cytokininrezeptor war (Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001b). Desweiteren waren die konservierten Aminosäurereste H482 und D996 in der Histidin-Kinase- respektive *Receiver*-Domäne zwingend erforderlich für das Cytokinin-abhängige Wachstum der Hefemutante, da die entsprechenden *cre1*-Mutantenallele nicht komplementierten (Inoue *et al.*, 2001).

Auf ähnliche Weise komplementierte CRE1/AHK4 eine Spalthefermutante (*Schizosaccharomyces pombe*), die für die Histidin-Kinasen *PHK1/2/3* defizient war. Die Mutante zeigte ein verkürztes Zellwachstum vor der Zellteilung im Vergleich zur Wildtyp-Hefe (Suzuki *et al.*, 2001). Die Expression von CRE1/AHK4 führte in dieser Mutante wiederum zu einem normalen Zellwachstum in Abhängigkeit von Cytokinin (Suzuki *et al.*, 2001). Ferner konnten Suzuki *et al.* (2001) zeigen, dass CRE1/AHK4 eine *E. coli*-Mutante komplementierte, die defizient in der Histidin-Kinase *RcsC* war. Der *RcsC* → *YojN* (Phosphotransferprotein) → *RcsB* (*Response-Regulatorprotein*) Signalweg kann in bakteriellen Zellen, die eine *cps::lacZ* Fusion im Chromosom tragen, durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität untersucht werden. Die Expression von CRE1/AHK4 in der Δ *rscC* Mutante resultierte in blauen Kolonien auf Cytokinin-haltigem Medium (+ X-Gal), was darauf hinwies, dass der *Arabidopsis*-Rezeptor an das bakterielle Zwei-Komponenten-System ankoppelte und Signaltransduktion vermittelte.

In einem transienten Expressionsassay in *Arabidopsis* Protoplasten (PTA) verstärkte CRE1/AHK4 cytokininabhängig die *ARR6* Promotoraktivität, während die Rezeptor-Mutanten H459Q und D973N einen dominant-negativen Effekt ausübten und die Cytokininantwort verminderten (Hwang und Sheen, 2001). Die beschriebenen Komplementationsexperimente in *Arabidopsis* bzw. Hefe und *E. coli* sowie der Transaktivierungsassay in Protoplasten gaben bereits starke Hinweise, darauf, dass CRE1/AHK4 tatsächlich als Rezeptor für Cytokinin fungiert. Jedoch erbrachten erst Yamada *et al.* (2001) den direkten Nachweis der Cytokininbindung an CRE1/AHK4, indem sie Bindungsstudien mit isolierten Membranen aus *S. pombe* nach Expression von CRE1/AHK4 durchführten, wobei das isoprenoide Cytokinin iP vom Rezeptor mit hoher Affinität (K_D 4,5 nM) gebunden wurde. Für das Ribosid iPR konnte hingegen keine Bindung beobachtet werden. Darüber hinaus hatte die *wol*-Mutation (T301I), die in der CHASE-Domäne liegt, einen vollständigen Verlust der Cytokininbindungsaktivität von CRE1/AHK4 zur Folge. Es sei erwähnt, dass bis zu diesem Zeitpunkt die *wol* Mutation die einzig beschriebene Mutation war, die nachweislich zu einem Verlust der Cytokininerkennung am Rezeptor führt.

Weitere detaillierte Bindungsstudien mit *E. coli*-Zellen konnten zeigen, dass CRE1/AHK4 ein weites Substratspektrum besitzt, da neben tZ (K_D 4 nM) und iP (K_D 17 nM) auch andere Cytokinine wie das Diphenylharnstoffderivat Thidiazuron oder tZ-Ribosid (tZR) und iPR mit hoher Affinität (K_D 40-130 nM) vom Rezeptor gebunden werden (Romanov *et al.*, 2006; 2005; Spíchal *et al.*, 2004).

Für das zu CRE1/AHK4 homologe Protein AHK3 konnte ebenso eine starke Bindung von tZ gemessen werden (K_D 1,3 nM), wobei auch cZ und Dihydrozeatin (DZ) im Vergleich zu CRE1/AHK4 mit hoher Affinität gebunden werden (Romanov *et al.*, 2006; Spíchal *et al.*, 2004). Cytokinine des iP-Typs werden dagegen schwächer gebunden als es für CRE1/AHK4 der Fall ist. Für den dritten mutmaßlichen Cytokininrezeptor AHK2 konnte bisher hingegen keinerlei direkte Cytokininbindung nachgewiesen werden. Weder komplementierte AHK2 die Δ Phk1/2/3 Hefemutante, noch konnte AHK2 die Expression des *cps::lacZ* Reportergens in der Δ *rcsC* *E. coli*-Mutante aktivieren (Suzuki *et al.*, 2001). Hingegen konnten Hwang und Sheen (2001) zeigen, dass AHK2 im PTA zu einer schwachen und cytokininabhängigen Expression des *ARR6::Luc* Reportergens führte, was einen Hinweis für eine Cytokininbindung von AHK2 darstellt.

In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen zeigten auch die zu CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 homologen Proteine von Mais (*Zea mays*) ZmHK1, ZmHK3a und ZmHK2 eine Cytokininantwort im bakteriellen β -Galaktosidaseassay. Während z. B. ZmHK1 gegenüber tZ und cZ eine ähnliche Sensitivität aufwies und ähnlich wie ZmHK3a generell für die freie Cytokininbase eine höhere Sensitivität als für das korrespondierende Ribosid aufwies, reagierte ZmHK2 ähnlich stark auf tZ und das entsprechende Ribosid (tZR) (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004).

Cytokininmessungen in Wildtyp-*Arabidopsis* ergaben z. B. für die beiden Cytokininbasen tZ und iP Werte von 0,6-1,3 bzw. 2,0 pmol g⁻¹ Frischgewicht⁻¹ (Riefler *et al.*, 2006; Takei *et al.*, 2004), was *in*

in vivo Konzentrationen von ca. 0,7-2,5 nM entspricht. Diese Konzentrationen stimmen gut mit den experimentell ermittelten K_D -Werten für CRE1/AHK4 und AHK3 überein (Romanov *et al.*, 2006).

Expressionsanalysen mittels RT-PCR, Northern Blot und Promotor-GUS-Fusionen zeigen, dass CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 prinzipiell in den meisten pflanzlichen Geweben exprimiert werden, wobei die Expressionsstärke sehr stark variiert. CRE1/AHK4 wird vorzugsweise wie bereits oben erwähnt in der Wurzel und dort speziell im Prokambium und in Perizykelzellen exprimiert (Mähönen *et al.*, 2000), wobei Expression auch im Spross, Blatt und Blüte nachweisbar ist (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Ueguchi *et al.*, 2001a). pCRE1::GUS exprimiert zudem im Blütenstängel und stark im sprossapikalen Meristem, jedoch zeigt keine *wol* oder *cre1/ahk4 loss-of-function* Mutante einen spross- oder blattbezogenen Phänotyp (Mähönen *et al.*, 2000). AHK3 und AHK2 werden in den oberirdischen Geweben stärker exprimiert. Vor allem AHK3 weist eine ausgeprägte Expression in den Rosettenblättern auf, während AHK2 generell ein schwächeres Expressionsniveau als AHK3 zeigt (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Ueguchi *et al.*, 2001a). Alle durchgeführten Studien zeigten insgesamt, dass alle drei Rezeptoren vorzugsweise in Zellen exprimiert werden, die meristematischen und vaskulären Geweben zugeordnet werden. Auf subzellulärer Ebene wurde anhand der Überexpression eines GFP-Fusionsprotein in *Arabidopsis*-Protoplasten eine plasmamembranständige Lokalisation für AHK3 nachgewiesen (Kim *et al.*, 2006). Weitere Studien dieser Art für CRE1/AHK4 und AHK2 liegen bisher nicht vor. Nur für die konstitutiv aktive aber Cytokinin-insensitive Histidinkinase CKI1 wurde wie für AHK3 eine Lokalisation an der Plasmamembran gezeigt (Hwang und Sheen, 2001).

Die oben geschilderten Differenzen hinsichtlich der Affinitäten und Spezifitäten von CRE1/AHK4 und AHK3 reflektieren darüber hinaus die spezifischen Funktionen beider Rezeptoren bei der Kommunikation von Wurzel und Spross. Die Tatsache, dass Cytokinine vom tZ-Typ verstärkt im Xylemsaft auftreten (Takei *et al.*, 2001b) und somit ein Fluss von tZ-Typ Cytokinenen von der Wurzel in die oberirdischen Gewebe der Pflanze stattfindet, in denen AHK3 vorzugsweise exprimiert (Higuchi *et al.*, 2004; Ueguchi *et al.*, 2001a), korrespondiert mit der experimentellen Beobachtung, dass AHK3 Cytokinine vom tZ-Typ als Liganden bevorzugt. AHK3 kann somit auf das von der Wurzel kommende Signal (Cytokinin) mit hoher Sensitivität reagieren und letztendlich cytokininabhängige physiologische Funktionen z. B. im Blatt vermitteln, die jedoch auch zumindest teilweise von der Wurzel kontrolliert werden. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass AHK3 an der Regulation von cytokinin-abhängigen Prozessen wie der Blattzellbildung oder Blattseneszenz entscheidend beteiligt ist (Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006). Die Expression von CRE1/AHK4 beschränkt sich hingegen größtenteils auf die Wurzel (Higuchi *et al.*, 2004), und dieser Rezeptor ist dort an der Entwicklung des vaskulären Gewebes und an der Elongation der Primärwurzel beteiligt (Riefler *et al.*, 2006; Mähönen *et al.*, 2000). Das verstärkte Auftreten von Cytokinenen des iP-Typs im Phloemsaft (Corbesier *et al.*, 2003), sowie die Präferenz von CRE1/AHK4 für tZ und iP reflektieren hierbei die physiologischen

Prozesse, an denen dieser Rezeptor mitbeteiligt ist und lassen den Schluss zu, dass CRE1/AHK4 möglicherweise sowohl auf Xylem- und Phloem-transportierte Cytokinine reagiert.

Um die physiologische Funktion der drei Cytokininrezeptoren zu ergründen, wurden Einzel-, Doppel- sowie Tripelrezeptormutanten phänotypisch auch auf eine veränderte Cytokininantwort analysiert (Riefler *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Einzig für CRE1/AHK4 sind bislang semi-dominante *loss-of-function* Mutationen (*wol*) mit stark veränderter Morphologie bekannt, die auf einen schweren Defekt in der Entwicklung der Leitgewebe zurückzuführen sind (de León *et al.*, 2004; Mähönen *et al.*, 2000). Andere Mutationen von CRE1/AHK4 veränderten hingegen die Signaltransduktion bei Phosphatmangel (Franco-Zorrilla *et al.*, 2002) oder die Aufnahme von Sulfat (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004), verursachten ansonsten aber kaum morphologische Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Hingegen war es mit Hilfe von Doppelrezeptormutanten und der Tripelrezeptormutante möglich, den drei Rezeptoren gezielt Funktionen bei der pflanzlichen Entwicklung zuzuordnen, da diese Knockout-Mutanten zum Teil ein gestörtes Wachstum und in diversen biologischen Assays eine verminderte bzw. gar keine Sensitivität gegenüber Cytokinin mehr zeigten (Riefler *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Mutationen der einzelnen Rezeptoren hatten in diesen Analysen keine starken Auswirkungen bezogen auf das Spross- und Blattwachstum, was auf überlappende Funktionen aller drei Rezeptoren bei der Regulation dieser Prozesse hindeutet. Einzig *ahk3* Pflanzen hatten einen verringerten Rosettendurchmesser, welcher in der *ahk2 ahk3* Doppelmutante noch weiter verringert war (Riefler *et al.*, 2006). Die ausgeprägteste morphologische Veränderung wies die *ahk2 ahk3 ahk4* Mutante auf, die sich vor allem in einer geringen Keimlingsgröße mit stark verkürzter Wurzel und kleineren Rosettenblättern ausdrückte. Diese Mutante ähnelte insgesamt betrachtet stark einer Miniaturpflanze. Zudem wies sie eine annähernd vollständige Insensitivität gegenüber Cytokinin in diversen physiologischen Assays, u. a. der Wurzelelongation, Kallusbildung oder dunkelinduzierten Seneszenz auf (Riefler *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2004). Anhand der durchgeführten Studien ergab sich, dass CRE1/AHK4 eine vorherrschende Rolle bei der Primärwurzelelongation und der *in vitro*-Sprossregeneration einnimmt (Riefler *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004), während AHK2 und AHK3 an der Ausbildung von Lateralwurzeln und Blattzellen beteiligt sind (Riefler *et al.*, 2006). Weitere Analysen bestätigten hingegen auch für CRE1/AHK4 eine Funktion bei der Lateralwurzelbildung, da die durch Cytokinin reprimierte Zellteilung von an die Xylempole angrenzenden Perizykelzellen vorzugsweise durch CRE1/AHK4 vermittelt wird (Li *et al.*, 2006). AHK3 hat darüber hinaus im Zusammenspiel mit ARR2 eine herausragende Rolle bei der Cytokinin-vermittelten Kontrolle der Blattseneszenz (Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006). Riefler *et al.* (2006) konnten zudem für alle drei Rezeptoren eine Funktion bei der Regulation u. a. der Samengröße und -keimung, des Plastochrons und dem Cytokininmetabolismus zeigen. Ferner scheinen CRE1/AHK4 und AHK3 den Eisenstatus der Pflanze zu beeinflussen, da Cytokinin, vermittelt durch diese beiden Rezeptoren, die Expression von diversen

für die Eisenaufnahme aus dem Boden verantwortlichen Genen unterdrückt (Séguéla *et al.*, 2008). Tran *et al.* (2007) konnten zeigen, dass alle drei Cytokininrezeptoren als negative Regulatoren der ABA Signaltransduktion und der Antwort auf osmotischen Stress fungieren, da entsprechende *loss-of-function* Mutanten eine Hochregulierung zahlreicher stress- bzw. ABA-induzierter Gene zur Folge hatte und damit eine verstärkte Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress hervorrief. Diese Arbeit konnte erstmals eine Verbindung zwischen Cytokinin, Stress und ABA Signalwegen offenbaren. Schließlich haben CRE1/AHK4 und AHK3 auch eine Funktion bei der Pathogenese. In *Arabidopsis* wurde herausgefunden, dass beide Rezeptoren essentiell für die Infektion mit dem Pathogen *Rhodococcus fascians* und die anschließende Entwicklung der Symptome sind. Darüber hinaus wird die Expression der beiden entsprechenden Gene infolge der Infektion induziert (Pertry *et al.*, 2009).

Generell weist das Cytokininerkennungssystem ein hohes Maß an Redundanz auf, da alle drei Rezeptoren an fast allen untersuchten physiologischen Prozessen beteiligt sind, wobei deren Beitrag jeweils zum Teil stark variiert.

Speziell die Analysen von Riefler *et al.* (2006) zeigen, dass es im Vergleich von Einzel- mit Doppelmutanten zu additiven Effekten bei bestimmten Cytokininantworten kommt. Die Mutation von *AHK2* z. B. hat keine signifikante Änderung in den von ihnen untersuchten Cytokinin-abhängigen Prozessen, verstärkte aber hinsichtlich der Verzögerung der Seneszenz die Cytokinininsensitivität der *ahk3* Mutante. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Rezeptoren zum Teil auch als Heterodimere fungieren. Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit den cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren bestätigen, dass *AHK2* Homodimere und Heterodimere mit *AHK3* ausbilden kann und *CRE1/AHK4* mit *AHK3* heterodimerisieren kann (Dortay *et al.*, 2006), wobei eine *in planta* Studie zur Dimerisierung der Cytokininrezeptoren bisher nicht vorliegt.

An dieser Stelle sei zusätzlich erwähnt, dass zu den drei beschriebenen Cytokininrezeptoren in *Arabidopsis* homologe Proteine in Reis (*OHK2*, *OHK3*, *OHK4*, *OHK5*) (Ito and Kurata, 2006) und Mais (*ZmHK2a*, *ZmHK3a*, *ZmHK4*) (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004) existieren, deren physiologische Funktionen jedoch bisher nicht untersucht worden sind. Hingegen konnte für die orthologen Cytokininrezeptoren in *Medicago truncatula* (*MtCRE1*) und *Lotus japonicus* (*LHK1*) eine essentielle Funktion bei der Knöllchenbildung (Nodulation) gezeigt werden (Murray *et al.*, 2007; Tirichine *et al.*, 2007; Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). Die zu *AHK3* orthologen Rezeptoren aus *Lupinus albus* (*LaHK1*) und *Medicago sativa* (*Mshk1*) haben dagegen eine eher untergeordnete Rolle bei der Knöllchenbildung (Coba de la Peña *et al.*, 2008a; 2008b). *Mshk1* wird durch Salzstress in Blättern, Wurzeln und Knöllchen induziert, was auf eine Rolle der Cytokinin-signaltransduktion bei osmotischem Stress hindeutet (Coba de la Peña *et al.*, 2008a). Ferner wurden Proteine mit einer CHASE-Domäne z. B. in Grünalgen wie *Chlamydomonas* und *Volvox* oder auch im Moos *Physcomitrella patens* gefunden (Pils und Heyl, 2009).

1.4.2 *Arabidopsis* Histidin-Phosphotransfer-Proteine (AHPs)

Die AHP-Proteine bilden in *Arabidopsis* eine Proteinfamilie mit sechs Mitgliedern, von denen fünf den für die Funktion als Histidin-Phosphotransfer-Proteine notwendigen konservierten Histidinrest (XHQXKGSSXS) besitzen (AHP1-AHP5) (Suzuki *et al.*, 2000). Dem letzten Mitglied dieser Familie (AHP6) hingegen fehlt der für die Signaltransduktion wichtige konservierte Histidinrest und wird daher auch als Pseudo-AHP betrachtet (Mähönen *et al.*, 2006b). Die AHPs nehmen eine kritische Rolle in der Cytokininsignaltransduktion ein, da sie den Phosphotransfer zwischen den AHKs und den *Response*-Regulator-Proteinen als Mediatoren ermöglichen (Heyl *et al.*, 2006). Genetische Studien konnten für die AHPs eine positive Rolle bei der Cytokininsignaltransduktion und eine hohe funktionelle Redundanz innerhalb der Familie zeigen (Hutchison *et al.*, 2006). AHP6 wurde im Gegensatz dazu als negativer Regulator der Cytokininsignaltransduktion identifiziert, da *ahp6* Mutanten die *wol* Mutation unterdrücken können und hypersensitiv auf Cytokinin bei der Ausbildung des vaskulären Gewebes in der Wurzel reagieren (Mähönen *et al.*, 2006b). Auf molekularer Ebene blockiert AHP6 vermutlich den Phosphotransfer der anderen AHPs auf die B-Typ ARR, was zu der beschriebenen negativen Regulation führt (Mähönen *et al.*, 2006b).

1.4.3 *Arabidopsis* Response Regulator-Proteine (ARRs)

Das letzte Element der Cytokininsignaltransduktion stellen die *Response*-Regulator-Proteine dar. Das *Arabidopsis*-Genom kodiert für insgesamt 21 *ARR* Gene. Alle ARRs zeichnen sich durch das Vorhandensein des hochkonservierten Aspartatrestes in der sogenannten *Receiver*-Domäne aus, der als Phosphorylierungsort in Zwei-Komponenten-Systemen fungiert (Abb. 3). Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus werden die ARRs in zwei Hauptgruppen weiter gegliedert, den A-Typ ARR (10 Mitglieder) und den B-Typ ARR (11 Mitglieder). Die B-Typ ARR besitzen neben der *Receiver*-Domäne zusätzlich am C-terminalen Ende eine DNA-bindende Domäne (Myb-Domäne) und eine *Output*-Domäne.

Die A-Typ *ARR* werden generell als primäre Antwortgene für Cytokinin betrachtet und üben nach Phosphorylierung eine negative *feedback*-Regulation auf die Signaltransduktion aus (To *et al.*, 2004; Hwang und Sheen, 2001). Für einen Teil der A-Typ ARRs konnte ferner eine erhöhte Stabilität des Proteins nach Cytokinin-induzierter Phosphorylierung nachgewiesen werden (To *et al.*, 2007). Eine funktionelle Beteiligung von A-Typ ARRs an Signalprozessen wie der Antwort auf Rotlicht (Mira-Rodado *et al.*, 2007; Sweere *et al.*, 2001), der Kontrolle der zirkadianen Rhythmik (Salomé *et al.*, 2006) oder der Regulation der Funktion des sprossapikalen Meristems (Leibfried *et al.*, 2005) wurde gezeigt.

Die Expression der B-Typ *ARR* Gene wird hingegen nicht durch Cytokinin beeinflusst (Lohrmann *et al.*, 1999). Die Funktion der B-Typ ARR im Cytokininsignalweg ist die transkriptionelle Aktivierung von primären Cytokininantwortgenen, zu denen u. a. die A-Typ ARRs zählen (Hwang und Sheen,

2001). Genetische Studien mit multiplen KO-Linien belegen zudem eine hohe funktionelle Redundanz innerhalb der Familie der B-Typ ARRs bei (Argyros *et al.*, 2008; Heyl *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2005).

1.5 Proteinstrukturen von (Rezeptor-)Histidin-Kinasen

Ein entscheidender Schritt zum besseren Verständnis der Funktionsweise von Histidin-Kinasen ist u. a. die Kenntnis der räumlichen Struktur des Proteins. Vor allem in prokaryotischen Organismen sind Zwei-Komponenten-Systeme weit verbreitet (West und Stock, 2001), was ein Grund dafür sein mag, dass bis heute eine größere Anzahl von Proteinstrukturen prokaryotischer Histidin-Kinasen gelöst worden sind. Unter anderem wurden die räumlichen Strukturen der Dimerisierungs- und Phosphotransferdomäne (DHP) sowie der katalytischen und ATP-bindenden (CA) Domäne des Osmosensors EnvZ aus *E. coli* getrennt mittels NMR gelöst (Tomomori *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1998). Darüber hinaus zeigen Kristallstrukturen der katalytischen Domänen des Chemorezeptors CheA aus *Thermotoga maritima* (Bilwes *et al.*, 1999), von PhoQ (Marina *et al.*, 2001) und NtrB aus *E. coli* (Song *et al.*, 2004) eine konservierte α/β sandwich-Struktur bestehend aus fünf β -Faltblättern und drei α -Helices, was auf die im Allgemeinen stärkere Konservierung von Aminosäuren im C-terminalen bzw. cytoplasmatischen Bereich der Histidin-Kinasen zurückzuführen ist. Letztendlich wurde auch die Struktur der Receiver-Domäne im aktivierten (phosphorylierten) Zustand mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst und bestätigte im Vergleich mit der Struktur der nichtaktivierten Domäne die Vermutung, dass die Phosphorylierung des Aspartatrestes mit einer alternativen Konformation der Domäne einhergeht (Lee *et al.*, 2001a; 2001b; Halkides *et al.*, 2000; Birck *et al.*, 1999; Kern *et al.*, 1999). Die Kristallstruktur einer vollständigen cytoplasmatischen Domäne einer Sensor-Histidin-Kinase aus *Thermotoga maritima* konnte schließlich Aufschluss darüber geben, wie die DHP- und CA-Domänen relativ zueinander angeordnet sind, um einen Phosphotransfer zu ermöglichen (Marina *et al.*, 2005). NMR-Analysen des Segmentes, welches die extrazelluläre Sensordomäne bzw. genauer die sich anschließende Transmembrandomäne mit der katalytischen Domäne verbindet, offenbarten eine homodimere, aus vier Helices bestehende, parallele *Coiled Coil*-Struktur, die eine Signalweiterleitung vom Sensor zur Kinase-Domäne durch eine einfache Rotation vermittelt und so eine entscheidende Funktion einnimmt (Hulko *et al.*, 2006). Aufgrund der weiten Verbreitung dieser speziellen Domäne in Histidin-Kinasen, Adenylylzyklasen, Methylakzeptierenden Chemotaxis-Proteinen und Phosphatasen wird sie als HAMP-Domäne bezeichnet (Aravind und Ponting, 1999). Die Arbeiten von Marina *et al.* (2005) und Hulko *et al.* (2006) lieferten letztendlich einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis darüber, welche strukturellen Veränderungen in einer Histidin-Kinase durch die Signalerkennung und die anschließende Signaltransduktion hervorgerufen werden.

Die Kenntnisse hinsichtlich der Proteinstruktur pflanzlicher Histidin-Kinasen sind bis heute stark limitiert. Einzig die Kristallstruktur der *Receiver*-Domäne des Ethylenrezeptors ETR1 (Müller-Dieckmann *et al.*, 1999), die eine hohe konformative Konservierung zu den prokaryotischen Vertretern dieser Domäne aufweist, sowie eine vorläufige Röntgenstrukturanalyse der *Receiver*-Domäne von CKII liegen vor (Klumpler *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu bereits vorhandenen Proteinstrukturen einiger Sensordomänen von prokaryotischen Histidin-Kinasen (Cheung *et al.*, 2009; Moore und Hendrickson, 2009; Cheung *et al.*, 2008; Reinelt *et al.*, 2003) ist das Verständnis der Signalerkennung auf struktureller Ebene bei den pflanzlichen Histidin-Kinasen aufgrund bislang ungeklärter Proteinstrukturen der entsprechenden Sensordomänen (z. B. CHASE bei den Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2) stark limitiert.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

In den vorherigen Abschnitten wurde auf die bisherigen Erkenntnisse, die bei der Analyse der Cytokininrezeptoren erzielt worden sind, näher eingegangen. Dabei konzentrierten sich bisherige Arbeiten zum einen verstärkt auf die Entschlüsselung der biologischen Funktionen der drei Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2, zum anderen auf die nähere Charakterisierung biochemischer Parameter wie der Substrataffinität und -spezifität. Nicht bekannt ist bis zu diesem Zeitpunkt hingegen, ob der vermutlich extrazellulären CHASE-Domäne tatsächlich eine essentielle Funktion für die Hormonerkennung zuerkannt werden muss. Ferner liegen abgesehen von der *wol* Mutation (T301I) keine Daten darüber vor, welche weiteren Aminosäuren innerhalb von CHASE an der Hormonbindung beteiligt sind bzw. von genereller struktureller Bedeutung sind. Für ein besseres Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen am Rezeptor vor allem in Bezug auf die Hormonbindung wäre eine hochaufgelöste räumliche Struktur des Proteins vonnöten, die bisher nicht vorhanden ist. Darüber hinaus fehlen eine umfassende Studie zur subzellulären Lokalisation der drei Cytokininrezeptoren aus *Arabidopsis* und eine Validierung der bereits erzielten Ergebnisse bezüglich des Dimerisierungsverhaltens der Rezeptoren *in planta*.

Auf Grund dessen ergeben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Promotion bearbeitet wurden:

- i. Zunächst war es das Ziel, experimentell mit Hilfe eines bakteriellen Bindungsassays zu bestätigen, dass die CHASE-Domäne die Ligandenbindungsdomäne der Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 darstellt.
- ii. Für die Cytokininbindung wichtige Aminosäuren innerhalb der CHASE-Domäne sollten mit einem bioinformatischen Ansatz und anschließender experimenteller Überprüfung identifiziert werden.

- iii. Um ein besseres Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen am Rezeptor zu erlangen, wurde exemplarisch die Kristallisation der CHASE-Domäne von CRE1/AHK4 angestrebt.
- iv. Transiente Expressionsversuche zur subzellulären Lokalisation der drei Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 sowie *in planta* Analysen zum Dimerisierungsverhalten der Rezeptoren wurden unternommen, die einen wichtigen Beitrag zum besseren Gesamtverständnis der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis* leisten sollen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Standardchemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Medien und Agar für Bakterien- und Pflanzenkulturen waren von BD Biosciences (Heidelberg), Difco Laboratories (Detroit, USA) und Duchefa (Haarlem, Niederlande).

2.1.2 Reaktionskits

Die in dieser Arbeit verwendeten Reaktionskits sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1: Reaktionskits

Bezeichnung	Firma	Verwendung
QiaQuick PCR Purification	Qiagen, Hilden	Aufreinigung von PCR-Produkten
QiaQuick Gel Extraction	Qiagen, Hilden	Gelextraktion von DNA-Fragmenten
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitek, Berlin	Plasmid-Mini-Präparation
Nucleobond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren	Plasmid-Maxi-Präparation
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis	Stratagene, La Jolla, USA	Ortsgerichtete Mutagenese
Gateway Cloning Technology	Invitrogen, Karlsruhe	Rekombinante Klonierungstechnologie

2.1.3 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2: Enzyme

Bezeichnung	Firma	Verwendung
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot bzw. New England Bio Labs, Frankfurt	Restriktionsverdau von DNA
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot	Ligation von DNA
T7 RNA Polymerase	eigene Herstellung modifiziert nach Li <i>et al.</i> , 1999	Zellfreie Proteinexpression
Pyruvat-Kinase	Roche Applied Science, Mannheim	Zellfreie Proteinexpression
<i>Taq</i> -Polymerase	institutseigene Herstellung	Polymerasekettenreaktion (PCR)
<i>Pfu</i> -Polymerase	institutseigene Herstellung	Polymerasekettenreaktion (PCR)

Cellulase R-10	Duchefa, Haarlem, Niederlande	Protoplastenherstellung
Macerozym R-10	Duchefa, Haarlem, Niederlande	Protoplastenherstellung

2.1.4 Organismen

2.1.4.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3: Bakterienstämme

Spezies/Stämme	Genotyp	Referenz	Verwendung
DB3.1 (<i>Escherichia coli</i>)	F ⁻ <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻m_B⁻) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1</i>	Hanahan, 1983 Bernard und Couturier, 1992	Klonierung
DH10B (<i>E. coli</i>)	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG</i>	Calvin und Hanawalt, 1988; Raleigh <i>et al.</i> , 1988	Klonierung
XL1 blue (<i>E. coli</i>)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁻ proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene, La Jolla, USA	Mutagenese
BL21 (DE3)pLysS (<i>E. coli</i>)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)pLysS (Cam^R)</i>	Grunberg-Manago, 1999; Lopez <i>et al.</i> , 1999	Proteinexpression
BL21 Star (DE3)pLysS (<i>E. coli</i>)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3)pLysS (Cam^R)</i>	Kido <i>et al.</i> , 1996; Lopez <i>et al.</i> , 1999	Proteinexpression
Rosetta 2 (<i>E. coli</i>)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm pRARE2 (Cam^R)</i>	Kane, 1995; Kurland und Gallant, 1996	Proteinexpression bzw. S30 Extrakt Herstellung
GV3101::pMP90 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	Rif ^R Gm ^R	Koncz <i>et al.</i> , 1987; Schell, 1978	Pflanzentransformation
C58C1::pCH32 (<i>A. tumefaciens</i>)	Rif ^R Gm ^R Km ^R	Voinnet <i>et al.</i> , 2003	Unterdrückung von posttranskriptionellem <i>genesilencing</i> mittels p19 Protein <i>in planta</i>

2.1.4.2 Pflanzen

Experimente mit Pflanzen wurden zum einen mit *Arabidopsis thaliana* Col-0 (Wildtyp) durchgeführt. Des Weiteren wurde *Nicotiana benthamiana* für die Proteinexpression (2.2.2.5), subzelluläre Lokalisation (2.2.4.1) und Versuche zur Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) (2.2.4.2) verwendet.

2.1.5 Nährmedien

2.1.5.1 Nährmedien für Bakterien

Standardmäßig wurde für Bakterien LB (Luria Broth) als Anzuchtmedium verwendet (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Natriumchlorid) (Sambrook und Russell, 2001). Die Herstellung von Festmedium erfolgte durch zusätzliche Gabe von 15 g Agar pro Liter LB-Flüssigmedium. Zur Anzucht von *A. tumefaciens* wurde neben LB auch YEB-Medium (5 g/l Bacto Pepton, 1 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Rinderextrakt, 5 g/l Saccharose, Zugabe von 2 ml 1 M MgCl₂ nach Autoklavieren) als nährstoffreicheres Medium verwandt (Vervliet *et al.*, 1975). Alle Medien wurden anschließend für 15 Minuten autoklaviert. Zur Selektion wurden dem Medium nach Abkühlen auf etwa 50°C Antibiotika entsprechend Tab. 4 nach Bedarf zugesetzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4: Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Lösungsmittel
Carbenicillin	50	50	H ₂ O
Chloramphenicol	34	34	Ethanol
Gentamycin	25	25	H ₂ O
Kanamycin	100	100	H ₂ O
Rifampicin	50	50	DMSO
Spektinomycin	30	30 60 (für <i>A. tumefaciens</i>)	H ₂ O
Zeocin	100	100	H ₂ O

2.1.5.2 Nährmedien für Pflanzen

Für die *in vitro* Anzucht von Arabidopsispflanzen mussten die Samen zunächst mit einer gesättigten Kalziumhypochloridlösung (200 g/l CaCl₂O₂, 0,1% Triton X-100) oberflächensterilisiert werden. Nach anschließendem gründlichem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen auf sterilem Filterpapier getrocknet. Die Sterilkultur von *A. thaliana* erfolgte auf Murashige & Skoog (MS) Medium (4,2 g/l MS-Salze, 0,1 g myo-Inositol, 0,5 g/l MES, 10 g/l Saccharose, pH 5.7 mit KOH, 9 g/l Agar) (Murashige und Skoog, 1962). Zur Selektion Basta-resistenter *Arabidopsis*-Pflanzen wurden dem MS-Medium noch 10 µg/ml Phosphinotricin (PPT) zugegeben.

Zur unsterilen Anzucht wurden *Arabidopsis*- bzw. Tabaksamen direkt auf einem GS 90 Erde-Vermeiculite Gemisch (3:1) ausgesät oder auf MS-Medium vorselektierte Pflanzen etwa 14 Tage nach der Keimung auf Erde überführt. Die Kultivierung in der Klimakammer bzw. im Gewächshaus fand unter Langtagbedingungen statt.

2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen, in sterilem destiliertem, deionisiertem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der gelösten Oligonukleotide betrug 100 µM.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 5: Oligonukleotide (Primer)

Primername	Verwendung	Sequenz 5'→3'
<i>attB1</i> Adapter forward	Gateway Adapter PCR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
<i>attB2</i> Adapter reverse	Gateway Adapter PCR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>NdeI</i> forward	Klonierung in pIVEX2.3MCS	GTACCAGG <u>CATATG</u> GCTTTGATTCTGTGGATCATCATTG
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>SmaI</i> reverse	Klonierung in pIVEX2.3MCS	AGTATA <u>CCCGGG</u> CAGTATATAACCCACCAAGAAACCA
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>Bam</i> HI forward	Klonierung in pET21b bzw. 30b	GTACC <u>GGATCC</u> GCTTTGATTCTGTGGATCATCATTGTTG
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>XhoI</i> reverse	Klonierung in pET21b bzw. 30b	GACCA <u>CTCGAG</u> CAGTATATAACCCACCAAGAAACAA
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>EcoRI</i> forward	Klonierung in pMAL-c2	AGCT <u>GAATTC</u> GCTTTGATTCTGTGGATCATC
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>HindIII</i> reverse	Klonierung in pMAL-c2	AGCC <u>AAGCTT</u> TACAGTATATAACCCACCAAGAAAC
AHK2 CHASE-TM <i>attB1</i> forward	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	<u>AAAAAGCAGGCTCC</u> AATATCCTTCTCCTTGG
AHK2 CHASE-TM <i>attB2</i> reverse	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CAGGCTTCATATAAAATATAACC
AHK3 CHASE-TM <i>attB1</i> forward	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	<u>AAAAAGCAGGCTCC</u> CCTTGTTGGTGGTTTGGGTTG
AHK3 CHASE-TM <i>attB2</i> reverse	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CAGATTATATGTGCAACAAG
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>attB1</i> forward	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	<u>AAAAAGCAGGCTTC</u> GCTTTGATTCTGTGGATCATCATTG
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>attB2</i> reverse	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	<u>AGAAAGCTGGGTG</u> TACAGTATATAACCCACCAA
CRE1/AHK4 <i>NcoI</i> forward	Klonierung in pICH11599, Magnifektion	TCGGAG <u>CCATGG</u> GAAGAGATTTTGTGTATAATAATAATG
CRE1/AHK4 <i>Bam</i> HI reverse	Klonierung in pICH11599, Magnifektion	ACATCC <u>GGATCC</u> TACGACGAAGGTGAGATAGGATTAG
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>NcoI</i> forward	Klonierung in pICH11599, Magnifektion	GTCACA <u>CCATGG</u> CCTTTGATTCTGTGGATCATCATTG
CRE1/AHK4 CHASE-TM <i>Bam</i> HI reverse	Klonierung in pICH11599, Magnifektion	GTCACA <u>GGATCC</u> TACAGTATATAACCCACCAAG
CRE1/AHK4 CHASE <i>NcoI</i> forward	Klonierung in pICH11599, Magnifektion	CAGGTA <u>CCATGG</u> ATGATGCTAATAAGATTAGAAGGG
CRE1/AHK4 CHASE <i>Bam</i> HI reverse	Klonierung in pICH11599, Magnifektion	ACATCC <u>GGATCC</u> CATGCCTTTTGGTGGTACCTGC
CRE1/AHK4 CHASE F304A forward	Mutagenese für Magnifektion	GCTGTCTTGACTAGCCCTGCTAGGTTGTTGGAAACTCA
CRE1/AHK4 CHASE F304A reverse	Mutagenese für Magnifektion	TGAGTTTCCAACAACCTAGCAGGGCTAGTCAAGACAGC

gAHK2 <i>StuI</i> forward	Klonierung in pSPYCE35S/ pSPYNE35S, BIFC-Analysen	GTCACA <u>AGGCCT</u> ATGTCTATAACTTGTGAGCTCTTG
gAHK2 <i>Bam</i> HI reverse	Klonierung in pSPYCE35S/ pSPYNE35S, BIFC-Analysen	GTCACA <u>GGATCC</u> ACAAGGTTCAAAGAATCTTGCTAC
AHK3 <i>SalI</i> forward	Klonierung in pSPYCE35S/ pSPYNE35S, BIFC-Analysen	GTCACA <u>GTCGAC</u> ATGAGTCTGTTCCATGTGCTAGG
AHK3 <i>SmaI</i> reverse	Klonierung in pSPYCE35S/ pSPYNE35S, BIFC-Analysen	GTCACA <u>CCCGGG</u> TGATTCTGTATCTGAAGGCG
CRE1/AHK4 <i>Bam</i> HI forward	Klonierung in pSPYCE35S/ pSPYNE35S, BIFC-Analysen	GTCACA <u>GGATCC</u> ATGAACTGGGCACTCAACAATCATC
CRE1/AHK4 <i>SmaI</i> reverse	Klonierung in pSPYCE35S/ pSPYNE35S, BIFC-Analysen	GTCACA <u>CCCGGG</u> CGACGAAGGTGAGATAGGATTAGG

Fettgedruckte und unterstrichene Nucleotide bezeichnen Restriktionsschnittstellen bzw. *att* Rekombinationsstellen.

2.1.7 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6: Plasmide

Bezeichnung	Funktion	Marker	Referenz
Gateway Entry-Plasmide			
pDONR 201	Gateway <i>Entry</i> -Vektor für BP Reaktion	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR 201-CRE1/AHK4 (As 1-1080)	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 CHASE (As 149-418)	<i>Entry</i> -Klon mit CHASE Domäne von CRE1/AHK4	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 cyto (As 464-1080)	<i>Entry</i> -Klon mit cytoplasmatischer Domäne von CRE1/AHK4	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 W244A	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon mit Mutation W244A	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 K297A	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon mit Mutation K297A	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 T301I	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon mit Mutation T301I	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 F304A	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon mit Mutation F304A	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 R305A	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon mit Mutation R305A	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 T317A	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon mit Mutation T317A	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 201-CRE1/AHK4 H482Q	CRE1/AHK4 <i>Entry</i> -Klon mit Mutation H482Q	Kanamycin	Heyl <i>et al.</i> , 2007
pDONR 221	Gateway <i>Entry</i> -Vektor für BP Reaktion	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe

pDONR 221-gAHK2	AHK2 <i>Entry</i> -Klon (genomisch)	Kanamycin	Klonierung durchgeführt von Dr. Andrea Arbeiter
pDONR 222	Gateway <i>Entry</i> -Vektor für BP Reaktion	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR 222-AHK3	AHK3 <i>Entry</i> -Klon	Kanamycin	Klonierung durchgeführt von Nijusha Mehnert
Plasmide für Expression in <i>E. coli</i>			
pDEST 15	Gateway Ziel-Vektor für N-terminale GST-Fusion, LR Reaktion	Carbenicillin	Invitrogen, Karlsruhe
pDEST 15-leer	Modifizierter Vektor für die Expression von GST	Carbenicillin	-----
pET-21b	Expressionsvektor für C-terminale 6xHis-Fusion in <i>E. coli</i>	Carbenicillin	Novagen, Darmstadt
pET-30b	Expressionsvektor für N- und C-terminale 6xHis-Fusion in <i>E. coli</i> , inkl. N-terminale Enterokinase-Schnittstelle	Carbenicillin	Novagen, Darmstadt
pMAL-c2	Expressionsvektor für N-terminale MBP-Fusion in <i>E. coli</i> , inkl. FaktorXa-Schnittstelle	Carbenicillin	New England Biolabs, Frankfurt
Plasmide für zellfreie Expression			
pIVEX2.3 MCS	Expressionsvektor für C-terminale 6xHis-Fusion	Carbenicillin	Roche Applied Science, Mannheim
pIVEX-GFP	Vektor für GFP-Expression	Carbenicillin	Roche Applied Science, Mannheim
Plasmide für Expression in Tabak (Magnifektion)			
pICH17388	5' Provektor für Magnifektion	Carbenicillin	Giritch <i>et al.</i> , 2006
pICH11599	3' Provektor für Magnifektion	Carbenicillin	Giritch <i>et al.</i> , 2006
pICH14011	Integrase Modul für Magnifektion	Carbenicillin	Giritch <i>et al.</i> , 2006
pICH7410	3' Provektor für GFP-Expression	Carbenicillin	Giritch <i>et al.</i> , 2006
Plasmide für subzelluläre Lokalisation in <i>Arabidopsis</i>-Protoplasten			
pA7-GFP	Vektor für transiente GFP-Expression	Carbenicillin	Voelker <i>et al.</i> , 2006
pA7-GW-GFP	Gateway-kompatibler GFP-Expressionsvektor	Carbenicillin	-----
pA7-KDEL-GFP	GFP Kontrolle für Endoplasmatisches Retikulum	Carbenicillin	Voelker <i>et al.</i> , 2006
pA7-AtAMT2-GFP	GFP Kontrolle für Plasmamembran	Carbenicillin	Sohlenkamp <i>et al.</i> , 2002

Plasmide für subzelluläre Lokalisation in <i>N. benthamiana</i>			
pB7FWG2	Binärer Gateway Ziel-Vektor für C-terminale GFP-Fusion	Spektinomycin (Bakterien), BASTA (Pflanze)	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pB7WGF2	Binärer Gateway Ziel-Vektor für N-terminale GFP-Fusion	Spektinomycin (Bakterien), BASTA (Pflanze)	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pB7WGF2-leer	Modifizierter Gateway-Vektor für die Expression von GFP	Spektinomycin (Bakterien), BASTA (Pflanze)	-----
pBIN-mCherry-HDEL	Rot-fluoreszierender ER-Marker für transiente Expression	Kanamycin	Nelson <i>et al.</i> , 2007
Plasmide für Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)			
pSPYCE-35S	Leerer binärer Vektor für C-terminale Fusion mit dem C-terminalen YFP-Fragment	Kanamycin	Walter <i>et al.</i> , 2004
pSPYNE-35S	Leerer binärer Vektor für C-terminale Fusion mit dem N-terminalen YFP-Fragment	Kanamycin	Walter <i>et al.</i> , 2004
pSPYCE-35S-LeSUT1	BiFC-Plasmid mit cDNA des Saccharose-Transporters <i>SUT1</i>	Kanamycin	(Krügel <i>et al.</i> , 2008)
pSPYNE-35S-LeSUT1	BiFC-Plasmid mit cDNA des Saccharose-Transporters <i>SUT1</i>	Kanamycin	Krügel <i>et al.</i> , 2008

2.2 Methoden

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit destilliertem, deionisiertem Wasser angesetzt. Glasgeräte und wässrige Lösungen für Arbeiten mit Bakterien, Nukleinsäuren und Pflanzen waren zuvor autoklaviert oder durch Filtration sterilisiert worden.

2.2.1 Mikrobiologische und gentechnische Arbeiten

2.2.1.1 Kultur von Bakterien

E. coli-Flüssigkulturen wurden in Reagenzröhrchen oder Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Auf Festmedium ausplattierte *E. coli* wurden ebenso bei 37 °C angezogen. Fest- bzw. Flüssigkulturen von *A. tumefaciens* wurden bei 28 °C bis zu 3 Tage wachsen gelassen.

2.2.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen nach der TSS-Methode

Es wurden zunächst 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Stamm beimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 aufwies, stellte man die Kultur auf Eis und pelletierte die Bakterien bei 4000 x g und 4 °C. Das Pellet wurde in 2 ml steriler TSS Lösung (85% LB, 10 g PEG6000, 5% DMSO, 50 mM MgCl₂) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl 87% Glycerol wurden die Bakterien direkt für die Transformation verwendet oder zu 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert (Chung *et al.*, 1989).

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und DNA hinzupipettiert. Der gemischte Ansatz wurde für etwa 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor ein Hitzeschock von 42°C für 60 Sekunden appliziert wurde. Nach einer kurzen Inkubation der geschockten Zellen auf Eis wurden 1 ml LB Medium hinzugegeben, und der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C geschüttelt. 50 µl bis 1 ml des Ansatzes wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Chung *et al.*, 1989).

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

100 ml einer frisch beimpften Bakterienkultur wurden bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend auf Eis heruntergekühlt und die Zellen bei 4000 x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem H₂O gewaschen und die Bakterien wieder wie zuvor abzentrifugiert. Das Waschen wurde noch zweimal wiederholt bevor das Pellet abschließend in 1 ml einer kalten Glycerinlösung resuspendiert wurde. Die kompetenten Zellen konnten direkt für die Transformation verwendet werden bzw. wurden zu 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert (Calvin und Hanawalt, 1988).

Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, die zu transformierende DNA gegen H₂O dialysiert und anschließend zu den Bakterienzellen hinzugegeben. Nach einer etwa zwanzigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in eine Elektroporationsküvette gegeben und am Micropulser (Biorad, München) ein Puls von 1,7 kV für 5 ms appliziert. Anschließend wurde dem Transformationsansatz 1 ml LB Medium zugesetzt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. 50 µl bis 1 ml des Ansatzes wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Calvin und Hanawalt, 1988).

Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Zunächst wurden 4 ml YEB Medium (inkl. Rifampicin und Gentamycin, siehe Tab. 4) mit dem Agrobakterienstamm (siehe Tab. 3) angeimpft. Die Vorkultur schüttelte über Nacht bei 28°C bevor mit

2 x 1 ml dieser Vorkultur 2 x 100 ml YEB-Medium (Antibiotika siehe oben) angeimpft wurden. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 28°C wurden die Zellen auf Eis gestellt. Die weitere Vorgehensweise ist im obigen Abschnitt „Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen“ beschrieben (Sambrook und Russell, 2001).

Transformation elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit zuvor dialysierter DNA versetzt. Nach Inkubation auf Eis für 20 min wurden die Zellen bei 2,4 kV für 5 ms elektroporiert. Dem Transformationsansatz wurden danach 1 ml LB-Medium hinzugegeben und 2 h bei 28°C geschüttelt. 10 µl bis 1 ml des Ansatzes wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert (Sambrook und Russell, 2001).

2.2.1.3 Transiente Transformation von Arabidopsis Mesophyllprotoplasten

Für die subzelluläre Lokalisation mittels GFP-Fusion wurden u. a. Protoplasten aus *A. thaliana* verwendet. Die Herstellung und transiente Transformation entsprechender Mesophyllprotoplasten erfolgte nach (Yoo *et al.*, 2007). Die Analyse der transformierten Protoplasten fand nach ein- bis zweitägiger Inkubation bei 25°C im Dunkeln statt.

2.2.1.4 Transiente Transformation von N. benthamiana Blattepidermiszellen

Etwa fünf bis sechs Wochen alte Tabakpflanzen wurden nach einem modifizierten Protokoll basierend auf (Sparkes *et al.*, 2006) transformiert. Eine Übernachtskultur mit Agrobakterien, in die zuvor der zu analysierende binäre GFP-Vektor transformiert worden war, wurde zunächst bei 4.000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde 1-2 x mit 10 ml frisch hergestelltem Infiltrationspuffer (10 mM MES-NaOH, pH 5,7; 10 mM MgCl₂; 150 µM Acetosyringon) gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Pellet in 2 ml Puffer resuspendiert und die OD₆₀₀ einer 1:10 Verdünnung ermittelt. Die Bakteriensuspension wurde vor der Infiltration in Tabak auf eine OD₆₀₀ von 0,7 mit Puffer eingestellt. Zur Unterdrückung von posttranskriptionellem *gene-silencing* wurde stets eine zweite Bakteriensuspension (enthält den Vektor für das p19 Protein; siehe Tabelle 3) mit der anderen Suspension gemischt, so dass letztendlich ein OD₆₀₀ Verhältnis von 0,7:1 (GFP:p19) entstand. Vor der Infiltration stand die Zellsuspension etwa 2 Stunden, damit sich die Zellen an das veränderte Medium anpassen konnten. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Unterseite des vierten bis sechsten Blattes eingespritzt. Nach ca. fünf Tagen wurden die transformierten Pflanzen am konfokalen Mikroskop auf Expression des fluoreszierenden Proteins untersucht.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* bzw. *A. tumefaciens*

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Ein detailliertes Protokoll für die Minipräparation aus *E. coli* findet sich bei Sambrook und Russell (2001). Zur Isolierung geringer Mengen hochreiner Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurde das *Invisorb Spin Plasmid Mini Two-Kit* (Invitex, Berlin) verwendet. Für Plasmid-Maxipräparationen wurde das *Nucleobond Xtra Maxi-Kit* (Macherey-Nagel, Düren) benutzt. Die Durchführung erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers.

Die Plasmid-Minipräparation aus Agrobakterien erfolgte nach einem modifizierten Protokoll, welches im Folgenden beschrieben wird. Fünf ml einer zwei oder drei Tage alten Flüssigkultur wurden abzentrifugiert und das vorhandene Zellpellet in 100 µl Puffer 1 + RNase (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) sorgfältig resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor 20 µl einer Lysozymlösung (20 mg/ml) hinzugegeben wurden. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei 37°C wurden zunächst 200 µl Puffer 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) hinzu pipettiert und im Anschluss die Lyse auf Eis für 5 min durchgeführt. Die Neutralisation erfolgte nach Zugabe von 150 µl Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 4,8 mit Eisessig) wiederum für 5 min auf Eis. Es folgte eine Zentrifugationsschritt für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit. Vom entstandenen Überstand wurden 400 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt. Es wurde intensiv durch Vortexen gemischt und 5 min zentrifugiert. Die gebildete obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4°C wurde die pelletierte DNA mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert, das Pellet kurz getrocknet und in 20 µl H₂O bidest gelöst.

2.2.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in Horizontal-Gelelektrophoreseapparaturen mit Agarose-TAE-Gelen (Sambrook und Russell, 2001). Je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente wurden 0,8 bis 2%ige Agarosegele hergestellt. Zur Detektion der DNA wurde der Gelmatrix vor dem Gießen Ethidiumbromid (0,1%) zugesetzt. Für eine Größen- und Mengenabschätzung der elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren wurde ein Größenmarker (Hyperladder I, Bioline, Luckenwalde) mit aufgetragen. Die Detektion und Dokumentation erfolgte am *Gene Genius* mit Hilfe der Software *Gene Snap* (Syngene, Cambridge, UK).

2.2.1.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch bei 260 nm am *NanoDrop* (Thermo Scientific/ Peqlab, Erlangen). Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über Verunreinigungen der DNA mit Proteinen und sollte bei einer reinen DNA-Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.8 Standardmethoden zur DNA-Klonierung

Standardmethoden zur DNA-Klonierung wie Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation wurden durchgeführt nach Sambrook und Russell (2001). Die Klonierungsstrategien für Konstrukte, die nicht mittels der Gateway-Technologie hergestellt wurden, finden sich in Abschnitt 2.2.1.12.

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem *QiaQuick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden). Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *QiaQuick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) benutzt. Es wurde jeweils nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.1.9 Gateway-Klonierung

Gateway ist ein universelles Klonierungssystem, das auf den ortsspezifischen Rekombinationseigenschaften des Bacteriophagen λ basiert (Landy, 1989). Diese Technologie erlaubt den schnellen Transfer von DNA in diverse Zielvektoren für verschiedenste Anwendungen. Dafür muss zunächst eine mit sogenannten *attB* Sequenzen amplifizierte DNA durch eine BP-Reaktion in einen *Entry*-Vektor kloniert werden. Mittels LR-Reaktion kann diese DNA-Sequenz im Anschluss in jeden beliebigen *Destination*-Vektor für Proteinexpression oder funktionelle Studien umklont werden. Die in dieser Arbeit verwendete Gateway *Destination*-Vektoren sind in Tab. 6 aufgeführt.

Für die Amplifizierung der DNA-Sequenz mit den nötigen *attB* Sequenzen wurden genspezifische und Adapter Primer gemäß Tab. 5 benutzt. Die Klonierung per BP-Reaktion erfolgte stets nach den Angaben des Herstellers. *Entry*-Klone wurden zunächst mittels Sequenzierung auf ihre Identität überprüft. Hierfür wurden standardmäßig Gateway Sequenzierungsprimer (M13) verwandt. Die anschließende LR-Reaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) wurde zum Nachweis von transgener DNA in Plasmiden aus Bakterien mit der thermostabilen *Taq*-Polymerase durchgeführt. Die Amplifizierung von DNA-

Fragmenten zur Klonierung bzw. die Implementierung von Restriktionsschnittstellen erfolgte mit der *Pfu*-Polymerase, die eine *Proofreading*-Aktivität besitzt.

Die Reaktion erfolgte in 0,2 ml Reaktionsgefäßen im T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50 µl (Tab. 7). Das Temperaturprofil wurde den Hybridisierungstemperaturen der verwendeten Oligonukleotide und der zu erwartenden Länge des Reaktionsproduktes angepasst. Ein typisches Standardprotokoll ist in Tab. 8 angegeben. Die dNTPs wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Der Reaktionspuffer wurde nach der Zusammensetzung des *Pfu*-Puffers von Promega (Mannheim) hergestellt und für Reaktionen sowohl mit *Taq*- als auch mit *Pfu*-Polymerase verwendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes

Substanz	Konzentration bzw. Volumen
DNA	1-10 ng
10x Puffer	1x
Primer <i>forward</i>	10-25 pmol
Primer <i>reverse</i>	10-25 pmol
dNTPs	125-200 µM
DNA-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O bidest	ad 20 bzw. 50 µl

Tabelle 8: Temperaturprogramm einer Standard-PCR

Temperatur	Dauer/ Zeit
94°C (initiale Denaturierung)	3 min
94°C (Denaturierung)	30 sek
55-60°C ($T_m - 5^\circ\text{C}$, Hybridisierung)	30 sek
72°C (Polymerisation)	bestimmt durch Fragmentlänge und Polymerase (0,5-1 min/kb)
Wiederholung der Schritte 2-4, 29x	
72°C (finale Polymerisation)	10 min

2.2.1.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese diente in dieser Arbeit der Veränderung der Aminosäuresequenz eines Proteins. Es wurde das *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Mutagenesen wurden mittels Sequenzierung bestätigt.

2.2.1.12 Klonierungsstrategien

Im Folgenden sind Klonierungsstrategien für Konstrukte dargelegt, die nicht mittels Gateway hergestellt worden waren. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 5 aufgeführt.

Konstrukte für die Proteinexpression in *E. coli*

Für Expressionsversuche in *E. coli* wurden zum einen die Vektoren pET-21b und pET-30b benutzt. Die kodierende Sequenz der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4 (inkl. angrenzender hydrophober Bereiche, kodierende Sequenz: 939 bp, Aminosäuren: 130-442) wurde amplifiziert und zusätzlich mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I am 5' bzw. 3' Ende versehen. Durch Klonierung in den Vektor pET-21 wurden eine N-terminale Fusion mit einem T7-Tag und eine C-terminale Fusion mit einem 6xHis-Tag hergestellt. Die Klonierung in pET-30b führte zu einer N-terminalen Fusion mit einem 6xHis- und einem S-Tag (bindet an S-Fragment der RNase A) sowie C-terminal mit einem weiteren 6xHis-Tag. Beide N-terminalen Tags im pET-30b waren potentiell durch eine Enterokinase abspaltbar.

Darüber hinaus wurde der Vektor pMAL-c2 für Expressionsversuche in *E. coli* verwendet. Für die Klonierung der CHASE-TM Domäne wurde der entsprechende Bereich aus CRE1/AHK4 mit den Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Hind*III amplifiziert und in den Vektor ligiert. Dies resultierte in einer N-terminalen Fusion mit dem Maltose-Binde-Protein (MBP), welches durch Verdau mit FaktorXa vom fusionierten Protein abgetrennt werden konnte.

Konstrukte für die zellfreie Proteinexpression

Für die zellfreie Proteinexpression wurde die CHASE-TM Domäne (siehe Abschnitt „Konstrukte für die Proteinexpression in *E. coli*“) mit genspezifischen Primern amplifiziert, an deren 5'Enden noch Restriktionsschnittstellen für *Nde*I bzw. *Sma*I hinzugefügt worden waren. Durch Klonierung in den Vektor pIVEX2.3 MCS wurde eine C-terminale Fusion mit einem 6xHis-Tag erzeugt.

Konstrukte für die Proteinexpression in *N. benthamiana* (Magnifektion)

Die kodierenden Regionen für die CHASE-TM (siehe Abschnitt „Konstrukte für die Proteinexpression in *E. coli*“) und die lösliche CHASE Domäne (kodierende Sequenz: 810 bp; Aminosäuren 149-418) wurden mit Stop-Codon und mit den Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bam*HI am 5' bzw. 3' Ende amplifiziert. Anschließend wurden diese Sequenzen in den Tabakexpressionsvektor pICH11599 kloniert. Das Konstrukt pICH11599-CHASE F304A wurde nachträglich mittels ortsgerichteter Mutagenese der CHASE Domäne erstellt (siehe 2.2.1.11).

Konstrukte für die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Für BiFC-Analysen mit den Cytokininrezeptoren wurden die Vektoren pSPYCE-35S und pSPYNE-35S verwendet. Das genomische Fragment von AHK2 (4592 bp) wurde ohne Stop-Codon und mit Restriktionsschnittstellen für *Stu*I und *Bam*HI am 5' bzw. 3' Ende amplifiziert. Die kodierende Region für AHK3 (3108 bp, 1036 Aminosäuren) wurde ohne Stop-Codon und mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sal*I und *Sma*I amplifiziert. CRE1/AHK4 (3171 bp, 1057 Aminosäuren) wurde amplifiziert und mit Schnittstellen für *Bam*HI und *Sma*I am 5' bzw. 3' Ende versehen. Die Klonierung

in die oben genannten Vektoren führte zu einer C-terminalen Fusion mit dem jeweiligen YFP-Fragment.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Colorimetrische Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte standardmäßig mit dem Protein Assay Kit (Bio-Rad, München) nach den Angaben des Herstellers. Das Konzentrat wurde vor der Verwendung 1:5 mit H₂O verdünnt. Vor der Messung der unbekanntes Proteinprobe wurde eine Standardreihe mit BSA von 10-50 µg/ml erzeugt.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mittels der denaturierenden SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Dafür wurden standardmäßig 10%ige Acrylamidgele verwendet, die nach Tabelle 9 und 10 hergestellt wurden.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines 10% SDS-Trenngels (Σ 10 ml)

Substanz	Volumen [ml]
H ₂ O bidest	4,8
40% Acryl-Bisacrylamid	2,5
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	2,5
10% Natriumdodecylphosphat (SDS)	0,1
10% Ammoniumpersulfat	0,1
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,004

Tabelle 10: Zusammensetzung eines 10% SDS-Sammelgels (Σ 5ml)

Substanz	Volumen [ml]
H ₂ O bidest	3,64
40% Acryl-Bisacrylamid	0,625
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,63
10% Natriumdodecylphosphat (SDS)	0,05
10% Ammoniumpersulfat	0,05
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,005

Die zu analysierende Probe wurde vor dem Gellauf mit 5x konzentriertem SDS-Probenpuffer (0,225 M Tris-HCl, pH 6,8; 50% Glycerol; 10% SDS; 0,05% Bromphenolblau; 0,25 M DTT oder 25% β -Mercaptoethanol) versehen und 5 min bei 95°C aufgekocht (Laemmli, 1970). Der 10x konzentrierte Laufpuffer für die Elektrophorese hatte folgende Zusammensetzung: 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1%

SDS) (Laemmli, 1970). Als Größenstandard wurden 5 µl *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) parallel mit aufgetragen. Für die anschließende Detektion der Proteine, wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung (0,1% Coomassie R250; 40% Methanol; 10% Eisessig) mindestens 30 min geschüttelt. Entfärbt wurde das Gel mit einem Methanol/Essigsäure-Gemisch (40% / 7%), welches mehrfach gewechselt wurde (Schrumpf, 2002).

2.2.2.3 Western Blot und Immunodetektion

Zuvor mittels SDS-PAGE getrennte Proteingemische wurden im Tankblotverfahren auf PVDF-Membranen (Bio-Rad, München) übertragen (Gültekin und Heermann, 1988). Als Transferpuffer wurde standardmäßig Towbin-Puffer (0,25 M Tris; 1,92 M Glycin) verwendet (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt (30 V, 90 mA).

Die geblottete Membran wurde zunächst 3x 5 min mit *Tris-buffered saline* mit Tween (TBS-T; 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH 7,5 mit HCl) und anschließend 1x 5 min mit TBS gewaschen. Die Membran wurde danach für 1 h bei RT mit TBS (+ 5% Magermilchpulver) geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blockpuffer) erfolgte 3 h bei RT. Meerrettich-Peroxidase-(HRP-)gekoppelter sekundärer Antikörper (1 h bei RT) und *Enhanced Chemoluminescent* (ECL) Reagenz (Pierce/Fisher Scientific, Schwerte) wurden zur Detektion benutzt. Nach jeder Inkubation mit Antikörper wurde zudem der Blot wie oben bereits beschrieben gründlich gewaschen. Die erforderliche Verdünnung des primären bzw. sekundären Antikörpers wurde zuvor empirisch bestimmt. Das ECL Reagenz wurde nach dem Protokoll des Herstellers angewandt (Schrumpf, 2002).

2.2.2.4 Proteinexpression in *E. coli*

Expressionsversuche in *E. coli* wurden mit den Stämmen BL21, BL21 Star und Rosetta 2 (siehe Tab. 3) vorgenommen. Für Expressionsversuche im analytischen Maßstab wurden 5 ml LB Medium (inkl. Selektionsmarker) mit einem Einzelklon von einer LB-Selektionsplatte angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wachsen gelassen. Danach erfolgte die Induktion der Expression mit IPTG in verschiedenen Konzentrationen (0,01; 0,1; 1 bzw. 100 mM) bei RT, 30 oder 37°C. Nach 4 bis 24 h Stunden Induktion wurden 1 ml der Zellen abzentrifugiert, das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgekocht (siehe 2.2.2.2) und mittels SDS-PAGE analysiert. Expressionsversuche im präparativen Maßstab fanden in 100 bis 200 ml LB-Medium statt, welches mit 1 bzw. 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft wurde.

Für Cytokinin-Bindungsassays mit *E. coli*-Zellen wurde die Expression in 5 ml M9 Medium (+ 0,1% Casaminoäuren; 0,025 mM IPTG) für 2 Tage bei 22°C durchgeführt.

2.2.2.5 Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana* (Magnifektion)

Für die systemische Expression heterologer Gene in der Pflanzenspezies *N. benthamiana* wurde die „Magnifektion“ angewandt. Dieses Proteinexpressionssystem wurde von ICON Genetics (Halle) zur Expression löslicher therapeutischer Proteine entwickelt und erstmals von Marillonnet *et al.* (2004) beschrieben. Prinzipiell können heterologe Gene in der Pflanze auf zwei Wegen exprimiert werden, entweder durch Generierung einer transgenen Pflanze oder durch transiente Expression, d. h. durch *Agrobacterium*-vermittelte oder von viralen Vektoren vermittelte Expression. Die transiente Expression bietet potentiell die Möglichkeit große Proteinmengen in einem Zeitraum von etwa zwei Wochen zu exprimieren.

Bei der „Magnifektion“ werden, um ein fremdes Gen in die Pflanze einzubringen, anstatt eines funktionsfähigen Virus zwei sogenannte virale Provektormodule (5' und 3') mittels *Agrobacterien* in die Pflanze transformiert. Das zu exprimierende Gen wird zuvor in das 3' Modul kloniert. Im Kern der Pflanzenzelle rekombinieren beide Module zu einem funktionellen viralen Vektor, der im Anschluss wie ein normales RNA-Molekül prozessiert, repliziert und translatiert wird (Abb. 5).

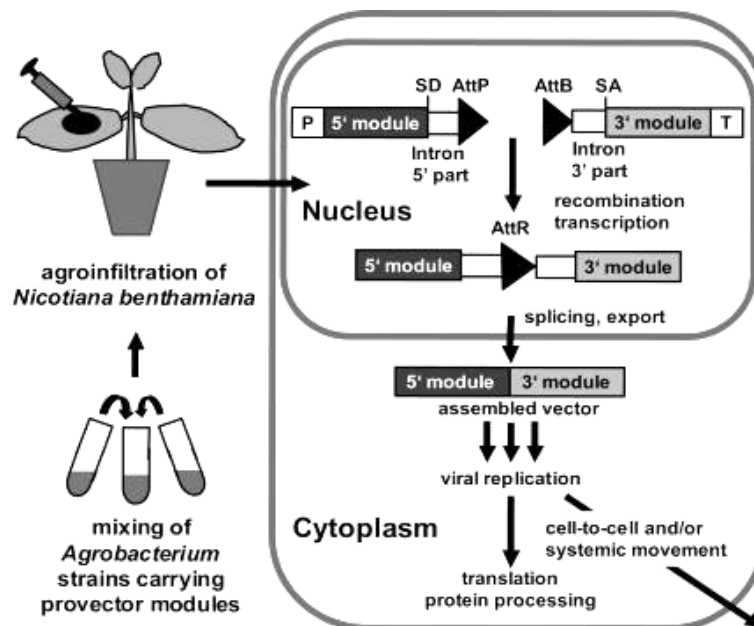


Abbildung 5: Schema zur in planta Rekombination viraler Provektormodule für die Expression heterologer Gene in *N. benthamiana* (aus Marillonnet *et al.*, 2004). Weitere Beschreibung siehe obigen Text.

Vor der Infiltration der Tabakpflanze wurden jeweils 5 ml LB-Medium (+ Carbenicillin) mit dem 5' Provektormodul (pICH17388), dem 3' Provektormodul (pICH11599 inkl. zu exprimierendem Gen) und einem Integrasemodul (pICH14011) angeimpft und über Nacht bei 28°C wachsen gelassen. Die Kulturen wurden 10 min bei 4.500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Resuspendierung in jeweils 10

ml Infiltrationspuffer (10 mM MES-NaOH, pH 5,5; 10 mM MgSO₄) wurden gleiche Volumina aller drei Kulturen gemischt. Für die Infiltration wurden 5 Wochen alte Tabakpflanzen verwendet. Die Blattunterseite des vierten bis sechsten Blattes wurde mit einem Skalpell angeritzt und die Kultur eingespritzt. Für eine Analyse der Proteinexpression mittels SDS-PAGE wurden Blattscheiden an bestimmten Zeitpunkten ausgestanzt, zerschreddert und in 5x SDS-Probenpuffer (siehe 2.2.2.2) aufgekocht. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

2.2.2.6 Zellfreie Proteinexpression mit *E. coli* S30 Extrakt

Die zellfreie Proteinexpression hat sich als attraktive Alternative zu zellbasierten Systemen in der Proteomik und für den Hochdurchsatz für die Expression löslicher globulärer Proteine in großen Mengen und in funktioneller Konformation etabliert (Yokoyama, 2003). Durch die Verwendung zellfreier Systeme, die auf einem kontinuierlichen Austausch zwischen einer semipermeablen Membran basieren (Abb. 6), konnte die Proteinausbeute auf bis zu 9 mg/ml Reaktionsvolumen gesteigert werden (Endo und Sawasaki, 2006).

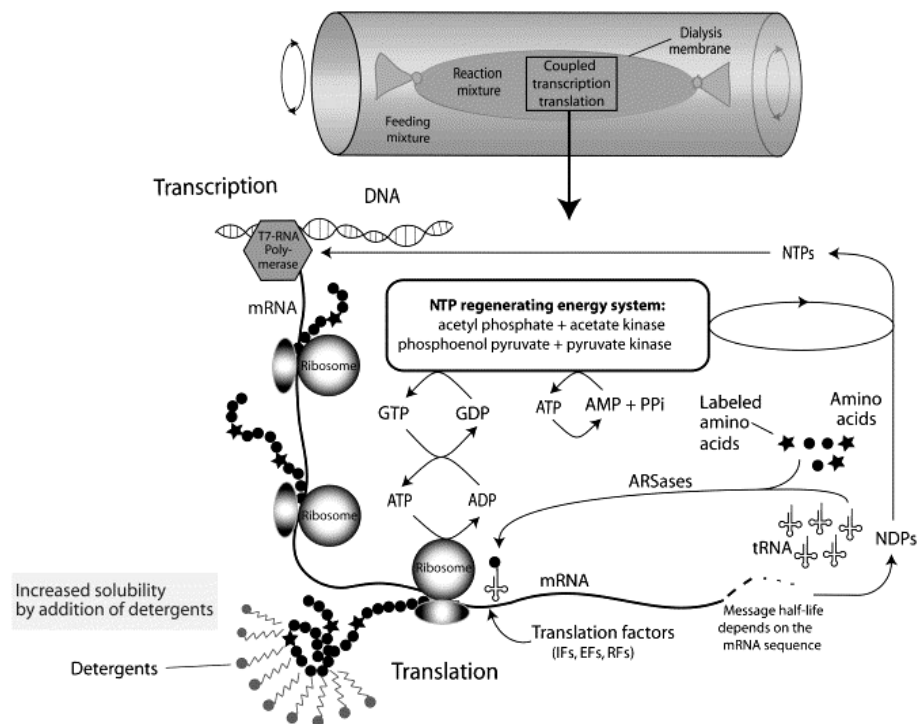


Abbildung 6: Schematische Darstellung der gekoppelten *in vitro* Transkription/ Translation in einem auf kontinuierlichem Austausch basierenden zellfreien Expressionssystem (CECF) (aus Schwarz *et al.*, 2007a).

Aufgrund der enormen Bedeutung von Membranproteinen in allen lebenden Organismen und der Tatsache, dass etwa 30% aller Gene in fast allen sequenzierten Genomen für Membranproteine

kodieren macht diese Proteine außerordentlich interessant (Kaiser *et al.*, 2008). Das Verständnis über die 3D-Struktur und Funktion von Membranproteinen ist hingegen immer noch sehr limitiert. Zum aktuellen Zeitpunkt (November 2009) sind unter >56.000 bekannten Strukturen in der *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>) nur 207 einzigartige Strukturen membranständiger Proteine enthalten (<http://blanco.biomol.uci.edu/>). Die geringe Anzahl an 3D-Strukturen von Membranproteinen liegt vor allem in der allgemeinen Problematik bei der Expression und Reinigung funktioneller Proteine begründet. Durch Verwendung eines zellfreien Expressionssystems können z. B. toxische Nebeneffekte, wie sie aus zellbasierten System bekannt sind, umgangen werden und damit die Expression des gewünschten Membranproteins gesteigert werden. Darüber hinaus handelt es sich um ein „offenes System“ und ermöglicht durch Zugabe eines geeigneten Detergenzes die Expression eines Membranproteins direkt in Lösung (Klammt *et al.*, 2005). Sogar ansonsten schwierig zu exprimierende Membranproteine wie z. B. humane G-Protein gekoppelte Rezeptoren können mittels dieser Technik im präparativen Maßstab exprimiert werden (Klammt *et al.*, 2007; Kaiser *et al.*, 2008).

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete zellfreie Expressionssystem basiert auf einem kontinuierlichen Austausch von Substratmolekülen und Endprodukten zwischen einer semipermeablen Membran und nutzt einen bakteriellen S30-Extrakt, der noch die komplette Transkriptions- und Translationsmaschinerie enthält (Abb. 6) (Klammt *et al.*, 2004).

In Tab. 11 sind alle für die zellfreie Expression benötigten Stammlösungen beschrieben. Nur bei kritischen Komponenten ist die Herstellerfirma, von der die Substanz bezogen wurde, angegeben.

Tabelle 11: Stammlösungen für die zellfreie Proteinexpression

Substanz	Stocklösung [x]	Einheit	MW	Einwaage [g]	Volumen [ml]	Bemerkungen	Lagerung
tRNA <i>E. coli</i> (Roche, Mannheim)	40	mg/ml	-----	0,046	1,15	-----	-20°C
Acetylphosphat (SIGMA, München)	1000	mM	184,1	0,3682	2	auf pH 7 eingestellt mit 20 µl 10 M KOH	-20°C
Phosphoenolpyruvat (Roche)	1000	mM	206,1	0,4122	2	auf pH 7 eingestellt mit 470 µl 10 M KOH	-20°C
Pyruvat-Kinase (Roche)	10	mg/ml	-----	-----	-----	-----	4°C
ATP (Roche)	360	mM	605,2	0,4357	2	auf pH 7 eingestellt mit 233 µl 5 M NaOH	-20°C
GTP (Roche)	240	mM	567,1	0,2722	2	auf pH 7 eingestellt mit 72 µl 5 M NaOH	-20°C
CTP (Roche)	240	mM	527,1	0,2530	2	auf pH 7	-20°C

						eingestellt mit 144 µl 5 M NaOH	
UTP (Roche)	240	mM	550,1	0,2640	2	auf pH 7 eingestellt mit 66 µl 5 M NaOH	-20°C
→ NTP-Mix	75	fach	-----	-----	8	gleiches Volumen je Stammlösung	-20°C
Folsäure (SIGMA)	10	mg/ml	511,5	0,010	1	=19,6 mM	-20°C
Dithiothreitol (DTT)	500	mM	154,2	0,154	2	-----	-20°C
HEPES KOH (SIGMA)	2500	mM	238,3	28,596	48	auf pH 8 eingestellt mit 6480 µl 10 M KOH	4°C
Ethylendiamintetra- essigsäure (EDTA)	500	mM	292,3	0,1461	1	-----	RT
HEPES/ EDTA	24	fach	-----	-----	-----	24 Vol. HEPES + 1 Vol. EDTA	4°C
Mg(oAc) ₂ (SIGMA)	1000	mM	214,4	3,216	15	-----	4°C
Kaliumacetat (SIGMA)	8000	mM	98,13	39,252	50	-----	4°C
PEG 8000 (SIGMA)	40	%	-----	40	50	-----	4°C
NaN ₃	20	%	65,01	0,200	1	-----	-20°C
Complete Protease Inhibitor (Roche)	50	fach	-----	1 Tablette	0,2	-----	-20°C
Brij 58 (SIGMA)	18	%	-----	9	50	-----	-20°C
Aminosäuren (AS) (SIGMA)							
Alanin (A)	100	mM	89,09	0,1336	15	-----	-20°C
Arginin	100	mM	210,7	0,3161	15	-----	-20°C
Asparagin (N)	100	mM	132,1	0,1982	15	-----	-20°C
Aspartat (D)	100	mM	133,1	0,1997	15	+ 40 µl 10 M KOH	-20°C
Cystein (C)	100	mM	121,2	0,1818	15	-----	-20°C
Glutamat (E)	100	mM	147,1	0,2207	15	+ 60 µl 10 M KOH	-20°C
Glutamin (Q)	100	mM	146,1	0,2192	15	-----	-20°C
Glycin (G)	100	mM	75,07	0,1126	15	-----	-20°C
Histidin (H)	100	mM	209,6	0,3144	15	-----	-20°C
Isoleucin (I)	100	mM	131,2	0,1968	15	-----	-20°C
Leucin (L)	100	mM	131,2	0,1968	15	-----	-20°C
Lysin (K)	100	mM	182,6	0,2739	15	-----	-20°C
Methionin (M)	100	mM	149,2	0,2238	15	-----	-20°C
Phenylalanin (F)	100	mM	195,2	0,2928	15	-----	-20°C
Prolin (P)	100	mM	115,1	0,1727	15	-----	-20°C
Serin (S)	100	mM	105,1	0,1577	15	-----	-20°C
Threonin (T)	100	mM	119,1	0,1787	15	-----	-20°C
Tryptophan (W)	100	mM	204,2	0,3063	15	-----	-20°C
Tyrosin (Y)	20	mM	181,2	0,1812	50	-----	-20°C
Valin (V)	100	mM	117,1	0,1757	15	-----	-20°C
Aminosäure- Stammlösung	4	mM	-----	-----	50	2 ml jeder AS + 10 ml Tyrosin, ad 50 ml mit H ₂ O	-20°C
Stammlösung bestehend aus den ASRCWMDE	16,7	mM	-----	-----	24	4 ml der jeweiligen AS	-20°C

Für die Herstellung des benötigten *E. coli* S30-Extraktes wurde der Stamm Rosetta 2 benutzt (siehe Tab. 3). Die Präparation des Extraktes erfolgte nach (Schwarz *et al.*, 2007b). Die Herstellung der T7 RNA Polymerase wurde nach einem modifizierten Protokoll von Li *et al.* (1999) durchgeführt.

Ein detailliertes Protokoll für die Durchführung der Proteinexpression inklusive eines Pipettierschemas findet sich bei Schwarz *et al.* (2007b). Reaktionen im analytischen Maßstab (70 µl) wurden entweder in *Spectra/Por Micro DispoDialyzer* (*Molecular Weight Cut Off* (MWCO) 15 kDa; Spectrum Labs Europe, Niederlande) oder in *Slide-A-LyzerMini Dialysis Units* (MWCO 10 kDa; Pierce/ Fisher Scientific, Schwerte) durchgeführt. Expressionsansätze im präparativen Maßstab (1 ml) wurden in *Spectra/Por DispoDialyzer* (MWCO 15 kDa) vorgenommen. Die Expressionsansätze wurde entweder in einem bewegten Wasserbad (analytische Ansätze) oder auf einem Taumelrollenmischer (präparative Ansätze) für 16-18 h bei 30°C inkubiert.

2.2.2.7 Reinigung und Rückfaltung der löslichen CHASE Domäne aus inclusion bodies aus *E. coli*

Die Proteinexpression der CHASE-Domäne (im pDEST17 Vektor) im *E. coli* Stamm BL21 wurde vor der Reinigung und Rückfaltung in 2x 100 ml LB-Medium für 24 h bei 30°C durchgeführt (zuvor Induktion mit 0,1 mM IPTG bei OD₆₀₀ = 0,5). Das Zellpellet wurde zunächst in Lysepuffer I (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl) (3 ml/ g Frischgewicht) resuspendiert. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (4 µl von 0,1 M je g Frischgewicht) und frisch hergestelltes Lysozym (80 µl von 10 mg/ml je g Frischgewicht) wurden der Zellsuspension hinzugegeben. Nach Rühren der Suspension auf Eis für 20 min wurde Deoxycholat (4 mg je g Frischgewicht) hinzugefügt und für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Nach weiterer Zugabe von DNase I (20 µl von 1 mg/ml je g Frischgewicht) und 3 mM MgSO₄ wurde der Ansatz bei RT inkubiert, bis er nicht mehr viskos war. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13.200 rpm und 4°C. Das gebildete Pellet (*inclusion bodies*) wurde in 9 Vol. Lysepuffer II (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl, 0,5% (v/v) Triton X-100) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurde erneut zentrifugiert und das Pellet wiederum in Puffer II aufgenommen. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Abschließend wurde das Pellet in Bindepuffer (BP) (6 M GuHCl, 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol, 1 mM β-Mercaptoethanol; pH 8,0) für 1 h bei RT gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) wurde der Überstand für die nachfolgende Rückfaltung auf der Säule abgenommen.

Die Rückfaltung der CHASE Domäne erfolgte an einem FPLC-Gerät (*Fast Protein Liquid Chromatography*) (ÄKTA Prime™, GE Healthcare, Freiburg) durch gleichzeitige affinitätschromatographische Reinigung und Rückfaltung durch intensives Auswaschen des denaturierenden Agens. Als Bindematrix wurde eine Ni-Sepharose-Säule (HisTrap™ HP, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Neben dem bereits erwähnten Bindepuffer wurden ein Solubilisierungspuffer (SP) (6 M

Urea, 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol, 1 mM β -Mercaptoethanol; pH 8,0), ein Rückfaltungspuffer (RP) (Bindepuffer ohne 6 M GuHCl) und ein Elutionspuffer (EP) (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,5 M Imidazol, 1 mM β -Mercaptoethanol; pH 8,0) benutzt. Nach Bindung des denaturierten Proteingemisches für 10 Säulenvolumen (*Column volume*, CV) mit BP und Waschen mit SP für 10 CV wurde 80 CV intensiv mit RP gewaschen. Die Elution der renaturierten CHASE Domäne erfolgte für 40 CV mit EP. Die Flussrate betrug während des gesamten Laufes 1 ml/min. 10 μ l der Fraktionen wurden anschließend auf einem SDS-Gel analysiert.

2.2.2.8 Chromatographische Reinigung nativer Proteine

Die Reinigung von His-getaggten Proteinen erfolgte an einem FPLC-Gerät (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg). Als Säulenmaterial wurden je nach Probenmenge 1 oder 5 ml Ni-Sepharose-Säulen (HisTrap™ HP, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Das zu reinigende Proteingemisch aus der zellfreien Expression wurde zunächst 1:1 mit Bindepuffer (20 mM Na-Phosphat; 0,5 M NaCl; 5 mM Imidazol; pH 7,8) verdünnt und an die äquilibrierte Säule gebunden. Danach folgten Waschschrte mit steigender Imidazolkonzentration an, um zunächst unspezifisch an die Säule gebundene Proteine herunterzuwaschen. Die Länge des Waschens und die Imidazolkonzentration wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. In der Regel wurde bei jeder Imidazolkonzentration (0, 25, 50, 100, 250 und 500 mM) für 10 CV gewaschen. Das gewünschte Protein wurde über einen Stufengradienten mit Elutionspuffer (20 mM Na-Phosphat; 0,5 M NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7,8) zu 1-2 ml Fraktionen eluiert. Die Elution z. B. der CHASE-TM Domäne erfolgte spezifisch bei 250 mM. Für die Reinigung hydrophober Proteine (z. B. CHASE-TM Domäne) wurden alle Puffer noch zusätzlich mit Detergenz (0,5% Brij58 bzw. 0,02% β -DDM) versetzt. Die Flussrate betrug stets zwischen 1 und 2 ml/min. 10-20 μ l der gewünschten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Für Gelfiltrationen wurde eine Dextran-Agarose-Säule (HiLoad™ 16/60 Superdex 200, GE Healthcare, Freiburg) und für Entsalzungen eine Sephadex-Säule (HiPrep™ 26/10 Desalting, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Der Puffer und das jeweilige Programm wurden entsprechend der nachfolgenden Verwendung des Proteins angepasst.

2.2.2.9 In vivo Cytokininbindungsassay mit Bakterienzellen

Zur Untersuchung der Cytokinin-Bindungseigenschaften der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 bzw. diverser CHASE-Mutanten wurde ein *in vivo* Bindungsassay mit Bakterienzellen und *trans*-[2-³H]Zeatin durchgeführt. Zuvor wurden die zu untersuchenden Proteine wie in 2.2.2.4 beschrieben in *E. coli* exprimiert. Ein detailliertes Protokoll zur Durchführung dieses Assays ist bei Romanov und Lomin (2009) beschrieben.

2.2.2.10 In vitro Cytokininbindungsassay mit Filtermembranen

Die Bindungsaktivität der gereinigten CHASE-TM Domäne wurde in einem Filtrationsassay (*Slide-A-LyzerMini Dialysis Units*; MWCO 10 kDa; Pierce/ Fisher Scientific, Schwerte) untersucht. Hierzu wurde zum gereinigten Protein (CHASE-TM Domäne) *trans*-[2-³H]Zeatin in etwa 10x molarem Überschuss hinzugegeben und der Ansatz auf 100 µl mit Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 mM DTT; 0,1% LPPG (1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]) aufgefüllt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des Proteins wurde in einem zweiten Ansatz zusätzlich nicht radioaktiv markiertes *trans*-Zeatin in 5000x molarem Überschuss hinzupipettiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde für 7 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert. Durch anschließendes Waschen der Membran mit Puffer konnte unspezifisch gebundener Ligand ausgewaschen werden. Die Proteine (mit gebundenem Liganden) wurden danach mit 100% Ethanol von der Membran eluiert und das Eluat in Szintillationsgefäße überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (ACS-II Scintillation liquid; Amersham Biosciences, UK) wurden die cpm (*counts per minute*) in jedem Gefäß für 10 min gemessen. Die spezifische Bindungsaktivität des jeweiligen Proteins konnte aus der Differenz von gesamter und unspezifischer Bindung ermittelt werden.

Als Negativkontrollen für den Bindungsassay wurden die lösliche CHASE Domäne und die CHASE-TM Domäne im zellfreien System als Präzipitate expremiert und diese mit 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 mM DTT; 1% LPPG etwa 10 min bei 40°C resolubilisiert. Aufgrund des hohen Reinheitsgrades der resolubilisierten Proteine war eine weitere Reinigung nicht erforderlich.

2.2.3 Biophysikalische Methoden

2.2.3.1 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Zur eindeutigen Identifizierung der zuvor gereinigten CHASE-TM Domäne wurden Banden aus einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und die aus dem Gel eluierten Proteine einer massenspektroskopischen Analyse unterzogen. Die Elution der Proteine aus dem Gel fand nach folgendem Protokoll statt (erhalten von Chris Weise, Freie Universität Berlin, Institut für Biochemie).

Zunächst wurden die zu analysierenden Banden aus dem Gel herausgeschnitten und jeweils in kleine Stücke zerschnitten. Nach Zugabe von 20 µl eines Acetonitril:100 mM NH₄HCO₃ (1:1) Gemisches zu den Gelstücken wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (in einem 500 µl Reaktionsgefäß). Der Überstand wurde abgenommen und durch 20 µl Acetonitril ersetzt und die Proben inkubiert, bis die Gelstücke milchig weiß geworden waren (ca. 5 min). Anschließend wurden die Gelstücke lyophilisiert (ca. 10 min) und in einem Reduktionsschritt mit 20 µl 100 mM DTT (frisch hergestellt) in 100 mM NH₄HCO₃ für 30 min bei 56°C die Disulfidbrücken geöffnet. Nach kurzer Zentrifugation der Proben

wurde das Volumen des Überstandes genau bestimmt und notiert. Es erfolgte eine Zugabe von 20 μl Acetonitril zu den Gelstücken. Nachdem diese wiederum milchig weiß geworden waren und der Überstand abgenommen wurde, wurden 20 μl 55 mM Iodacetamid (frisch hergestellt) in 100 mM NH_4HCO_3 zu den Gelstücken pipettiert und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. In diesem Schritt wurden die Cysteine durch kovalente Reaktion so modifiziert, dass keine Rückbildung von Disulfidbrücken stattfinden konnte. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Gelstücke in 20 μl 100 mM NH_4HCO_3 für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte erneut eine Inkubation in 20 μl Acetonitril für 5 min. Der Überstand wurde danach vollständig abgenommen und der Vorgang wiederholt. Es folgte eine Lyophilisierung der Gelstücke für ca. 10 min. Zu einem frisch aufgetauten Trypsin-Aliquot (1 mg/ml Trypsin *sequencing grade* in 1 mM HCl; SIGMA, München) wurden 400 μl kaltes 25 mM NH_4HCO_3 (frisch verdünnt) zugegeben, gevortext und die fertige Trypsinlösung (12,5 ng/ μl finale Konz.) auf Eis gelagert. Zu den Gelstücken wurde entsprechend dem zuvor bestimmten Überstand soviel Trypsinlösung zupipettiert, dass ein Überstand von 2-3 μl vorhanden war ($V_{\text{Trypsinlösung}} = 20 \mu\text{l} - \text{Überstand} + 3 \mu\text{l}$). Der Verdau wurde zunächst für 30 min auf Eis stehen gelassen und danach über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde kurz zentrifugiert und der Verdauüberstand abgenommen.

Die anschließende MALDI-MS Messung der verdauten Proben inkl. Datenbankabgleich wurde von Chris Weise (Freie Universität Berlin, Institut für Biochemie) vorgenommen.

2.2.3.2 CD-Spektroskopie (Circulardichroismus)

Der Circulardichroismus nutzt die Wechselwirkung optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht und hat sich zu einer Standardmethode für die Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen etabliert.

In optisch aktiven Strukturen ist die Geschwindigkeit für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich groß. Dies ist auf den unterschiedlichen Brechungsindex beider Lichtkomponenten zurückzuführen. Bei der CD-Spektroskopie wird für die Messung zudem die unterschiedliche Absorption des links- und rechts-zirkular polarisierten Lichtes aufgrund von Differenzen bei den Extinktionskoeffizienten (ϵ_L und ϵ_R) beider Lichtanteile ausgenutzt. Die Differenz $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ wird gemessen und als Elliptizität Θ angegeben:

$$\Theta(\lambda) = \text{const.} (\epsilon_L - \epsilon_R) \times c \times d$$

Dabei stellt d die Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der Probe dar. Im CD-Spektrum wird die Elliptizität Θ in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ dargestellt. Da die beiden Absorptionskoeffizienten sich nur sehr gering unterscheiden (10^{-3} oder weniger) erfordert die CD-Messung eine hochpräzise Technik. Dabei wird zunächst monochromatisches Licht (Licht einer

Wellenlänge) erzeugt und linear polarisiert. Durch einen Modulator wird dann die Polarisationssebene soweit moduliert, dass durch den Einfluss eines hochfrequenten elektrischen Wechselfeldes alternierend eine links- und eine rechts-zirkular polarisierte Welle entsteht. Ein synchron dazu geschalteter Detektor misst alternierend dazu I_L und I_R . Aus diesen Werten kann das Spektrometer die Elliptizität berechnen und erzeugt durch Veränderung der Wellenlänge ein CD-Spektrum (Lottspeich und Engels, 2006).

Für die Analyse der Sekundärstruktur eines Proteins wird vor allem der Spektralbereich von 180 – 250 nm untersucht. Dieser Bereich wird auch Fern-UV genannt, und hier liegen die $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Peptidbindung. Als Resultat ergeben sich für α -helikale und β -faltblattartige Proteine charakteristische Bandenmuster. Während α -helikale Proteine negative Banden bei 222 und 208 nm und eine positive Bande bei 193 nm aufweisen, zeigen Proteine mit antiparallelen β -Faltblättern negative Banden bei 218 nm und positive Banden bei 195 nm. Ungeordnete Proteine haben eine geringe Elliptizität oberhalb von 210 nm und negative Banden bei 195 nm (Greenfield, 2006).

Alle Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an einem J-700 CD-Spektropolarimeter (Jasco, Gross-Umstadt) aufgezeichnet. Als Wellenlängenbereich wurde 200-260 nm gewählt. Die Spektren wurden bei 20°C in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm aufgenommen. Als Puffer für die Messungen wurde 20 mM Na-Phosphat, pH 7,4; 0,15 M NaCl; 0,015% β -DDM verwendet. Vom Puffer wurde zunächst ein CD-Spektrum dreimal aufgenommen und gemittelt. Von allen nachfolgenden Spektren mit Protein (ebenso dreimal gemessen) wurde das Pufferspektrum abgezogen. Die zu messende Proteinprobe wurde vor der Messung auf eine Konzentration von 6 μ M mit Puffer eingestellt. Die Zugabe von Liganden (Adenin, *trans*-Zeatin, *cis*-Zeatin) erfolgte in 10x molarem Überschuss. Die Rohdaten wurden anschließend in Elliptizität Θ umgerechnet und gegen die Wellenlänge λ graphisch aufgetragen. Die prozentualen Anteile von α -Helix, β -Faltblatt, *Turn* und *Random* wurden mit der dem Spektrometer beiliegenden Software *Secondary Structure Estimation* ermittelt.

2.2.3.3 Kernmagnetresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die NMR-Spektroskopie ist neben der Röntgenstrukturanalyse die einzige Methode, die eine Strukturaufklärung von Biomakromolekülen wie z. B. Proteinen auf atomarem Niveau ermöglicht. Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments μ eines Atomkerns mit einem homogenen Magnetfeld (Lottspeich und Engels, 2006). Dieses magnetische Moment liegt in dem quantenmechanischen Spin eines Atomkerns begründet, der sich aus der Summe der Spins von Protonen und Neutronen (beide jeweils Spin $1/2$) eines Kerns ergibt. Der Wasserstoffkern ^1H z. B. besteht nur aus einem Proton und besitzt einen Spin von $1/2$, während das Kernisotop ^{12}C z. B. einen Gesamtspin von 0 hat und damit der NMR-Spektroskopie nicht zugänglich

ist. Neben der Spinquantenzahl I , die das magnetische Moment eines Kerns beschreibt und damit die Art des Magnetfeldes, ist das gyromagnetische Verhältnis γ als charakteristische Konstante für jede Kernsorte entscheidend für das NMR Experiment, da es die Empfindlichkeit bestimmt. Das große gyromagnetische Verhältnis des Protons ^1H sowie dessen hohe natürliche Häufigkeit machen dieses Isotop zu einem idealen Kern für die NMR-Spektroskopie. Die Applikation eines äußeren homogenen Magnetfeldes resultiert in der Aufspaltung der Energieniveaus des betrachteten Kerns. Für den ^1H Kern ergeben sich zwei mögliche Zustände aufgrund der Einstellung des Spins: parallel oder antiparallel zum angelegten Magnetfeld. Die Energie E dieser beiden Energieniveaus ist abhängig vom magnetischen Moment μ und der Feldstärke B_0 des äußeren Magnetfeldes. Das magnetische Moment des Kerns rotiert in einer sogenannten Präzessionsbewegung um die Richtung des Magnetfeldes B_0 , dessen Frequenz als Larmor-Frequenz ω_0 bezeichnet wird. Dies ist die Resonanzfrequenz des Kerns und die Übergangsfrequenz der Energieniveaus. Die Larmor-Frequenz ist kern- und magnetfeldabhängig. Bei einer Feldstärke von z. B. 14,1 T (Tesla) beträgt ω_0 für ein Proton ca. 600 MHz.

NMR Daten wurden an einem Bruker 600 MHz und 900 MHz Spektrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe) am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP, Berlin Buch) in der Arbeitsgruppe von Prof. Reif aufgenommen. Die gemessene Probe (gereinigte CHASE-TM Domäne) hatte eine Konzentration von 100 μM in 20 mM Na-Phosphat, pH 7,4; 0,15 M NaCl; 0,015% β -DDM. Vor der Messung wurde dem Protein noch 10% D_2O (*lock signal*) zugefügt. Dieses dient letztendlich dazu, das Magnetfeld möglichst konstant zu halten. Es wurden ^1H Spektren mit 16.000 Scans mit einer Aquisitionszeit von 300 ms bei 300 Kelvin aufgenommen. Das spektrale Fenster betrug 10.000 Hz. Die Daten wurden mit einer Sine-Bell-Funktion prozessiert, die in F1 Dimension mit einem *Spinning Side Band* (SSB) Bereich von 2,0 angewandt wurde, um das spektrale Rauschen zu verringern. Zusätzlich wurde eine QFIL-Funktion (*Water Deconvolution*) benutzt, um das H_2O Signal zu unterdrücken und eine Basislinienkorrektur durchzuführen. Eine Erhöhung der spektralen Auflösung wurde durch die Erhöhung der Stützstellenzahl N durch das Anhängen von Nullen an das Zeitsignal erreicht (*zero-filling*). Es ergaben sich dabei 128.000 (t1) Datenpunkte. Alle Arbeiten zur Datenbearbeitung wurden mit der Software Topspin (Bruker Biospin, Karlsruhe) vorgenommen.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

Alle fluoreszenzmikroskopischen Analysen mit Tabakepidermiszellen wurden an einem konfokalen Leica DMI 6000 CS Inversmikroskop mit einer Leica TCS SP5 Laser Scan Einheit vorgenommen (Leica, Solms), während für *Arabidopsis* Protoplasten ein Leica DM IRB Inversmikroskop mit einer Leica TCS SP2 Laser Scan Einheit verwendet worden war (MPIMP Potsdam-Golm). Für die Aufnahme und Bearbeitung von Bildern wurde das zum Mikroskop zugehörige Programmpaket (Leica Application Suite) benutzt.

2.2.4.1 Subzelluläre Lokalisation mittels Green Fluorescent Protein (GFP)-Fusionsproteinen

Die subzelluläre Lokalisation der Cytokininrezeptoren erfolgte nach transienter Expression von C- bzw. N-terminalen GFP-Fusionen zum einen in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten (2.2.1.3) zum anderen in Epidermiszellen von *N. benthamiana* (2.2.1.4).

Die Anregung des Fluorophors GFP fand mit dem Argon-Laser bei 488 nm statt. Die Emission wurde bei 509 nm gemessen. Mit mCherry getaggte Markerproteine für Kollokalisationsstudien wurden bei 587 nm angeregt und die Emission bei 610 nm gemessen.

2.2.4.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation ist eine nicht-invasive fluoreszenzbasierte Methode für die Detektion von Protein-Protein Interaktionen in lebenden Zellen. Sie kann darüber hinaus auch für die subzelluläre Lokalisation interagierender Proteine genutzt werden.

BiFC basiert auf der Rekonstituierung nicht-fluoreszierender N- und C-terminaler Subfragmente des gelb-fluoreszierenden YFP (*yellow fluorescent protein*) (oder anderer GFP-Varianten) zu einem funktionellen Fluorophor, wenn die Fragmente in engen Kontakt kommen. Voraussetzung für eine Rekonstitution des Fluorophors ist jedoch, dass die Fragmente jeweils an Proteindomänen (A und B in Abb. 7) fusioniert sind, die durch ihre Interaktion den engen Kontakt der YFP-Subfragmente ermöglichen (Kerppola, 2006). Die Vorteile dieser Technik liegen vor allem in der hohen Sensitivität (auch schwache Interaktionen sind aufgrund hoher Stabilität des YFP-Komplexes nachweisbar) und im schwachen Hintergrundsignal, da sich ein fluoreszierendes YFP Molekül nur nach Interaktion der beiden fusionierten Proteine bilden kann.

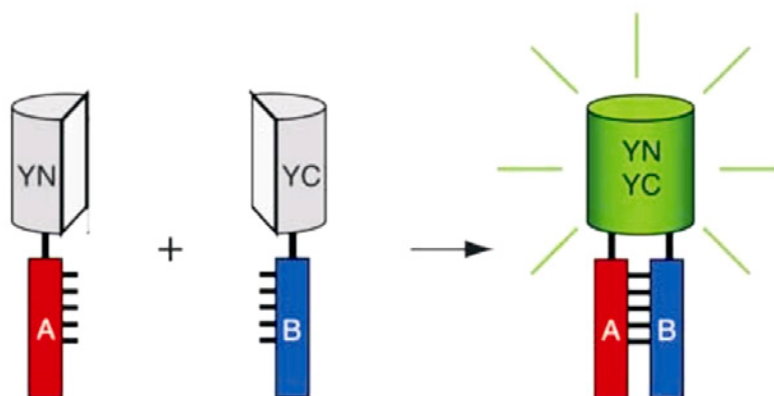


Abbildung 7: Prinzip der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation. Um die Interaktion zweier Proteine A und B zu untersuchen, wird an beide jeweils ein nicht-fluoreszierendes Fragment des YFP fusioniert (YN und YC). Nach Interaktion von A und B kommt es zu einer Rekonstitution der beiden YFP-Fragmente zu einem funktionellen fluoreszierenden YFP (Kerppola, 2006).

BiFC Experimente wurden mit Epidermiszellen von *N. benthamiana* durchgeführt, die zuvor mit Agrobakterien transformiert worden waren (2.2.1.4). Nach etwa drei bis fünf Tagen wurden die transformierten Blätter auf YFP-Fluoreszenz untersucht. Die Anregung der Fluoreszenz fand bei 514 nm statt, die Emission wurde bei 527 nm gemessen.

2.2.5 Programme und Datenbanken zur *in silico* Analyse

Die Analyse und Bearbeitung von Sequenzdaten erfolgte mit dem Programmpaket Vector NTI Advance 9.0 (Invitrogen, Karlsruhe). Bilddaten wurden mit Corel Draw 9.0 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) oder der Adobe Illustrator Creative Suite (Adobe Systems, München) bearbeitet. *Ab initio* Strukturmodelle wurden mit dem PyMOL Molecular Viewer (DeLano Scientific LLC, Palo Alto, USA) erstellt und bearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit benutzte Datenbanken und Webtools sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Internetdatenbanken und Analysetools

Name	Dienst	Webadresse
3Dpro	<i>Ab initio</i> Vorhersage der 3D Proteinstruktur	http://www.igb.uci.edu/?page=tools&subPage=psss
Aramemnon	Datenbank pflanzlicher Membranproteine	http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/
ExpASy	allgemeine Proteindatenbank und Sammlung von Analysetools	http://au.expasy.org/sprot/
MaxSprout	Tool zur Rekonstruktion von 3D Koordinaten aus der C _α -Kette eines Proteins	http://www.ebi.ac.uk/Tools/maxsprout/index.html
NCBI/GenBank	allgemeine Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PSIPred v2.6	Proteinsekundärstrukturvorhersage	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
RCSB Protein Data Bank	Sammlung von gelösten 3D Proteinstrukturen	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
TAIR	allgemeine Sequenzdatenbank und Sammlung von Analysetools	http://www.arabidopsis.org/

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Charakterisierung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4

3.1.1 *In vivo* Cytokininbindung der CHASE Domäne in *E. coli*

Im derzeitigen Modell der Cytokinin-signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* wird das Hormon durch eine Rezeptorfamilie erkannt, deren Mitglieder (AHK2, AHK3, CRE1/AHK4) in ihrem N-terminalen (vermutlich extrazellulären) Bereich eine sogenannte CHASE Domäne (*c*yclases/*h*istidine *k*inases *a*ssociated *s*ensory *e*xtracellular) besitzen, welche als Bindungsdomäne für Cytokinine in Frage kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst experimentell überprüft, inwieweit diese Modellvorstellung der Realität entspricht und CHASE eine Bindungseigenschaft für Cytokinine zugeordnet werden kann.

Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden vier verschiedene Expressionskonstrukte erstellt, die unterschiedliche Anteile vom Rezeptor CRE1/AHK4 enthielten (Abb. 8) und die Fähigkeit der einzelnen Proteine bzw. Proteindomänen zur Cytokininbindung untersucht.

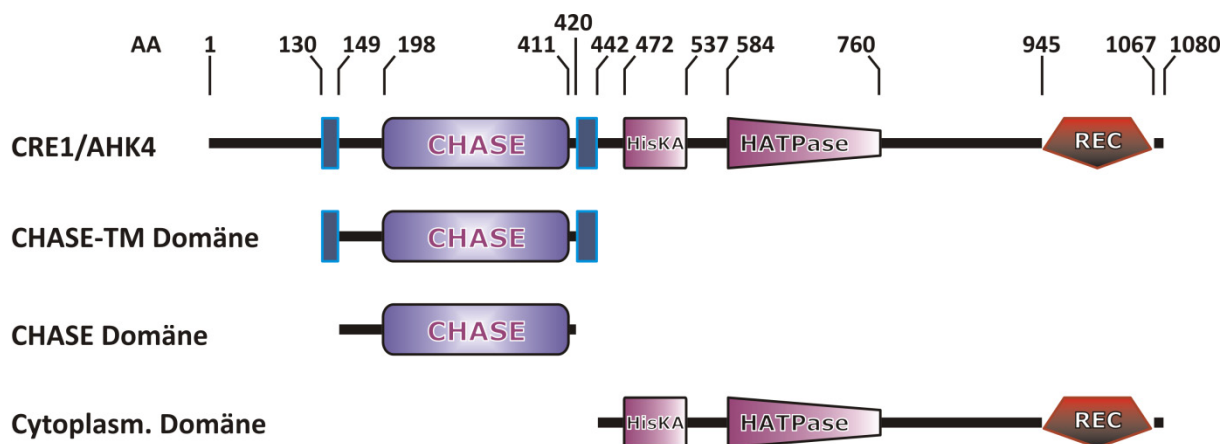


Abbildung 8: Domänenstruktur von CRE1/AHK4. Der Rezeptor besitzt eine potentiell extrazelluläre cytokininbindende CHASE Domäne (Aminosäuren 198-411), die von zwei hydrophoben transmembranständigen Bereichen (130-149 bzw. 420-442) flankiert ist. Im cytoplasmatischen Teil des Proteins befinden sich die Histidin-Kinase A Domäne (472-537), eine Histidin-Kinase ähnliche ATPase (584-760) und eine *Receiver* Domäne (945-1067). Entsprechend dieser Vorhersage wurden verschiedene Proteinkonstrukte erstellt, um die Hormonbindungsdomäne zu identifizieren. Die Abbildung wurde anhand der Vorhersagen der Pfam- (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) und der SMART-Datenbank (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) erstellt

Die getesteten Proteine wurden als His-getaggte Proteine in *E. coli* (BL 21) exprimiert (siehe 2.2.2.4) und die Bindung für das Cytokinin *trans*-Zeatin in einem *in vivo* Assay in *E. coli* überprüft (Romanov und Lomin, 2009). Neben der CHASE Domäne und dem vollständigen cytoplasmatischen Bereich von

CRE1/AHK4 wurde außerdem CHASE mit den beiden angrenzenden hydrophoben Bereichen (siehe Abb. 8, CHASE-TM Domäne) auf eine spezifische Bindung des Hormons hin untersucht, um die mögliche Notwendigkeit einer Membranständigkeit der Domäne für die Funktionalität zu überprüfen. Die spezifische Bindung dieser drei Peptide wurde mit der Bindungskapazität des Volllängenrezeptors CRE1/AHK4 als Kontrolle verglichen.

CRE1/AHK4 zeigte die stärkste Bindung von *trans*-Zeatin (Abb. 9). Die spezifische Bindung der drei Proteindomänen wurde relativ zur Bindung von CRE1/AHK4 angegeben. Für die CHASE Domäne konnte hierbei nur eine marginale Bindung von *trans*-Zeatin beobachtet werden (< 5% von CRE1/AHK4) wohingegen die CHASE-TM Domäne eine nur gering schwächere Bindung als der komplette Rezeptor aufwies (~70%). Der vollständige cytoplasmatische Teil des Rezeptors zeigte unter den verwendeten experimentellen Bedingungen keinerlei Bindung gegenüber dem Hormon (~1%).

Somit kann man rückschließen, dass die CHASE-Domäne notwendig und hinreichend ist für die Bindung von Cytokinin, jedoch die beiden angrenzenden transmembranständigen Bereiche zumindest in *E. coli* benötigt werden, um eine bindungsfähige Domäne zu erhalten.

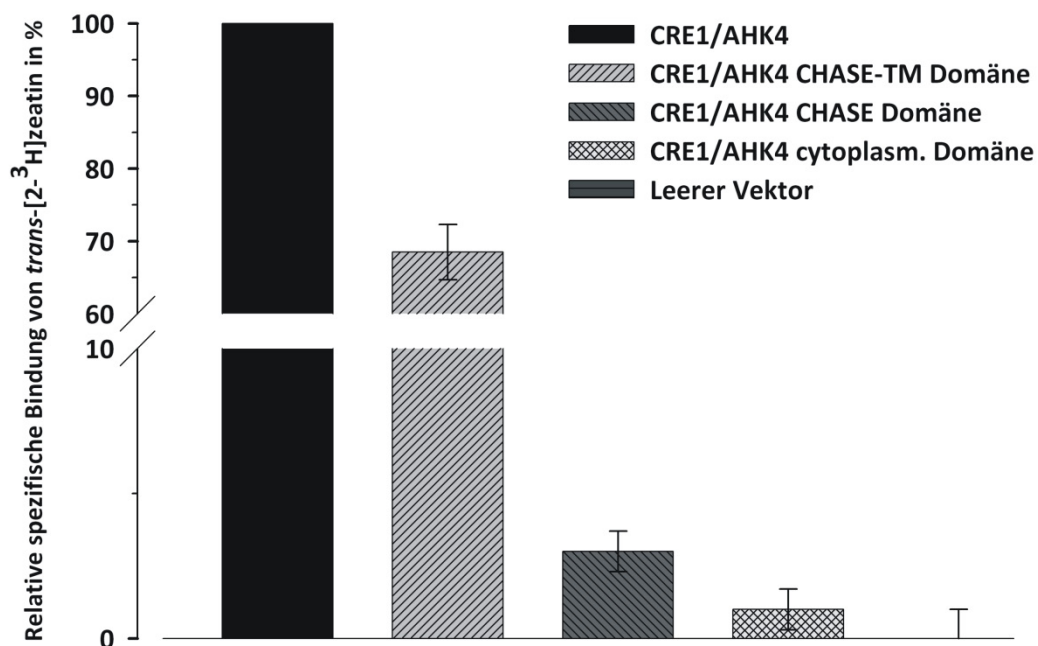


Abbildung 9: *In vivo* Bindung von *trans*-[2-³H]Zeatin an CRE1/AHK4 bzw. an verschiedene Domänen des Rezeptors. Alle Proteine wurden als His-getaggte Fusionsproteine in *E. coli* (BL21) exprimiert (siehe 2.2.2.4) und die spezifische Hormonbindung der Bakterienzellen nach Romanov und Lomin (2009) untersucht. Angegeben ist die mittlere relative spezifische Bindung in % vom Volllängenrezeptor CRE1/AHK4 ± SD. Alle Messungen wurden mit zwei verschiedenen Expressionsklonen und als Duplikat durchgeführt.

In einem sich anschließenden Experiment wurde untersucht, ob die für CRE1/AHK4 erzielten Ergebnisse auch auf die beiden anderen Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 zutreffen, d. h. die CHASE-TM Domäne die Bindungsdomäne des jeweiligen Rezeptors darstellt.

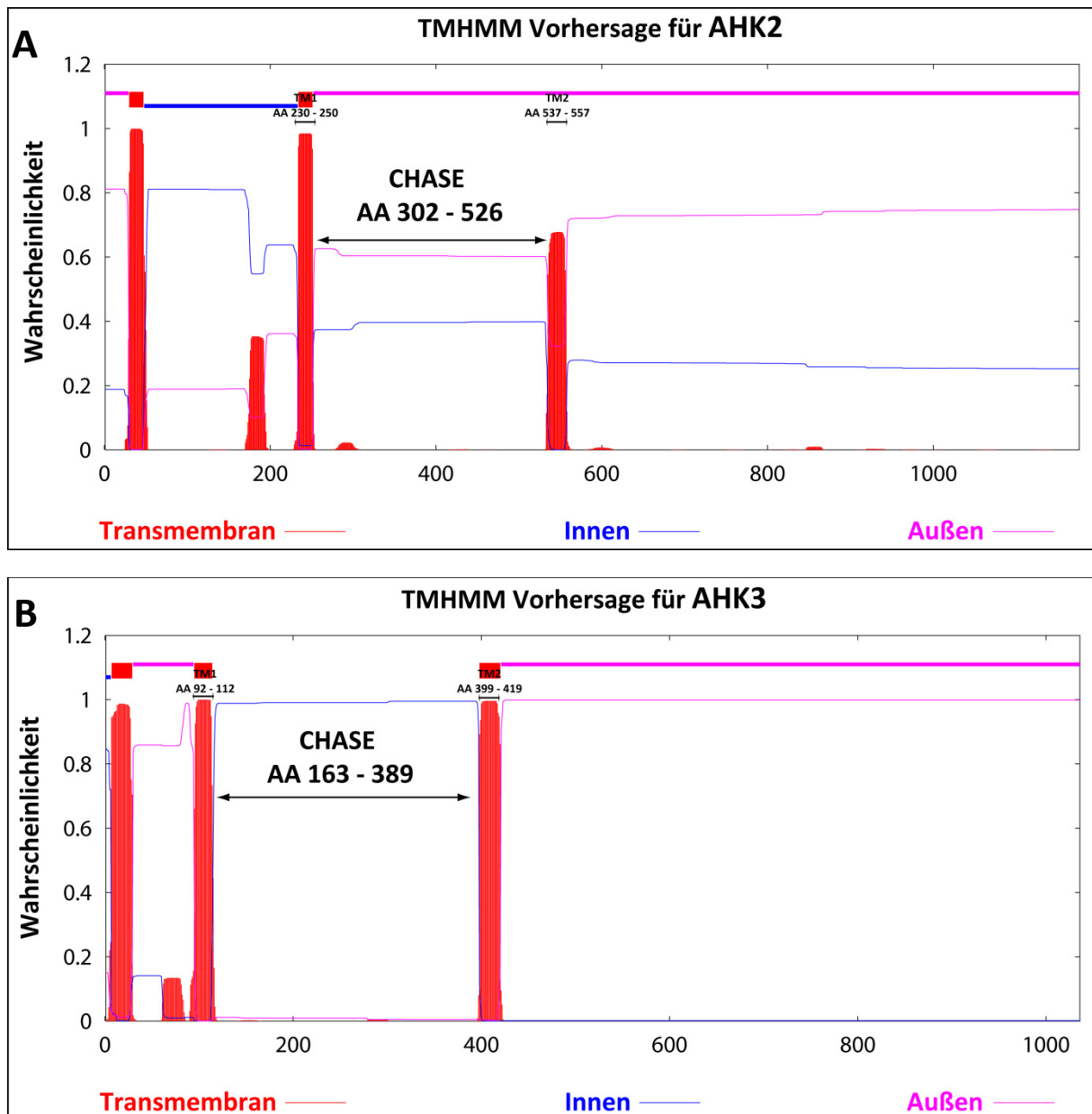


Abbildung 10: Wahrscheinlichkeit hydrophober Helices in den Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3. Die Primärstrukturen von AHK2 (A) und AHK3 (B) wurden mit Hilfe des TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) auf das Vorhandensein transmembranständiger Bereiche (dargestellt als rote Balken) überprüft.

Basierend auf einer TMHMM Analyse (TMHMM Server v2.0; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) zur Vorhersage hydrophober transmembranständiger

Helices in einem Protein wurden die CHASE-TM Domänen von AHK2 (Abb. 10A; Aminosäuren 230-557) und AHK3 (Abb. 10 B; 92-419) kloniert und als GST-Fusionsproteine im bakteriellen Assay auf ihre Fähigkeit Cytokinin zu binden untersucht.

Sowohl für die CHASE-TM Domäne von AHK2 als auch für die von AHK3 konnte eine spezifische Bindung von *trans*-Zeatin gemessen werden. Die entsprechende Domäne von AHK2 zeigte dabei eine etwa viermal so starke Bindung als die von AHK3 (Abb. 11A; ~1000 cpm bzw. ~250 cpm).

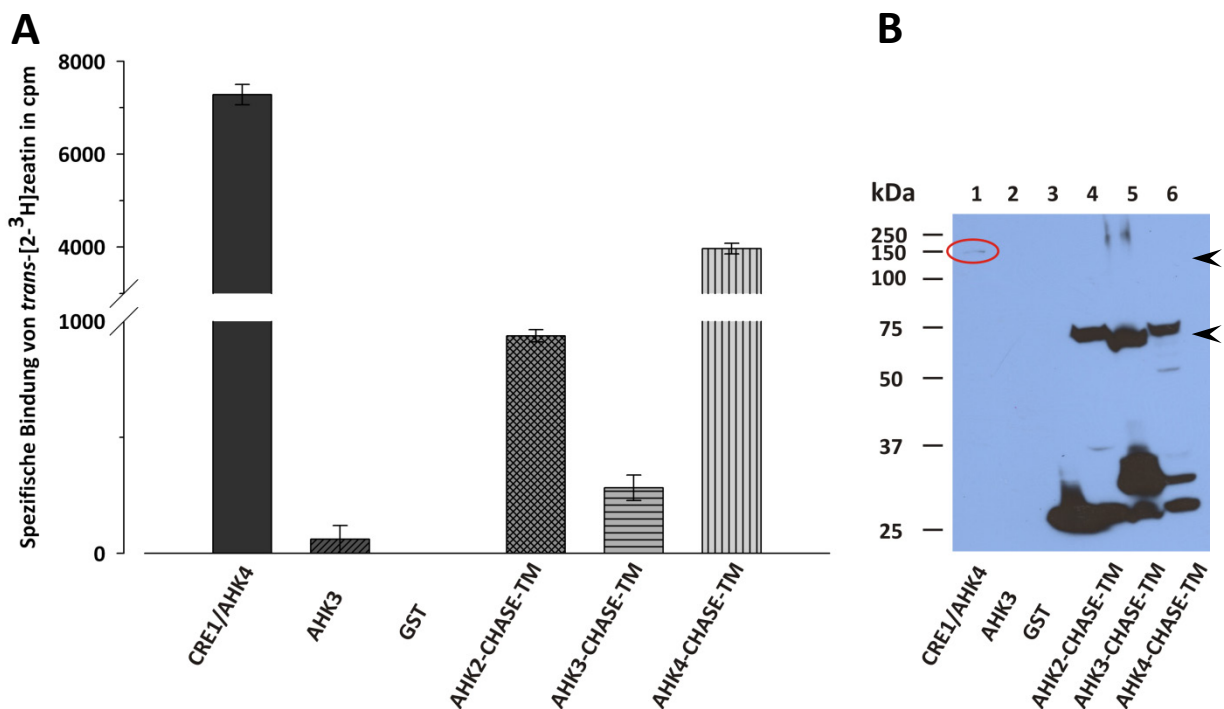


Abbildung 11: *In vivo* Bindung von Cytokinin an die CHASE-TM Domänen von CRE1/AHK4, AHK2 und AHK3. (A) Die CHASE-TM Domänen der drei Cytokininrezeptoren wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* (BL21) exprimiert (siehe 2.2.2.4) und deren spezifische Bindung *trans*-[2-³H]Zeatin in cpm bestimmt (Romanov und Lomin, 2009). Als Kontrollen wurden die beiden Vollängenrezeptoren CRE1/AHK4 und AHK3 sowie der leere Vektor pDEST15 (GST) verwendet. Alle Messungen wurden mit 2 verschiedenen Expressionsklonen und als Duplikat durchgeführt. (B) Nachweis der in (A) untersuchten Fusionsproteine mittels Immunoblot. 1 ml der für den Bindungsassay verwendeten Bakterienkultur wurde abzentrifugiert und das Pellet in 40 μ l 5xLaemmli-puffer aufgekocht. 20 μ l der jeweiligen Probe wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine im Anschluss auf eine PVDF-Membran geblottet. Für die Detektion auf der Membran wurde ein GST spezifischer Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) verwendet. Pfeile markieren detektierte Proteine für CRE1/AHK4 (oberer Pfeil) bzw. CHASE-TM Domänen (unterer Pfeil). Rot umrandet ist die Bande für GST-CRE1/AHK4.

Der Nachweis der exprimierten Fusionsproteine (~75 kDa) mit einem GST-spezifischen Antikörper bestätigte eine etwa gleich starke Expression beider Proteine (Abb. 11 B; Spur 4 und 5, unterer Pfeil

rechts), weshalb die große Differenz der Bindungsstärken nicht auf ein unterschiedliches Expressionsniveau zurückgeführt werden konnte. Die CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4 wies unter allen drei Domänen die höchste Bindung für *trans*-Zeatin auf (~4000 cpm) und wurde ähnlich stark exprimiert wie die von AHK2 und AHK3 (Abb. 11B; Spur 6, unterer Pfeil). Die Bindung der drei Proteindomänen wurde mit der Bindung der beiden Vollängenrezeptoren CRE1/AHK4 und AHK3 verglichen. CRE1/AHK4 zeigte in diesem Experiment eine etwa 40% stärkere Bindung als seine entsprechende CHASE-TM Domäne (~7000 cpm bzw. 4000 cpm), was die bereits beschriebene Beobachtung in 3.1.1 bestätigte. Interessanterweise wurde der komplette Rezeptor (~150 kDa) im Vergleich zur korrespondierenden Domäne nur sehr schwach in *E. coli* exprimiert (Abb. 11B; Spur 1, oberer Pfeil rechts), was für eine hohe Affinität des Rezeptors für seinen Liganden sprechen würde. Für AHK3 hingegen konnte nur eine verschwindend geringe spezifische Bindungsaktivität gemessen werden. Dies kann möglicherweise auf eine nur sehr schwache Expression des Proteins zurückgeführt werden, da auf dem entsprechenden Immunoblot kein GST-Fusionsprotein detektiert werden konnte (Abb. 11B; Spur 2). Nur mit einem speziellen ECL-Reagenz war es möglich, eine schwache Bande für GST-AHK3 nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt betrachtet, konnte für alle drei CHASE-TM Domänen in unterschiedlichem Ausmaß eine spezifische Bindungsaktivität für das Cytokinin *trans*-Zeatin beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die CHASE Domäne mit beiden angrenzenden Transmembranhelices in allen drei Cytokininrezeptoren die Hormonbindungsdomäne darstellt, wobei die unterschiedlichen Bindungsaktivitäten u. U. auf divergente Affinitäten gegenüber *trans*-Zeatin zurückzuführen sind.

3.1.2 Eine evolutionäre Analyse der CHASE Domäne offenbart potentiell Cytokininbindende Aminosäurereste

Im vorherigen Abschnitt wurde experimentell bewiesen, dass die CHASE Domäne notwendig und hinreichend für die Cytokininerkennung ist. Der nächste Schritt bestand darin, die Domäne näher zu charakterisieren und funktionell wichtige Aminosäuren zu identifizieren.

Hierfür wurde ein bioinformatischer Ansatz gewählt, der von Birgit Pils (Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) durchgeführt wurde. Es wurden dafür Sequenzinformationen aller CHASE Domänen aus der *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) herangezogen, um mögliche funktionell relevante Reste in der CHASE Domäne vorherzusagen. Zum einen sollten mit Hilfe dieses Ansatzes Aminosäurepositionen identifiziert werden, die womöglich für die übergeordnete Struktur der Domäne entscheidend sind oder, interessanter noch, Positionen, die direkt an der Interaktion mit dem Hormon beteiligt sein könnten.

Unter Zuhilfenahme eines auf einem repräsentativen multiplen Sequenzabgleichs (Anantharaman und Aravind, 2001) basierenden Hidden Markov Modells wurden zunächst aus der nicht-redundanten

Datenbank der *GenBank* alle Sequenzen mit einer CHASE Domäne herausgefiltert. Anschließend erfolgte eine weitere Suche nach pflanzenspezifischen Sequenzen innerhalb der EST Datenbank von *GenBank* mit der CHASE Sequenz von CRE1/AHK4. Auf diese Weise konnten Sequenzen, die die CHASE Domäne enthalten, in Pflanzen, Schleimpilzen, Cyanobakterien und Proteobakterien identifiziert werden. Aus den gefundenen Sequenzen wurde ein multiples Sequenz-Alignment generiert (Abb. 12B), welches für die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums mit CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) benutzt wurde (Abb. 12A).

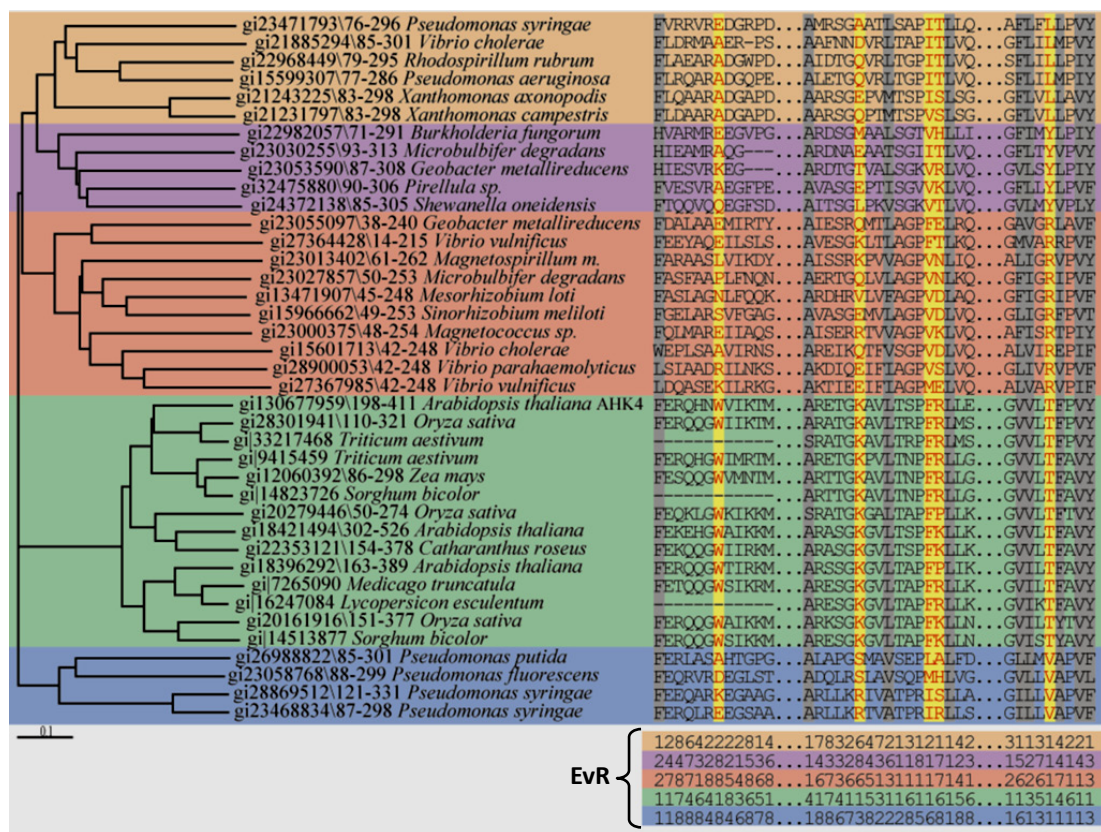


Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum und Proteinsequenzabgleich der CHASE Domänen. (A) Phylogenetischer Stammbaum der CHASE Domänen von fünf verschiedenen Subgruppen. Die verwendeten Sequenzen sind mit *gene identifier* (gi) Nummern und mit dem Beginn bzw. Ende der entsprechenden CHASE Domäne (Aminosäuren) gekennzeichnet. (B) Ausschnitt des Sequenzabgleichs der CHASE Domänen, die für die Analyse der Evolutionsrate der einzelnen Aminosäuren herangezogen wurden. Die Evolutionsraten (EvR) der Aminosäuren innerhalb der einzelnen Subgruppen sind unterhalb des Sequenzabgleichs dargestellt. Die Aminosäurepositionen, die letztendlich für die experimentelle Analyse verwendet worden waren (W244, K297, F304, R305, T317), sind in orange hervorgehoben. Positionen, die in allen CHASE Sequenzen konserviert sind, sind grau gekennzeichnet. Drei Punkte in der jeweiligen Proteinsequenz stellen Unterbrechungen dar, Lücken in der Sequenz sind hingegen durch Striche markiert (übernommen von Heyl *et al.*, 2007).

Der phylogenetische Stammbaum gliederte sich in fünf Subgruppen, wobei eine Gruppe (Abb. 12A, grün unterlegt) alle pflanzenspezifischen Sequenzen enthielt. Zusätzlich wurden die Evolutionsraten innerhalb jeder Subgruppe für jede Aminosäureposition mit dem Programm TREE-PUZZLE v5.1 (Yang, 1994; Strimmer und von Haeseler, 1996) ermittelt. Die Identifizierung funktionell möglicherweise wichtiger Reste in der CHASE Domäne mit Hilfe dieser bioinformatischer Daten basierte zum einen auf der Annahme, dass die in Pflanzen gefundenen CHASE Domänen eine andere Klasse von Liganden binden (Cytokinine) als die entsprechenden Domänen der anderen Spezies und zum anderen darauf, dass sich diese Differenzen in einer veränderten Evolutionsrate bestimmter Aminosäurepositionen widerspiegeln. Basierend auf der Annahme, dass für Bindung unterschiedlicher Liganden höchstwahrscheinlich andere Aminosäurereste wichtig sind, wurde zum einen nach Positionen in CHASE gesucht, die eine geringe Evolutionsrate in Pflanzen aufweisen und in den anderen Subgruppen schnell evolvieren. Zum anderen waren Positionen interessant, die in allen Subgruppen langsam evolvieren, aber jeweils durch eine andere Aminosäure in jeder Subgruppe repräsentiert waren.

Anhand dieser Kriterien wurden fünf Positionen in der pflanzlichen Subgruppe selektiert (Abb. 12B, orange markiert), die an der Cytokininbindung beteiligt sein könnten (W244, K297, F304, R305 und T317). Position T317 z.B. wies eine sehr geringe Evolutionsrate (*Evolutionary Rate* EvR = 1) innerhalb der Pflanzensequenzen und auch in allen anderen Subgruppen auf. In allen Subgruppen fand sich jedoch an dieser Position ein Aminosäurerest mit divergenten biochemischen Eigenschaften, was insgesamt betrachtet diese Position für die Ligandenbindung als sehr wichtig erscheinen ließ.

Die Evolutionsraten der Positionen W244 und K297 in CRE1/AHK4 waren im Vergleich zu denen in den anderen Subgruppen hingegen sehr niedrig. An der zu W244 homologen Position z. B. fanden sich in den anderen Subgruppen keine aromatischen Aminosäuren sondern eher unpolare (Alanin A) bzw. basische (Arginin R, Lysin K) und saure Aminosäuren (Glutamat D). Dies deutete auf eine wichtige Funktion dieser Position in Pflanzen hin.

Die Position 304 evolviert bis auf eine Ausnahme in allen Subgruppen sehr langsam, wobei nur in den pflanzlichen CHASE Domänen diese Stelle mit einem Phenylalanin F besetzt ist. Alle anderen Subgruppen tragen an dieser Stelle unpolare Reste (Isoleucin I, Valin V), was ein Indiz für eine funktionelle Relevanz dieses Restes für die Cytokininbindung sein könnte.

Position 305 ist in der pflanzlichen Subgruppe entweder mit einer basischen Aminosäure (Arginin R, Lysin K) oder einem Prolin P besetzt. In allen anderen CHASE Domänen mit Ausnahme von Subgruppe 1 ist diese Position kaum konserviert.

Anzumerken wäre an dieser Stelle zudem, dass die Aminosäureposition 301 nicht die Selektionskriterien des gewählten Ansatzes erfüllte. Zwar war diese Position in allen CHASE Domänen hoch konserviert und wies eine sehr niedrige Evolutionsrate auf, jedoch fanden sich an

dieser Stelle verstärkt Reste mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften (Threonin T und Serin S). Gleichwohl führt eine Mutation an dieser Position in CRE1/AHK4 von T zu I zum bekannten *wooden leg (wol)* Phänotyp in *Arabidopsis* (Mähönen *et al.*, 2000), was auf eine gestörte Cytokininwahrnehmung des Rezeptors zurückgeführt werden kann (Yamada *et al.*, 2001). In unserer nachfolgenden experimentellen Analyse wurde diese Mutation als Positivkontrolle miteinbezogen.

3.1.3 Der Austausch spezifischer Aminosäuren resultiert in signifikanten Änderungen der Hormonbindung

Die in 3.1.2 beschriebenen und für eine weitere experimentelle Analyse selektierten Aminosäurepositionen innerhalb der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 wurden zu Alanin (A) mutiert und die Cytokininbindungsfähigkeit dieser Mutanten im bakteriellen Bindungsassay untersucht.

Wie erwartet wies der Wildtyprezeptor CRE1/AHK4 als Kontrolle in diesem Assay eine starke Bindung von *trans*-Zeatin auf, wohingegen GST alleine keinerlei Bindung vermittelte (Abb. 13A, Balken 1 und 9). Es konnte zudem bestätigt werden, dass die Mutation T301I in der CHASE Domäne einen vollständigen Verlust der Cytokininbindungsaktivität des Rezeptors bewirkt (Abb. 13A, Balken 7).

Ein Austausch der hochkonservierten Aminosäure Histidin H an Position 482 zu Glutamin Q (in der HisKA Domäne; siehe Abb. 8) hebt die Fähigkeit von CRE1/AHK4 auf, das Cytokininsignal in der Pflanzenzelle weiterzuleiten, da die dafür benötigte Autophosphorylierung infolge der Mutation nicht mehr vonstatten gehen kann (Hwang und Sheen, 2001). Diese Mutante wurde als Kontrolle in diesem Assay benutzt, da ein Austausch an dieser Stelle keinen Einfluss auf die Ligandenbindung der CHASE Domäne (Aminosäure 198-411; siehe Abb. 8) haben sollte. Für die Rezeptorvariante H482Q konnte in der Tat ein identisches Bindungsverhalten wie für den Wildtyp-Rezeptor bestätigen (Abb. 13A, Balken 8).

Von den fünf zuvor im bioinformatischen Ansatz identifizierten und potentiell für die Cytokininerkennung interessanten Aminosäureresten führte die Mutation zu Alanin A an zwei Positionen (F304A, T317A) zu einem kompletten Verlust der Cytokininbindung am Rezeptor (Abb. 13A, Balken 2 und 5). Mutationen an den Positionen F305 und W244 führten zu einer stark verminderten Bindung um 60%, respektive 40% im Vergleich zum Wildtyp CRE1/AHK4 (Abb. 13A, Balken 4 und 6). Einzig die Mutation der Aminosäure K297 hatte nur eine sehr geringe Veränderung der Bindung (~ 10%, Balken 3) gegenüber CRE1/AHK4 zur Folge. Durch den Nachweis vergleichbar starker Proteinexpression für alle untersuchten GST-Fusionsproteine mittels Immunoblot konnte darüber hinaus ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede in der Cytokininbindung auf eine unterschiedliche Expression der Rezeptorvarianten zurückzuführen war (Abb. 13B).

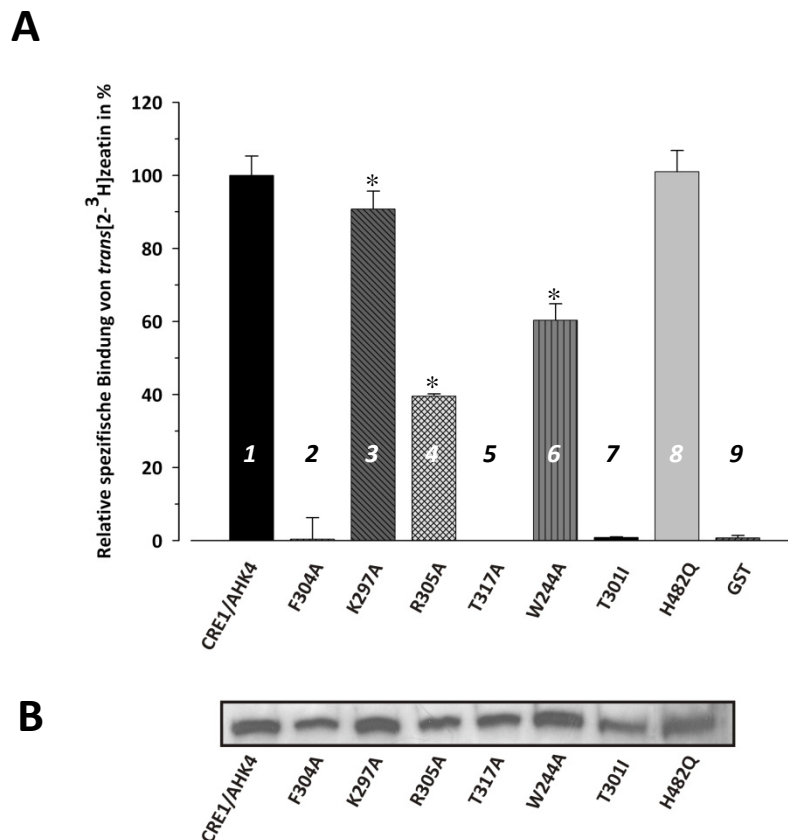


Abbildung 13: *In vivo* Cytokininbindung ausgewählter CRE1/AHK4-Mutanten. (A) Alle Rezeptorvarianten wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* (BL21) exprimiert (siehe 2.2.2.4) und deren spezifische Bindung von *trans*-[2-³H]Zeatin in cpm bestimmt (Romanov und Lomin, 2009). Angegeben ist die mittlere relative spezifische Bindung in % vom Wildtyprezeptor CRE1/AHK4 ± SD (Standardabweichung). Als Kontrollen wurden die nicht-bindende Rezeptormutante T301I und die Signaltransduktionsmutante H482Q sowie GST (leerer Vektor pDEST15) benutzt. Alle Messungen wurden mit zwei verschiedenen Expressionsklonen und als Duplikat durchgeführt. (B) Nachweis der in (A) untersuchten Fusionsproteine mittels Immunoblot. 1 ml der für den Bindungsassay verwendeten Bakterienkultur wurde abzentrifugiert und das Pellet in 40 µl 5 x Laemmli-puffer aufgekoht. 20 µl der jeweiligen Probe wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine im Anschluss auf eine PVDF-Membran geblottet. Für die Detektion auf der Membran wurde ein GST-spezifischer Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) verwendet.

3.2 Präparative Expression und Aufreinigung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4

Unter Zuhilfenahme eines bioinformatischen Ansatzes und *in vivo* Bindungsassays wurden Aminosäurepositionen innerhalb der CHASE Domäne identifiziert, die potentiell direkt an der Interaktion mit Cytokinin beteiligt sind. Zur Validierung dieser Ergebnisse und um ein tieferes Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen dieser Domäne zu erhalten, war es jedoch unabdingbar, die räumliche Struktur des Proteins zu entschlüsseln. Darüber hinaus sollten Informationen über die Struktur helfen, weitere funktionell relevante Aminosäurereste zu

identifizieren. Voraussetzung für Strukturlösungsversuche war jedoch, dass das entsprechende Protein in höherer Konzentration exprimierbar war (≥ 5 mg/ml) und in funktionellem Zustand zu hoher Reinheit gebracht werden konnte.

3.2.1 Expression und Reinigung der löslichen CHASE Domäne von CRE1/AHK4

Aufgrund der allgemeinen Schwierigkeiten bei der Expression unlöslicher Proteine (z. B. verringertes Expressionsniveau) konzentrierte ich mich zunächst auf die hydrophile CHASE Domäne (Aminosäuren 149-418, siehe Abb. 8), obwohl dieses Protein im bakteriellen Assay keine spezifische Cytokininbindung zeigte (siehe Abb. 9).

3.2.1.1 Die CHASE Domäne wird in *E. coli* in inclusion bodies exprimiert

Die CHASE Domäne wurde für Expressionsversuche in *E. coli* in den Vektor pDEST17 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert, der eine N-terminale Fusion mit einem 6x His-Tag ermöglichte. Zunächst wurde die Expression im *E. coli* Stamm BL21 untersucht. Nach Induktion mit 1 mM IPTG für 24 h bei 30°C konnte eine starke Proteinbande bei ~30 kDa beobachtet werden (Abb. 14, Spur 1), was mit dem berechneten Molekulargewicht für CHASE (+ His-Tag) von ~32 kDa gut übereinstimmte.

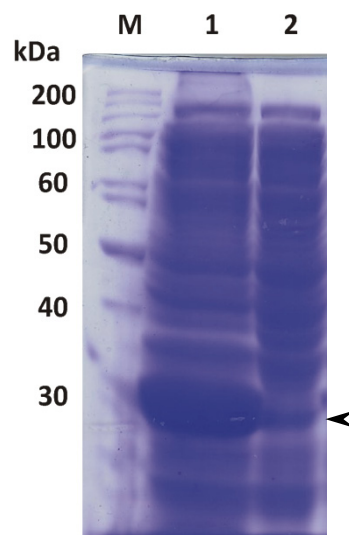


Abbildung 14: Expression der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 in *E. coli*. Die CHASE Domäne (Aminosäure 149-418, ~32 kDa) wurde als His-getaggtetes Protein (pDEST17; Invitrogen, Karlsruhe) im *E. coli* Stamm BL21 exprimiert (siehe 2.2.2.4). Nach Induktion mit 1 mM IPTG für 24 h bei 30°C wurde das Zellpellet von 1 ml Kultur in 5 x SDS-Probenpuffer aufgekocht und 10 μ l in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt (1). Eine nicht-induzierte Kontrolle wurde parallel mit aufgetragen (2). 5 μ l *Page-Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot) wurden als Größenmarker aufgetragen (M). Bei ~30 kDa wurde eine starke Proteinbande im Gesamtzelllysat für CHASE detektiert (markiert mit einem Pfeil).

Weil die CHASE Domäne im bakteriellen Bindungsassay praktisch keine spezifische Hormonbindung aufwies (siehe Abb. 9), wurde vermutet, dass das Protein möglicherweise in *E. coli* unkorrekt gefaltet wird und in sogenannten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vorliegt. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden die *inclusion bodies* entsprechend dem Protokoll in 2.2.2.7 aufgereinigt. Nach diversen Waschschrritten und Solubilisierung der abgetrennten *inclusion bodies* mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid konnte eine starke Proteinbande zwischen 25 und 37 kDa für CHASE auf einem SDS-Gel nachgewiesen werden (Abb. 15; Spur 6). Zudem wies die denaturierte CHASE Domäne bereits einen verhältnismäßig hohen Reinheitsgrad auf. Ein großer Anteil der löslichen bakteriellen Proteine konnte durch mehrere Waschschrritte erfolgreich entfernt werden (Spur 2-5).

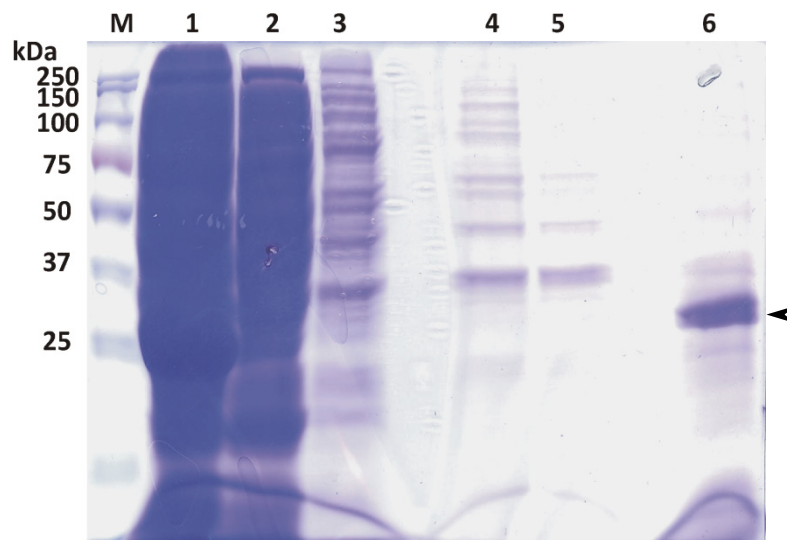


Abbildung 15: Expression der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 in *E. coli* inclusion bodies. Die Expression der Domäne wurde mit 1 mM IPTG für 24 h bei 30°C in *E. coli* (BL21) induziert (siehe 2.2.2.4). Entsprechend 2.2.2.7 wurden die *inclusion bodies* von den löslichen Proteinen separiert und jeweils 20 µl der *inclusion bodies*, der Waschfraktionen von der Reinigung der *inclusion bodies* (2-5) bzw. vom Gesamtzelllysat (1) mittels SDS-PAGE analysiert. 5 µl vom *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) wurden als Größenstandard mitaufgetragen (M). Ein spezifische Proteinbande für CHASE zwischen 25 und 37 kDa konnte in den solubilisierten *inclusion bodies* (6) detektiert werden (markiert mit einem Pfeil).

3.2.1.2 Nach Säulen-basierter Rückfaltung weist die CHASE-Domäne keine spezifische Cytokininbindungsaktivität auf

Die aus den *inclusion bodies* solubilierte CHASE Domäne von CRE1/AHK4 wurde im nachfolgenden einer Säulen-basierten Rückfaltung unterzogen. Hierzu wurde die denaturierte Domäne in Puffer mit denaturierendem Agenz zunächst spezifisch an eine Säule für die Reinigung His-getaggtter Proteine gebunden (HisTrap™, GE Healthcare, Freiburg). Nach intensivem Auswaschen des denaturierenden Agenzes mit nativem Puffer, konnte das renaturierte CHASE Protein über einen

Imidazolgradienten spezifisch von der Säule eluiert werden. Im resultierenden Chromatogramm wurden zwei nicht voneinander getrennte Peaks erhalten, die sich über einen weiten Imidazolkonzentrationsbereich (ca. 250-500 mM) erstreckten (Abb. 16; vergrößerter Ausschnitt B).

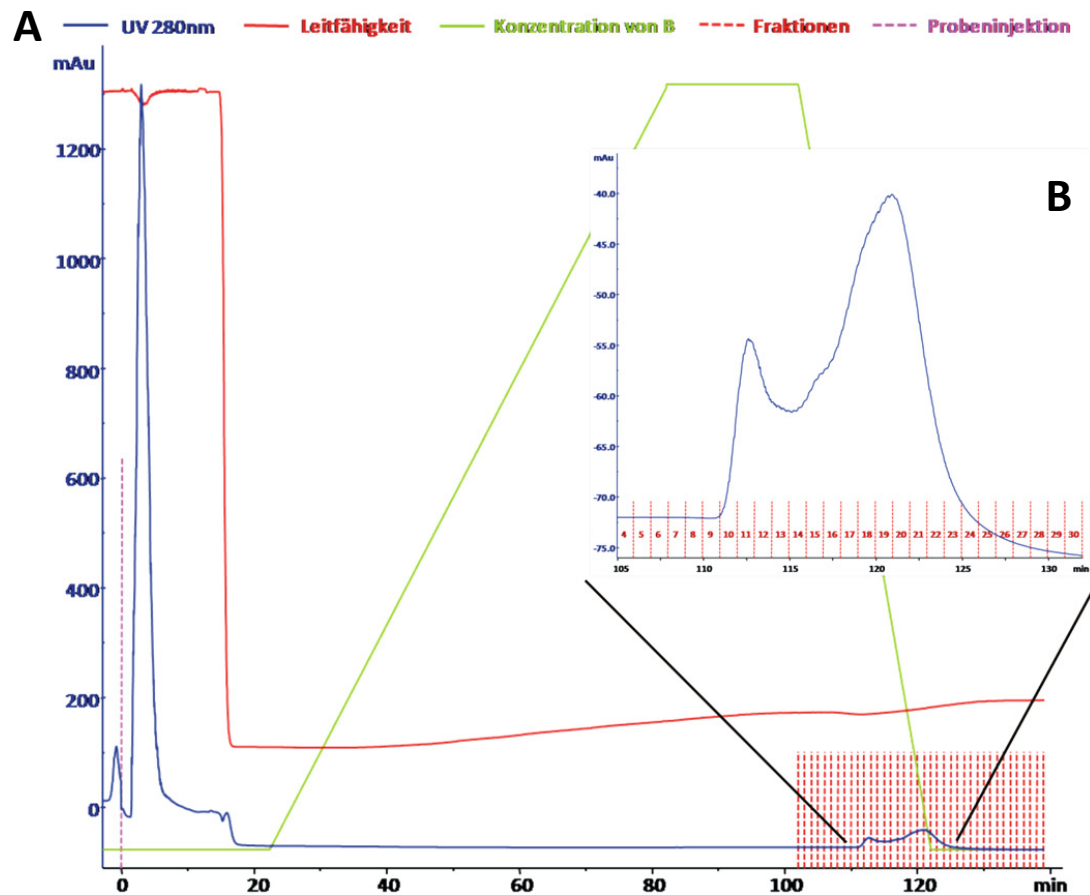


Abbildung 16: Chromatogramm der Säulen-basierten (*On-column*) Rückfaltung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4. Nach Expression der CHASE Domäne wurden die mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid solubilisierten *inclusion bodies* aus *E. coli* einer Rückfaltung auf einer His-Trap Säule entsprechend 2.2.2.7 unterzogen. Nach Rückfaltung durch intensives Waschen mit Puffer ohne denaturierendes Agens wurde das Protein mit steigender Konzentration an Imidazol von der Säule spezifisch eluiert und 1 ml Fraktionen gesammelt. x-Achse, Zeit (min); y-Achse, UV-Absorption bei 280 nm (mAU); Konzentration von B, steigende Konzentration von Rückfaltungspuffer von 0% bis 100% zwischen 20 und 100 min bzw. steigende Konzentration von Elutionspuffer zwischen 100 und 120 min (für Puffer siehe 2.2.2.7). B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von A.

Die Fraktionen 17-25 wurden auf einem SDS-Gel analysiert, um das korrekte Molekulargewicht (MW) und die Reinheit des Proteins zu überprüfen. In allen Fraktionen konnte eine spezifische Bande bei ca. 30 kDa detektiert werden (Abb. 17, markiert mit einem Pfeil). Neben der Bande für die CHASE-Domäne wurde ein zweites Protein bei etwa dem doppelten MW spezifisch mit aufgereinigt,

wobei die Intensität der entsprechenden Bande im Vergleich gering war. Weitere Banden (z. B. bei ~100 kDa) waren auf dem Gel nur sehr schwach zu detektieren. Insgesamt betrachtet wies die renaturierte CHASE Domäne somit einen sehr hohen Reinheitsgrad von schätzungsweise >95% auf. In den Fraktionen 10-14, die zum ersten Peak korrespondierten (siehe Abb. 16), konnten hingegen nur sehr geringe Mengen verschiedener höhermolekularer Proteine nachgewiesen werden (SDS-Gel nicht gezeigt).

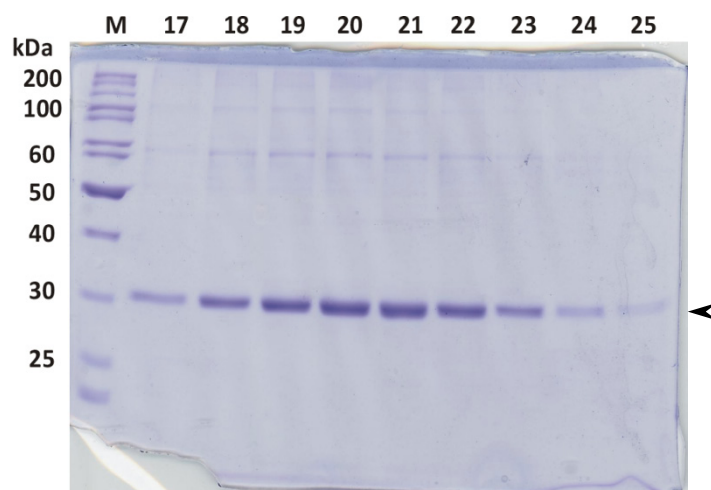


Abbildung 17: SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der Säulen-basierten Rückfaltung der CHASE Domäne von CRE1/AHK4. 20 μ l der Fraktionen 17-25 wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. 5 μ l *Page-Ruler* (Fermentas, St. Leon-Rot) wurden als Größenstandard parallel aufgetragen (M). Ein Pfeil markiert die gereinigte CHASE Domäne.

Um den Erfolg der Rückfaltung von CHASE zu überprüfen, sollte die spezifische Cytokininbindungsfähigkeit nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein experimenteller Ansatz verwendet, bei dem das Protein mit dem markierten Cytokinin *trans*-[2-³H]Zeatin gemischt und der resultierende Protein-Ligand-Komplex erneut einer Affinitätsreinigung (mittels Ni-NTA Spinsäulen; Qiagen, Hilden) über den an die Domäne fusionierten His-Tag unterworfen wurde. Als Negativkontrolle wurde die denaturierte CHASE Domäne verwendet. Eine Positivkontrolle lag nicht vor. In keinem Fall war es jedoch möglich, für die gereinigte und rückgefaltete Domäne eine spezifische Bindungsaktivität im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen. Die gemessenen cpm Werte betragen für Protein und Kontrolle jeweils <100 und ließen keine Aussage über die Aktivität zu (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.3 Expression der CHASE Domäne im zellfreien System

Aufgrund der nichtvorhandenen Bindungsaktivität nach Rückfaltung der in *E. coli* exprimierten CHASE Domäne, wurde versucht, das Protein direkt im nativen Zustand zu exprimieren. Hierfür verwendeten wir ein zellfreies Expressionssystem, welches auf einem bakteriellen S30 Extrakt basierte (siehe 2.2.2.6). Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 16 h wurde eine starke Präzipitatbildung beobachtet. Nach Analyse des Präzipitates und des löslichen Überstandes auf einem SDS-Gel konnte eine prominente Bande zwischen 25 und 37 kDa detektiert werden, die Resultat einer unlöslichen und damit nichtfunktionellen Expression der Domäne war (Abb. 18, P, mit Pfeil markiert). In der löslichen nativen Fraktion konnte hingegen nur eine sehr schwache zusätzliche Bande identischen Molekulargewichts im Vergleich zum Reaktionsgemisch nachgewiesen werden (Abb. 18, S, mit Pfeil markiert).

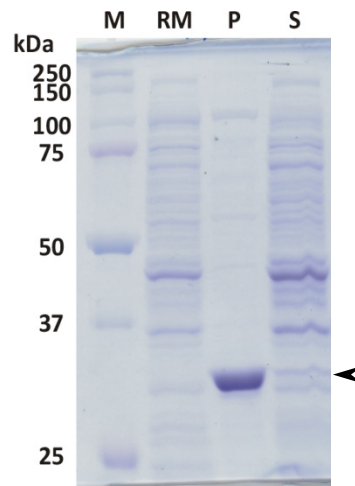


Abbildung 18: Zellfreie Expression der CHASE-Domäne von CRE1/AHK4. Die lösliche CHASE Domäne wurde im Vektor pIVEX2.3MCS im analytischen Maßstab (70 μ l) im zell-freien System für 16 h exprimiert (siehe 2.2.2.6) und 1 μ l des Präzipitates (P) bzw. der löslichen Fraktion (S) in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Als Nullpunktkontrolle der Expression wurden 1 μ l vom Reaktionsgemisch (RM) mit aufgetragen. Die Bandenhöhe für das CHASE Protein ist mit einem Pfeil markiert. 5 μ l vom *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) dienten als Größenstandard (M).

Durch Zusatz des nicht-ionischen Detergenzes Brij58, welches sich als sehr geeignet für die lösliche Expression hydrophober Proteine herausgestellt hat (Klammt *et al.*, 2005), wurde überprüft, ob die CHASE Domäne nativ in Mizellen exprimiert werden konnte. Selbst in hoher Konzentration (bis zu 1,5%) wurde jedoch kein nennenswerter positiver Effekt auf die lösliche Expression beobachtet (Gel nicht gezeigt). Klammt *et al.* (2004) beschreiben, dass nach *in vitro* Expression präzipitierte Proteine durch Inkubation mit 1% des Detergenzes LPPG (1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]) erfolgreich in Lösung gebracht werden können und in vielen Fällen ihre Funktionalität

nachgewiesen werden kann. Wir überprüften diesen Ansatz und konnten die zuvor präzipitierte CHASE Domäne vollständig solubilisieren. Der Nachweis einer spezifischen Cytokininbindungsaktivität blieb hingegen erfolglos (siehe Abb. 37).

3.2.2 Expression und Reinigung der unlöslichen CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4

Parallel zur Expression der löslichen CHASE Domäne, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die CHASE Domäne mit den beiden angrenzenden hydrophoben Bereichen (Aminosäuren 130-442, siehe Abb. 8) zu exprimieren und aufzureinigen. Aufgrund der bereits nachgewiesenen Funktionalität dieses Proteins im bakteriellen Bindungsassay (siehe Abb. 9), war eine höhere theoretische Wahrscheinlichkeit gegeben, dass das Protein sich auch nativ reinigen ließe unter der Voraussetzung eines adäquaten Expressionsniveaus.

3.2.2.1 Die CHASE-TM Domäne wird in *E. coli* möglicherweise nur schwach exprimiert

Nach Klonierung der entsprechenden kodierenden Region (Aminosäuren 130-442, siehe Abb. 8) in den Expressionsvektor pDEST17 wurde zunächst standardmäßig die Expression in *E. coli* (BL21) überprüft.

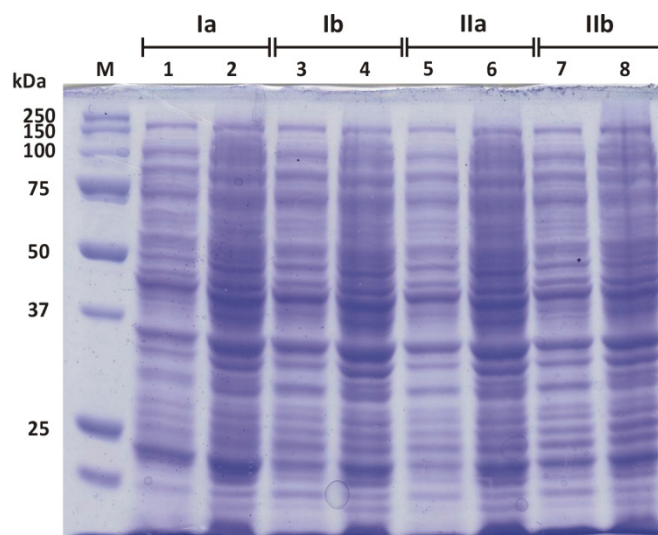


Abbildung 19: Expressionsversuch der CHASE-TM Domäne in *E. coli* bei 30°C und Raumtemperatur. Die CHASE-TM Domäne wurde in pDEST17 kloniert und die Expression mit 0,1 mM IPTG für 20 h bei 30°C (I) bzw. RT (II) für zwei verschiedene Klone in *E. coli* (BL21) induziert (jeweils a und b) (siehe 2.2.2.4). Jeweils 1 ml der Kultur wurde abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl 5x SDS-Probenpuffer aufgekocht. 25 µl der Probe (Spuren 2, 4, 6, 8) und der jeweiligen nicht-induzierten Kontrolle (Spuren 1, 3, 5, 7) wurden mittels einer SDS-PAGE analysiert. 5 µl *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) wurden parallel mit aufgetragen (M).

Um eine Anreicherung der möglicherweise nur sehr schwach exprimierten CHASE-TM Domäne zu erzielen, führten wir nach IPTG-Induktion (0,1 mM) und Inkubation bei RT für ~20 h eine Fraktionierung der Bakterienzellen in cytosolische Proteine sowie in lösliche und unlösliche Membranproteine durch. Hierzu wurden nach Zellyse und Abtrennung der cytosolischen Proteine von den Membranen durch Ultrazentrifugation die Membranproteine mit dem Detergenz β -Dodecylmaltosid herausgelöst und eine Aufreinigung His-getaggtter Proteine mit Ni-NTA Spinsäulen (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht-induzierte Bakterienzellen fraktioniert und ebenso His-getaggte Proteine aus der löslichen Membranfraktion gereinigt. Wie in Abb. 20 eindeutig zu sehen ist, war es nicht möglich, ein Protein bei der zu erwartenden Größe für die CHASE-TM Domäne bei ca. 37 kDa anzureichern bzw. aufzureinigen. Nur Proteine höheren Molekulargewichts (ca. 50 bzw. 75 kDa) konnten spezifisch aufgereinigt werden, die im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (A) aber intrinsische *E. coli* Proteine gewesen zu sein schienen.

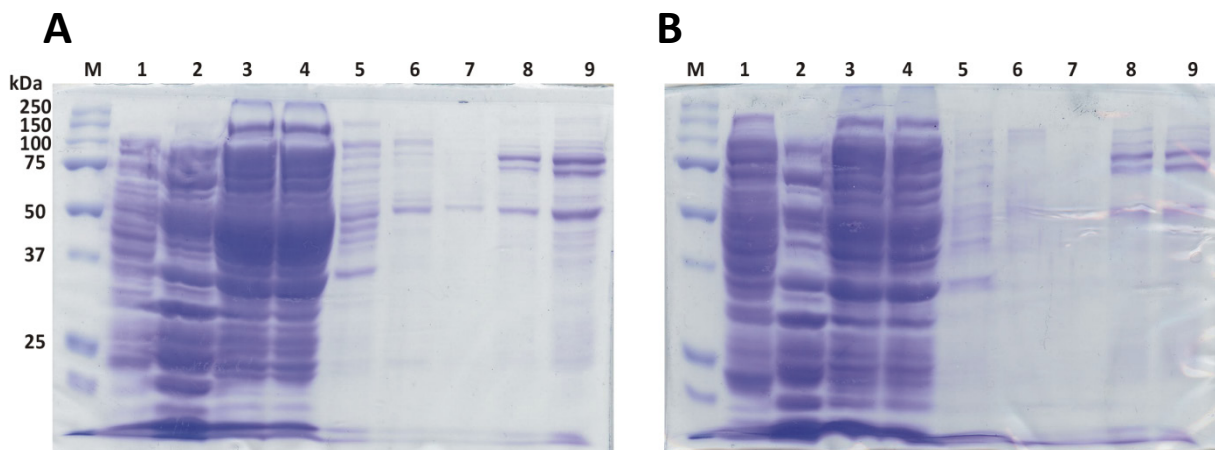


Abbildung 20: Fraktionierung von Bakterienzellen und Ni-NTA Reinigung der löslichen Membranfraktion nach Induktion der Expression von CHASE-TM. Die Expression wurde mit 0,1 mM IPTG für 20 h in *E. coli* (BL21) induziert (A) und im Anschluss eine Fraktionierung der Zellen in cytosolische (1) und Membranproteine durch Ultrazentrifugation durchgeführt. Mit 1% β -DDM wurden die unlöslichen (2) von den löslichen Membranproteinen (3) separiert und die löslichen Membranproteine anschließend einer Ni-NTA Reinigung mit Spinsäulen (Qiagen, Hilden) unterzogen. Die Gelspuren 4-9 zeigen den Durchfluss (4), drei Waschschrte (5-7) sowie zwei Elutionen der an die Säulen gebundenen Proteine (8,9). Als Kontrolle für das Experiment dienten nicht-induzierte Zellen (B). Von jeder Fraktion wurden 10 μ l mittels einer SDS-PAGE analysiert. 5 μ l *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) wurden mit aufgetragen (M).

In weiteren Experimenten wurde versucht, die CHASE-TM Domäne denaturierend mit 8 M Harnstoff aus *E. coli* zu reinigen. Abb. 21 zeigt beispielhaft den Versuch der Reinigung der Domäne unter denaturierenden Bedingungen unter Verwendung der beiden Expressionsvektoren pDEST17 und pQE40 (Qiagen, Hilden) (Abb. 21A und B) im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (Abb. 21C).

Nach Induktion mit 1 mM IPTG für 2 h bei 37°C war es in keinem Fall möglich eine spezifische Bande für CHASE-TM aufzureinigen. Alle mit SDS-PAGE detektierten Proteine waren ebenso in der Kontrolle nachweisbar.

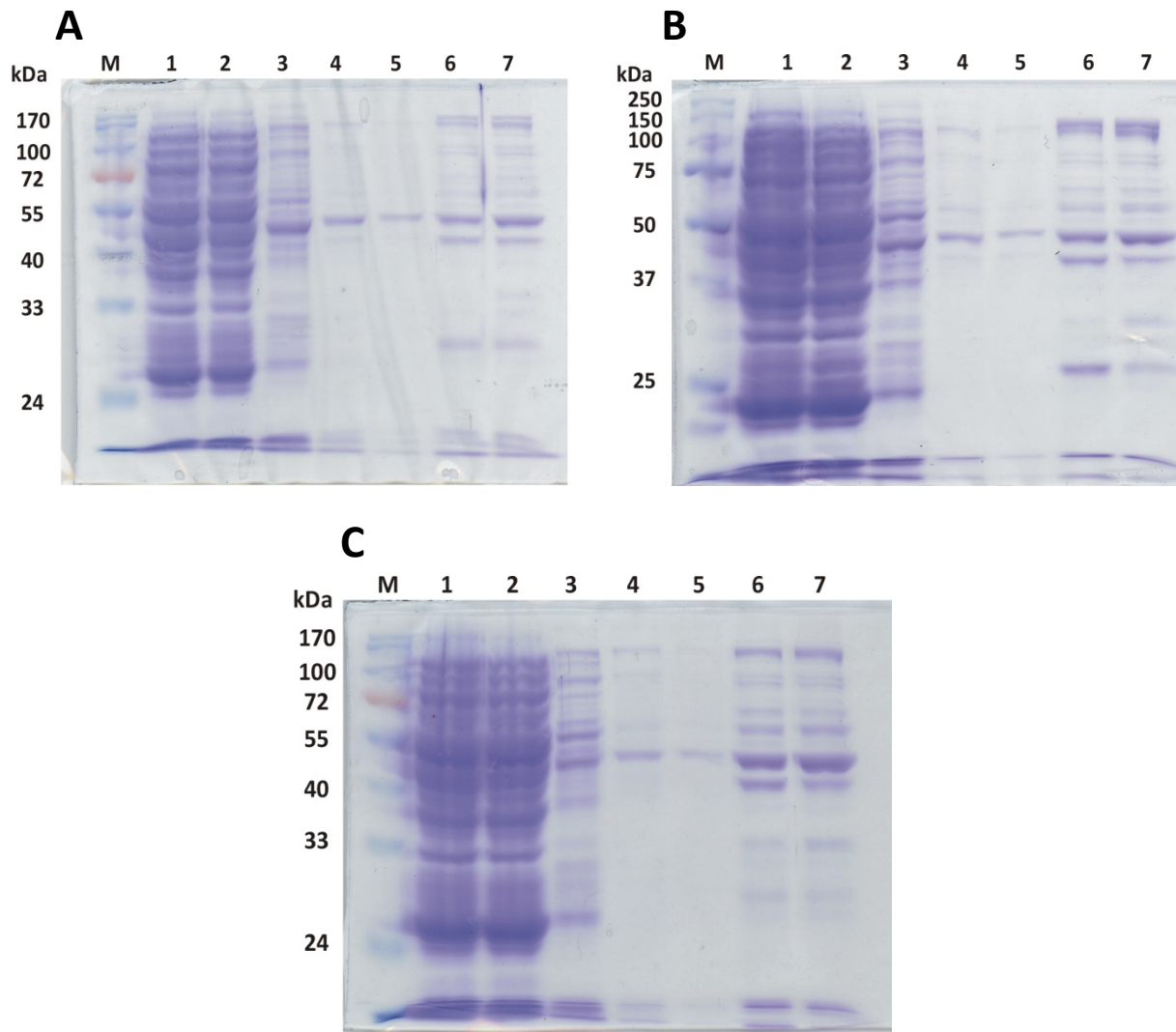


Abbildung 21: Versuch zur denaturierenden Reinigung der CHASE-TM Domäne aus *E. coli*. Die Induktion des Proteins wurde in den Expressionsvektoren pDEST17 (A) und pQE40 (B) bei 37 °C für 2 h in *E. coli* (BL21) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 8 M Harnstoff aufgeschlossen und das Lysat einer Ni-NTA Reinigung mit Spinsäulen (Qiagen, Hilden) unterzogen. Eine nicht-induzierte Kontrolle wurde auf die gleiche Weise behandelt (C). Jeweils 10 µl vom Lysat (1), des Durchflusses (2), der drei Waschfraktionen (3-5) und zweier Elutionen (6,7) wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. 5 µl Proteinmarker (M) wurden parallel mit aufgetragen.

Es wurden darüber hinaus Expressionsversuche mit den Vektoren pMAL-c2 (New England Biolabs, Frankfurt) und pET-21b bzw. pET-30b (beide Novagen/Merck, Darmstadt) unternommen. Der

Expressionsversuch der hydrophoben Domäne im Vektor pMAL-c2 lag der Idee zugrunde, dass durch Fusion mit dem im Vektor kodierten MBP-Tag (Maltosebindeprotein) die Löslichkeit erhöht und die vermeintliche Toxizität des Proteins herabgesetzt werden sollte. Unter Benutzung dieses Vektors konnte jedoch keine Expression nachgewiesen werden (Gelbild nicht gezeigt). Unter Verwendung der beiden pET-Vektoren war es hingegen möglich, im Bereich des Molekulargewichtes von CHASE-TM (~37 kDa) Proteine spezifisch aufzureinigen (Abb. 22A und B). Da stets drei Proteine im Bereich um 37 kDa gereinigt wurden (mit einem Pfeil markiert) und eine weitere Auftrennung bzw. Aufreinigung nicht möglich war, wurden weitere Experimente, die CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4 in *E. coli* zu (über-)exprimieren, nicht mehr unternommen und ein alternatives Expressionssystem speziell für Membranproteine etabliert (siehe 3.2.2.2).

Ob es sich bei den drei spezifisch angereicherten Proteinen um verkürzte Expressionsprodukte oder um Abbauprodukte der CHASE-TM Domäne handelte, wurde nicht weiter untersucht. Des Weiteren ist an dieser Stelle anzumerken, dass ein Nachweis der Proteinexpression auch mittels Immunoblot gegen den fusionierten His-Tag nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

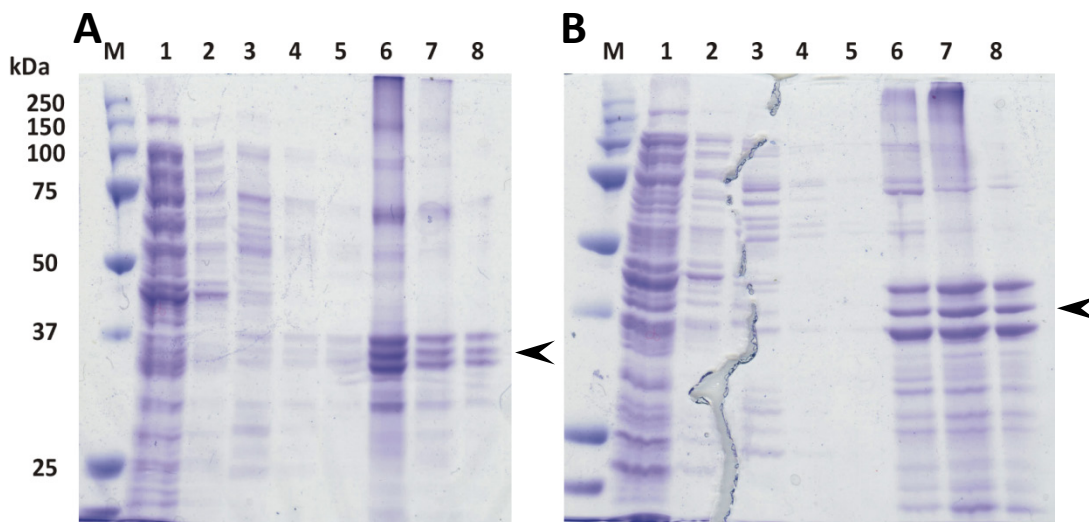


Abbildung 22: Expressionsversuch der CHASE-TM Domäne mit den Vektoren pET-21b bzw. pET-30b in *E. coli*. Die Expression der Domäne in pET-21b (A) bzw. pET-30b (B) wurde mit 1 mM IPTG bei 30°C für 16 h in *E. coli* (BL21) induziert. Das Gesamtzelllysate wurde einer Ni-NTA Reinigung unterzogen. Jeweils 10 µl vom Durchfluss (1), von vier Waschfraktionen (2-5), zwei Elutionen (6,7) und von den aufgekochten Ni-NTA Beads (8) wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. 5 µl *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) wurden parallel mit aufgetragen (M). Ein Pfeil markiert jeweils spezifisch angereicherte Proteinbanden.

3.2.2.2 Das zellfreie System ermöglicht eine präparative native Expression der CHASE-TM Domäne

Die im obigen Abschnitt beschriebene Problematik bei der Expression der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4 aufgrund einer vermeintlichen Toxizität des Proteins in *E. coli* machte die Etablierung eines anderen Expressionssystem notwendig, um die gewünschte Proteinmenge für Strukturanalyseversuche zu erreichen. Hierbei machten wir uns die zellfreie Expression basierend auf einem bakteriellen ribosomalen Extrakt zunutze (siehe 2.2.2.6). Ein entscheidender Vorteil dieses „offenen“ Systems gegenüber zellbasierten System ist der, dass Membranproteine durch den Zusatz eines geeigneten Detergenzes nativ in Lösung exprimiert werden können, ohne dass sie aus einer Zellmembran nachträglich herausgelöst werden müssen.

Um die Anwendbarkeit dieser Technik auf CHASE-TM zu überprüfen, wurde zunächst der Vektor pDEST17 benutzt. Darüber hinaus war es notwendig, einen Detergenzscreen durchzuführen, um ein geeignetes Agenz zu identifizieren, welches zum einen die Expression generell nicht negativ beeinflusste und zum anderen eine möglichst vollständige Expression der hydrophoben Domäne im löslichen Zustand gewährleistete.

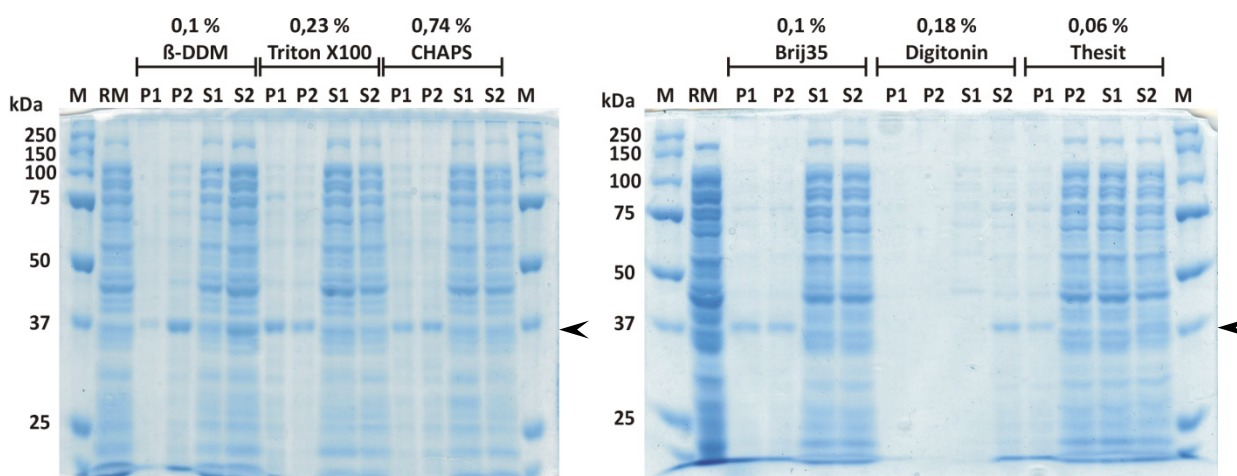


Abbildung 23: Detergenzscreen I für die lösliche Expression der CHASE-TM Domäne im zellfreien System. Unter Zugabe der Detergenzien β -DDM, Triton X-100, CHAPS, Brij35, Digitonin und Thesit zum Reaktionsgemisch wurde die Domäne (zuvor in pDEST17 kloniert) im analytischen Maßstab (70 μ l) bei 30°C für 16 h exprimiert (siehe 2.2.2.6) und jeweils 1 μ l vom gebildeten Präzipitat (P) und vom löslichen Überstand (S) mittels einer SDS-PAGE analysiert. Das Reaktionsgemisch zum Zeitpunkt $t=0$ h diente als Kontrolle. Alle Ansätze wurden als Duplikat ausgeführt. 5 μ l *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) wurden als Größenstandard aufgetragen (M). Ein Pfeil markiert die Bandenhöhe für CHASE-TM.

Hierfür wurden diverse nicht-ionische (n-Dodecyl- β -D-maltosid (β -DDM), Digitonin, n-Octyl- β -D-glucopyranosid (β -OG), Lauryl-dimethylamin-n-oxid (LDAO), Triton X-100, Thesit sowie

verschiedene Brij Detergenzien), ein zwitterionisches (CHAPS) und ein industrielles Detergenz (Tego-Betain F) getestet. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen richteten sich nach Klammt *et al.* (2005). In den ersten Tests zeigte sich bereits, dass die CHASE-TM Domäne mit diesem System exprimiert werden konnte. Bei Anwendung der Detergenzien β -DDM, Triton X-100, CHAPS und Brij35 konnte eine prominente Bande mittels SDS-PAGE bei 37 kDa detektiert werden, jedoch zum größten Anteil wenn nicht sogar vollständig im Präzipitat (Abb. 23, jeweils P1 bzw. P2, Bandenhöhe mit einem Pfeil markiert). Im löslichen Überstand war im Vergleich zur Kontrolle (RM) höchstens eine schwache Bande bei gleichem Molekulargewicht zu beobachten. Mit 0,18% Digitonin war hingegen das entsprechende Protein im Überstand nachweisbar (Abb. 23, 0,18% Digitonin, S2), wobei generell die Expression schwächer zu sein schien als bei Zugabe von β -DDM oder Triton X-100 zum Reaktionsansatz. Thesit erwies sich als weitgehend ungeeignet für die Expression der CHASE-TM Domäne.

In einem weiteren Screen wurden zusätzlich die Detergenzien β -OG, Tego-Betain F und LDAO im Hinblick auf ihre Eigenschaften für die Expression und Löslichkeit der Domäne untersucht. Alle drei Substanzen erwiesen sich als ungeeignet. Entweder wurde die Expression komplett durch die Zugabe unterdrückt, oder das Protein wurde als unlösliches Präzipitat gebildet (Gelbild nicht gezeigt).

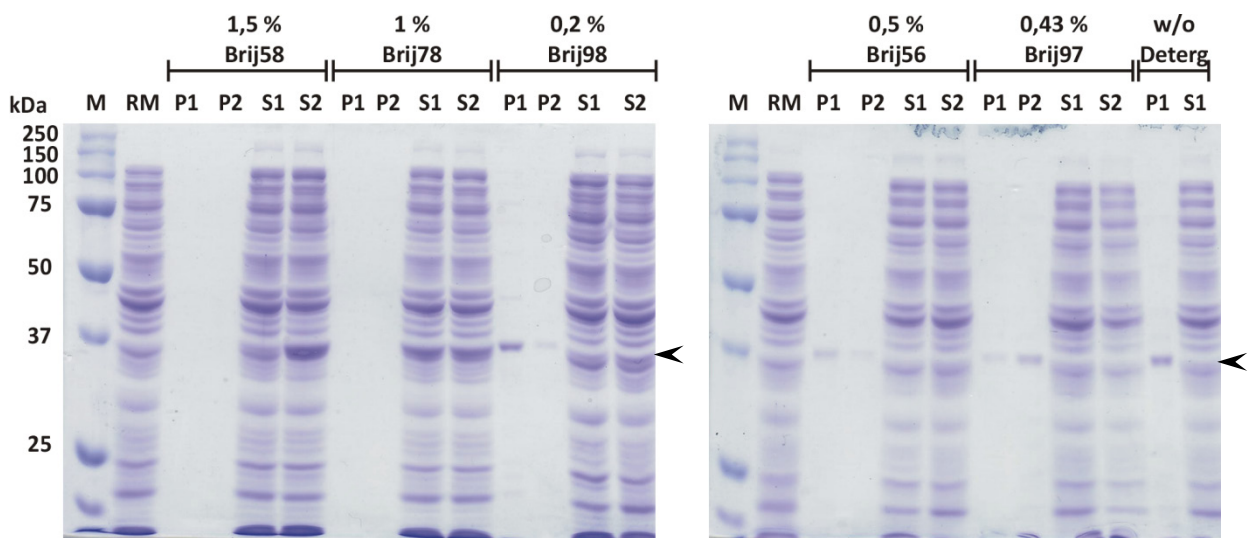


Abbildung 24: Detergenzscreen II für die lösliche Expression der CHASE-TM Domäne im zellfreien System. Unter Zugabe der Detergenzien Brij58, Brij78, Brij98, Brij56 und Brij97 zum Reaktionsgemisch bzw. ohne Detergenz (w/o Deterg) wurde die Domäne (zuvor in pDEST17 kloniert) im analytischen Maßstab (70 μ l) bei 30°C für 16 h exprimiert (siehe 2.2.2.6) und 1 μ l vom gebildeten Präzipitat (P) und vom löslichen Überstand (S) mittels einer SDS-PAGE analysiert. Das Reaktionsgemisch zum Zeitpunkt $t=0$ h diente als Kontrolle. Alle Ansätze wurden als Duplikat ausgeführt. 5 μ l *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) wurden als Größenstandard aufgetragen (M). Ein Pfeil markiert die Bandenhöhe für CHASE-TM.

In zusätzlichen Expressionsanalysen kristallisierte sich die Gruppe der Brij Detergenzien als besonders zweckdienlich heraus. Bereits Klammt *et al.* (2005) hatten diese Detergenzien als außerordentlich geeignet für die native Expression membranständiger Proteine im zellfreien System beschrieben. Besonders unter Zugabe von Brij58 und Brij78 zur Reaktion wurde das CHASE-TM Protein praktisch vollständig in Lösung exprimiert, wohingegen unter Anwendung von Brij56, Brij97 und Brij98 stets eine eindeutige Bande im Präzipitat bei 37 kDa nachgewiesen werden konnte (Abb. 24). Bemerkenswert war hierbei, dass selbst sehr hohe Konzentrationen dieser Substanzen (100-200x cmc, *critical micelle concentration*) von der Transkriptions- und Translationsmaschinerie des bakteriellen Extraktes toleriert wurden.

Aufgrund der bereits erzielten Ergebnisse, wurden die folgenden Expressionsversuche der CHASE-TM Domäne nur noch unter Zugabe des Detergenz Bri58 vorgenommen, da es sich als das geeignetste von allen getesteten Detergenzien herausstellte. Es gewährleistete eine adäquate und zugleich vollständige Expression der Domäne in Lösung.

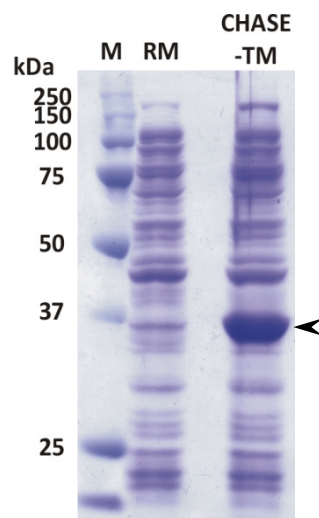


Abbildung 25: Optimierte zellfreie Expression der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4 im löslichen Zustand. Unter Verwendung des Vektors pIVEX2.3 und mit S30 Extrakt, der aus dem Stamm Rosetta2 präpariert worden war, wurde die Domäne mit 1,5% Brij58 im präparativen Zustand (1 ml) bei 30°C für 16 h exprimiert (siehe 2.2.2.6). 1 µl des Proteins bzw. des Reaktionsgemisches zum Zeitpunkt t= 0 (RM) als Kontrolle wurden mittels einer SDS-PAGE analysiert. 5 µl *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) wurden als Größenstandard aufgetragen (M). Ein Pfeil markiert die CHASE-TM Domäne.

Um das Expressionsniveau der CHASE-TM Domäne weiter zu verbessern, wurde der Einfluss des verwendeten Expressionsvektors und des für die Herstellung des S30 Extraktes benutzten *E. coli* Stammes untersucht. Durch Klonierung der kodierenden Region in den für *in vitro* Expression etablierten Vektor pIVEX2.3 (Roche, Mannheim) sowie durch Verwendung des Stammes Rosetta2

(siehe Tab. 3) war es möglich, die Expression des Proteins zu maximieren und damit eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Strukturanalyse zu erfüllen. Im Vergleich zu den ersten Analysen konnte die Expression auch im präparativen Maßstab (1 ml) letztendlich um einen Faktor von 5-10 gesteigert werden (Abb. 25, markiert mit einem Pfeil). Alle weiteren Expressionsansätze für die anschließende Aufreinigung der Domäne wurden anhand der hier beschriebenen Resultate vorgenommen.

3.2.2.3 Die CHASE-TM Domäne kann im nativen Zustand mit dem Detergenz β -DDM zu hoher Reinheit gebracht werden

Neben einer starken Expression war eine zweite Voraussetzung für nachfolgende Analysen, dass das Protein im nativen Zustand zu hoher Reinheit gebracht werden konnte. Hierfür wurde standardmäßig eine Affinitätsreinigung über den am C-terminalen Ende der Domäne fusionierten His-Tag durchgeführt. Um den nativen Zustand der in Lösung exprimierten Domäne im Zuge der Reinigung zu bewahren, wurde zunächst allen Puffern 0,5% Brij58 zugesetzt und die Reinigung über eine HisTrap Säule (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt (siehe 2.2.2.8).

Im resultierenden Chromatogramm (Abb. 26A) waren zwei prominente Elutionspeaks bei einer Konzentration an Eluent (Imidazol) von 10% (Peak 1) respektive 50% (Peak 2) sichtbar. Jedoch wies der Peak bei 50 % Eluent, eine gewisse Unschärfe auf, was entweder auf eine verminderte Reinheit des gewünschten Proteins infolge von koelutierenden Fremdproteinen oder auf einen negativen Einfluss des Detergenz auf die Trennung vermuten ließ. Die Fraktionen 2 bzw. 8-20 wurden einer SDS-PAGE unterworfen, um die Reinheit der CHASE-TM Domäne zu überprüfen. In allen getesteten Fraktionen war eine Proteinbande bei ~37 kDa für die Domäne nachweisbar, wobei deren Intensität in den zum zweiten Peak zugehörigen Fraktionen (15-18) deutlich zunahm (Abb. 26B, markiert mit einem Pfeil). Jedoch wurden in diesen Fraktionen auch eine größere Anzahl weiterer Proteine sowohl größeren als auch kleineren Molekulargewichtes koeluiert, die neben Fremdproteinen (aus *E. coli*) auch Abbauprodukte der Domäne ausmachen konnten. Somit wurde durch die Affinitätschromatographie unter diesen Bedingungen nur eine Reinigung von schätzungsweise 50-70 % erzielt, was einen weiteren Reinigungsschritt notwendig machte.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie über eine Gelfiltrationssäule durchgeführt (siehe 2.2.2.8). Hierfür wurden die Fraktionen 15-18 aus der vorherigen Affinitätsreinigung gepoolt und auf die Säule appliziert. Im Zuge dieses Reinigungsschrittes wurde zudem auf einen für mögliche Kristallisationsansätze geeigneteren Tris-Puffer (20 mM) mit einer geringen Konzentration an Brij58 (2x cmc) gewechselt. Trotz der nachgewiesenen Verunreinigungen war im Chromatogramm nur ein breiter Peak zwischen 42 und 56 ml sichtbar, was auf eine Koelution verschiedener Proteine hindeutete (Abb. 27A).

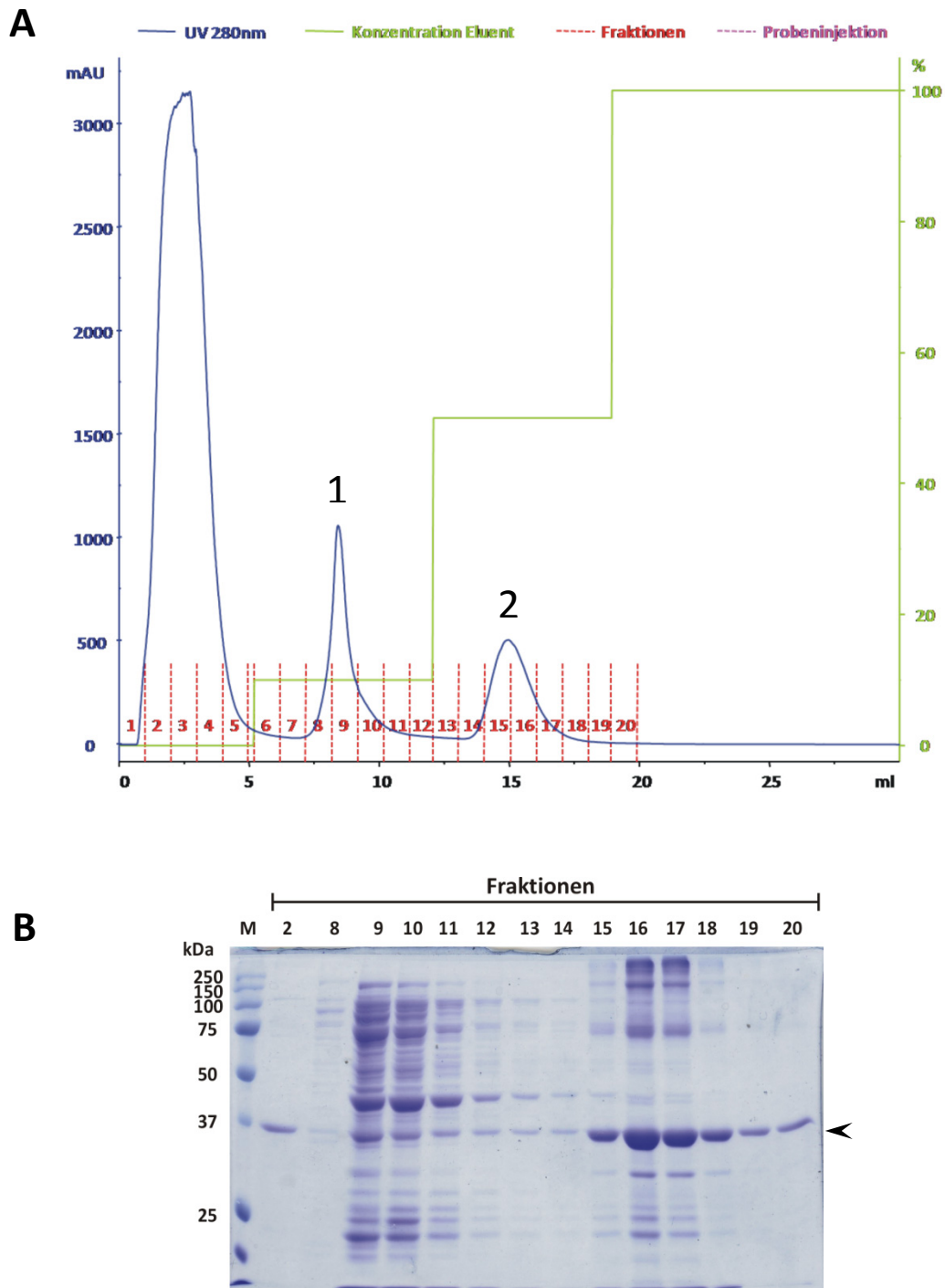


Abbildung 26: **Native Reinigung der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4.** (A) Die zellfrei exprimierte CHASE-TM Domäne wurde in Gegenwart von 0,5% Brij58 einer Affinitätsreinigung über einen C-terminalen His-Tag unterzogen. Im Chromatogramm sind die Absorption bei 280 nm (—UV 280nm) und die Imidazolkonzentration in % (—Konzentration Eluent) gegen das Volumen (ml) aufgetragen. Für die Elution wurde ein Imidazolgradient mit Stufen von 0, 10, 50 und 100% angewandt. Die Fraktionen sind durch rote gestrichelte Linien markiert. Für weitere Informationen bezüglich Pufferbedingungen siehe 2.2.2.8. (B) Jeweils 10 μ l ausgewählter Fraktionen der Affinitätsreinigung (2 und 8-20) wurden einer 10%igen SDS-PAGE unterzogen. 5 μ l *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) dienen als Größenstandard (M). Ein Pfeil markiert die Bandenhöhe der CHASE-TM Domäne.

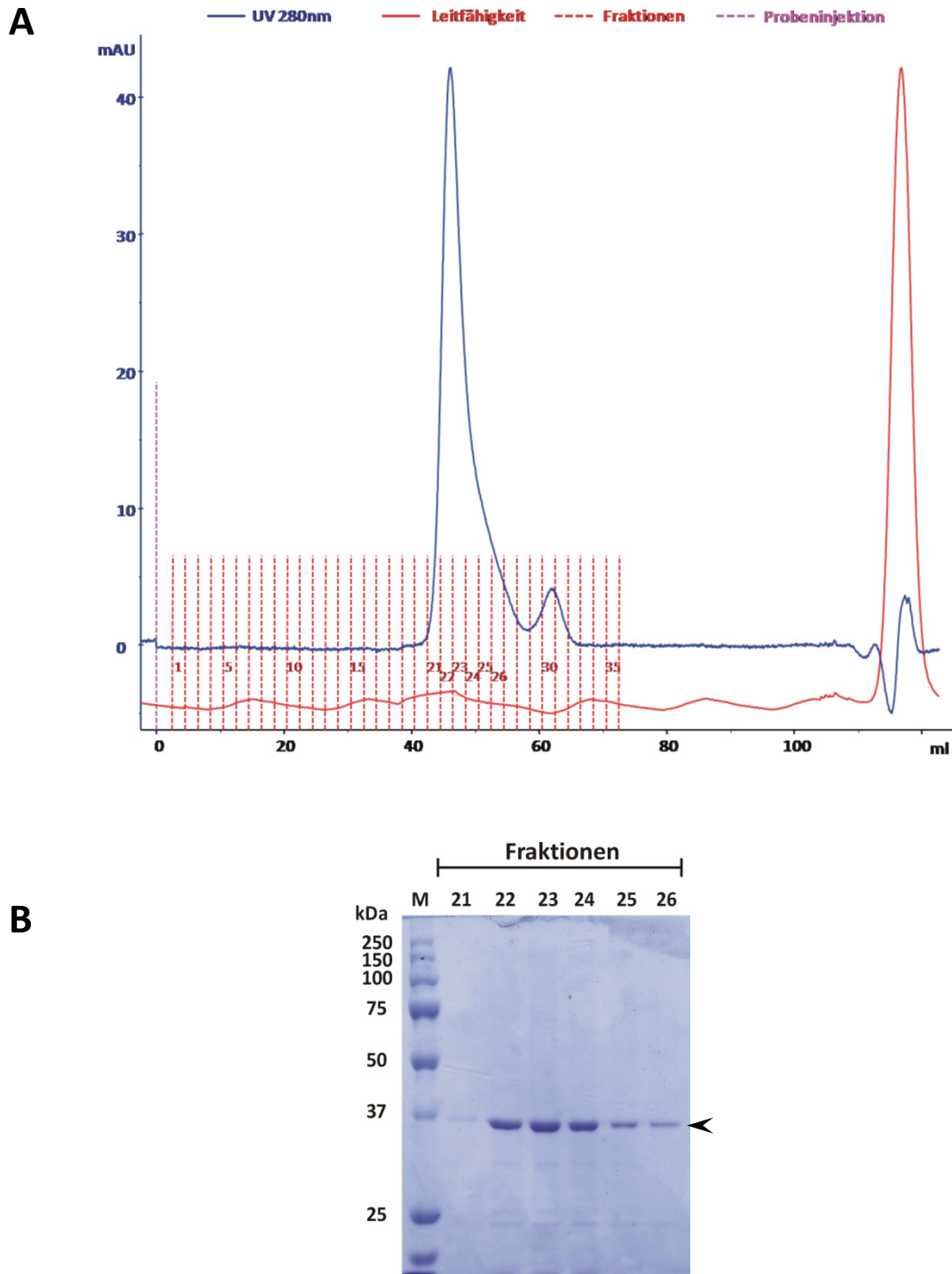


Abbildung 27: Größenausschlusschromatographie der affinitätsgereinigten CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4. Die Fraktionen 15-18 der Affinitätsreinigung (Abb. 26B) wurden gepoolt und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (siehe 2.2.2.8). Als Puffer wurde 20 mM Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl, 0,017% Brij58 benutzt. (A) Im Chromatogramm ist die Absorption bei 280 nm (—UV 280nm) gegen das Volumen (ml) aufgetragen. Die Fraktionen sind durch rote gestrichelte Linien markiert. (B) Jeweils 10 μ l ausgewählter Fraktionen der Gelfiltration (21-26) wurden einer 10%igen SDS-PAGE unterzogen. 5 μ l *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) dienten als Größenstandard (M). Ein Pfeil markiert die Bandenhöhe der CHASE-TM Domäne.

Im nachfolgenden SDS-Gel konnten in den entsprechenden Fraktionen neben der Bande für die CHASE-TM Domäne bei 37 kDa weitere schwache Banden vor allem geringeren Molekulargewichtes nachgewiesen werden, was auf Abbauprodukte der Domäne hindeutete (Abb. 27B). Die Fraktionen 22-25 wurden für die sich anschließende Aufkonzentrierung des Proteins verwendet, worauf in Abschnitt 3.3.4 näher eingegangen wird. An dieser Stelle soll nur zum besseren Verständnis erwähnt werden, dass die Domäne unter diesen Pufferbedingungen bereits oberhalb einer Konzentration von ~1 mg/ml begann, Aggregate auszubilden, die präzipitierten.

Aufgrund der Präzipitation unter den zuvor benutzten Bedingungen wurde eine Reinigung mit dem Detergenz β -DDM angestrebt, da dieses u. a. generell für die Kristallisation als geeigneter angesehen wird. Alle Puffer für die Affinitätsreinigung über den His-Tag beinhalteten 0,02% β -DDM, was $2 \times c_{mc}$ entsprach. Hierdurch wurde vermieden, dass ein großer Überschuss an Detergenz zu einer Peakverbreiterung beitrug. Im Gegensatz zur vorherigen Reinigung in Gegenwart von Brij58 wurden außerdem zwei zusätzliche Elutionsstufen bei 5% und 20% Imidazol eingeführt. Durch die zusätzlichen Waschschriffe konnte das Detergenz Brij58 effektiv ausgewaschen und gegen β -DDM auf der Säule ausgetauscht werden. Damit war gewährleistet, dass die CHASE-TM Domäne nach der Elution in β -DDM vorlag.

Im Vergleich zu Abb. 26A waren wiederum zwei ausgeprägte Peaks bei 5% (Abb. 28A, Peak 1) und 50% Imidazol (Abb. 28A bzw. B, Peak 2) zu beobachten, wobei die CHASE-TM Domäne unter diesen Bedingungen wesentlich schärfer eluierte als zuvor mit 0,5% Brij58. Ein weiterer nur schwacher Peak wurde bei 20% Imidazol im Elutionspuffer aufgezeichnet. Im korrespondierenden SDS-Gel war in allen aufgetragenen Fraktionen der Elutionen bei 20% bzw. 50% Imidazol eine Bande bei ~37 kDa deutlich erkennbar (markiert mit einem Pfeil). Dies lässt den Schluss zu, dass die Domäne bei etwa 100 mM Imidazol (20%) begann, zu eluieren.

Insgesamt betrachtet zeigte sich, dass die CHASE-TM Domäne unter diesen Bedingungen in einem schärferen Peak von der Säule eluierte als zuvor, da das Protein erheblich konzentrierter in den Fraktionen 13 und 14 nachgewiesen werden konnte (vergleiche Abb. 26 B und 28 C). Zum anderen wies das Protein eine viel höhere Reinheit auf (> 90%), da vor allem im hochmolekularen Bereich weniger zusätzliche Proteine koeluierten als mit Brij58. Weitere Banden bei <37 kDa waren hingegen weiterhin gut nachzuweisen, die vermutlich auf ein bestimmtes Maß an Degradation oder verkürzte Expressionsprodukte zurückzuführen waren.

Neben diesem Reinigungsschritt wurden keine Gelfiltration mehr vorgenommen, da ein zusätzlicher Reinigungseffekt nicht beobachtet werden konnte. Auch nach Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) waren stets noch Proteine vor allem kleineren Molekulargewichtes als der CHASE-TM Domäne nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

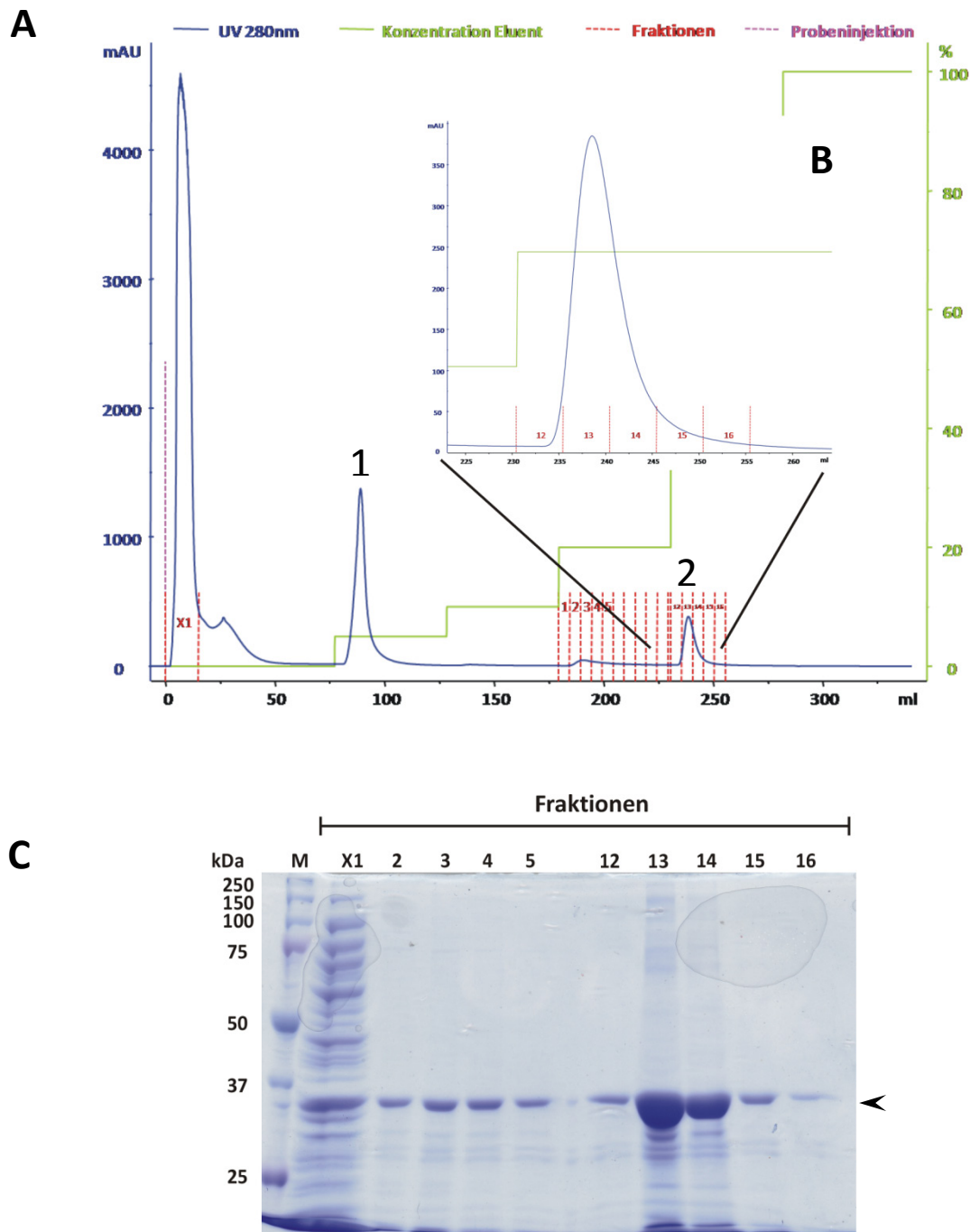


Abbildung 28: Optimierte native Reinigung der CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4. Die zellfrei exprimierte CHASE-TM Domäne wurde in Gegenwart von 0,02 % β -DDM einer Affinitätsreinigung über einen C-terminalen His-Tag unterzogen. (A) Im Chromatogramm sind die Absorption bei 280 nm (— UV 280nm) und die Imidazolkonzentration in % (— Konzentration Eluent) gegen das Volumen (ml) aufgetragen. Für die Elution wurde ein Elutionsgradient mit Stufen von 0, 5, 10, 20, 50 und 100% Imidazol angewandt. Die Fraktionen sind durch rote gestrichelte Linien markiert. Für weitere Informationen bezüglich Pufferbedingungen siehe 2.2.2.8. (B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von (A). (C) Jeweils 10 μ l ausgewählter Fraktionen der Affinitätsreinigung (X1, 2-5, 12-16) wurden einer 10%igen SDS-PAGE unterzogen. 5 μ l *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) dienen als Größenstandard (M). Ein Pfeil markiert die Bandenhöhe der CHASE-TM Domäne.

3.2.3 Experimente zur Expression des Volllängenrezeptors CRE1/AHK4

Es wurde außerdem überprüft, ob der vollständige Rezeptor CRE1/AHK4 in *E. coli* oder im zellfreien System im größeren Maßstab exprimiert werden kann, da neben der Ligandenbindung mögliche strukturelle durch die Bindung verursachte Veränderungen im cytoplasmatischen Bereich des Rezeptors nur bei einer kompletten räumlichen Struktur nachgewiesen werden könnten.

Wie schon für die CHASE-TM Domäne wurde zunächst der Vektor pDEST17 verwendet und die Expression im *E. coli* Stamm BL21 bei 37°C, 30°C und RT getestet. Es wurde mit 0,1, 1 und 5 mM IPTG induziert und nach 2 h, 4 h und 20 h (37°C und 30°C) bzw. 15 h und 18 h (RT) Proben auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 29).

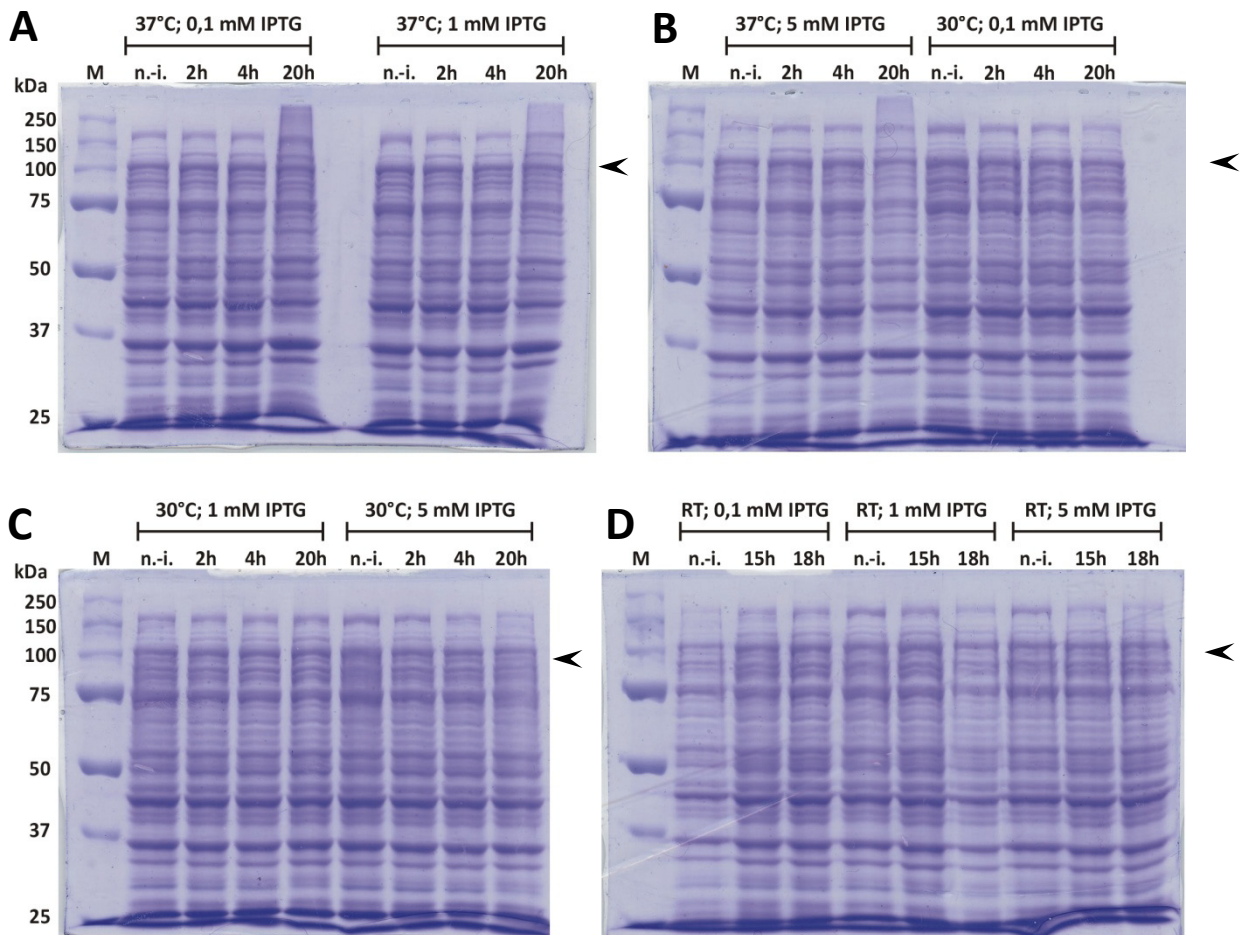


Abbildung 29: Expressionsversuche des Rezeptors CRE1/AHK4 in *E. coli*. Die cDNA des Rezeptors (3240 bp) wurde in pDEST17 kloniert und die Expression mit 0,1, 1 und 5 mM IPTG für 20 h bei 37°C, 30°C bzw. RT in *E. coli* (BL21) induziert (siehe 2.2.2.4). Proben für ein SDS-Gel wurden zum Zeitpunkt der Induktion (n.-i.) und zu den angegebenen Zeitpunkten genommen. Jeweils 1 ml der Kultur wurde abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl 5x SDS-Probenpuffer aufgekocht. 25 µl der Probe wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. 5 µl *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) dienen jeweils als Größenstandard (M). Ein Pfeil markiert jeweils die vermutliche Bande für CRE1/AHK4.

Unter keiner der getesteten Bedingungen war eine starke Bande zwischen 100 und 150 kDa für den Vollängenrezeptor (~125 kDa) nach Induktion zu erkennen. Jedoch konnte eine schwache zusätzliche Bande im Vergleich zur jeweiligen nicht-induzierten Kontrolle bei ~125 kDa in allen induzierten Proben nachgewiesen werden, die vermeintlich auf CRE1/AHK4 zurückzuführen war (Abb. 29, markiert mit einem Pfeil). Bei 37°C schien diese im Vergleich aller Proben am stärksten zu sein (Abb. 29A). Wie schon bei den Expressionsversuchen mit der CHASE-TM Domäne hatten andere Parameter wie z. B. der benutzte *E. coli* Stamm keinen Einfluss auf die Expressionsstärke.

Es wurde außerdem, wie bereits für die CHASE-TM Domäne beschrieben, eine Fraktionierung der Bakterienzellen in cytosolische bzw. unlösliche und lösliche Membranproteine nach Induktion mit 0,1 mM IPTG bei RT über Nacht durchgeführt. Aus der löslichen Membranfraktion (+ β -DDM) sollte mittels Ni-NTA Spinsäulen (Qiagen, Hilden) der Rezeptor gereinigt und über seinen fusionierten His-Tag mit einem Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 30). Auf dem entsprechenden SDS-Gel und auch nach Immunoblotting wurde keine CRE1/AHK4 spezifische Bande detektiert, was vermutlich auf einen toxischen Effekt des Proteins für *E. coli* zurückzuführen ist.

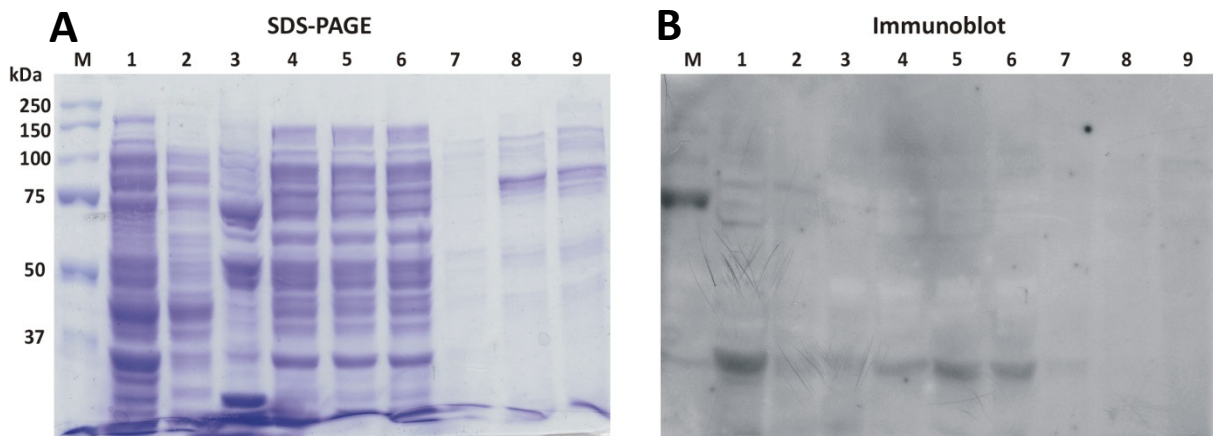


Abbildung 30: Fraktionierung von Bakterienzellen und Ni-NTA Reinigung der löslichen Membranfraktion nach Expression des Rezeptors CRE1/AHK4. Die Expression wurde mit 0,1 mM IPTG über Nacht in *E. coli* (BL21) induziert (siehe 2.2.2.4) und im Anschluss eine Fraktionierung der Zellen in Zelltrümmer (1), cytosolische (2) und Membranproteine durch Ultrazentrifugation durchgeführt. Mit 1% β -DDM wurden die unlöslichen (3) von den löslichen Membranproteinen (4) separiert und die löslichen Membranproteine anschließend einer Ni-NTA Reinigung mit Spinsäulen unterzogen. Die Gelspuren 5-9 zeigen den Durchfluss (5), zwei Waschschritte (6,7) sowie zwei Elutionen der an die Säulen gebundenen Proteine (8,9). Von jeder Fraktion wurden 10 μ l mittels einer SDS-PAGE analysiert (A) und parallel ein zweites Gel geblottet und eine Immunodetektion mit einem His-spezifischen Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) durchgeführt (B). 5 μ l *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) dienten jeweils als Größenstandard (M).

Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor schon für die CHASE-TM Domäne gemacht (vergleiche 3.2.2.1). Diese Annahme wurde zudem durch die Tatsache gestützt, dass die Expressionskultur nach Induktion mit IPTG an Zelldichte verlor. (von $\sim 0,7$ nach 2 h Induktion auf $< 0,4$ nach 20 h Induktion bei 30°C oder RT).

Abschließend wurde die Expression des Rezeptors außerdem im zellfreien System untersucht. Beispielhaft zeigt Abb. 31 einen Detergenzscreen für den Versuch, eine lösliche Expression des Proteins zu erzielen. Unter den abgebildeten Bedingungen war es möglich den Rezeptor (~ 125 kDa) generell zu exprimieren (Abb. 31, markiert mit einem Pfeil), jedoch war sowohl mit den gezeigten (Brij35, Digitonin und Thesit) als auch mit anderen getesteten Detergenzien keine oder nur eine marginale lösliche Expression des Proteins möglich sondern nur Expression als Präzipitat nachweisbar. Aufgrund der negativen Ergebnisse wurden keine weitere Expressionsversuche mit dem Vollängenprotein unternommen und weitere Analysen auf die CHASE-TM Domäne beschränkt.

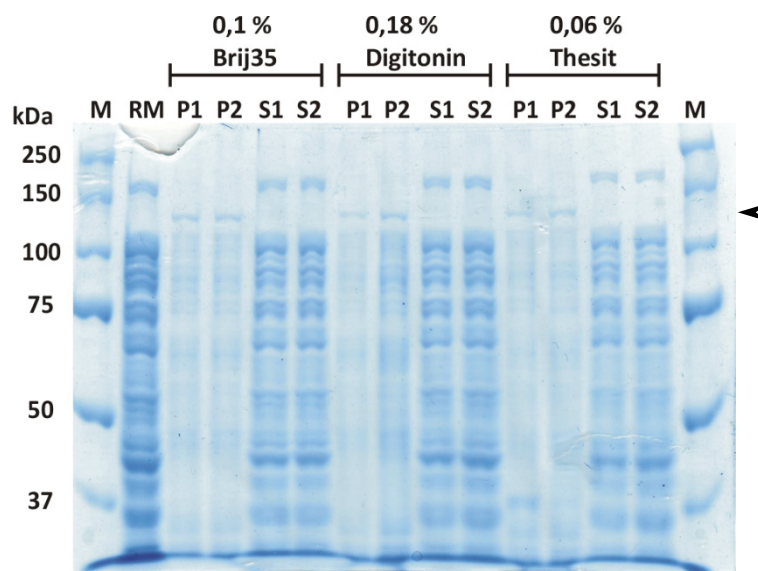


Abbildung 31: Detergenzscreen für die lösliche Expression des Rezeptors CRE1/AHK4 im zellfreien System. Unter Zugabe der Detergenzien Brij35, Digitonin und Thesit zum Reaktionsgemisch wurde das Protein (zuvor in pDEST17 kloniert) im analytischen Maßstab ($70 \mu\text{l}$) bei 30°C für 16 h exprimiert (siehe 2.2.2.6) und $1 \mu\text{l}$ vom gebildeten Präzipitat (P) und vom löslichen Überstand (S) auf ein 10%iges SDS Gel aufgetragen. Das Reaktionsgemisch zum Zeitpunkt $t = 0$ h diente als Kontrolle. Alle Ansätze wurden als Duplikat ausgeführt. $5 \mu\text{l}$ Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, München) dienen als Größenstandard (M). Ein Pfeil markiert die Bandenhöhe für CRE1/AHK4.

3.2.4 Magnifektion als mögliches alternatives Proteinexpressionssystem

Neben dem zellfreien System wurde die Magnifektion als ein zweites, auf Pflanzen basierendes Proteinexpressionssystem, das virale Vektoren nutzt, im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Eine kurze

theoretische Erläuterung dieser Methode findet sich in Abschnitt 2.2.2.5. Durch die transiente Expression eines *Arabidopsis*-Proteins in einer anderen Pflanzenspezies (*N. benthamiana*) sollten mögliche toxische Effekte einer Überexpression, die zuvor in *E. coli* beobachtet worden waren, überwunden und zugleich alle notwendigen pflanzenspezifischen post-translationalen Proteinmodifikationen bereitgestellt werden.

Um das System generell zu testen, wurde zunächst die Expression des Proteins GFP analysiert. Unter UV-Licht betrachtet, zeigte ein mit dem Kontrollplasmid (für GFP-Expression) infiltrierte Blatt bereits 7 Tage nach der Infiltration (7 dpi) aufgrund der systemischen Expression von GFP blattübergreifende Fluoreszenz (Abb. 32A und B). Nicht-infiltrierte Blätter fluoreszierten hingegen nicht (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob das System auf CRE1/AHK4 anwendbar war. Es wurden Blätter mit Konstrukten für die Expression der CHASE bzw. der CHASE-TM Domäne infiziert. 12 dpi wurde an diesen Pflanzen ein starker Phänotyp im Vergleich zu nicht infiltrierte Kontroll- (Abb. 32C) und GFP Kontrollpflanzen (Abb. 32D) beobachten.

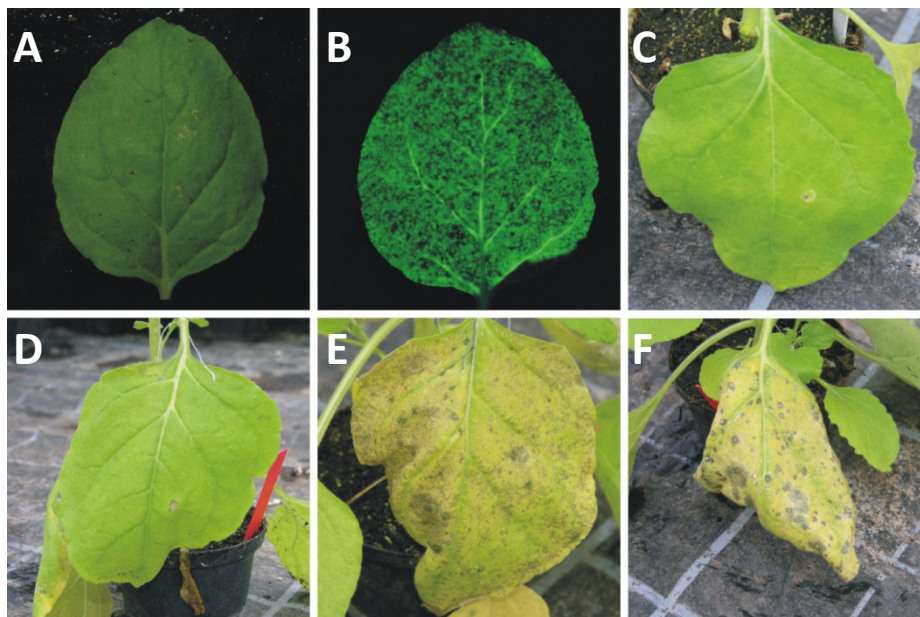


Abbildung 32: Test auf Überexpression von GFP bzw. der CHASE und der CHASE-TM Domäne mittels Magnifikation in *N. benthamiana*. Tabakpflanzen wurden entsprechend 2.2.2.5 mit Konstrukten für die Expression von GFP (A, B, D), CHASE (E) und CHASE-TM (F) infiziert und 12 Tage nach der Infiltration (12 dpi) dokumentiert. Zudem wurde ein mit GFP infiltrierte Blatt 7 dpi unter UV-Licht betrachtet, um GFP-Fluoreszenz sichtbar zu machen (B). Eine nicht-infiltrierte Pflanze (C) diente als Vergleich zu den infiltrierte Pflanzen. (C) – (F) wurden von A. Pfeifer angefertigt.

Die Blätter für CHASE (Abb. 32E) und CHASE-TM (Abb. 32F) zeigten eine starke Gelbfärbung gekoppelt mit der Ausbildung von zahlreichen dunklen Flecken (Nekrosen). Hierbei ist zudem

anzumerken, dass erste Symptome bei den entsprechenden Pflanzen bereits etwa 3-4 dpi zu beobachten waren. Hingegen zeigten trotz der ausgeprägten Überexpression von GFP die entsprechenden Kontrollpflanzen auch 12 dpi keinerlei Symptomatik z. B. im Hinblick auf Chlorophylldegradation, die bei den mit den anderen Konstrukten (für CHASE und CHASE-TM) infiltrierten Pflanzen beobachtet worden war.

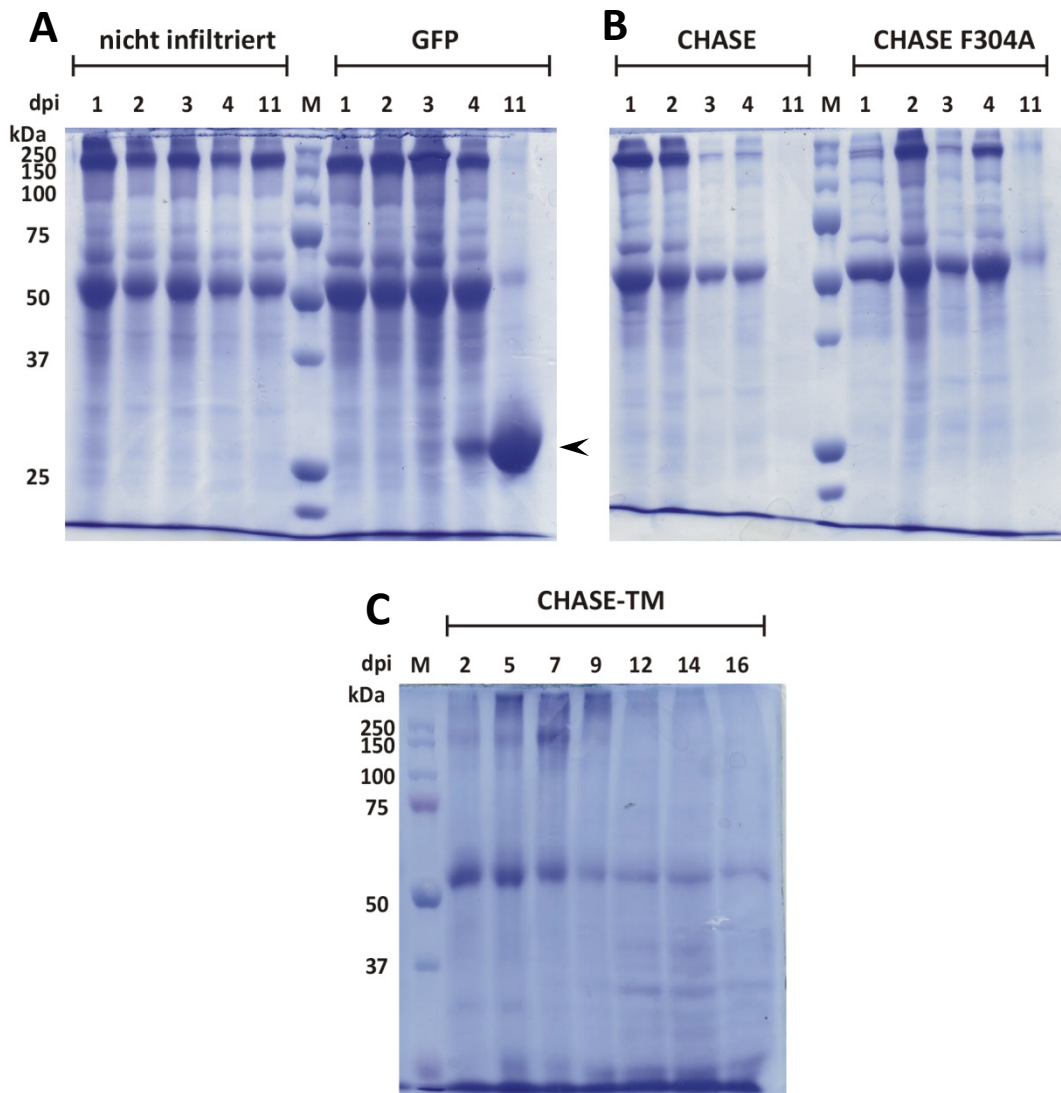


Abbildung 33: Experiment zur Überexpression von GFP bzw. der CHASE, der CHASE F304A und der CHASE-TM Domäne mittels Magnifektion in *N. benthamiana*. Tabakpflanzen wurden entsprechend 2.2.2.5 mit Konstrukten für die Expression von GFP (A, markiert mit einem Pfeil), CHASE (B), der nicht bindenden Mutante CHASE F304A (B) und CHASE-TM (C) infiltriert. Eine nicht infiltrierte Pflanze diente als Vergleichskontrolle für die Expression (A). Zu den angegebenen Tagen (dpi) wurden aus den infiltrierten Blättern Blattscheiben ausgestanzt, zerschreddert und mit 5x SDS-Probenpuffer (+ 8M Harnstoff) aufgeköcht. Die isolierten Gesamtproteine wurden mittels einer SDS-PAGE analysiert. 5 µl *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad, München) dienen jeweils als Größenstandard (M). Ein Pfeil markiert die Proteinbande für GFP.

Nach der Infiltration wurden an definierten Tagen Blattproben entnommen und die isolierten Gesamtproteine in einem SDS-Gel aufgetrennt, um einen direkten Nachweis über eine mögliche Expression zu erhalten. Hierbei wurde neben den bereits erwähnten Proteinen außerdem die nichtbindende CHASE Mutante F304A mit in das Experiment eingeschlossen (vergleiche Abb. 13). Insgesamt betrachtet ergab sich anhand dieser Analyse ein ähnliches Gesamtbild, verglichen mit dem oben beschriebenen Phänotyp. Die starke Expression von GFP (~27 kDa), zu beobachten 11 dpi (Abb. 33A, markiert mit einem Pfeil), korrespondierte sehr gut zur blattübergreifenden Fluoreszenz unter UV-Licht. Bemerkenswerterweise war, dass zu diesem Zeitpunkt die intrinsischen Proteine wie z. B. die große Untereinheit der RuBisCO (~53 kDa) stark herab reguliert worden waren, obwohl die Pflanze keinen offensichtlichen Phänotyp aufwies (Abb. 32D). Für die CHASE bzw. CHASE-TM Domäne war hingegen keine Expression auf dem SDS-Gel nachweisbar. Vielmehr hatte ein fast vollständiger Proteinabbau der intrinsischen Proteine nach 11 bzw. 12 Tagen stattgefunden (Abb. 33B und C), was sich auch in der starken Gelbfärbung bzw. Nekrosenbildung der entsprechenden Blätter widerspiegelte. Der beobachtete Proteinabbau begann zudem schon zwei Tage nach Infiltration, was womöglich auf eine starke Toxizität der beiden Proteine zurückzuführen ist. Selbst die als nicht funktionell identifizierte Mutante CHASE F304A erwies sich als ein für die Magnifikation ungeeignetes Protein, da auch in diesem Fall eine fast vollständige Proteindegradation zu beobachten war.

3.3 Charakterisierung der affinitätsgereinigten CHASE-TM Domäne von CRE1/AHK4

Im folgenden Abschnitt werden alle Ergebnisse der mit der gereinigten CHASE-TM Domäne vorgenommenen Analysen dargelegt. Zu diesen gehören die eindeutige massenspektrometrische Identifizierung, der Nachweis einer Sekundärstruktur und die Bestätigung der Funktionalität des Proteins durch den Beleg für eine spezifische Cytokininbindung. Überdies wird auf die bisherigen Resultate der jedoch als vorläufig zu betrachtenden Untersuchungen zur Lösung der räumlichen Struktur der Domäne eingegangen. Der Schwerpunkt liegt hierbei verstärkt auf der Beschreibung der Problematik auf dem Weg zur 3D Struktur eines membranständigen Proteins.

3.3.1 Identifizierung des gereinigten Proteins mittels MALDI-Massenspektrometrie

Um experimentell abzusichern, dass es sich zum einen bei dem weitgehend gereinigten Protein (siehe Abb. 28B, markiert mit einem Pfeil) tatsächlich um die CHASE-TM Domäne handelte und zum anderen die Identität der im Zuge der Affinitätsreinigung stets mit aufgereinigten anderen Proteine abzuklären, wurde eine MALDI-MS Analyse vorgenommen. Hierfür wurden nach einer repräsentativen Reinigung der Domäne sechs Proteinbanden verschiedenen Molekulargewichtes aus

einem 10%igen SDS-Gel wie in 2.2.3.1 beschrieben eluiert. Neben der stärksten Bande für die CHASE-TM Domäne bei ~37 kDa (Abb. 27, Bande 4) wurde zwei weitere Proteine geringeren (zwischen > 25 kDa, 5 und 6) und drei Proteine größeren Molekulargewichtes (1-3) analysiert.

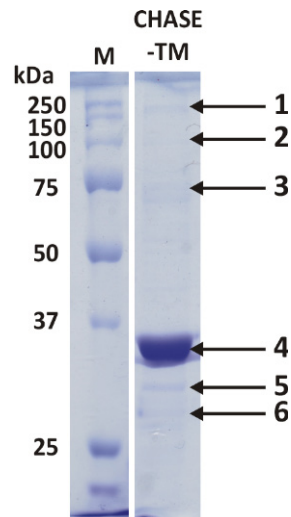


Abbildung 34: Proteinbanden, die nach nativer Reinigung der CHASE-TM Domäne massenspektrometrisch charakterisiert wurden. Nach Reinigung der Domäne zusätzlich detektierte Proteine wurden aus einem 10%igen SDS-Gel wie in 2.2.3.1 beschrieben eluiert und anschließend einer MALDI-MS Analyse unterzogen. Alle isolierten Proteinbanden sind mit einem nummerierten Pfeil markiert.

Die Messungen ergaben zunächst einmal, dass in allen sechs Proben die CHASE-TM Domäne vorhanden war, da ein Datenbankabgleich für alle Proben mit Ausnahme von Probe 2 als beste und statistisch signifikante Zuordnung „Cytokininrezeptor CRE1/AHK4 aus *A. thaliana*“ ergab. Die Qualität des Spektrums für Probe 2 war durch Keratinverunreinigung (z. B. aus Hautschuppen) stark verringert und ergab daher eine Abweichung von den anderen Spektren.

Die Peptidmassen, die CRE1/AHK4 zugeordnet werden konnten, waren 1734, 1751 und 1812 (m/z) (Abb. 35, jeweils markiert mit einem Pfeil). Diese Massen korrespondierten zu den Aminosäurepositionen 369-383 (YDITNASDPLVMYG), 191-206 (STFHYHKNPSAIDQET) und 175-190 (QFSVSVNHVHALAILV) im Rezeptor. Da mit diesen drei Peptiden sowohl der Beginn als auch das Ende der CHASE-TM Domäne (siehe Abb. 8, Aminosäure 130-442) gut abgedeckt waren, konnte gefolgert werden, dass zumindest in vier von sechs analysierten Proben (1, 3-5) mit hoher Wahrscheinlichkeit die vollständige Domäne vorlag. Gestützt wurde diese Annahme durch die Tatsache, dass diese Proteine spezifisch über den His-Tag mit aufgereinigt worden waren, d. h. der C-terminale Bereich inklusive dem Tag vollständig vorlag. Lediglich in den Spektren 2 und 6 fehlte jeweils die entsprechende Peptidmasse 1734, was zumindest für Probe 6 auf einen möglichen Proteinabbau oder ein verkürztes Expressionsprodukt schließen ließ. Im Spektrum 2 ist dieser Bereich

aufgrund der starken Keratinsignale (Peptidmasse 1791) nicht mehr sichtbar. Es kann zudem aus der gesamten Analyse gefolgert werden, dass aufgrund der Nachweisbarkeit der CHASE-TM Domäne in allen Proben unterschiedlichen Molekulargewichtes, die Ausbildung von höhermolekularen Komplexen der Domäne wie Dimeren, Trimeren und Tetrameren als wahrscheinlich angesehen werden kann. Dabei kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden konnten, ob es sich dabei um Artefakte der Reinigung oder um tatsächlich biologisch relevante Komplexe handelte.

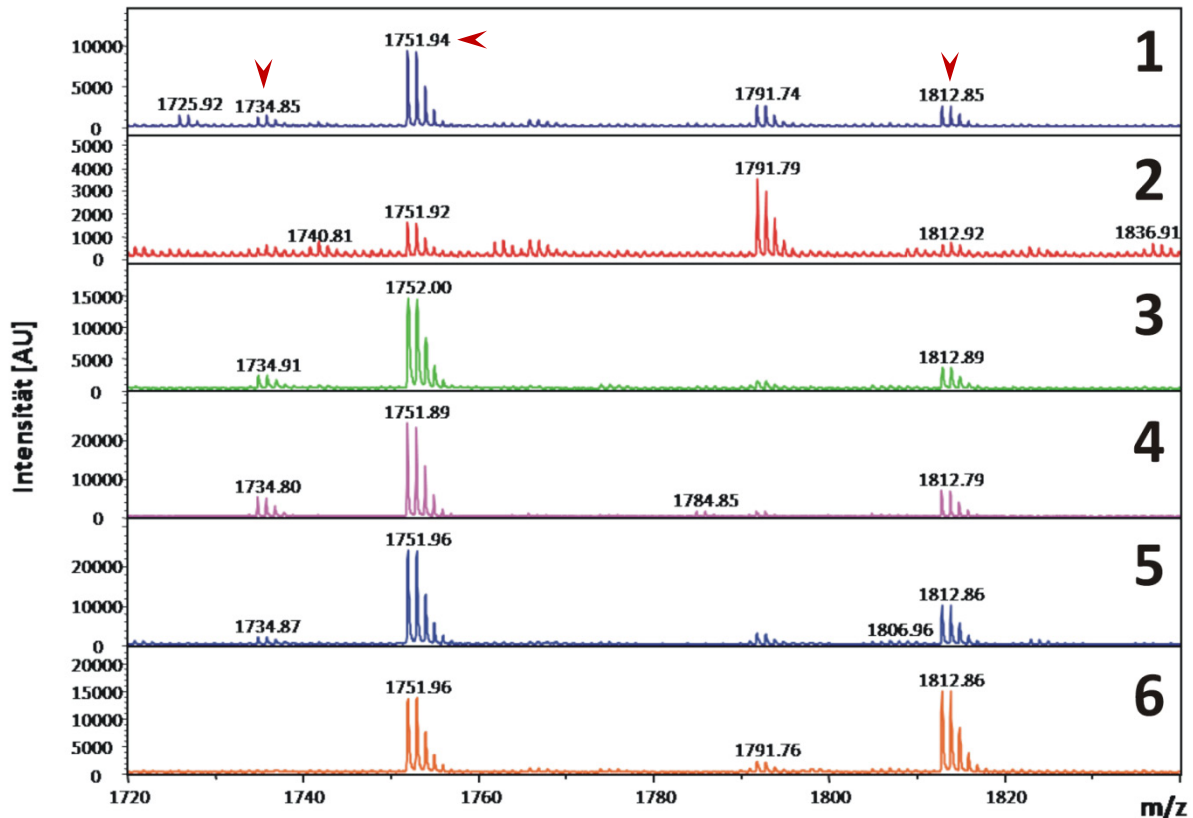


Abbildung 35: MALDI-MS Spektren von koeluierten Proteinen der Reinigung der CHASE-TM Domäne. Mit sechs zuvor aus einem 10%igen SDS-Gel isolierten Proteinen wurde eine MALDI-MS Analyse durchgeführt (Chris Weise, FU Berlin, Institut für Biochemie). Die Peakintensität in Absorptionseinheiten (AU) ist gegen das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetragen. Peptidmassen, die der CHASE-TM Domäne zugeordnet werden konnten, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

In den Proben 1 und 5 konnten darüber hinaus Proteine aus *E. coli* gefunden werden. In Probe 1 handelte es sich dabei um die β -Untereinheit der DNA abhängigen RNA-Polymerase (156 kDa, Peptidmasse 1725) und in Probe 5 um das 50S ribosomale Protein L2 (30 kDa, Peptidmasse 1806). Beide Proteine waren Verunreinigungen, die aus der zellfreien Proteinexpression herrührten.

3.3.2 CD-spektroskopische Analyse offenbart eine charakteristische Faltung der Domäne

Zum Nachweis einer Faltung der aufgereinigten CHASE-TM Domäne wurde eine CD-spektroskopische Analyse vorgenommen. Dazu wurde eine Messung mit dem gereinigten Protein wie in 2.2.3.2 beschrieben vorgenommen und im Anschluss eine zweite Messung nach Zugabe eines Cytokininderivates bzw. von Adenin durchgeführt. Für das Protein alleine ergab sich nach Berechnung der prozentualen Anteile von α -Helix, β -Faltblatt, *Turn* und *Random* mit der im Messgerät implementierten Software eine vorwiegend durch Helices bestimmte Sekundärstruktur, wobei vor allem der Anteil an β -Faltblättern von Messung zu Messung einer starken Schwankung unterlegen war (Tab. 13; 18,5%; 1,9% und 6,8%). Auch in den zugehörigen Spektren waren Schwankungen eindeutig sichtbar (Abb. 36, blaue Graphen), die aus Messungenauigkeiten resultieren könnten.

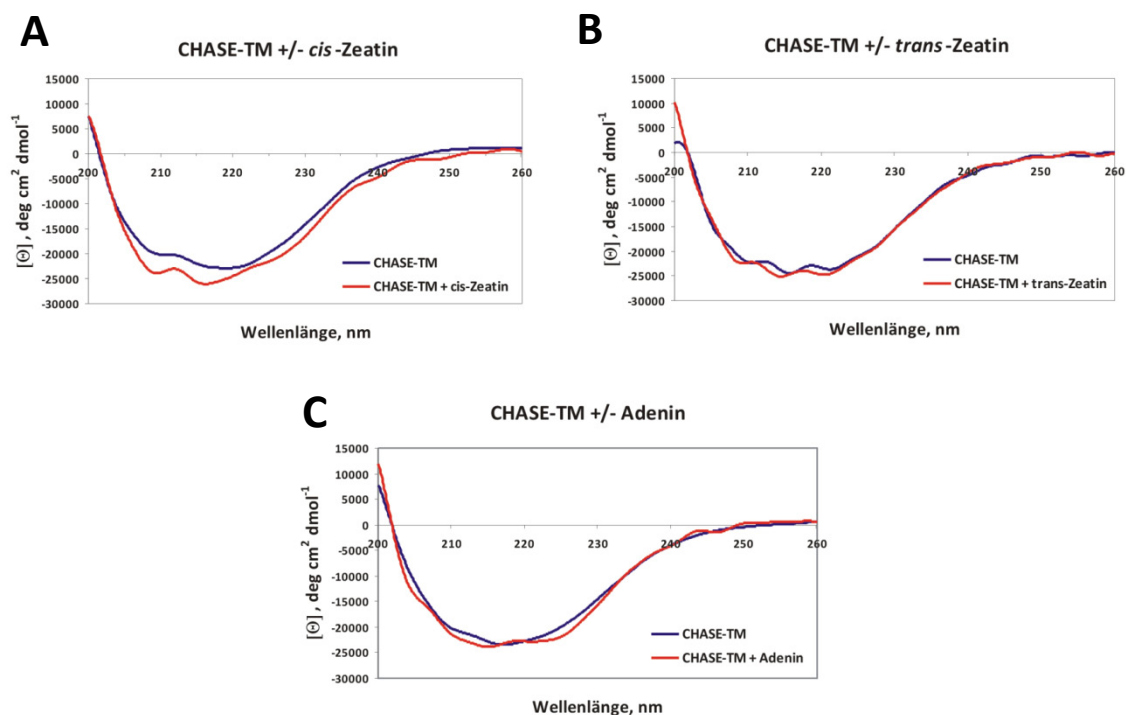


Abbildung 36: CD-spektroskopische Analyse der gereinigten CHASE-TM Domäne. Die Faltung der zuvor gereinigten CHASE-TM Domäne bzw. der Einfluss von drei verschiedenen Substanzen (*cis*-Zeatin (A), *trans*-Zeatin (B) und Adenin (C)) auf die Faltung des Proteins wurde untersucht. Alle Messungen wurden wie in 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Das Spektrum des Proteins alleine ist jeweils in blau dargestellt, das Spektrum nach Zugabe der Substanz in rot. Dargestellt ist die molare Elliptizität $[\Theta]$ in $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$ gegen die Wellenlänge in nm.

Die Zugabe von zwei Cytokininderivaten bzw. Adenin zum Protein sollte Hinweise liefern, ob ein vom Rezeptor CRE1/AHK4 stark gebundenes Cytokininderivat wie z. B. *trans*-Zeatin (Romanov *et al.*, 2006) u. U. eine Umwandlung innerhalb der CHASE-TM Domäne zur Folge hatte, die sich in einer Sekundärstrukturveränderung widerspiegelt. Zusätzlich wurde der Einfluss des niedrigaffinen Cytokinins *cis*-Zeatin (Romanov *et al.*, 2006) bzw. Adenins als Negativkontrolle untersucht. Die Zugabe resultierte in allen drei Fällen in einer Veränderung der jeweiligen Sekundärstrukturanteile (Tab. 13), wobei diese Änderungen aufgrund der bereits bei der Domäne alleine beobachteten Schwankungen keine eindeutigen Hinweise auf eine bindungsinduzierte Modifizierung der Sekundärstruktur darstellten.

Insgesamt betrachtet wies die zuvor gereinigte CHASE-TM Domäne eine vorwiegend helikale Faltung auf, was nach Vergleich mit der Vorhersage der Sekundärstruktur (PSIPRED v2.6) -Helix: 44%, β -Faltblatt: 18%, *Coil*: 38%) auf eine vermutlich native Faltung der Domäne hinwies.

Tabelle 13: Prozentualer Anteil an Sekundärstrukturelementen in der CHASE-TM Domäne ohne und mit Cytokinin. Anhand der CD-Spektren in Abb. 36 wurden die Sekundärstrukturanteile in der gereinigten CHASE-TM Domäne mit der dem CD-Spektrometer beiliegenden Software *Secondary Structure Estimation* berechnet. Zusätzlich ist die mit PSIPRED v2.6 erstellte vorhergesagte Sekundärstruktur für CHASE-TM angegeben.

	CHASE-TM	CHASE-TM + <i>cis</i> -Zeatin	CHASE-TM	CHASE-TM + <i>trans</i> -Zeatin	CHASE-TM	CHASE-TM + Adenin	CHASE-TM PSIPRED v2.6
α -Helix (%)	42	37,5	39	43,1	46,3	51,4	44
β -Faltblatt (%)	18,5	9,2	1,9	10,4	6,8	9,7	18
<i>Turn</i> (%)	11,1	22,4	25	18	18	12,6	38 (<i>Coil</i>)
<i>Random</i> (%)	28,4	30,9	34,1	28,5	29	26,3	

3.3.3 Nachweis der spezifischen Cytokininbindung an die gereinigte Domäne

Neben der Faltung war der Nachweis einer spezifischen Cytokininbindung für die Bestätigung der Funktionalität der Domäne entscheidend. Um die Bindung von der gereinigten Domäne nachzuweisen, wurden radioaktiv markiertes *trans*-[2-³H]Zeatin und Filtermembranen verwendet, um ungebundene von gebundenen Liganden zu trennen (siehe 2.2.2.10). Für die in Lösung exprimierte und nativ gereinigte CHASE-TM Domäne (S) konnte in diesem radioaktiven Filtrationsassay eine spezifische Bindung von *trans*-Zeatin nachgewiesen werden (Abb. 37). Im Vergleich zur nativen Domäne wiesen die unlöslich exprimierten und nachträglich resolubilisierten CHASE-TM (P) und CHASE (P) Domänen nur eine schwache bzw. keine Bindungsaktivität auf (<30% bzw. <10%). Dem

Reaktionsgemisch der zellfreien Expression (Nullpunktkontrolle) konnte keine Bindung zugordnet werden.

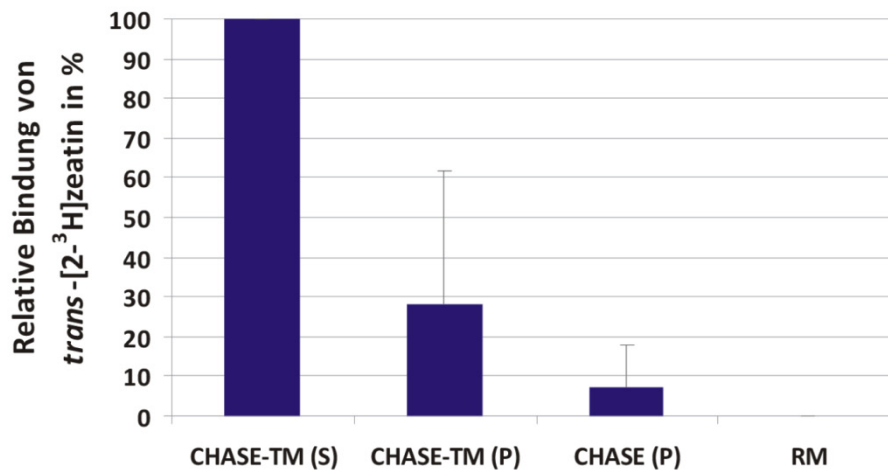


Abbildung 37: Nachweis der spezifischen Bindung von *trans*-[2-³H]Zeatin an die gereinigte CHASE-TM Domäne in einem Filtrationsassay. Zur nativ gereinigten Domäne (CHASE-TM (S)) wurde in zehnfach molarem Überschuss *trans*-[2-³H]Zeatin gegeben und in einem zweiten Ansatz zusätzlich *trans*-Zeatin in 5000x molarem Überschuss, um die spezifische Bindung ermitteln zu können. Die als Präzipitat exprimierte und nachträglich solubilisierten Proteine CHASE-TM (P) und CHASE (P) sowie das Reaktionsgemisch (RM) wurden als Negativkontrollen benutzt und wie CHASE-TM (S) auf eine Cytokininbindung untersucht. Angegeben ist die mittlere relative spezifische Bindung in % von CHASE-TM (S) ± SD. Alle Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Für weitere Informationen bezüglich der Durchführung siehe 2.2.2.10.

3.3.4 Vorexperimente zur Lösung der räumlichen Struktur der CHASE-TM Domäne

Nachdem die Domäne in größeren Mengen exprimiert, aufgereinigt und die Funktionalität nachgewiesen werden konnte, waren drei wichtige Voraussetzungen für eine strukturelle Analyse erfüllt. In weiteren Vorexperimenten wurde außerdem die Stabilität des Proteins unter verschiedenen Bedingungen überprüft, bevor mit Kristallisationsscreens begonnen wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass die Wahl des Puffers (Phosphat, Tris, HEPES, MES, Cacodylat) keinen positiven oder negativen Einfluss auf die Lebensdauer des Proteins ausübte. Auch war die Domäne bis zu einer Konzentration von ca. 2 mg/ml bei 4°C oder auch Raumtemperatur für mindestens 2 Wochen stabil. Zusätzliche Banden konnten auf einem SDS-Gel nach dieser Zeit nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Als problematisch erwies sich hingegen die notwendige Aufkonzentrierung des Proteins. Für eine erfolgreiche Kristallisation eines Proteins ist eine minimale Konzentration von mindestens 5 mg/ml erforderlich. Die Aufkonzentrierung wurde standardmäßig mit Amicon Membranen (Millipore, Schwalbach) vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass die CHASE-TM Domäne bis ca. 2 mg/ml

erfolgreich aufkonzentriert werden konnte. Bei höheren Konzentrationen wurden weiße nadelförmige Präzipitate beobachtet, die vermutlich auf die Ausbildung höhermolekularer Aggregate zurückgingen. Dieser Niederschlag wurde ebenso bei einer Aufkonzentrierung mittels Dialyse gegen Puffer mit 20 % PEG beobachtet. Ein positiver Einfluss von z. B. *trans*-Zeatin im Hinblick auf eine verminderte Präzipitatbildung konnte nicht beobachtet werden. Daher kann vermutet werden, dass es ab einer bestimmten kritischen Konzentration durch intermolekulare Interaktion es zur Aggregatbildung kam. Dies könnte entweder auf den hydrophoben Charakter des Proteins im Allgemeinen oder indirekt auf die vergleichsweise großen Mizellen zurückzuführen sein, wodurch einzelne Proteinmoleküle bei Einengung eher in Kontakt treten als in einer detergenzfreien Lösung.

Trotz der erläuterten Problematik wurden mit der gereinigten CHASE-TM Domäne Kristallisationsscreens speziell für Membranproteine durchgeführt (MemGold, Molecular Dimensions, England; Mb Class/ Mb ClassII, Qiagen; MemFac, Hampton Research, USA). Diese wurden in Kooperation mit der AG Saenger (Freie Universität Berlin, Institut für Chemie) vorgenommen. Alle Screens enthielten 48 (MemFac) bzw. 96 (MemGold, MbClass und MbClassII) verschiedene Kristallisationsbedingungen, die sich jeweils in ihrer Pufferzusammensetzung (z. B. Tris, Natriumacetat, Natriumcitrat, HEPES), dem Präzipitant (z. B. PEGs, Ammoniumsulfat, Natriumchlorid) und Salzzusätzen (z. B. Natriumchlorid, Magnesiumchlorid, Ammoniumsulfat) unterschieden. Leider wurden in diesen Screens keine Proteinkristalle sondern nur Salzkristalle erhalten. Daher wurden keine weiteren Arbeiten zur Kristallisation durchgeführt und stattdessen versucht, über NMR-Spektroskopie Strukturinformationen zur Domäne zu generieren. NMR-Spektroskopie erlaubt im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse eine Untersuchung der Probe in Flüssigkeit, d. h. unter (nahezu) physiologischen Bedingungen. Prinzipiell kann eine NMR-Analyse auch bei einer geringeren Proteinkonzentration ab ca. 50 μM begonnen werden.

Es wurde vom gereinigten Protein in der AG Reif (FMP Berlin) ein ^1H -NMR-Spektrum in 0,015% β -DDM aufgenommen (Konz. 54 μM). Das resultierende Spektrum wies insgesamt betrachtet eine sehr geringe spektrale Auflösung auf, da viele Peaks kaum getrennt waren (Abb. 31). Zudem waren starke Signale, hervorgerufen durch das Detergenz, im gesamten ppm-Bereich (*parts per million*) sichtbar, was den Schluss zuließ, dass dieses Detergenz ungeeignet für NMR-Experimente war. Zudem war die Domäne nicht mit einem anderen Isotop wie z. B. ^{15}N im Zuge der Expression gelabelt worden, was möglicherweise eine informativere ^{15}N -NMR-Spektroskopie erlaubt hätte.

Das Spektrum gliederte sich grob in zwei interessante Bereiche, die Amid-Protonen Region (Abb. 38C, ppm Bereich $\sim 6,5$ -10,5) und die Methyl-Protonen Region (Abb. 38D, ppm Bereich $\sim 0,5$ -1,5). In der Region der C_α -Protonen zwischen 4-6 ppm waren nur starke Resonanzen des Detergenz zu beobachten. Die Amid-Protonen Region, in der auch Resonanzen aromatischer Protonen liegen (6,5-8 ppm), wies insgesamt betrachtet keine Dispersion auf und nur solche Resonanzen, die innerhalb der *Random coil* Region lagen, waren sichtbar. Darüber hinaus waren Resonanzen für einige Seitenketten

H₂N-Protonen erkennbar, wobei deren Zahl gering war und diese auch bei einer chemischen Verschiebung für *Random coil* Strukturen lagen. Die Methyl-Protonen Region wies sehr starke Signale auf, die durch das Detergenz hervorgerufen wurden.

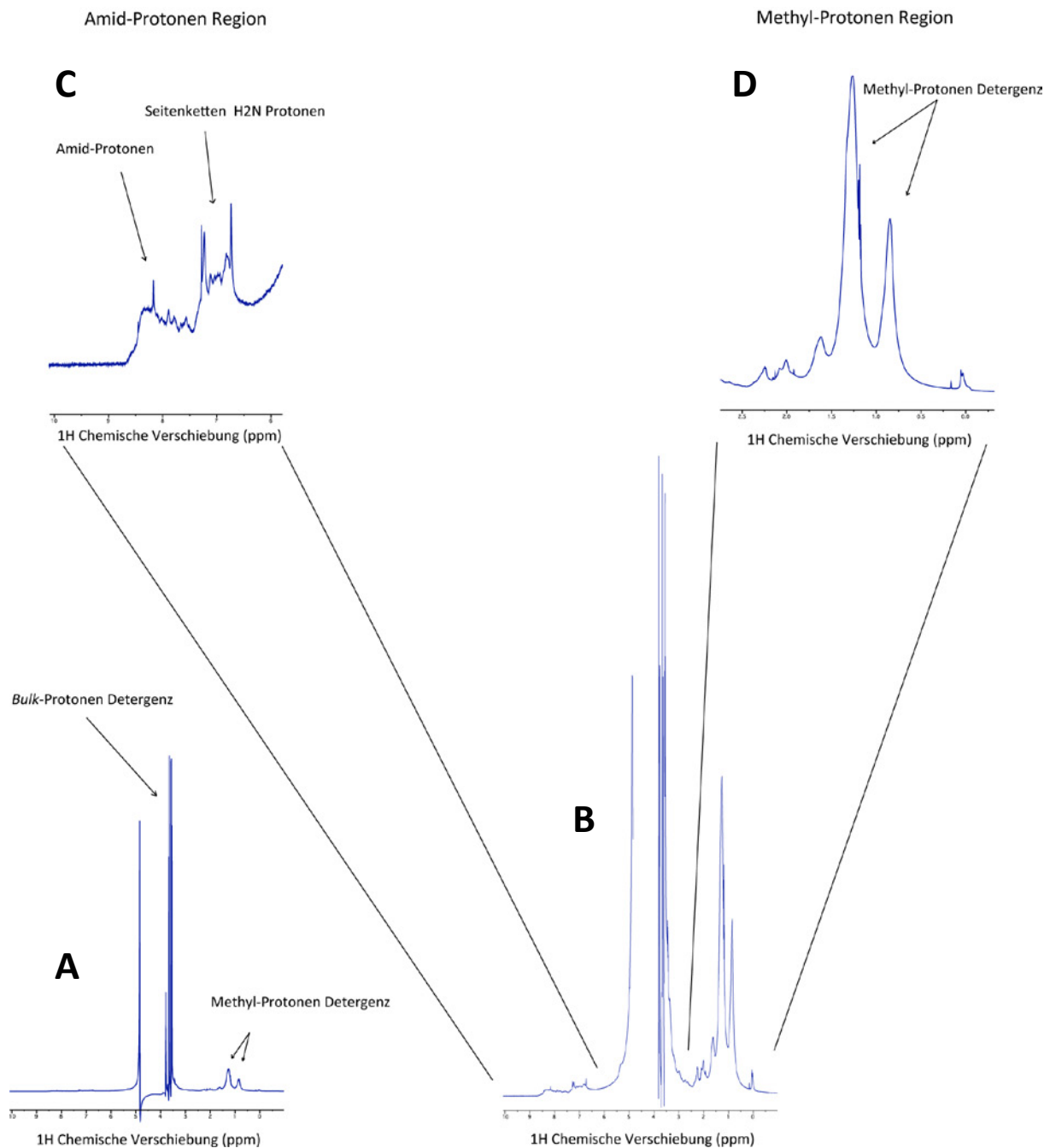


Abbildung 38: ¹H-NMR-Spektrum der gereinigten CHASE-TM Domäne. Die zuvor *in vitro* exprimierte und gereinigte Domäne wurde in 20 mM Na-Phosphat, pH 7,4; 0,15 M NaCl, 0,015% β-DDM einer NMR-Analyse unterzogen (Konz. 54 μM). Das komplette NMR-Spektrum ist unten links (A) dargestellt. Rechts davon ist eine Vergrößerung des Spektrums zu sehen (B). Darüber sind stark vergrößerte Bereiche der Amid-Protonen (C) und der Methylprotonen (D) dargestellt. Für weitere Informationen hinsichtlich der Durchführung des Experimentes siehe 2.2.3.3.

Weitere Resonanzen ließen sich nicht auflösen. Es war nicht möglich, Peaks spezifisch der CHASE-TM Domäne zuzuordnen. Aufgrund dieser Untersuchung wurde vermutet, dass die Korrelationszeit (t_c) des Proteins, die ein Maß für die Bewegung des Proteins in Lösung ist und z. B. abhängig vom Lösungsmittel und der Größe des Proteins ist, für Lösungsmittel-NMR zu gering war, um unter diesen Bedingungen ein auswertbares Spektrum zu erhalten.

Daher wäre für die CHASE-TM Domäne ein intensives Detergenzscreening notwendig gewesen. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass eine zweite Untersuchung des Proteins mit dem Detergenz LPPG, welches im Allgemeinen als für NMR geeigneter betrachtet wird, ebenso kein auswertbares Spektrum ergab (Daten nicht gezeigt).

3.4 Subzelluläre Lokalisation der Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 mittels GFP-Fusion

Im Modell der Cytokinintransduktion wird das Hormon von einer Rezeptorfamilie erkannt, deren Mitglieder (AHK2, AHK3 sowie CRE1/AHK4) an der Plasmamembran lokalisiert sein sollen (z. B. Heyl und Schmülling, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Studien nach transienter Expression von Rezeptor-GFP-Fusionen in Protoplasten von *A. thaliana* bzw. Epidermiszellen von *N. benthamiana* vorgenommen, um ein detailliertes Bild über die intrazelluläre Lokalisation der Rezeptorfamilie zu erhalten.

3.4.1 Transiente Expression in *Arabidopsis* Protoplasten deutet auf eine weitgehend endomembranständige Lokalisation der Rezeptoren hin

Zunächst wurde eine Analyse der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen für AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 in *Arabidopsis* Protoplasten vorgenommen. Für AHK3 und CRE1/AHK4 wurden C-terminale Fusionsen mit der entsprechenden cDNA (pA7-Vektor) erstellt. Für AHK2 wurde die Lokalisation mittels einer N-terminalen Fusion mit dem korrespondierenden genomischen Fragment überprüft, da ein korrekter cDNA Klon nicht zur Verfügung stand (pB7WGF2-Vektor).

Für alle drei GFP-Fusionsproteine konnte GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Im Vergleich mit GFP-Kontrollen für Cytosol (GFP) (Voelker *et al.*, 2006), Plasmamembran (PM) (AtAMT2-GFP) (Sohlenkamp *et al.*, 2002) und endoplasmatisches Retikulum (ER) (KDEL-GFP) (Voelker *et al.*, 2006) ergaben sich für die Rezeptoren die folgenden Ergebnisse: AHK2- und AHK3-GFP-Fusionen verursachten eine ausgeprägte Fluoreszenz im Zellinneren auf, die am ehesten mit einer endomembranständigen Lokalisation der beiden Proteine vereinbar war. Eine feine, nur auf die äußerste Schicht beschränkte GFP-Fluoreszenz wie für den PM-Marker AtAMT2-GFP, war für beide Proteine nicht zu beobachten (Abb. 39), wohingegen eine Übereinstimmung verstärkt mit dem ER-

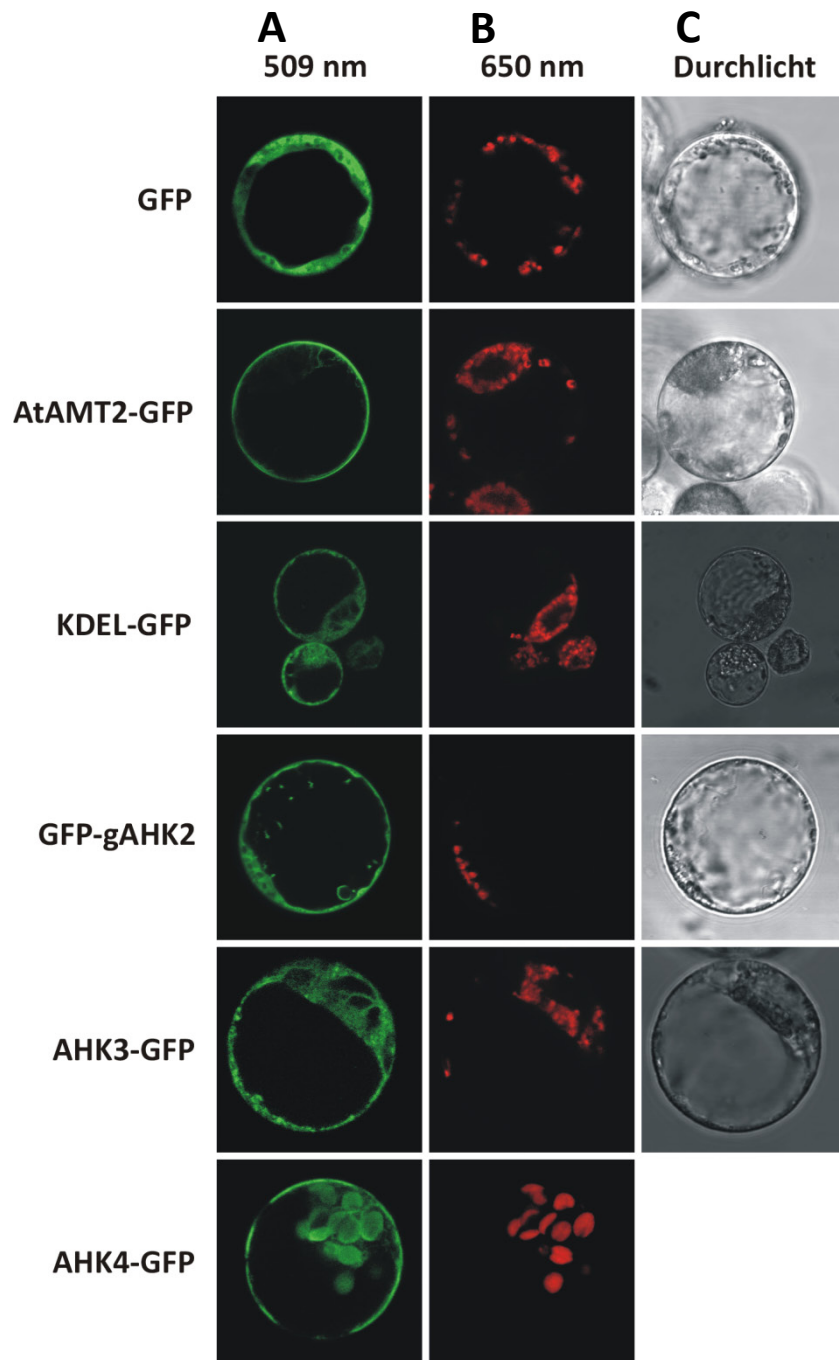


Abbildung 39: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen der Cytokininrezeptorfamilie in *Arabidopsis* Protoplasten. C-terminale GFP-Fusionskonstrukte für AHK3 und CRE1/AHK4 (pA7-Vektor) bzw. ein N-terminales GFP-Konstrukt für gAHK2 (genomisches Fragment, pB7WGF2-Vektor) wurden nach Yoo *et al.* (2007) transient in Protoplasten exprimiert (siehe 2.2.1.3). Als Kontrollen dienten der leere Vektor pA7 (GFP), das plasmamembranständige Protein AtAMT2-GFP und KDEL-GFP als Marker für das endoplasmatische Retikulum. Anregung von GFP fand bei 488 nm mit einem Argonlaser statt. Die entsprechende Emission wurde bei 509 nm gemessen (A). Zusätzlich wurden die Chlorophyllemission bei 650 nm aufgenommen (B) und die Protoplasten unter Durchlicht (C) photographiert. Eine Durchlichtaufnahme für AHK4-GFP fehlt in diesem Experiment.

Marker nachgewiesen werden konnte. Eine eindeutige Lokalisation war jedoch in diesem Expressionssystem nicht möglich, da die intrazellulären Strukturen nicht weiter mikroskopisch aufgelöst werden konnten. Eine zumindest partielle Lokalisation der beiden Rezeptoren an der Plasmamembran war daher nicht völlig auszuschließen. Außerdem konnte zwischen dem ER und anderen Endomembranen wie z. B. dem Golgi Apparat oder Endosomen nicht unterschieden werden.

Die Analysen der CRE1/AHK4-GFP-Fusion ergaben ein hiervon abweichendes Ergebnis. Wie in Abb. 39 zu erkennen ist, wurde dieses Fusionsprotein nicht wie die beiden anderen zuvor verstärkt im Zellinneren lokalisiert. Die feine Fluoreszenzlinie am äußeren Rand der Zelle deutete hingegen stark auf eine plasmamembranständige Lokalisation von CRE1/AHK4 hin, wobei berücksichtigt werden muss, dass auch die Chloroplasten in diesem Experiment vergleichsweise stark grün fluoreszierten und zudem die Vakuole sich vermutlich weiträumig im Zellinneren erstreckte, wodurch zellinterne Strukturen weit an die PM gedrückt wurden.

Letztendlich war in diesem Expressionssystem keine klare Zuordnung der Rezeptoren zu einem definierten Kompartiment bzw. einer Membran möglich, da eine detailliertere Untersuchung vor allem des ER durch die Größe der Vakuole erschwert wurde.

3.4.2 Transiente Expressionsstudien in *N. benthamiana* weisen auf eine BFA-insensitive Lokalisation von AHK3 und CRE1/AHK4 vorzugsweise im endoplasmatischen Retikulum hin

Um ein vollständigeres Bild der subzellulären Lokalisation der Cytokininrezeptoren zu erhalten bzw. verstärkt innere Zellstrukturen wie das ER genauer betrachten zu können, wurde neben *Arabidopsis* Protoplasten Tabakepidermiszellen als zweites transientes Expressionssystem verwendet.

3.4.2.1 Analysen zur subzellulären Lokalisation von AHK3

Abb. 40 zeigt die Ergebnisse nach Transformation mit einem C-terminalen GFP-Fusionsprotein für die Expression von AHK3-GFP (pB7FWG2-AHK3). GFP-Fluoreszenz war eindeutig um den Zellkern herum (perinuklear) (Abb. 40A, weißer Pfeil) sowie in einem Netzwerk von Endomembranen (Abb. 40C, weißer Pfeil) zu detektieren. Anhand dieser Beobachtungen konnte auf eine subzelluläre Lokalisation von AHK3 in der ER-Membran geschlossen werden. Darüber hinaus war durch Überlagerung von Bildern mehrerer z-Ebenen einer Zelle GFP-Fluoreszenz in intrazellulären Strängen sichtbar, wobei es sich möglicherweise um Cytoskelettelemente (Aktin- bzw. Tubulinfilamente) handelte (Abb. 40E, weißer Pfeil). Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter im Detail untersucht. Da in den untersuchten Zellen keine Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns beobachtet

wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Fluoreszenz auf GFP-Fusionsproteine und nicht alleine auf abgespaltenes GFP zurückzuführen war.

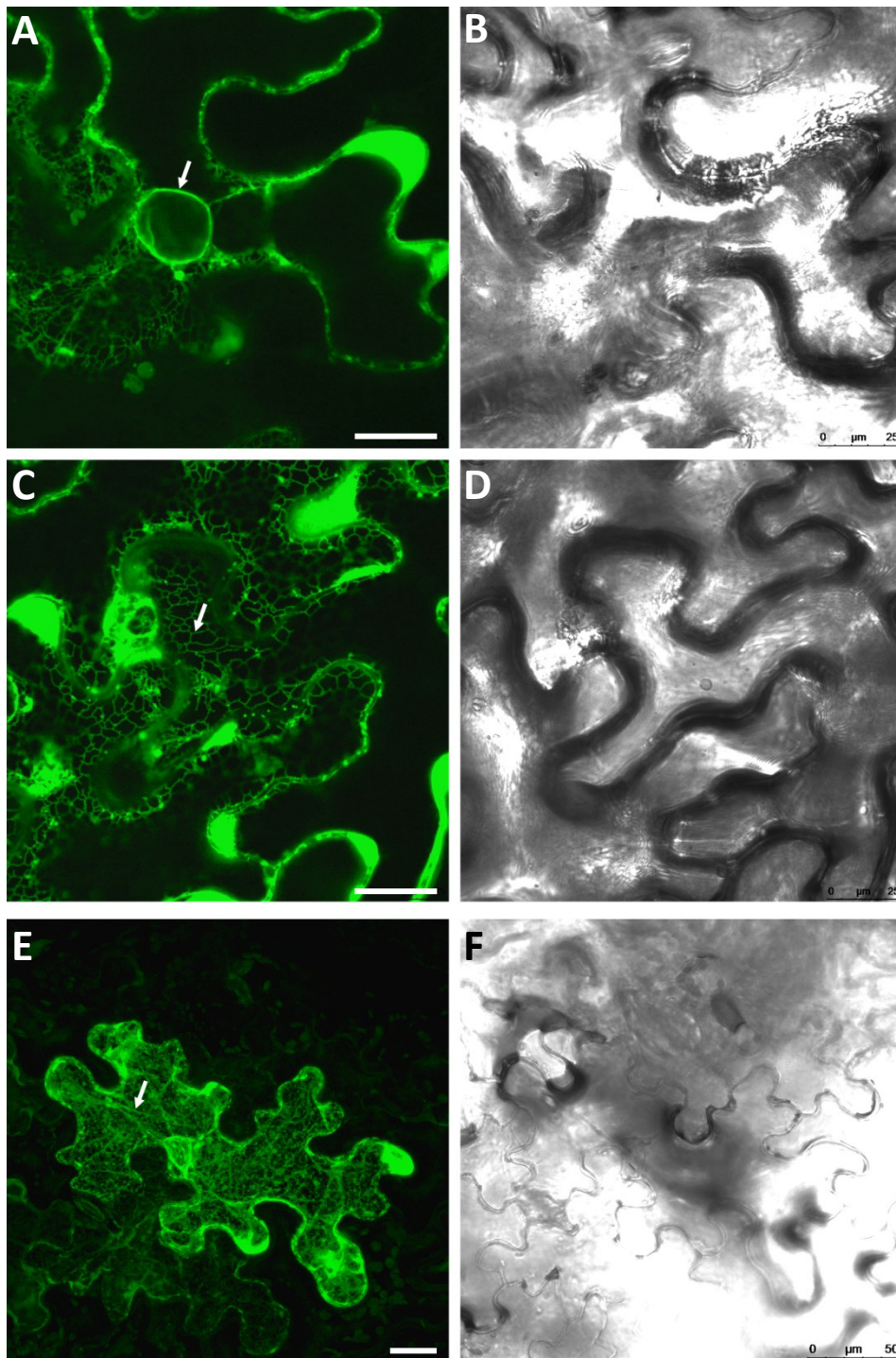


Abbildung 40: Subzelluläre Lokalisation von AHK3-GFP (pB7FWG2-AHK3) in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*. GFP-Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 488 nm mit einem Argonlaser angeregt. A, C und E zeigen GFP-Emission bei 509 nm; B, D und F die korrespondierenden Durchlicht-Aufnahmen. E wurde durch Überlagerung von Bildern verschiedener z-Ebenen (Abstand 1 µM) erstellt. Hinsichtlich der Durchführung der Transformation siehe 2.2.1.4. Weißer Balken = 25 µM.

Darüber hinaus wurde eine Koexpression mit einem rot fluoreszierenden mCherry-getaggtten HDEL-Motiv durchgeführt, um die zuvor beobachtete Lokalisation im ER zu verifizieren. In koexprimierenden Tabakepidermiszellen war eine deutliche Kolokalisation von AHK3-GFP mit mCherry-HDEL in der ER-Membran sichtbar (Abb. 41, weißer Pfeil). Ferner wurden z. T. starke GFP-Signale in rundlicher Form mit einer Größe von ca. 5-10 μM am äußeren Rand der Zelle beobachtet (Abb. 41A). Ob es sich dabei um Strukturen im Zellinneren oder Überexpressionsartefakte (z. B. GFP-*bulbs*) handelte, ist unklar.

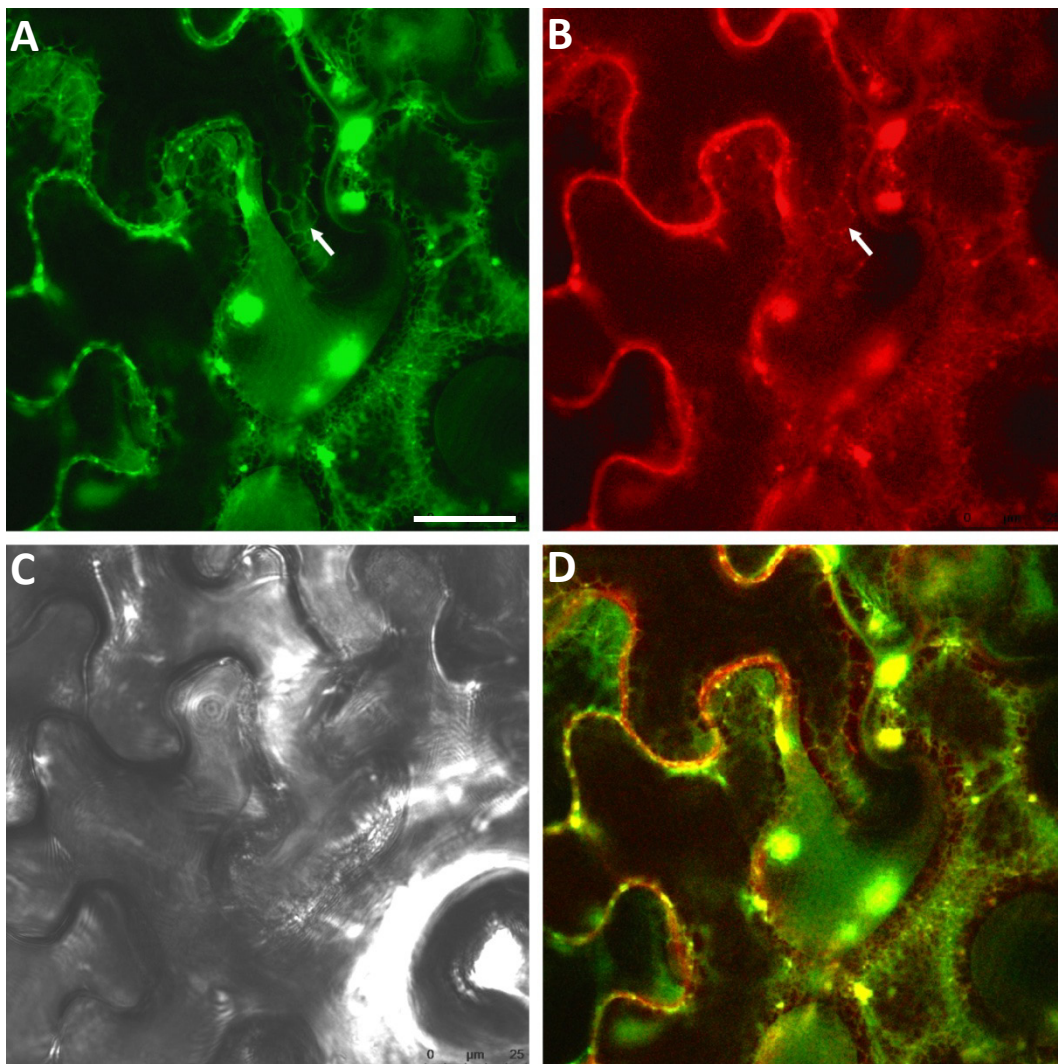


Abbildung 41: Kolokalisation von AHK3-GFP mit mCherry-HDEL in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*. GFP-Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und mCherry durch Licht der Wellenlänge 587 nm. GFP-Emission wurde bei 509 nm detektiert (A), und Fluoreszenz von mCherry bei 610 nm (B). C zeigt den Blattausschnitt unter Durchlicht, D ist die Überlagerung von A und B. Ein weißer Pfeil markiert das ER als Ort der Kolokalisation. Für weitere Informationen hinsichtlich der Durchführung der Transformation siehe 2.2.1.4. Weißer Balken = 25 μm .

Nach Anfärbung der Plasmamembran mit dem spezifischen Farbstoff FM4-64 (Bolte *et al.*, 2004) in AHK3-GFP exprimierenden Zellen für 5-10 Minuten konnte hingegen größtenteils keine Kolokalisation von Rezeptor und Farbstoff nachgewiesen werden, womit die bereits erzielten Ergebnisse weiter bekräftigt wurden, jedoch eine zumindest partielle Lokalisation des Rezeptors an der PM nicht völlig ausgeschlossen werden konnte (Abb. 42C).

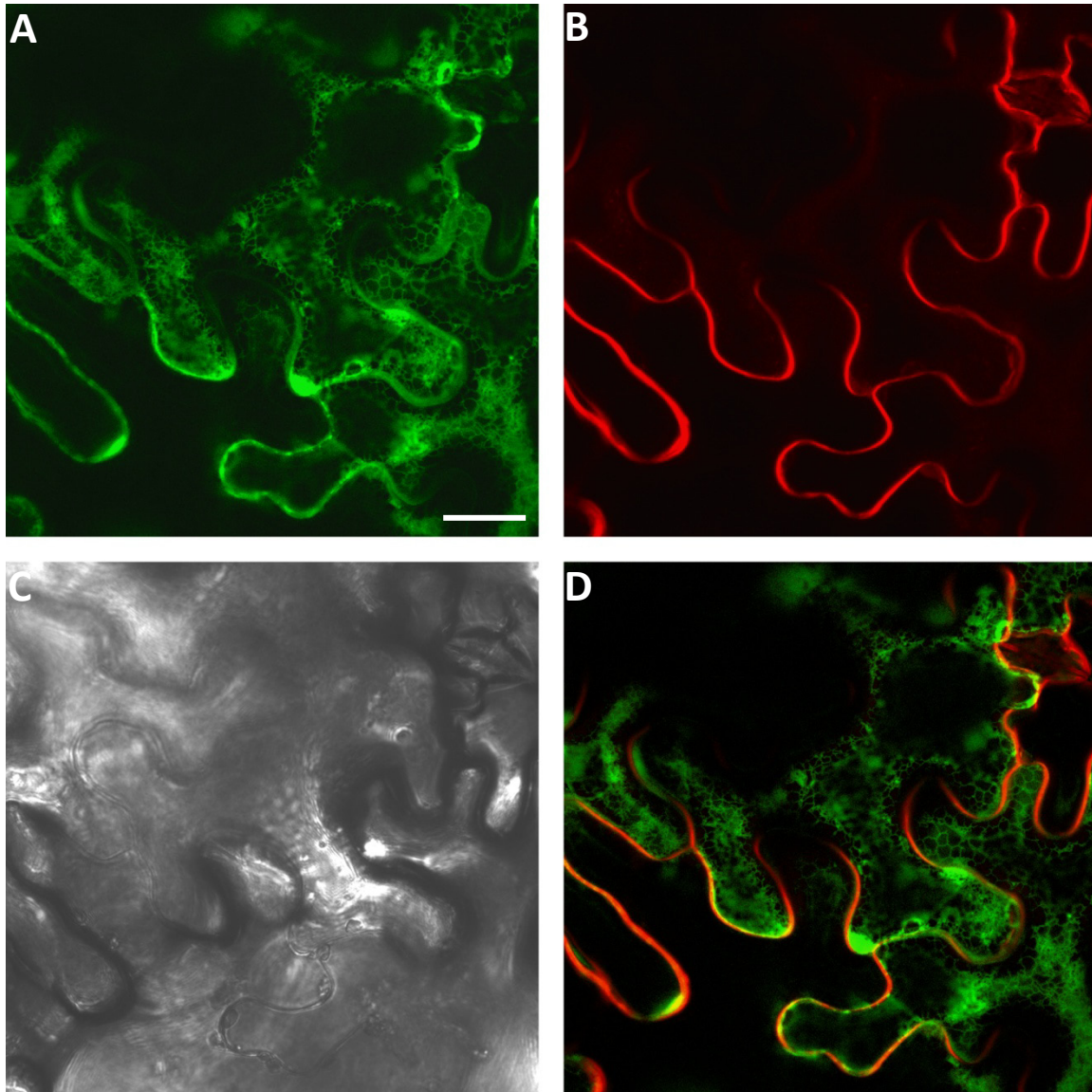


Abbildung 42: Expression von AHK3-GFP in *N. benthamiana* und Anfärbung der Plasmamembran mit FM4-64. Blattscheiden von transformierten Pflanzen wurden mit 50 μM FM4-64 infiltriert und für 5-10 Minuten inkubiert. GFP-Fluoreszenz und die rote Fluoreszenz des Farbstoffes wurden durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. GFP-Emission wurde bei 509 nm detektiert (A), die Fluoreszenz von FM4-64 zwischen 625 und 665 nm (B). C zeigt den Blattausschnitt unter Durchlicht, D ist die Überlagerung von A und B. Für weitere Informationen hinsichtlich der Durchführung der Transformation siehe 2.2.1.4. Weißer Balken = 25 μm .

Insgesamt betrachtet unterstützen diese GFP-Studien die bereits anhand der Daten aus den Protoplastenassays zuvor erstellte Vermutung einer vorwiegenden Lokalisation von AHK3 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER).

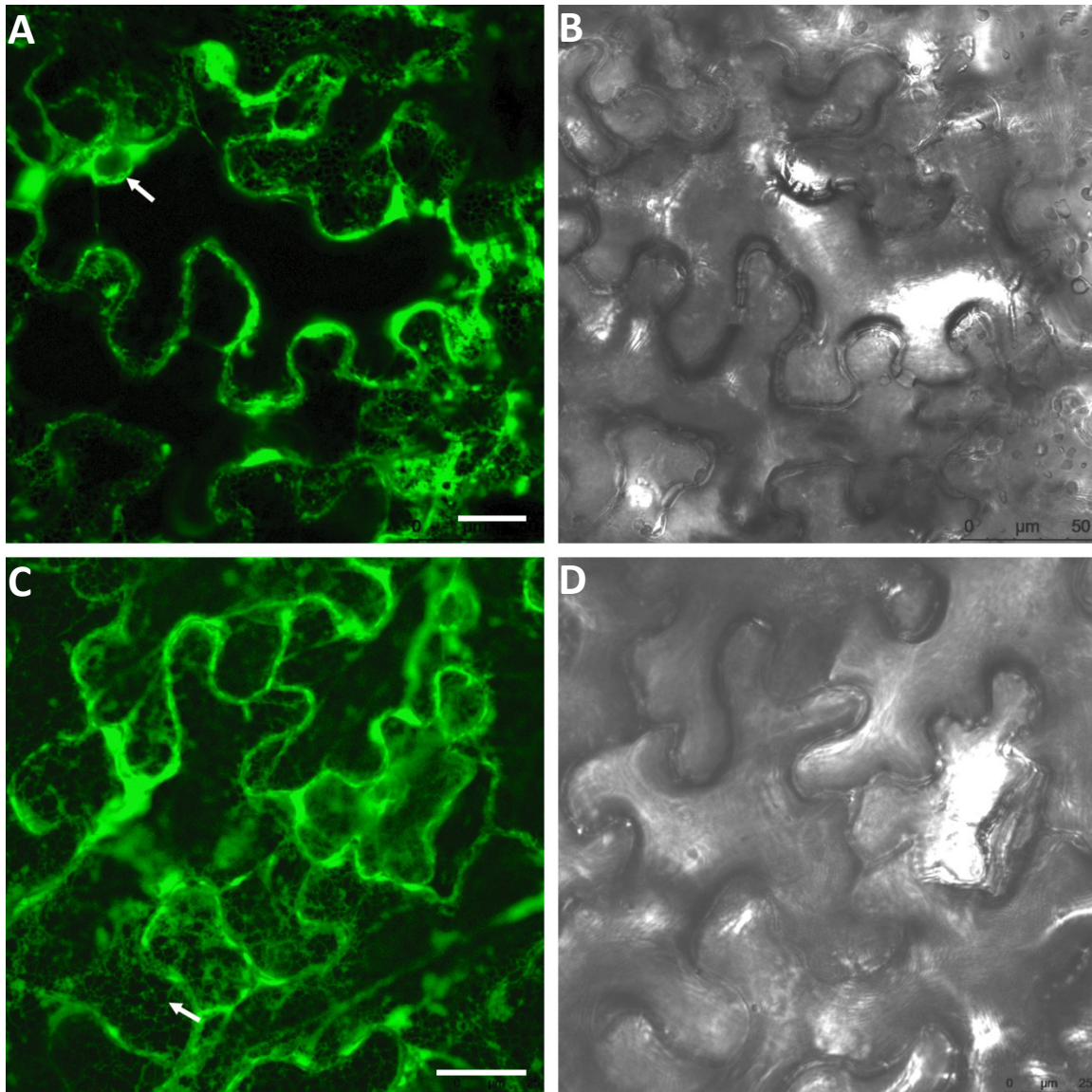


Abbildung 43: Lokalisation von AHK3-GFP in *N. benthamiana* nach Inkubation mit Brefeldin A (BFA). Blattscheiben von transformierten Pflanzen wurden mit 50 μM BFA infiltriert und für 2-3 h inkubiert. GFP-Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. GFP-Emission wurde bei 509 nm detektiert (A und C). B und C zeigen den jeweiligen Blattausschnitt unter Durchlicht. Für weitere Informationen hinsichtlich der Durchführung der Transformation siehe 2.2.1.4. Weißer Balken = 25 μM .

Es wurde ferner der Einfluss des Endocytose- bzw. Exocytose-Inhibitors Brefeldin A (BFA) (Šamaj *et al.*, 2005) auf die ER-ständige Lokalisation von AHK3 untersucht. Auch nach mehrstündiger Inkubation AHK3-GFP exprimierender Blattscheiben mit 50 μM BFA (Geldner *et al.*, 2007) konnte

keine Veränderung in der Lokalisation des Rezeptors beobachtet werden (Abb. 43A und C, weißer Pfeil). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine funktionierende Positivkontrolle für BFA nicht vorlag. Darüber hinaus hatte die Behandlung mit dem Cytokinin *trans*-zeatin (10 μ M) keinen nachweisbaren Effekt auf die Lokalisation von AHK3 (Daten nicht gezeigt).

3.4.2.1 Analysen zur subzellulären Lokalisation von CRE1/AHK4

Für CRE1/AHK4 wurde eine im Vergleich zu AHK3 ähnliche Lokalisationsstudie mit Hilfe einer N-terminalen GFP-Fusion durchgeführt (pB7WGF2-CRE1/AHK4). Es war für CRE1/AHK4 wie bereits für AHK3 möglich, GFP Fluoreszenz perinukleär (den Zellkern umgebendes ER) und im ER-Netzwerk der gesamten Zelle nachzuweisen (Abb. 44A und C, weiße Pfeile). Außerdem war auch hier wieder starke Fluoreszenz in cytoplasmatischen Strängen, möglicherweise Cytoskelettfilamenten, sichtbar (44E, weißer Pfeil). Fluoreszenz im Zellkern, was ein Hinweis auf abgespaltenes GFP gewesen wäre, wurde nicht beobachtet.

Eine Kolokalisationsstudie mit dem ER-Markerprotein mCherry-HDEL nach Inkubation mit dem Inhibitor BFA (50 μ M) kam zu einem identischen Ergebnis wie bereits zuvor für AHK3-GFP. CRE1/AHK4 kolokalisierte mit dem Marker im ER und darüber hinaus konnte keine Veränderung der ER-Lokalisation durch BFA induziert werden (Abb. 45A). Beide Proteine, Rezeptor und Marker, kolokalisierten weiterhin im ER (Abb. 45F), wobei eine partielle Lokalisation von CRE1/AHK4 an der Plasmamembran nicht ausgeschlossen werden kann. Ein Effekt von *trans*-Zeatin (10 μ M) auf die Lokalisation von CRE1/AHK4 wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Schlussendlich wurden auch GFP-Analysen für verschiedene AHK2-GFP Fusionsproteine (N- und C-terminal) in Tabak im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen. Dabei erschwerten niedrige Transformationsraten und generell ein schwaches Expressionsniveau die Analyse, wobei die C-terminale GFP-Fusion trotz korrekter Klonierung generell keine Fluoreszenzsignale lieferte. Daher war es nicht möglich, eine aussagekräftige Studie für den dritten Rezeptor der Cytokininrezeptorfamilie durchzuführen. Aufgrund der in Abschnitt 3.5 erläuterten Ergebnisse aus den BiFC-Analysen der drei Rezeptoren kann vermutet werden, dass AHK2 möglicherweise zu einem gewissen Anteil an der Plasmamembran lokalisiert (siehe Abb. 47).

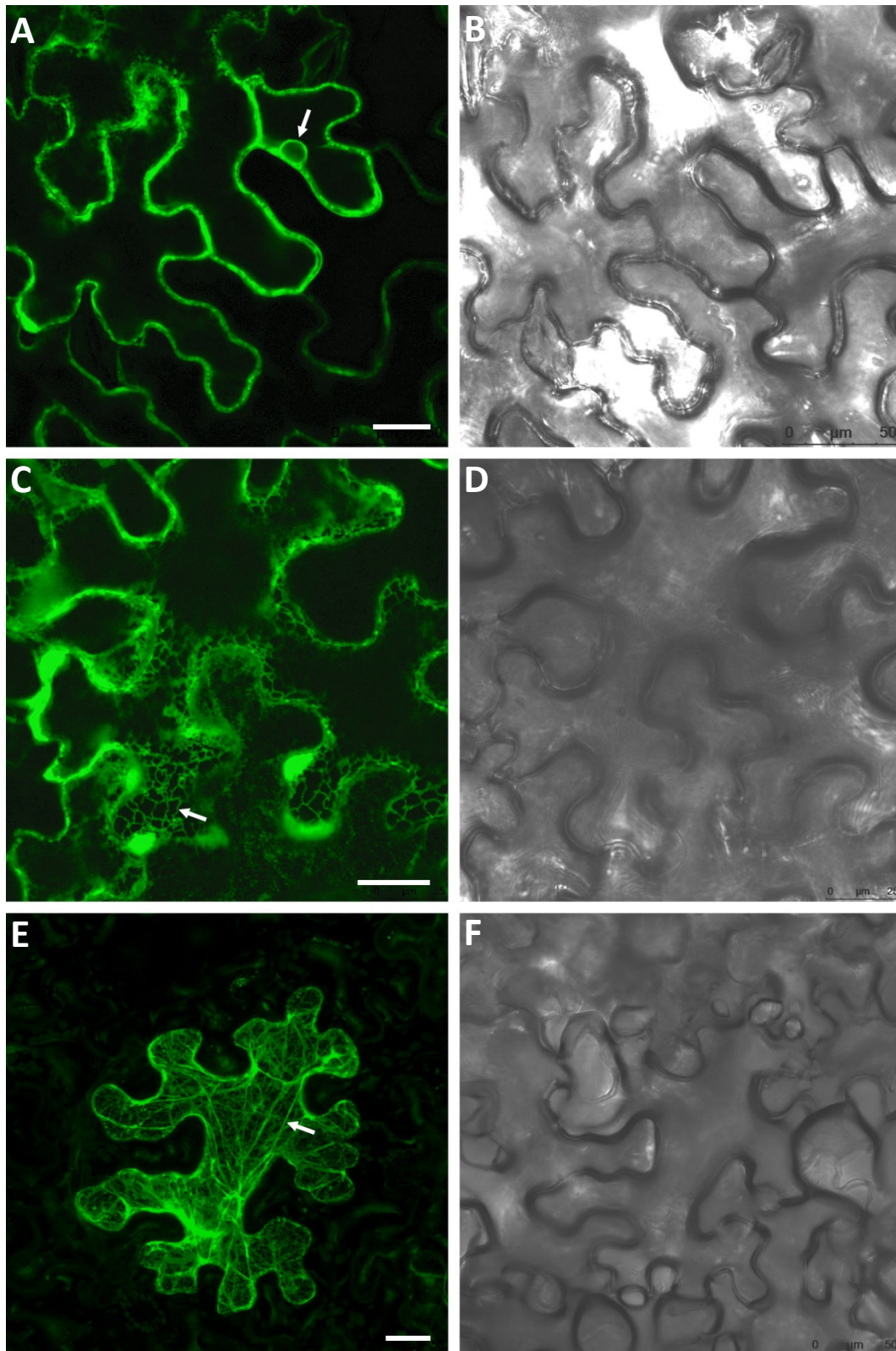


Abbildung 44: Subzelluläre Lokalisation von GFP-CRE1/AHK4 (pB7WGF2-CRE1/AHK4) in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*. GFP-Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. A, C und E zeigen GFP-Emission bei 509 nm; B, D und F die korrespondierenden Durchlicht-Aufnahmen. E wurde durch Überlagerung von Bildern verschiedener z-Ebenen (Abstand 1 µM) erstellt. Für weitere Informationen hinsichtlich der Durchführung der Transformation siehe 2.2.1.4. Weißer Balken = 25 µM.

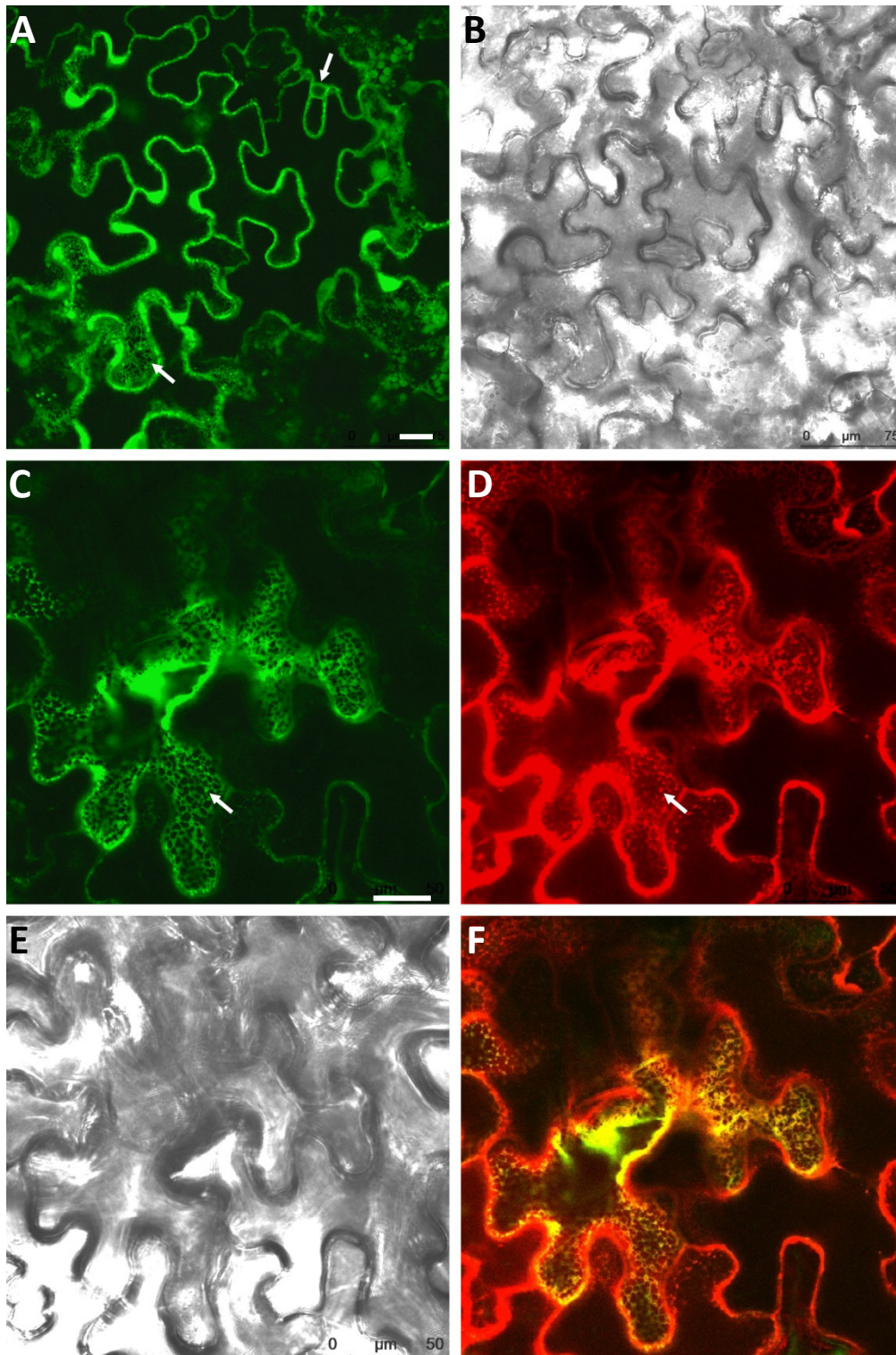


Abbildung 45: Kolokalisation von GFP-CRE1/AHK4 mit mCherry-HDEL in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana* nach Inkubation mit Brefeldin A (BFA). Blattscheiben von transformierten Pflanzen wurden mit 50 μM BFA infiltriert und für 2-3 h inkubiert. GFP-Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und mCherry durch Licht der Wellenlänge 587 nm. GFP-Emission wurde bei 509 nm detektiert (A und C), und Fluoreszenz von mCherry bei 610 nm (D). B und E zeigen den jeweiligen Blattausschnitt unter Durchlicht, F ist die Überlagerung von C und D. Für weitere Informationen hinsichtlich der Durchführung der Transformation siehe 2.2.1.4. Weißer Balken = 25 μM .

3.5 *In planta* Analysen zur Homo- und Heterodimerisierung zeigen eine generelle Fähigkeit zur Interaktion innerhalb der Rezeptorfamilie

Vorherige Arbeiten zur Protein-Protein-Interaktion innerhalb der Cytokininrezeptorfamilie konnten mittels Hefe-Zwei-Hybrid- und *Pulldown*-Experimenten zeigen, dass alle drei Rezeptoren (genauer die cytoplasmatischen Domänen) Dimere ausbilden können, wobei allerdings nicht alle sechs möglichen Kombinationen tatsächlich nachgewiesen werden konnten (Dortay *et al.*, 2006).

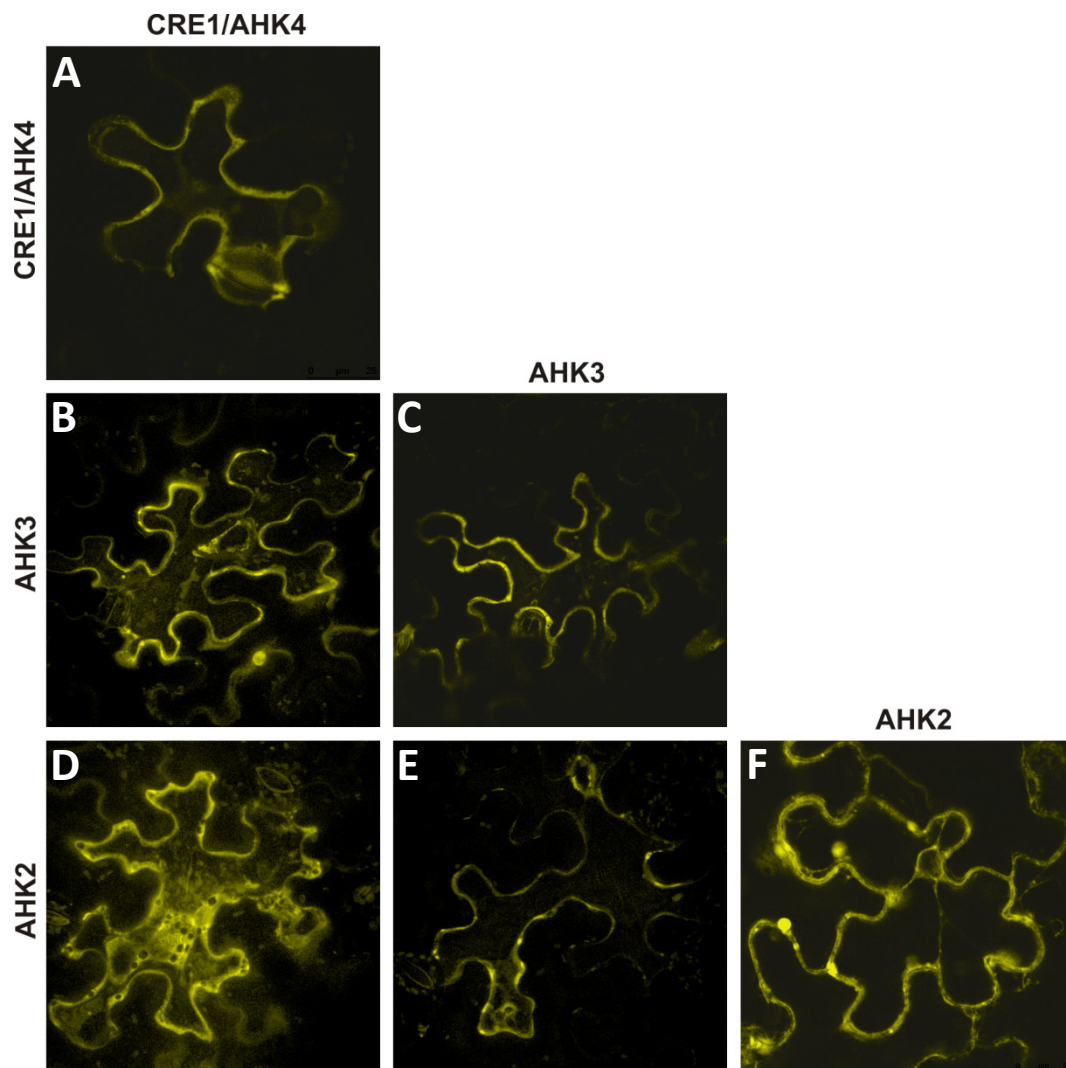


Abbildung 46: BiFC-Analyse zum Nachweis einer *in planta* Dimerisierung innerhalb der Cytokininrezeptorfamilie in *N. benthamiana*. Die kodierenden Regionen der drei Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 wurden jeweils in die BiFC-Vektoren pSPYNE-35S und in pSPYCE-35S kloniert und immer ein SPYNE- mit einem SPYCE-Konstrukt zusammen in Tabakblätter infiltriert (siehe 2.2.1.4). Es wurde die Homodimerisierung der drei Rezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 (A, C und F) und die Bildung aller möglichen Heterodimere nachgewiesen (B, D, und E). YFP-Fluoreszenz in infiltrierten Tabakepidermiszellen wurde bei 514 nm angeregt, die Emission wurde bei 527 nm gemessen. Für weitere Informationen bezüglich BiFC siehe 2.2.4.2.

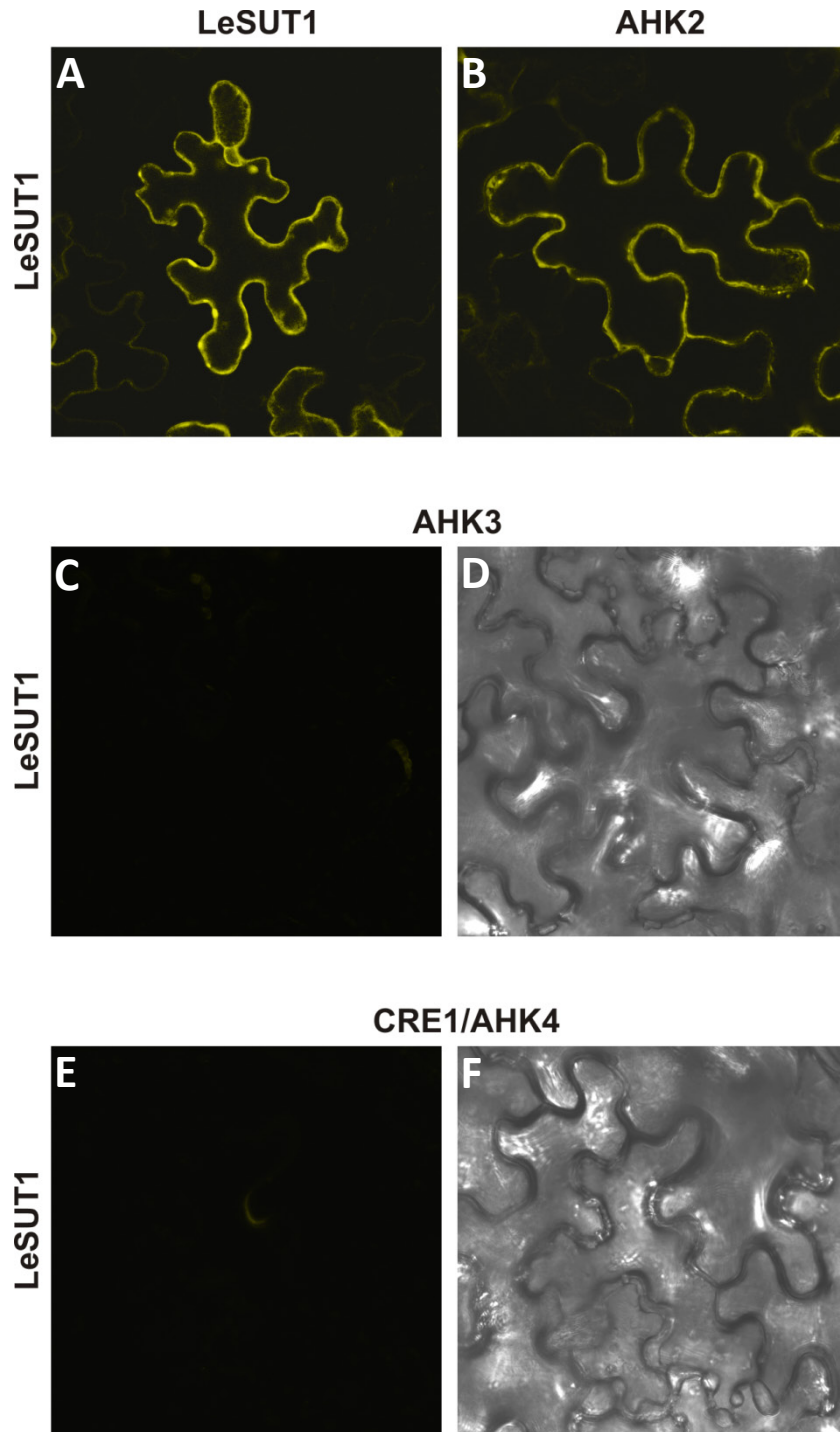


Abbildung 47: BiFC-Analyse zur Interaktion der Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 mit dem Saccharose-Transporter SUT1 aus *Lycopersicon esculentum* in *N. benthamiana*. Die kodierenden Regionen der drei Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 wurden in den BiFC-Vektor pSPYNE-35S kloniert und jeweils zusammen mit pSPYCE-35S-LeSUT1 (Krügel *et al.*, 2008) in Tabakblätter infiltriert (siehe 2.2.1.4), um die Spezifität des Systems zu zeigen. Für AHK2 mit LeSUT1 war eine Interaktion nachweisbar (B). AHK3 und CRE1/AHK4 interagierten nicht mit dem Transporter (C bzw. E). Zusätzlich wurde die Homodimerisierung von LeSUT1 an der Plasmamembran als Kontrolle photographiert (A). YFP-Fluoreszenz in infiltrierten Tabakepidermiszellen wurde bei 514 nm angeregt, die Emission wurde bei 527 nm gemessen. D und F sind die entsprechenden Durchlichtaufnahmen von C und E.

Während AHK2 die Fähigkeit zur Ausbildung von Homodimeren (AHK2-AHK2) und Heterodimeren (AHK2-AHK3) besaß, konnten für die beiden anderen Rezeptoren nur Heterodimere nachgewiesen werden (AHK3-AHK2 und AHK3-CRE1/AHK4). Eine *in planta* Analyse, um diese Resultate zu verifizieren, liegt bislang nicht vor.

Um die Fähigkeit der Rezeptoren zur Dimerisierung *in planta* nachzuweisen, wendeten wir die nicht-invasive Technik der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC, *Split*-YFP) in Epidermiszellen von *N. benthamiana* an (Walter *et al.*, 2004), um einen Beitrag zum besseren Verständnis der Cytokininsignaltransduktion zu leisten. Es wurden alle sechs möglichen Kombinationen in jeweils beiden Richtungen (z. B. pSPYNE-35S-gAHK2 + pSPYCE-35S-AHK3 als auch pSPYNE-35S-AHK3 + pSPYCE-35S-gAHK2) auf YFP-Fluoreszenz hin untersucht. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch den konstitutiv aktiven 35S Promotor gesteuert.

Die BiFC-Studien ergaben, dass innerhalb der Rezeptorfamilie keinerlei Spezifität hinsichtlich der Bildung bestimmter Dimere bestand. Für alle drei Cytokininrezeptoren konnte sowohl die Bildung des entsprechenden Homodimers als auch die Bildung der anderen beiden möglichen Heterodimere nachgewiesen werden (Abb. 46).

Zusätzlich wurde zur Kontrolle die Interaktion mit dem plasmamembranständigen Saccharose-Transporter LeSUT1 untersucht (Krügel *et al.*, 2008). Aufgrund der ER-ständigen Lokalisation von AHK3 und CRE1/AHK4 sollte dieses Experiment als Negativkontrolle dienen und die Spezifität des Testsystems zeigen. Hierbei ergab sich für die Kombination LeSUT1-AHK2 (Abb. 47B) eine unspezifische Interaktion, während jeweils AHK3 bzw. CRE1/AHK4 nicht mit dem Transporter interagierten (Abb. 47C und E). Wie schon in 3.4.2.2 angemerkt, könnte diese Beobachtung ein indirekter Hinweis für eine eher plasmamembranständige Lokalisation von AHK2 sein, die jedoch einer weiteren Bestätigung bedarf. Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, inwiefern die Interaktion von AHK2 mit SUT1 tatsächlich von physiologischer Relevanz ist und nicht nur ein Überexpressionsartefakt darstellte.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass die Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und vermutlich auch AHK2 aus *Arabidopsis thaliana* das Hormon über ihre N-terminale CHASE Domäne binden, wobei die erzielten Ergebnisse für CRE1/AHK4 auf eine Notwendigkeit der angrenzenden transmembranständigen Bereiche für die Funktionalität der Domäne hindeuten. Die bioinformatische und experimentelle Analyse der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 führte zur Identifizierung für die Hormonbindung vermutlich wichtiger Aminosäurereste. Um die Struktur-Funktionsbeziehungen der CHASE-Domäne besser zu verstehen, wurde die Lösung der räumlichen Struktur des Proteins angestrebt. Zwar konnte die CHASE-TM Domäne (CHASE inkl. transmembranständiger Bereiche) zu hoher Reinheit gebracht und die Faltung sowie die Bindung von Cytokinin durch das gereinigte Protein nachgewiesen werden, eine räumliche Strukturanalyse blieb hingegen erfolglos. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und Dimerbildung der Cytokininrezeptoren mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken unternommen, die eine größtenteils endomembranständige Lokalisation und eine generelle Fähigkeit der Cytokininrezeptoren zur Interaktion untereinander zeigten. Im nachfolgenden werden die erzielten Ergebnisse anhand der vorhandenen Literatur näher erläutert und im Einzelnen diskutiert.

4.1 CHASE als Bindungsdomäne der Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2

Anantharaman und Aravind (2001) sowie Mougel und Zhulin (2001) identifizierten anhand bioinformatischer Analysen u. a. im Cytokininrezeptor CRE1/AHK4 eine vermutlich extrazelluläre Sensordomäne, die sie aufgrund ihres Vorkommens in diversen Rezeptoren mit Histidin-Kinase und Nukleotid-Cyklase Domänen ‚CHASE‘ (*cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular*) nannten. Arbeiten von Inoue *et al.* (2001) und Suzuki *et al.* (2001) gaben bereits starke Hinweise darauf, dass CRE1/AHK4 als Rezeptor für Cytokinin fungiert. Erst Yamada *et al.* (2001) konnten aber durch Bindungsstudien mit isolierten Membranen aus *S. pombe* nach Expression von CRE1/AHK4 zeigen, dass diese Histidin-Kinase ein Rezeptor für Cytokinin ist. Zudem stellten sie fest, dass die bereits bekannte *wol* Mutation T301I (Mähönen *et al.*, 2000) innerhalb der CHASE Domäne zu einem totalen Verlust der Cytokininbindung führt, was ein starkes Indiz für eine Bindungsaktivität der CHASE Domäne war. Da jedoch bisher kein direkter experimenteller Nachweis vorlag, dass die CHASE Domäne in CRE1/AHK4 und auch in den beiden anderen Cytokininrezeptoren AHK3 und AHK2 tatsächlich verantwortlich für die Hormonbindung am Rezeptor ist, wurde zunächst die Bindungsaktivität der entsprechenden Domäne von CRE1/AHK4 in einem bakteriellen Cytokininbindungsassay überprüft. Anhand des Vergleichs mit dem kompletten Rezeptor konnte bestätigt werden, dass CHASE tatsächlich die Cytokininbindung des Rezeptors vermittelt (siehe Abb.

9 bzw. Heyl *et al.*, 2007). Eine Bindung an den vermutlich cytoplasmatischen Teil des Rezeptors war hingegen nicht nachweisbar, obwohl Cytokinin auch innerhalb der Zelle vorkommt. Durch eine ähnliche methodische Herangehensweise wurden zuvor u. a. auch die Bindungsdomänen des Ethylenrezeptors ETR1 (Rodríguez *et al.*, 1999; Schaller und Bleecker, 1995), des Brassinosteroidrezeptors BRI1 (Kinoshita *et al.*, 2005) und einer Calmodulin-bindenden Rezeptor-ähnlichen Kinase CaMRLK (Charpenteau *et al.*, 2004) aus *Arabidopsis* identifiziert, was die Zweckmäßigkeit des gewählten Ansatzes gut demonstriert.

Bemerkenswert an den hier erzielten Ergebnissen zur CHASE Domäne ist jedoch, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen die angrenzenden transmembranständigen Bereiche zwingend notwendig waren (CHASE-TM), um eine Bindung des Hormons an die Domäne zu gewährleisten. Der als CHASE Domäne definierte Bereich (anhand der Pfam-Datenbank, <http://pfam.sanger.ac.uk/>) wies hingegen alleine keinerlei Bindungsaktivität auf. Zwar wurde für AHK3 und AHK2 nur die Bindung der entsprechenden CHASE-TM Domänen untersucht und nicht auch die der CHASE Domänen alleine (siehe Abb. 11), aber aufgrund des identischen strukturellen Aufbaus aller drei Cytokininrezeptoren ist davon auszugehen, dass die für CRE1/AHK4 gemachten Beobachtungen auch auf AHK3 und AHK2 zutreffen.

Bei den Expressionsversuchen mit der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 in *E. coli* stellte sich heraus, dass das Protein in *E. coli* nicht funktionell exprimiert bzw. korrekt gefaltet wird, sondern in *inclusion bodies* eingelagert wird, was ein Grund für die nicht vorhandene Cytokininbindung der CHASE Domäne sein kann. Trotzdem kann nicht vollends ausgeschlossen werden, dass in der Tat nur die CHASE-TM Domäne ein funktionelles d. h. cytokininbindendes Protein darstellt. Im Allgemeinen wird den Transmembrandomänen (TM Domänen) in Rezeptorkinasen, im Besonderen der TM Domäne, die der Sensor-Domäne folgt und an die sich die cytoplasmatische katalytische Domäne anschließt, eine wichtige Funktion bei der Signalweiterleitung von der Sensor- zur Kinase-Domäne zuerkannt. Dabei werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wie membranständige Rezeptoren das Signal in die Zelle weiterleiten. Anhand von Strukturanalysen wurden Hubkolben-ähnliche Bewegungen einer Transmembranhelix im Verhältnis zur anderen (*piston-like*) und Drehbewegungen (Ottemann *et al.*, 1999; Scott und Stoddard, 1994) als auch zusammengesetzte Bewegungen (*swinging-piston*) (Chervitz und Falke, 1996) innerhalb der TM Domänen nach Ligandenbindung an die Sensordomäne beobachtet. Miwa *et al.* (2007) identifizierten fünf konstitutiv aktive CRE1/AHK4 Mutanten, von denen drei eine Punktmutation in der zweiten TM Domäne besitzen (G435C, F436S, M447T). Es scheint, als würden diese Mutanten eine *locked-on* Konformation einnehmen, ohne Bindung von Cytokinin, was eindeutig auf eine Funktion der zweiten TM Domäne bei der Cytokininisignaltransduktion in CRE1/AHK4 hinweist. Diese Vermutung wird vor allem dadurch gestützt, dass eine der Rezeptormutanten (F436S) in der Lage ist, die

cytokinininsensitive *wol* Mutation (T301I) cytokininunabhängig zu komplementieren (Miwa *et al.*, 2007).

Neben der Funktion für die Signalweiterleitung sind weitere hypothetische Möglichkeiten generell denkbar, warum die Transmembranbereiche für die CHASE Domäne direkt oder indirekt von funktioneller Bedeutung sind: Orientierung des Proteins in der Membran, Bildung eines funktionellen Dimers, direkte Beteiligung an der Cytokininbindung oder Stabilität der Domäne.

Eine Bedeutung der membranständigen Bereiche für die generelle Orientierung des Proteins in der Membran und die Dimerbildung der Sensordomäne sind denkbar, aber Strukturanalysen diverser Sensordomänen bakterieller Histidinkinasen mit und ohne Liganden deuten auf eine Liganden- und auch transmembranunabhängige Dimerisierung der entsprechenden Sensordomänen hin (Cheung and Hendrickson, 2008; Cheung *et al.*, 2008; Reinelt *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1996. Zudem belegen die Strukturen, dass die Sensordomänen funktionelle, d. h. bindende Domänen ausbilden, ohne dass es eine Beteiligung der angrenzenden TM Domänen bei der korrekten Orientierung oder auch Faltung der Domäne bedarf. Deletionsexperimente am bakteriellen Aspartatrezeptor (Tar) weisen z. B. darauf hin, dass diese Rezeptorhistidinkinase auch ohne die beiden TM Domänen Aspartat binden kann und eine im Vergleich zum Wildtyprezeptor allerdings schwächere Fähigkeit zur Signaltransduktion behält (Ottemann und Koshland, 1997). Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung der Sensordomäne und einige Liganden-induzierte Konformationsänderungen im Rezeptor nicht die Präsenz von Transmembrandomänen voraussetzen, um das Signal zur katalytischen Domäne weiterzuleiten. Ob dies auch auf andere Histidinkinasen zutrifft, ist nicht untersucht. Unterstützt werden die am Rezeptor Tar gewonnenen Ergebnisse durch ähnliche Beobachtungen an einem humanen Wachstumsfaktor- und einem Cytokininrezeptor (Fernando *et al.*, 1991; Hudziak und Ullrich, 1991). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese beiden Rezeptoren keine Histidinkinasen darstellen. Die Expression der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 im zellfreien System in Form von wasserunlöslichen Präzipitaten und der Expression in *E. coli* in *inclusion bodies* sind wie bereits oben erwähnt ein Hinweis darauf, dass diese Sensordomäne hingegen sich ohne die angrenzenden TM Domänen nicht korrekt faltet oder möglicherweise die korrekte Orientierung in einer Membranumgebung fehlt. Hingegen konnte die CHASE-TM Domäne unter Zusatz von Detergenz im nativen Zustand exprimiert werden, was durch den Nachweis der Cytokininbindung (siehe Abb. 37) und einer Sekundärstruktur, die gut mit der Vorhersage übereinstimmt (siehe Tab. 13), belegt werden konnte. Die Ergebnisse zur CHASE-TM Domäne werden auch unterstützt durch Studien an humanen Rezeptoren bzw. deren Sensordomänen, die zeigen, dass eine Deletion der angrenzenden TM Domänen zu einem Verlust der Bindungsaktivität oder insgesamt der Stabilität der entsprechenden Sensordomäne führen kann (Du *et al.*, 2009; Chiang und Knowles, 2008). Aufgrund der hier beschriebenen Diskrepanz bei den Ergebnissen für verschiedene bakterielle und humane Rezeptoren hinsichtlich eines Einflusses von TM-Domänen auf die Ligandenbindungsdomäne und im

Hinblick auf die eigenen Ergebnisse kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden, ob für die CHASE Domäne die TM Bereiche tatsächlich eine essentielle Funktion bei der Etablierung einer funktionellen Bindungsdomäne einnehmen.

Eine direkte Beteiligung der beiden TM Domänen an der Cytokininbindung der CHASE Domäne ist dagegen unwahrscheinlich. Diese Annahme gründet sich auf die bioinformatischen Analysen von Anantharaman und Aravind (2001) sowie Mougel und Zhulin (2001), die offenbarten, dass alle CHASE-beinhaltenen Proteine strukturell betrachtet einen Rezeptor-ähnlichen Aufbau haben, der stark dem von Proteinen mit der ligandenbindenden CACHE Domäne ähnelt (Anantharaman und Aravind, 2000). Die CHASE Domäne tritt in den entsprechenden Proteinen stets N-terminal im extrazellulären oder periplasmatischen Raum auf und ist von membranständigen Bereichen umgeben, an die sich intrazellulär die Domänen für die Signalweiterleitung anschließen. Diese strukturellen Gegebenheiten prädestinieren CHASE als Ligandenbindungsdomäne. Unterstützt wird diese Annahme durch die experimentelle Beobachtung, dass Insertionen in der CHASE Domäne einer Histidin-Kinase aus *Dictyostelium discoideum* (DhkA) die Bindung vom Liganden aufhebt (Wang *et al.*, 1999). Hinsichtlich des strukturellen Aufbaus unterscheiden sich die Cytokininrezeptoren zudem vom Ethylenrezeptor ETR1, der zwar auch als Rezeptor-Histidin-Kinase fungiert aber keine extrazelluläre Domäne besitzt, und nachweislich mit seinen drei Transmembranhelices den Liganden bindet (Rodríguez *et al.*, 1999; Schaller und Blecker, 1995). Stark abweichend zu den Ergebnissen zur CHASE Domäne von CRE1/AHK4 sind zudem Resultate, die Studien an den beiden Osmosensoren EnvZ aus *E. coli* (Leonardo und Forst, 1996) und Sln1 aus *S. cerevisiae* (Reiser *et al.*, 2003; Ostrander and Gorman, 1999) erbracht haben. Für beide Rezeptoren scheint die bestimmte Kombination aus TM Domänen und cytoplasmatischer Domäne einzigartig und untrennbar mit der Funktion des jeweiligen Rezeptors verknüpft zu sein, während nur die Integrität der periplasmatischen Domäne als solches und nicht bestimmte Bereiche für die Funktionalität des Osmosensors wichtig zu sein scheinen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass z. B. nach einem Austausch der periplasmatischen Domäne von Sln1 gegen die CHASE Domäne von CRE1/AHK4 der Sln1-Rezeptor weiterhin cytokininunabhängig als Osmosensor fungiert (Reiser *et al.*, 2003). Für Sln1 im speziellen lassen die bisherigen Resultate vermuten, dass die Transmembransegmente als Osmosensoren wirken, während die extrazelluläre Domäne eine essentielle Funktion bei der Dimerisierung und der daraus resultierenden Aktivierung der Histidin-Kinase ausübt (Ostrander und Gorman, 1999). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese experimentellen Beobachtungen auch auf ligandenbindende Histidin-Kinasen mit einem zu Sln1 und EnvZ ähnlichem strukturellem Aufbau (wie z. B. den Cytokininrezeptoren) übertragen werden können.

4.2 Eine bioinformatische Analyse CHASE-Domäne von CRE1/AHK4 führt zur Identifizierung für die Cytokininbindung essentieller Aminosäurereste

Die Vorhersage funktionell wichtiger Aminosäurereste mit Hilfe von Proteinsequenzabgleichen und/oder vorhandener 3D Strukturen stellt die computerbasierte biologische Forschung weiterhin vor enorme Herausforderungen. Es wird angenommen, dass hochkonservierte Positionen innerhalb einer Proteinfamilie vermutlich von großer genereller Bedeutung sind (Innis *et al.*, 2004; Panchenko *et al.*, 2004; Aloy *et al.*, 2001). Dabei scheinen Positionen, die innerhalb einer Untergruppe von nahverwandten Proteinen einer Familie konserviert aber variabel zwischen den einzelnen Untergruppen sind, für spezifische Unterschiede wie z. B. der Substratspezifität zwischen den Untergruppen verantwortlich zu sein (Mirny und Shakhnovich, 1999). Eine Vielzahl an computerbasierten Methoden wurde in der jüngeren Vergangenheit entwickelt, um solche funktionell interessanten Aminosäurereste zu identifizieren. Bei diesen Analysen wurden Informationen aus Sequenz- und Phylogenieanalysen, biochemische Eigenschaften von Aminosäureresten sowie 3D Strukturmuster herangezogen (die folgenden Referenzen stellen nur eine kleine Auswahl der vorhandenen Literatur zu diesem Thema dar: (Kalinina *et al.*, 2009; Pei *et al.*, 2006; Landau *et al.*, 2005; Jones und Thornton, 2004; Kalinina *et al.*, 2004; del Sol *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2003; Aloy *et al.*, 2001; Lichtarge *et al.*, 1996; Casari *et al.*, 1995). In mehreren Fällen konnten überdies Mutageneseexperimente die Zweckmäßigkeit der bioinformatischen Vorhersagen bestätigen (Budovskaya *et al.*, 2005; Sowa *et al.*, 2001; Onrust *et al.*, 1997). Die computerbasierte Analyse der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 konzentrierte sich auf die Identifizierung von Resten, die eine geringe Evolutionsrate in Pflanzen aufweisen und zum anderen auf Reste, die in allen Subgruppen langsam evolvieren, aber in jeder Subgruppe durch eine anderen konservierten Rest gekennzeichnet sind (siehe Abb. 12 bzw. Heyl *et al.*, 2007). Die nachfolgende experimentelle Analyse der zuvor als potentiell wichtig für die Bindung eingestuftem Aminosäurereste mittels Mutagenese und Überprüfung der Bindungsaktivität bestätigte den Nutzen des angewandten Ansatzes. Mutationen an vier der fünf selektierten Positionen resultierten entweder in einem totalen Verlust (F304A, T317A) oder zumindest in einer starken Verminderung der Cytokininbindung (W244A, R305A) (siehe Abb. 13 bzw. Heyl *et al.*, 2007).

Dabei sollte angemerkt werden, dass die Aminosäuren, bei denen der größte Effekt beobachtet wurde (F304, R305, T317) und die Positivkontrolle T301, in β -Faltblättern im Zentrum der CHASE Domäne liegen (Abb. 48). Hingegen sind die Reste K297 und W244, bei denen die Mutation zu Alanin gar keinen oder den von allen untersuchten Resten geringsten Effekt verursachte, in Nachbarschaft zu α -Helices angeordnet. Darüber hinaus unterscheiden sich diese beiden Aminosäurereste von den anderen drei untersuchten dahingehend, dass diese in den pflanzlichen CHASE Domänen hoch konserviert sind, während sie in den restlichen CHASE Domänen (fast) keine Konservierung aufweisen. Es kann spekuliert werden, ob die erwähnten β -Faltblätter Teil der Bindungstasche für Cytokinin im Rezeptor

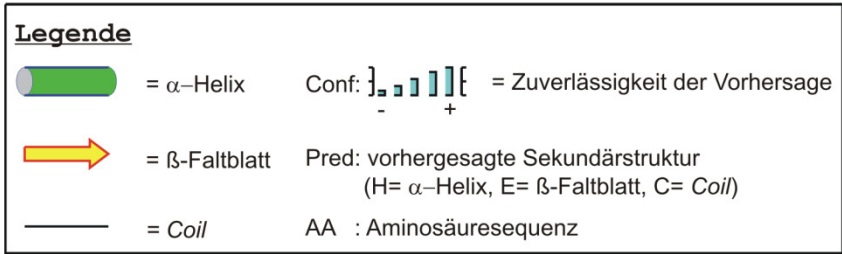
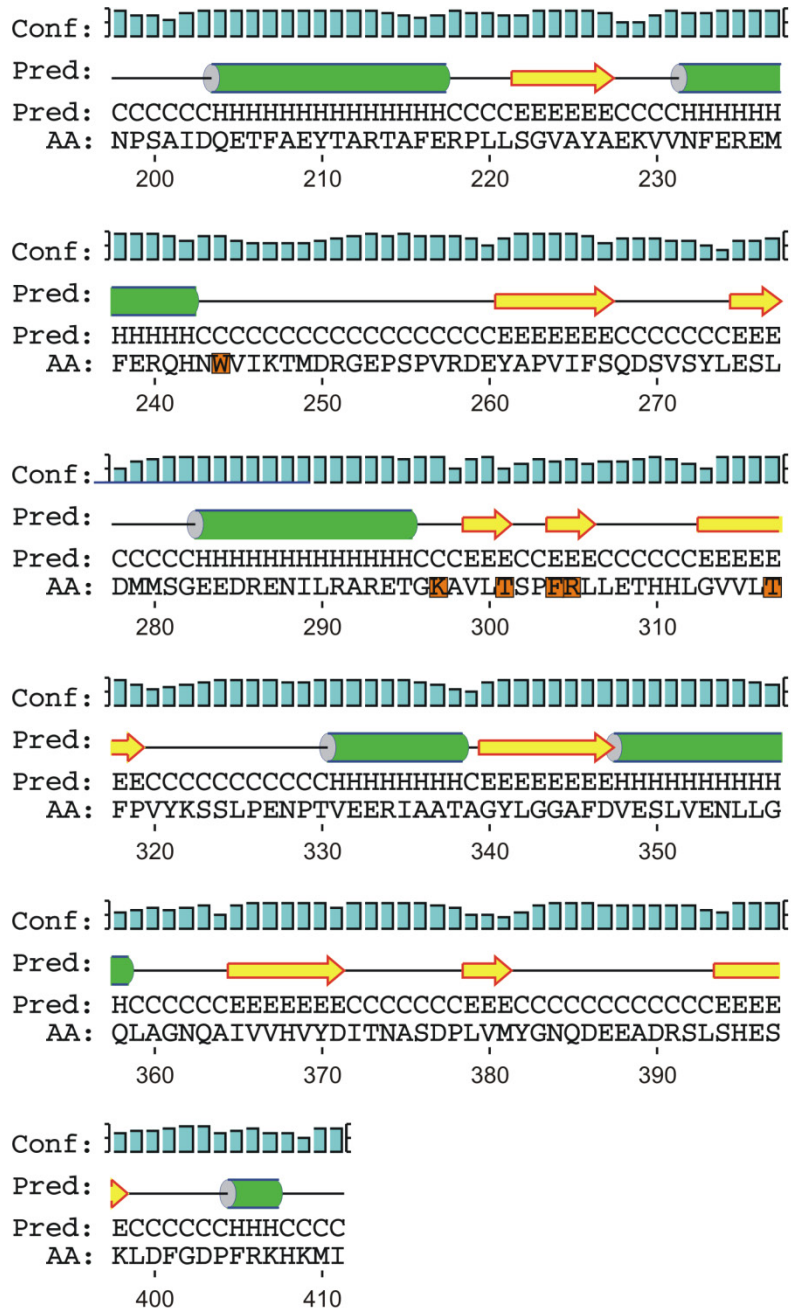


Abbildung 48: Sekundärstrukturvorhersage für die CHASE Domäne von CRE1/AHK4. Mittels PSIPRED v2.6 (Bryson *et al.*, 2005; Jones, 1999) wurde die CHASE Domäne (Aminosäuren 198-411) auf α -Helices, β -Faltblätter und *Coil*-Strukturelemente untersucht. Aminosäurepositionen, deren Funktion für die Cytokininbindung im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, sind orange hervorgehoben. Für weitere Informationen siehe Legende.

sind, wobei nur eine räumliche Struktur, wenn möglich in Kombination mit dem gebundenen Liganden, tatsächlich darüber Aufschluss geben kann, welche Aminosäurereste direkt an der Bindung beteiligt sind. Im folgenden werden die erzielten Ergebnisse bezüglich der Identifizierung von bindungsrelevanten Aminosäuren anhand eines Strukturmodells für die CHASE-Domäne und anhand von bereits gelösten 3D Strukturen Cytokinin-bindender Proteine diskutiert und mögliche Erklärungsansätze für die gemachten Beobachtungen gegeben. Es muss trotzdem erwähnt werden, dass diese nur rein spekulativ sein können, da keine 3D Struktur einer CHASE Domäne bis zu diesem Zeitpunkt gelöst worden ist. Die Erstellung eines Homologiemodells war daher nicht möglich.

Es wurde zunächst eine *ab initio* Vorhersage (siehe 2.2.6, Tab. 12) der CHASE Domäne vorgenommen (Abb. 49). Mit Hilfe der generierten Modellstruktur ist es u. U. möglich, Aussagen über die Relevanz der zuvor identifizierten Reste zu treffen. Problematisch bei *ab initio* Ansätzen ist trotz der stetigen Verbesserung der Methoden, dass die Verlässlichkeit und Genauigkeit der erstellten Modelle noch gering ist (Aloy *et al.*, 2005).

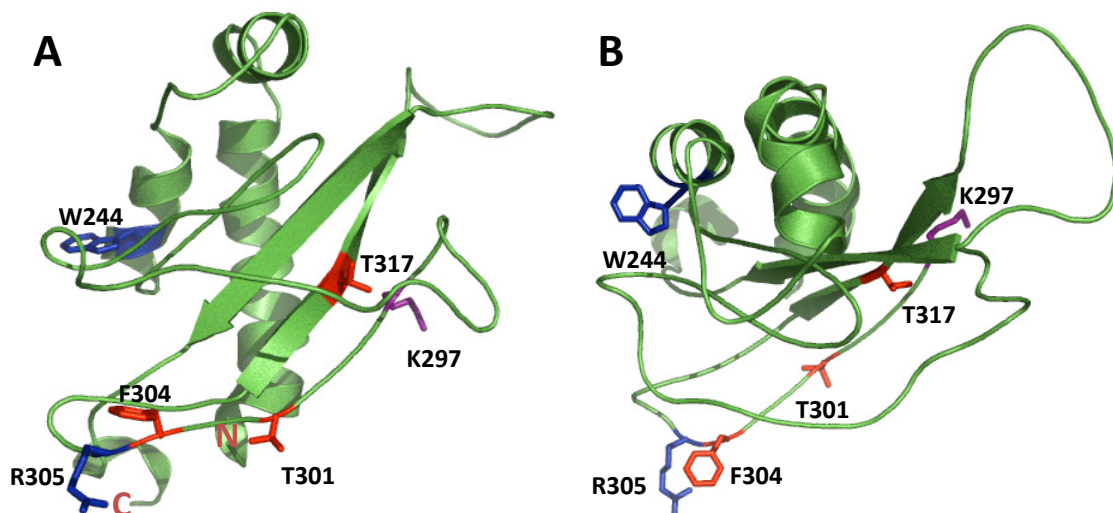


Abbildung 49: Strukturvorhersage der CHASE Domäne von CRE1/AHK4. Anhand der Primärstruktur wurde ein *ab initio* Modell der CHASE Domäne mit Hilfe der Programme 3Dpro und MaxSprout (siehe Tab. 12) erstellt. (A) Ansicht der Domäne parallel zur Membranoberfläche. (B) Ansicht des Modells in Richtung der Membranebene. Die Seitenketten der Aminosäurepositionen, die in dieser Arbeit analysiert wurden, sind zusätzlich dargestellt und farblich hervorgehoben. Aminosäurereste, deren Mutation zu einem totalen Verlust der Cytokininbindung führte, sind rot hervorgehoben. Blau hervorgehoben sind Reste, deren Mutation in einer verringerten Bindung resultierte und in Violett dargestellt ist der Rest, für den kein Einfluss auf die Ligandenbindung festgestellt wurde. In A sind überdies der N- und C-Terminus der Domäne markiert (N bzw. C).

Insgesamt betrachtet weist das Modell der CHASE Domäne α -Helix- und β -Faltblatt-Elemente auf, wobei ein Großteil der Domäne jedoch keinerlei Sekundärstrukturelemente enthält (Abb. 49) und bei weitem nicht so viele α -Helices und β -Faltblätter besitzt, wie es die Sekundärstrukturvorhersage vorgibt (vergleiche Abb. 48). Dabei sollte erwähnt werden, dass die Vorhersage der Sekundärstruktur eines Proteins generell eine höhere Verlässlichkeit besitzt als die Vorhersage seiner Tertiärstruktur.

Nur der Rest T317 befindet sich in der Modellstruktur in einem β -Faltblatt, während T301, F304 und R305 in unstrukturierten Bereichen des Proteins liegen. Das Modell ist jedoch insoweit sinnvoll, weil die beiden Enden der Domäne, an die sich die TM Domänen anschließen, in die gleiche Richtung zeigen, was für den korrekten Einbau in die Membran eine günstige Voraussetzung ist (Abb. 49A, N- und C-Terminus). Zusätzlich kann bei Betrachtung des Modells in Richtung der Membranebene spekuliert werden, dass die beiden antiparallelen β -Faltblätter Teil einer Bindungstasche für Cytokinin sind (Abb. 49B). Die Reste T301 und T317 würden sich demnach in räumlicher Nähe des Liganden befinden und könnten somit an der Bindung beteiligt sein. Dies spiegelt die Ergebnisse aus den Bindungsassays wider, nach denen beide Reste für die Bindung essentiell zu sein scheinen. Auch eine Mutation an Position F304 führte zu einem vollständigen Verlust der Ligandenbindung (siehe Abb. 13). In Modell liegt diese Aminosäure aber weiter entfernt von den Resten T301 und T317, was demnach gegen eine direkte Beteiligung an der Bindung sprechen würde. Es muss stets berücksichtigt werden, dass alle durchgeführten Mutationen auch zu einer gestörten Faltung der CHASE Domäne führen können und damit möglicherweise nur indirekt für die Bindungsfähigkeit der Domäne mitverantwortlich sind.

Mutationen an den Positionen W244 und R305 resultierten in einer verminderten Cytokininbindung um 40% respektive 60% (siehe Abb. 13). Tatsächlich liegen beide Reste weiter entfernt von der vermutlichen Bindungstasche als T301 und T317. Unter Umständen ist die starke Verminderung der Bindung nach Mutation von R305 aber auch auf eine indirekte Wirkung aufgrund der Nähe zur vermutlich für die Bindung sehr wichtigen Aminosäure F304 zurückzuführen. Die Modellstruktur erlaubt keine Hypothese darüber, warum K297 für die Funktion der CHASE Domäne nicht wichtig zu sein scheint.

In der jüngeren Vergangenheit wurden die Kristallstrukturen zweier Cytokinin-bindender Proteine aus *Vigna radiata* (Cytokinin specific binding protein, CSBP) und *Lupinus luteus* (Pathogenesis-related class 10, PR-10) im Komplex mit *trans*-Zeatin gelöst (Fernandes *et al.*, 2008; Pasternak *et al.*, 2006). Interessanterweise haben beide strukturell verwandten Proteine eine Bindungstasche für Cytokinin, die von mehreren zentral gelegenen β -Faltblättern und einer α -Helix ausgekleidet wird. Auch die CHASE Domäne besitzt im Zentrum β -Faltblätter, die aufgrund der Mutagenesestudien an der Bildung der Bindungstasche wahrscheinlich beteiligt sind. Daher ist es möglich, dass die Strukturen der beiden angesprochenen Proteine auf eine generell konservierte Struktur Cytokinin-bindender Proteine einschließlich der CHASE Domänen der Cytokininrezeptoren hinweisen. Ferner wird das

Zeatinmolekül in der Bindungstasche des CSBP zum einen durch Wasserstoffbrücken mit einem Threonin- (T) und einem Glutamatrest (E) gebunden (Pasternak *et al.*, 2006). Mutationen in der CHASE Domäne der Aminosäuren T301, T317 (neben R305) führen zu einem Verlust bzw. Verminderung der Bindung, was zusammen mit den Strukturdaten des CSBP auf die Wichtigkeit von Resten mit einer Hydroxyl- oder Carboxylgruppe für die Bindung hinweist. Die Kristallstruktur des CSBP-Zeatin Komplexes offenbart zudem eine Vielzahl stabilisierender van-der-Waals Bindungen zwischen dem Zeatinmolekül und aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y), was sich auch im Einklang mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur CHASE Domäne befindet, da die Aminosäuren W244 und F304 u. U. auch eine wichtige Rolle bei der Cytokininbindung zu spielen scheinen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die genauen physiologischen Funktionen der strukturell verwandten Proteine CSBP und PR-10 noch unklar sind, insbesondere ob sie an der Regulation des intrazellulären Cytokininstatus der Pflanze beteiligt sind. Für PR-10 Proteine wird eine Rolle während der Pathogeninfektion und der pflanzlichen Entwicklung diskutiert (van Loon and van Strien, 1999). Zudem besitzen beide Proteine nur eine im Vergleich zu den Cytokininrezeptoren sehr geringe Affinität zu *trans*-Zeatin von 10^{-4} M (Fernandes *et al.*, 2009; Pasternak *et al.*, 2006), und zumindest für PR-10 Proteine wurde neben der Fähigkeit Cytokinin zu binden, auch die Bindung von Steroiden, Fettsäuren und Flavonoiden demonstriert (Koistinen *et al.*, 2005; Marković-Housley *et al.*, 2003; Mogensen *et al.*, 2002), was auf eine hohe Unspezifität hinsichtlich der Cytokininbindung dieses Proteins schließen lässt.

Die Kristallstruktur einer humanen Cyklin-abhängigen Kinase (CDK2) im Komplex mit dem Cytokinin Isopentenyladenin (iP) als spezifischem Inhibitor des Enzyms zeigt eine von β -Faltblättern geformte Bindungstasche, was auch, wie bereits oben erläutert, für die CHASE Domäne vermutet wird. Die Bindung des Liganden wird vornehmlich durch hydrophobe und van-der-Waals Kontakte mit Phenylalanin (F) und unpolare aliphatische Aminosäuren wie Leucin (L), Isoleucin (I) oder Valin (V) stabilisiert (Schulze-Gahmen *et al.*, 1995), was in den hydrophoben Eigenschaften von iP begründet ist. Auch für die Bindung von *trans*-Zeatin (tZ) an die CHASE Domäne von CRE1/AHK4 sind, den Ergebnissen nach zu urteilen, aromatische Aminosäuren wichtig. Die fehlende Hydroxylgruppe in iP im Vergleich zu tZ ist jedoch wahrscheinlich der Grund, warum in der Kristallstruktur der CDK2 mit iP Wasserstoffbrücken zwischen polaren Aminosäureresten und dem Liganden kaum vorhanden sind (3 von insgesamt 28 Kontakten) (Schulze-Gahmen *et al.*, 1995), während für die Bindung von tZ an die CHASE Domäne Threoninreste von essentieller Bedeutung zu sein scheinen.

Darüber hinaus existiert die Kristallstruktur einer Cytokininoxidase/dehydrogenase aus *Zea mays* (ZmCKX1) im Komplex mit Cytokinin, die wichtige Erkenntnisse zum katalytischen Reaktionsmechanismus des Cytokininabbaus in der Pflanze erbrachte (Malito *et al.*, 2004). Die Tertiärstruktur von ZmCKX1 und auch die Sekundärstruktur unterscheiden sich jedoch in größerem

Maße von denen der zuvor erwähnten Cytokinin-bindenden Proteine CSBP und PR-10 und in Bezug auf die Sekundärstruktur auch von der CHASE Domäne von CRE1/AHK4. Dies lässt vermuten, dass die mechanistischen Unterschiede zwischen der Bindung von Cytokinin und seines Abbaus sich möglicherweise auch in verschiedenen Proteinstrukturen widerspiegeln.

4.3 Ein zellfreies Expressionssystem erlaubt die Überexpression einer funktionellen CHASE-TM Domäne

Viele Membranproteine treten nur in vergleichsweise geringer Menge in ihrer natürlichen Umgebung auf und machen daher die Überexpression in einem heterologen System vonnöten. Doch gerade die Überexpression für z. B. spätere Strukturanalysen stellt sich jedoch in vielen Fällen als sehr problematisch dar (Wagner *et al.*, 2006). Der korrekte Einbau einer großen Anzahl rekombinanter Membranproteine in die Zellmembran des Expressionswirtes und die Überladung seiner intrinsischen Transportkapazitäten können Gründe für eine Toxizität des Proteins sein. Darüber hinaus können notwendige Translokationssignale für das Protein-*Targeting* zur Zellmembran im Expressionsorganismus fehlen, um eine funktionelle Faltung des Membranproteins zu gewährleisten (Wagner *et al.*, 2006; Tate, 2001). Speziell die Verwendung von *E. coli* als Expressionswirt beinhaltet diverse potentielle Probleme, die im Fehlen bestimmter posttranslationaler Modifikationen, dem Gebrauch anderer Codons, der Bildung von *inclusion bodies* oder auch dem Fehlen spezifischer Translokationssysteme begründet sind. Tatsächlich war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, den kompletten Cytokininrezeptor CRE1/AHK4 oder auch nur die hydrophobe CHASE Domäne mit angrenzenden Transmembrandomänen in *E. coli* zu überexprimieren (siehe Abb. 29 bzw. Abb. 19). Die Abnahme der OD₆₀₀ nach Induktion der Expression kann dabei auch als Hinweis auf toxische Effekte beider Proteine verstanden werden. Das Bindungsstudien mit diesen Proteinen nach Expression in *E. coli* möglich waren und die untersuchten GST-Fusionsproteine auch mittels Immunoblot nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 11B und Abb. 13B), zeugt zumindest von einer generell möglichen Expression von CRE1/AHK4 oder auch der CHASE-TM Domäne in Bakterien, wenn auch nur auf einem geringen Niveau. Suzuki *et al.* (2001) konnten zeigen, dass CRE1/AHK4 an ein intrinsisches Zwei-Komponenten-System in Bakterien ankoppeln kann und Signaltransduktion ermöglicht. Es ist zu vermuten, dass eine Überexpression von CRE1/AHK4 in Bakterien aufgrund der nachgewiesenen Phosphataseaktivität des Rezeptors zu einem vollständigen Abschalten des Histidin-Aspartat-Phosphorelais in Bakterien führen würde, was die geringe Expressionsstärke zumindest für den kompletten Rezeptor erklären könnte.

Es wurde darüber hinaus die Anwendbarkeit eines pflanzlichen Proteinexpressionssystems basierend auf viralen Vektoren (Magnifektion) für die Expression der CHASE und der CHASE-TM Domäne überprüft (Gleba *et al.*, 2005; Marillonnet *et al.*, 2005). Bereits wenige Tage nach der Transformation

zeigten die infiltrierten Tabakblätter eine ausgeprägte Gelbfärbung mit Nekrosenbildung, während Kontrollblätter keinerlei Symptomatik aufwiesen (siehe Abb. 32). Zusammen mit dem Fehlen entsprechender Proteinexpression (siehe Abb. 33) deuten diese Ergebnisse auf ein starkes toxisches Potential der CHASE und der CHASE-TM Domäne hin, welches vermutlich durch die Verwendung von den für starke Überexpression konstruierten Vektoren besonders zum Ausdruck kommt. Möglicherweise sind pflanzliche Proteine aber auch generell ungeeignete Kandidaten für die Magnifektion, da auch zwei weitere Proteine, der Transkriptionsfaktor *ARR1* aus *Arabidopsis* und das Enzym Acetamidase (AMDS) aus *Aspergillus nidulans*, nicht mit Hilfe dieser Technik exprimiert werden konnten und zudem dieselben phänotypischen Merkmale wenige Tage nach der Infiltration festgestellt wurden (A. Pfeifer, persönliche Mitteilung). Selbst die als nicht cytokininbindend identifizierte CHASE-F304A Mutante war nicht exprimierbar. Bisherige Arbeiten zu diesem Proteinexpressionssystem zeigen hingegen nur die starke Überexpression humaner Proteine wie die eines ImmunglobulinG-Antikörpers oder des *human growth hormone* (hGH) (Giritch *et al.*, 2006; Gils *et al.*, 2005), während hinsichtlich der Anwendbarkeit der Magnifektion auf pflanzliche Proteine bisher keine publizierten Daten vorliegen.

Im Gegensatz zu den zuvor erläuterten Expressionssystemen war es mit Hilfe eines zellfreien Systems möglich, die CHASE-TM Domäne im funktionellen Zustand zu überexprimieren (siehe Abb. 25). Im Allgemeinen hat sich diese Methode in der jüngeren Vergangenheit vor allem bei der ansonsten schwierigen Expression für die Strukturanalyse ausreichender Mengen membranständiger Proteine etabliert (Katzen *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2008, Liguori *et al.*, 2007). Bei den Expressionsversuchen kristallisierte sich besonders das langkettige Polyoxyethylenderivat Brij58 als geeignetes Detergenz heraus, die CHASE-TM Domäne im löslichen Zustand in Mizellen zu exprimieren. Dies korrespondiert mit früheren Arbeiten zur zellfreien Expression diverser humaner und bakterieller Membranproteine, nach denen Brij-Detergenzien die Transkriptions- und Translationsmaschinerie des Systems auch in hohen Konzentrationen nicht zu stören scheinen (Klammt *et al.*, 2007; 2006; 2005). Selbst der Vollängenrezeptor CRE1/AHK4 konnte mit geringerer Ausbeute im Vergleich zur CHASE-TM Domäne exprimiert werden (siehe Abb. 31). Dabei können Proteine größeren Molekulargewichtes (> 100 kDa) vermutlich generell schwerer zellfrei exprimiert werden, da publizierte Ergebnisse hierzu nicht vorliegen. Mittels CD-Spektroskopie und eines *in vitro* Cytokininbindungsassays konnten die Faltung und Aktivität der gereinigten CHASE-TM Domäne bestätigt werden, was letztendlich zeigt, dass das zellfreie Expressionssystem eine geeignete Alternative zu anderen Methoden der Proteinexpression darstellt. Zwar waren in den aufgenommenen CD-Spektren der CHASE-TM Domäne zum Teil stärkere Schwankungen vor allem im Anteil an β -Faltblättern zu beobachten, jedoch kann nicht vollends ausgeschlossen werden, dass diese von Messungenauigkeiten herrühren (siehe Abb. 36). Daher ist es nicht möglich, Aussagen darüber zu treffen, ob die Zugabe von Cytokinin tatsächlich zu Veränderungen in der Sekundärstruktur führt.

Tatsächlich kann die Ligandenbindung an ein Protein bzw. eine Domäne subtile (Yeh *et al.*, 1996); (Milburn *et al.*, 1991) bis hin zu größeren Konformationsänderungen (z. B. Verschluss der Bindungstasche) (Zhou *et al.*, 2008; Neiditch *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2004; Björkman und Mowbray, 1998) oder sogar Veränderungen der Sekundärstruktur verursachen (Kaarsholm *et al.*, 1993). Der durchgeführte *in vitro* Cytokininbindungsassay bestätigte die Ergebnisse aus dem bakteriellen Bindungsassay dahingehend, als dass die zellfrei exprimierte und gereinigte CHASE-TM Domäne in der Lage ist, *trans*-Zeatin spezifisch zu binden, während nur die CHASE Domäne alleine keinerlei Bindung vermittelte (siehe Abb. 37). Anzumerken ist, dass CHASE alleine nicht in Lösung exprimiert werden konnte und auch die Resolubilisierung des Präzipitates aus der zellfreien Expression mit dem Detergenz LMPG in keinem funktionellen Protein resultierte. Frühere Arbeiten zeigen hingegen, dass mit LMPG in Lösung gebrachte präzipitierte Proteine ihre korrekte Faltung und Funktionalität zurückerhalten, was darauf hinweist, dass diese während der zellfreien Expression gebildeten Membranproteinpräzipitate weniger denaturiert vorliegen als z. B. Proteine in *inclusion bodies* (Klammt *et al.*, 2004). Für die CHASE Domäne kann daher vermutet werden, dass, wie bereits in 4.1 erläutert, die TM Domänen zwingend für die Funktionalität von CHASE erforderlich sind. Aus Proteingel- und MALDI-MS-Analysen mit der gereinigten CHASE-TM Domäne konnte im Übrigen geschlossen werden, dass die Domäne Dimere aber auch in geringem Umfang höhermolekulare Komplexe wie Tri- und Tetramere ausbildet (siehe Abb. 34 und Abb. 35), was entweder ein Artefakt der Reinigung aber zumindest hinsichtlich der nachgewiesenen Dimere auch biologisch relevant sein kann. Zumindest bestätigen verschiedene Strukturanalysen die Dimerbildung diverser Sensordomänen bakterieller Histidin-Kinasen (Moore und Hendrickson, 2009; Cheung *et al.*, 2008; Cheung und Hendrickson, 2008; Sevvana *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Yeh *et al.*, 1993). Möglicherweise trifft diese Beobachtung auch auf die Sensordomäne von CRE1/AHK4 zu. Es muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass neben der Veränderung molekularer Eigenschaften auch die Bildung von Oligomeren durch einen terminalen His-Tag, wie in dieser Arbeit für die Reinigung der CHASE-TM Domäne verwendet, induziert werden kann (Amor-Mahjoub *et al.*, 2006; Perron-Savard *et al.*, 2005; Wu and Filutowicz, 1999). Ferner kann die Wahl des Detergenzes im zellfreien System auch einen starken Einfluss auf die Bildung von Oligomeren bzw. die prozentuale Verteilung von Dimeren und Oligomeren höherer Ordnung an der Gesamtmenge synthetisierten Proteins spielen (Klammt *et al.*, 2007). Letztendlich kann daher keine abschließende Aussage hinsichtlich einer tatsächlichen und biologisch relevanten Dimerisierung der CHASE-TM Domäne getroffen werden.

Im Anschluss an die Reinigung der CHASE-TM Domäne wurde die Lösung der räumlichen Struktur der Domäne angestrebt. Die Aufkonzentrierung des Proteins stellte sich jedoch als sehr problematisch heraus. Ab einer ungefähren Konzentration von 2 mg/ml begannen sich Präzipitate in der Proteinlösung auszubilden, was unabhängig von der Methode zur Aufkonzentrierung passierte (Ultrafiltration, Dialyse). Da das Auftreten dieses Phänomens für ein Protein nicht vorausgesagt

werden kann und auch ein häufiger auftretendes Problem nicht nur bei Membranproteinen zu sein scheint, war eine nachfolgende Kristallisation der Domäne praktisch nicht möglich, da dafür Konzentrationen von mindestens 5 mg/ml Voraussetzung sind. Zwar konnte eine NMR-Analyse im Lösungszustand auch bereits bei einer Konzentration von 2 mg/ml vorgenommen werden, aber im Fall der CHASE-TM Domäne war das Spektrum aufgrund einer fehlenden Peakauflösung nicht auswertbar. Dies war mit großer Wahrscheinlichkeit auf das verwendete Detergenz zurückzuführen. Abschließend betrachtet wäre mindestens ein breit angelegter Detergenzscreen notwendig, um das für die NMR-Analyse der Domäne optimale Detergenz zu identifizieren.

4.4 Die Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4 und AHK3 sind ER-lokalisierte Proteine und bilden Homo- und Heterodimere in *planta*

Nach dem derzeitigen Modell der Cytokinintransduktion werden die drei Rezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 stets als plasmamembranständige Proteine betrachtet (z. B. To und Kieber, 2008; Heyl und Schmülling, 2003). Bisher liegen experimentelle Daten jedoch nur zu AHK3 vor, die eine Lokalisation von AHK3-GFP an der Plasmamembran bestätigen (Kim *et al.*, 2006). Für die cytokinininsensitive Histidin-Kinase CKI1 konnten Hwang und Sheen (2001) ebenso eine Lokalisation an der Plasmamembran zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden transiente Expressionsstudien mit GFP-Konstrukten zur subzellulären Lokalisation der Cytokininrezeptoren durchgeführt, die ein weiterer Baustein zu einem umfassenderen Verständnis der Cytokinintransduktion sein sollen. Zumindest für CRE1/AHK4 und AHK3 ergaben die Analysen in Tabakepidermiszellen eine überwiegende Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (siehe Abb. 40 und Abb. 44). Dies wurde anhand einer Kolo-kalisation mit einem ER-Markerprotein (mCherry-HDEL) (Nelson *et al.*, 2007) und durch Anfärbung der Plasmamembran mit dem Farbstoff FM4-64 (Bolte *et al.*, 2004) verifiziert. Für AHK2 erschwerten schlechte Transformationsraten und eine geringe Expressionsstärke eine genauere Analyse in Tabak. Es kann spekuliert werden, dass die Beobachtungen für die beiden anderen Rezeptoren auch auf AHK2 zutreffen.

Die erzielten Ergebnisse stehen damit im klaren Gegensatz zum derzeitigen Modell und den publizierten Daten zu AHK3, wobei eine Lokalisation zu einem kleineren Anteil an der Plasmamembran nicht komplett ausgeschlossen werden kann, da AHK3-GFP und FM4-64 am äußeren Rand der Zelle teilweise kolo-kalisiert. Die Vermutung einer größtenteils ER-ständigen Lokalisation wird zudem gestützt durch Bindungsassays mit isolierten Plasma- und Endomembranen aus *Arabidopsis* Rezeptor-Doppelknockoutmutanten, die eine vorrangige Cytokininbindung in Endomembranen zeigen (Lomin und Romanov, unveröffentlichte Ergebnisse). Für die Ethylenrezeptoren als zweite große Gruppe der pflanzlichen Histidin-Kinasen wurde ebenso eine eindeutige Lokalisation im ER mittels biochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden

gezeigt (Grefen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; 2002; Hall *et al.*, 2000). Möglicherweise stellt die ER-Lokalisation daher ein grundlegendes Prinzip für die pflanzlichen Histidin-Kinasen dar, um die schnelle und effiziente Erkennung des spezifischen Signals im Zellinnern zu gewährleisten. Begründet könnte die Lokalisation im ER auch durch die Tatsache sein, dass durch die starke Zunahme an Rezeptoren im Laufe der Evolution im Vergleich zu einer eher konstant gebliebenen oder zum Teil sogar kleiner gewordenen Oberflächengröße der Zelle, die Plasmamembran als Signaloberfläche zu stark limitierend wirkte und ein Ausweichen auf Endomembranstrukturen notwendig geworden war (Geldner und Robatzek, 2008).

Damit ein Protein in der ER-Membran lokalisiert, sind spezifische Signale und Mechanismen notwendig. In der jüngeren Vergangenheit wurde am C-Terminus vieler Typ-I Membranproteine (N-Terminus im Lumen), ein cytosolisches Di-Lysinmotiv (K(X)KXX) identifiziert, das für die ER-Membranständigkeit notwendig und ausreichend ist (Pagny *et al.*, 1999). In Typ-II Membranproteinen (C-Terminus im Lumen) wurde hingegen ein Di-Argininmotiv (RXR) in den ersten fünf Aminosäuren am N-Terminus als ER-Retentionssignal identifiziert (Pagny *et al.*, 1999). Die Proteinsequenzen der drei Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 wurden auf die Präsenz der beiden Motive untersucht, jedoch konnte keines davon an den Enden der jeweiligen Proteine identifiziert werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Proteinsequenzen der Rezeptoren u. U. bisher noch unbekannte ER-Retentionssignale beinhalten. In den terminalen Bereichen der Proteinsequenzen der drei Rezeptoren wurde außerdem kein diazidisches Motiv (DXE, DXD) gefunden, welches als ER-Exportsignal für Plasmembranproteine bekannt ist (Zelazny *et al.*, 2009; Mikosch *et al.*, 2006). Wenn von einer Lokalisation im ER ausgegangen wird, ist darüber hinaus die Membrantopologie von Interesse, d. h. ist der Rezeptor so angeordnet, dass seine katalytische Domäne ins ER-Lumen oder ins Cytoplasma zeigt. Aufgrund der cytoplasmatischen Lokalisation der AHPs, die nach Phosphorylierung durch die Rezeptoren in den Kern translozieren (Hwang und Sheen, 2001), ist davon auszugehen, dass die katalytische und die *Receiver* Domäne der Cytokininrezeptoren in das Cytoplasma zeigen. Tatsächlich geben biochemische Arbeiten an den Ethylenrezeptoren ETR1 aus *Arabidopsis* und ERS1 aus Melone starke Hinweise darauf, dass ihr langer C-terminaler Bereich cytoplasmatisch lokalisiert ist und somit eine Interaktion mit den anderen Proteinen der Signaltransduktion gewährleistet ist (Ma *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 1995). Für die Cytokininrezeptoren muss diese Vorstellung erst noch experimentell bestätigt werden.

Es wurde auch untersucht, ob Cytokinin (10 μ M *trans*-Zeatin) oder BFA (5 μ M) einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von CRE1/AHK4 und AHK3 ausüben. Für die beiden pflanzlichen Hormone Auxin und ABA wurde gezeigt, dass sie die Endocytose und das endosomale konstitutive Recycling des Auxin-Effluxtransporters *PIN-Formed1* (PIN1) bzw. des Kaliumkanals KAT1 beeinflussen (Sutter *et al.*, 2007; Paciorek *et al.*, 2005). Die Lokalisation der Cytokininrezeptoren wurde hingegen nicht durch Cytokinin verändert. Darüber hinaus ergaben die hier durchgeführten mikroskopischen

Analysen keinen Hinweis auf ein konstitutives Recycling der Rezeptoren zwischen ER und Plasmamembran, welches für einige plasmamembranständige Proteine wie die *Leucine-rich repeat* (LRR) *receptor-like kinase* (RLK) *Brassinosteroid Insensitive 1* (BRI1), die RLK CRINKLY4 (ACR4) und PIN1 gezeigt werden konnte (Dhonukshe *et al.*, 2007; Geldner *et al.*, 2007; Gifford *et al.*, 2005; Geldner *et al.*, 2001). Auch die Inkubation mit BFA hatte in transformierten Tabakblättern keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von CRE1/AHK4 und AHK3 (siehe Abb. 45 bzw. Abb. 43). BFA ist ein Fungizid, welches als Inhibitor der Sekretion (Nebenführ *et al.*, 2002) und auch als Endocytoseinhibitor beschrieben ist (Geldner, 2004), abhängig davon, wo die BFA-sensitiven ADP Ribosylierungsfaktor(ARF)-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren(GEFs) lokalisiert sind: *early* Golgi oder *post* Golgi. Ein Mitglied der Familie der ARF-GEFs in *Arabidopsis* ist GNOM, welches an der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports beteiligt ist bzw. im speziellen z. B. das Recycling von PIN1 zurück zur Plasmamembran vermittelt (Geldner *et al.*, 2003). Die Beobachtungen zur BFA- und Cytokinininsensitivität unterstützen somit weiter die Vermutung einer tatsächlich ständigen Lokalisation der Cytokininrezeptoren im ER. Im Gegensatz dazu konnten Dortay *et al.* (2008) für AHK3 eine Interaktion mit GNOM im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) nachweisen, was für einen intrazellulären Transport der Cytokininrezeptoren zwischen Plasmamembran und Endosomen sprechen würde. Ähnliche Vermutungen ergeben sich aus weiteren Interaktionen mit anderen Proteinen, die am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind. Hierzu zählen Adaptin und ADL1A, die beide mit AHK2 interagieren (Dortay *et al.*, 2008). Aufgrund der erläuterten Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen zur Lokalisation der Cytokininrezeptoren und bereits vorhandenen Daten ist eine endgültige Aussage hinsichtlich des Aufenthaltsortes von CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 innerhalb der Zelle kaum möglich. Hierfür wären weitere Analysen z. B. transgener Rezeptor-GFP-Pflanzen unter Kontrolle des jeweils eigenen Promotors oder auch eines induzierbaren Promotors sinnvoll, um z. B. auch Überexpressionsartefakte ausschließen zu können. Unberücksichtigt bei der bisherigen Diskussion blieb zudem die Beobachtung, dass GFP-Fluoreszenz nach transienter Expression der entsprechenden Konstrukte für CRE1/AHK4 und AHK3 auch in cytoplasmatischen Strängen nachweisbar war. Ob es sich dabei um Cytoskelettelemente z. B. Aktinfilamente handelte, was ein Hinweis für intrazellulären Transport der Rezeptoren sein könnte, wurde nicht weiter im Detail untersucht.

Neben der subzellulären Lokalisation wurde auch die Fähigkeit Dimere auszubilden für die Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 mittels der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) *in planta* untersucht. Diese Ergebnisse lassen auf eine Unspezifität hinsichtlich der Dimerbildung innerhalb der Rezeptorfamilie schließen, da alle sechs möglichen Dimere nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 46), wobei allerdings AHK2 auch eine vermutlich unspezifische Interaktion mit dem plasmamembranständigen Saccharosetransporter SUT1 (Krügel *et al.*, 2008) einging. Dortay *et al.* (2006) konnten anhand von Hefe-Zwei-Hybrid-

Experimenten (Y2H) nur folgende Rezeptordimere nachweisen: AHK2-AHK2, AHK2-AHK3 und AHK3-CRE1/AHK4. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass im Y2H nur die cytoplasmatischen Bereiche der Rezeptoren verwendet werden konnten und daher die zusätzlichen Interaktionsmöglichkeiten von TM bzw. Sensordomänen untereinander nicht berücksichtigt werden konnten. Diese können jedoch die Dimerbildung verschiedener pflanzlicher und tierischer Rezeptoren nachweislich unterstützen (Cheung und Hendrickson, 2008; Falke und Hazelbauer, 2001; Kubatzky *et al.*, 2001, Bell *et al.*, 2000; Umemura *et al.*, 1998) und ein möglicher Grund für die Diskrepanz zwischen den hier zuvor beschriebenen Ergebnissen und denen von Dortay *et al.* (2006) sein. Im Übrigen konnten für die fünf Ethylenrezeptoren aus *Arabidopsis* ebenso alle möglichen Homo- und Heterodimere nachgewiesen werden (Grefen *et al.*, 2008). Es ist denkbar, dass die diversen Rezeptordimere in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gebildet werden oder sich auch hinsichtlich ihrer Affinität zum Liganden oder in ihrer Interaktion zu anderen Signalkomponenten unterscheiden und damit ein breites Spektrum an diversen Cytokininantworten spezifisch durch bestimmte Rezeptorkombinationen vermittelt werden kann. Tatsächlich differieren CRE1/AHK4 und AHK3 z. B. hinsichtlich der Affinität zu Cytokinin des iP-Typs (Romanov *et al.*, 2006), und nur AHK2 interagiert spezifisch mit dem B-Typ ARR14 (Dortay *et al.*, 2006). Darüber hinaus zeigten genetische Studien mit *loss-of-function* Mutanten aller drei Rezeptoren, dass bestimmte Rezeptorkombinationen spezifisch für die Regulation einiger cytokininabhängiger Prozesse verantwortlich sind (Riefler *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Die Analysen von Riefler *et al.* (2006) lassen dabei besonders das Vorhandensein von Heterodimeren vermuten, da z. B. die phänotypisch unauffällige *ahk2* Mutante die Cytokinininsensitivität der *ahk3* oder auch der *cre1/ahk4* Mutante in bestimmten Assays weiter verstärkte. Auch die stark verringerte Induktion der Expression von *ARR16* in *cre1/ahk4* und *ahk3* Einzelmutanten sowie der Doppelmutante legen die Vermutung nahe, dass die Expression dieses Gens die Kooperation von CRE1/AHK4 und AHK3 auf molekularer Ebene notwendig macht, welche durch die Ausbildung des entsprechenden Heterodimers gewährleistet wäre (Franco-Zorrilla *et al.*, 2005). Bei der Einordnung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Dimersierung sollten zudem die Expressionsdomänen der einzelnen Rezeptoren in Betracht gezogen werden. Arbeiten hierzu zeigen, dass *CRE1/AHK4*, *AHK3* und *AHK2* bevorzugt in Zellen exprimieren, die meristematischen oder vaskulären Geweben zugeordnet werden, wobei *CRE1/AHK4* verstärkt in den Wurzeln exprimiert und *AHK3* sowie *AHK2* stärker in oberirdischen Geweben (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Ueguchi *et al.*, 2001a; Mähönen *et al.*, 2000). Prinzipiell sind jedoch alle drei Cytokininrezeptoren in allen untersuchten Geweben auf RNA-Ebene nachweisbar, was zumindest eine Voraussetzung für die Interaktion innerhalb der Rezeptorfamilie schaffen würde.

Für bakterielle Sensor-Histidin-Kinasen wurde zuerst eine ligandenunabhängige Dimerisierung in der Zellmembran postuliert (Hendrickson, 2005; Wolanin *et al.*, 2002), wobei sich N-Terminal von der Kinase-Domäne ein für die Dimerbildung der Histidin-Kinase wichtiger Bereich befindet (Marina *et*

al., 2005; Stock *et al.*, 2000; Bilwes *et al.*, 1999). Auch für pflanzliche Rezeptoren wie z. B. den Brassinosteroidrezeptor BRI1 (Wang *et al.*, 2005), die *S*-Locus Rezeptor-Kinase SRK (Naithani *et al.*, 2007) oder auch für Histidin-Kinasen wie den Ethylenrezeptoren ETR1 und ERS1 (Hall *et al.*, 2000); (Schaller *et al.*, 1995) wurde eine ligandenunabhängige Homodimerbildung nachgewiesen. Möglicherweise kann diese experimentelle Beobachtung somit als ein generelles Prinzip für Histidin-Kinasen betrachtet werden. Die BiFC-Daten lassen für die Cytokininrezeptoren eine ähnliche Vermutung zu, da eine cytokininunabhängige, konstitutive Dimerbildung für alle sechs Kombinationen nachgewiesen werden konnte. Für ETR1 konnte zudem die Ausbildung von zwei intermolekularen Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinen an Position 4 und 6 gezeigt werden (Schaller *et al.*, 1995). Es kann spekuliert werden, ob zwei hochkonservierte Cysteine kurz vor und nach der CHASE Domäne in allen drei Cytokininrezeptoren ebenfalls eine kovalente Verknüpfung von Monomeren verursachen und so zur konstitutiven Dimerbildung beitragen. Dies muss jedoch erst experimentell verifiziert werden. Interessant ist zudem die Frage, ob die CHASE Domäne alleine ein Cytokininmolekül bindet oder ob die Bindung des Hormons in einem Verhältnis 2:1 (Rezeptordimer:Ligand) erfolgt. Im Fall einer Bindung im Verhältnis 2:1 würde die bestätigte Cytokininbindung von CRE1/AHK4 und AHK3 im bakteriellen Assay vermutlich auf entsprechende Homodimere zurückgehen und damit die Ergebnisse aus den BiFC Experimenten bestätigen, dass CRE1/AHK4 und AHK3 auch Homodimere ausbilden können. Im Gegensatz zu der vermuteten konstitutiven Dimerisierung der Rezeptoren und einer Bindung von Cytokinin im Verhältnis 2:1 stehen Studien zur interallelicen Komplementation mit *wol*-Allelen. Diese lassen vermuten, dass CRE1 *per se* als Monomer in der Lage ist, ein Repressorsignal zu vermitteln, welches die Zellproliferation im Prokambium reprimiert und erst nach Cytokininbindung die Dimerisierung des Rezeptors den Verlust der Repressoraktivität zur Folge hat (de León *et al.*, 2004). Eine Kokristallisation des Rezeptors oder vielleicht auch nur der CHASE Domäne mit Cytokinin sowie z. B. eine Isothermale Titrationskalorimetrie könnten entscheidende Hinweise zur Stöchiometrie geben.

4.5 Ausblick

Aufbauend auf einer bioinformatischen Untersuchung wurden in der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 Aminosäurepositionen identifiziert, die für die Bindung von Cytokinin notwendig sind. Letztendlich bleiben jedoch folgende Fragen unbeantwortet: sind die gefundenen Aminosäurereste tatsächlich direkt an der Bindung des Hormons beteiligt oder haben sie eine übergeordnete strukturelle Funktion für die CHASE Domäne und, sind möglicherweise weitere Aminosäuren an der Cytokininbindung beteiligt, die aber die Kriterien des bioinformatischen Ansatzes nicht erfüllten und daher nicht getestet wurden? Beide Fragestellungen können nur durch eine hochauflösende räumliche Struktur der Domäne im Komplex mit Cytokinin befriedigend beantwortet werden. Hierfür bieten sich die Röntgenstrukturanalyse und die NMR-Spektroskopie an. Insbesondere die kristallographische

Untersuchung wird in diesem Fall jedoch erschwert oder sogar unmöglich gemacht durch die erläuterte Problematik bei der Herstellung einer hochkonzentrierten Proteinlösung der CHASE-TM Domäne, da für die Kristallisation eines Proteins eine Konzentration von mindestens 5 mg/ml erforderlich sind. Für eine weiterführende NMR-Analyse der CHASE-TM Domäne muss, zumindest nach den bisherigen Ergebnissen zu urteilen, das Detergenz angepasst werden. Eine höhere Proteinkonzentration als in dieser Arbeit erreicht wäre auch für die NMR-Spektroskopie vorteilhaft, möglicherweise sogar essentiell, was eine Lösung der 3D-Struktur der CHASE Domäne in dieser Form u. U. unmöglich macht. Daher könnte eine Fortführung der Arbeiten zur Rückfaltung der löslichen CHASE Domäne sinnvoll sein (Swietnicki, 2006; Singh und Panda, 2005), unter der Annahme, dass CHASE alleine auch eine funktionelle Domäne darstellt.

Transiente Expressionsstudien zur subzellulären Lokalisation der Cytokininrezeptoren CRE1/AHK4 und AHK3 geben bereits starke Hinweise darauf, dass die Erkennung von Cytokinin vorrangig im ER stattfindet. Weitere Untersuchungen mit transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, die Rezeptor-GFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des rezeptoreigenen oder eines induzierbaren Promotors exprimieren, wären sinnvoll, um die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Lokalisation weiter zu verifizieren und zudem Überexpressionsartefakte auszuschließen. Neben den hier vorgestellten Ergebnissen zellbiologischer Experimente zur Lokalisation sind biochemische Untersuchungen mit isolierten Endomembranen geplant, die eine ER-Lokalisation der Cytokininrezeptoren nach Immunodetektion zeigen sollen. Die Endomembranen würden hierfür aus transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen isoliert werden, die getaggte Cytokininrezeptoren unter Kontrolle des jeweils eigenen Promotors exprimieren, um eine mögliche Falschlokalisierung infolge einer Überexpression durch Verwendung des 35S-Promotors zu verhindern. Darüber hinaus sind Komplementationsversuche der *ahk2 ahk3* Doppelmutante mit den bereits verwendeten Rezeptor-GFP-Konstrukten notwendig, um die Funktionalität der GFP-Fusionsproteine zu demonstrieren und die biologische Relevanz der erhaltenen Ergebnisse zu belegen. Die durch BiFC-Experimente gefundene Dimerisierung der Cytokininrezeptoren muss hinsichtlich der Spezifität für bestimmte Homo- bzw. Heterodimere noch weiter gesichert werden. Die bisherigen Daten werden jedoch zumindest teilweise durch Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente unterstützt. Die Untersuchung der Dimerbildung sollte mit einer weiteren unabhängigen Methode, wie z. B. dem *Split-Ubiquitin*-System (Thaminy *et al.*, 2004), das im Gegensatz zum Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Membranproteine anwendbar ist, weiter untersucht werden. Darüber hinaus bieten sich hierfür neben der BiFC auch andere *in planta* Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wie z. B. die Co-Immunopräzipitation gekoppelt mit einer MS-Analyse an. Die Anwendung proteinbiochemischer Methoden für solche Fragestellungen ist jedoch im Allgemeinen für Membranproteine aufgrund der Notwendigkeit, Detergenzien benutzen zu müssen, die schwache Protein-Protein-Interaktionen stören können, erschwert. Letztendlich stellen die bereits erhaltenen Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation und der Dimerisierung der

Cytokininrezeptoren einen weiteren Baustein zum Verständnis der Cytokininsignaltransduktion dar, weiterführende Arbeiten sind wie zuvor erläutert jedoch sinnvoll und notwendig.

5 Zusammenfassung

Cytokinine sind eine Gruppe von Pflanzenhormonen, die an einer Vielzahl von Prozessen des pflanzlichen Wachstums und der Entwicklung beteiligt sind. Hierzu zählen z. B. die Meristemfunktionen in Spross und Wurzel, die Blattseneszenz oder auch die Differenzierung der Leitgewebe. Chemisch betrachtet handelt es sich um N^6 -substituierte Adeninderivate, die anhand ihrer Seitenkettenkonfiguration als isoprenoide oder aromatische Cytokinine eingeordnet werden. Im derzeitigen Modell wird die Cytokininsignaltransduktion durch die Bindung des Hormons an membranständige Rezeptorproteine eingeleitet, die Sensor-Histidin-Kinasen sind. Diese Rezeptoren bilden in *Arabidopsis thaliana* eine Proteinfamilie bestehend aus drei Mitgliedern: CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2. Strukturell gliedern sich alle drei Rezeptoren in eine N-terminale und vermutlich extrazelluläre CHASE Domäne, die als Bindungsdomäne für Cytokinin in Frage kommt und die von zwei Transmembrandomänen umschlossen ist sowie in einen C-terminalen Bereich, der die Histidin-Kinase- und die *Receiver*-Domäne umfasst. In dieser Promotionsarbeit wurde zunächst experimentell durch Anwendung eines bakteriellen Cytokininbindungsassays die Bindungsdomäne für das Hormon exemplarisch von CRE1/AHK4 kartiert. Es stellte sich heraus, dass die vermutlich extrazelluläre CHASE Domäne des Rezeptors für die Bindung des Hormons notwendig und hinreichend ist, jedoch zumindest im hier verwendeten Testsystem die angrenzenden Transmembranbereiche für die Funktionalität von CHASE benötigt wurden. Auch für die beiden anderen Rezeptoren AHK3 und AHK2 war eine spezifische Cytokininbindung der jeweiligen CHASE-TM Domänen nachweisbar. Im Folgenden wurde eine bioinformatische Analyse der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 basierend auf Sequenz- und Phylogenieinformationen durchgeführt. Ziel dieser Analyse war es, Aminosäurepositionen zu identifizieren, die für die Cytokininbindung von entscheidender Bedeutung sind. Die nachfolgende experimentelle Untersuchung der anhand der computergestützten Analyse gefundenen Aminosäurereste durch Überprüfung der Cytokininbindungsfähigkeit generierter Rezeptormutanten von CRE1/AHK4 konnte den Nutzen der bioinformatischen Vorhersagen bestätigen. Mutationen an vier von fünf selektierten Positionen resultierten entweder in einem vollständigen Verlust (F304A und T317A) oder zumindest in einer starken Verminderung (W244A und R304A) der Hormonbindung. Mit dem Ziel eines tieferen Verständnisses der Struktur-Funktions-Beziehungen am Cytokininrezeptor und um die Ergebnisse aus der vorangegangenen Mutationsanalyse zu validieren, wurde exemplarisch die Lösung der räumlichen Struktur der CHASE Domäne von CRE1/AHK4 angestrebt. Die Versuche konzentrierten sich auf die CHASE-TM Domäne, da für dieses Protein in *E. coli* eine Cytokininbindung nachgewiesen werden konnte. Die Experimente zur Proteinexpression ergaben, dass CHASE-TM nur in einem zellfreien System überexprimiert werden konnte, während Versuche in *E. coli* oder einem pflanzlichen Expressionssystem keinen Erfolg hatten. Die Ergebnisse lassen ein hohes toxisches Potential für dieses Protein vermuten, welches auch für den Volllängenrezeptor CRE1/AHK4 in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Die lösliche

CHASE Domäne konnte denaturierend aus *E. coli* gereinigt werden, der Nachweis einer Cytokininbindung an das renaturierte Protein blieb hingegen ohne Erfolg. Die zellfrei exprimierte CHASE-TM Domäne konnte mittels einer Affinitätsreinigung zu hoher Reinheit gebracht und eine charakteristische Faltung sowie eine spezifische Cytokininbindung für das gereinigte Protein nachgewiesen werden. Die Kristallisation der Domäne war jedoch letztendlich erfolglos, da die Herstellung einer hochkonzentrierten Proteinlösung durch Präzipitatbildung erschwert wurde und damit eine notwendige Voraussetzung für die Ausbildung von Proteinkristallen nicht erfüllt war. Es wurde nur eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml erreicht. Parallel zur Kristallisation von CHASE-TM wurde eine NMR-spektroskopische Analyse der Domäne begonnen. Diese ergab, dass neben der geringen Proteinkonzentration vor allem das für die Reinigung verwendete Detergenz β -DDM oder auch LPPG ungeeignet waren, um ein auswertbares aufgelöstes Spektrum zu erhalten, da viele Bereiche im Spektrum durch starke Detergenzsignale überlagert waren. Zumindest ein umfassender Detergenzscreen wäre für eine NMR-Analyse der CHASE-TM Domäne notwendig gewesen. Zum Abschluss wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit transiente Expressionsstudien zur subzellulären Lokalisation mit GFP-Fusionsproteinen sowie *in planta* Analysen zur Dimerisierung der Cytokininrezeptoren mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) unternommen. Vor allem die Experimente in Tabakepidermiszellen zeigten für CRE1/AHK4 und AHK3 eine überwiegende im Gegensatz zum bisherigen Modell der Cytokinintransduktion stehende Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER), die zudem von Cytokinin oder dem Transportinhibitor Brefeldin A unabhängig war. Ein konstitutives Recycling von Rezeptor-GFP-Fusionsproteinen zwischen dem ER und der Plasmamembran, wie zum Teil für andere pflanzliche Rezeptoren nachgewiesen, konnte nicht beobachtet werden. Die Experimente zum Dimerisierungsverhalten der Cytokininrezeptoren ergaben ein hohes Maß an Unspezifität, da alle möglichen Homo- bzw. Heterodimere zwischen den drei Rezeptoren CRE1/AHK4, AHK3 und AHK2 mittels BiFC nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu bisherigen Ergebnissen, was die Notwendigkeit weiterführender Analysen zur Dimerisierung auch hinsichtlich einer möglichen biologischen Relevanz der nachgewiesenen Dimere begründet.

6 Summary

Cytokinins are a class of plant hormones which have been implicated in a broad range of developmental and growth processes including root and shoot meristem function, leaf senescence or vascular development. Natural cytokinins are adenine derivatives that carry an isoprenoide or an aromatic side chain at the N^6 atom of the purine ring. In the current model of the cytokinin signaling pathway the hormone is perceived by a family of membrane-bound receptor histidine kinases comprising three members in *Arabidopsis thaliana*: CRE1/AHK4, AHK3 and AHK2. The receptors are composed of an N-terminally located putative extracellular CHASE domain which is considered to be the cytokinin binding domain and which is flanked by two membrane-spanning domains. At the C-terminal end there are the kinase and the receiver domain which are responsible for the phosphorelay. In the first part of this thesis I mapped the cytokinin binding domain of CRE1/AHK4 by testing the binding activity of different truncated versions of the full length receptor in a bacterial hormone binding assay. This assay revealed that the CHASE domain is necessary and sufficient for binding of cytokinin. The results also suggested that the two membrane-spanning domains are needed to form a functional CHASE domain. For AHK3 and AHK2 the corresponding CHASE-TM domains showed specific cytokinin binding as well. The next step of the characterization of the CHASE domain was to identify functionally important residues. By using a bioinformatics approach based on sequence and phylogenetic information of distantly related CHASE domains five amino acid positions potentially involved in cytokinin binding were identified. Subsequently the selected amino acids were mutated to alanine and the cytokinin binding ability of the mutated CRE1/AHK4 receptor variants was tested. Mutations of two of the five candidate residues led to a complete abolishment of hormone binding (F304A and T317A) and two other amino acid substitutions resulted in a strongly reduced binding capacity (W244A and R305A). These results clearly demonstrate the usefulness of the selected bioinformatics approach in connection with experimental work. To get a deeper understanding of the structure-function relation at the receptor level and to verify the findings of the previous study the next aim was to exemplarily crystallize the CHASE domain of CRE1/AHK4. The following experiments focused on the CHASE-TM domain because this protein showed a specific cytokinin binding activity in the bacterial hormone binding assay, comparable to the full length receptor CRE1/AHK4. The CHASE-TM protein could only be overexpressed in a cell-free system whereas it showed a highly toxic potential in standard *E. coli* expression systems or as well in a plant protein expression system based on plant viral vectors. The full length receptor CRE1/AHK4 could only be produced at low amounts in *E. coli* and the cell-free system. The soluble CHASE domain could be purified under denaturing conditions from bacterial inclusion bodies but did not show any specific cytokinin binding after refolding, which supported the idea of the necessity for the transmembrane regions to form a functional CHASE domain. The cell-free expressed CHASE-TM protein was cleaned to high purity by affinity chromatography and a characteristic folding and specific cytokinin binding activity were

proven for the purified domain. However, the crystallization of the CHASE-TM domain was not successful because of precipitation of the protein during the essential concentration procedure. The protein could only be concentrated to 2 mg/ml. In parallel, I attempted to perform NMR spectroscopic analysis with the low concentrated and purified CHASE-TM protein. Unfortunately, the NMR spectra did not show any dispersion neither with β -DDM nor LPPG as detergent. Many parts of the spectra showed a strong overlay with detergent signals which made it impossible to assign certain peaks specifically to the CHASE-TM domain. As a result, at least an intensive detergent screen is needed to find an appropriate detergent for NMR analysis of the CHASE-TM protein. Within the final part of this thesis I did on the one hand studies on the subcellular localization of the cytokinin receptors after transient expression of the particular GFP fusion proteins in tobacco epidermal leaves and *Arabidopsis* protoplasts. On the other hand I investigated the dimerization properties of the receptors *in planta* by the non-invasive bimolecular fluorescence complementation (BiFC) technique. In particular the results of the localization studies in tobacco leaves showed a Brefeldin A and cytokinin independent predominant localization of CRE1/AHK4 and AHK3 within the endoplasmic reticulum (ER). This is in clear contrast to the current model of cytokinin signaling, which suggests the plasma membrane as the residence of the cytokinin receptors. Additionally, any constitutive recycling of receptor molecules between the ER and the plasma membrane was not observed which a characteristic feature of some other plant receptors is. The results of the BiFC experiments showed in contrast to previous published results no specificity with respect to the dimerization within the cytokinin receptor family. All possible possible homo- and heterodimers between the receptors were observed through the detection of YFP fluorescence. These results give reasons for the need for further analyses, also regarding the biological relevance of the detected receptor dimers.

7 Bibliographie

- Aloy, P., Querol, E., Aviles, F.X. und Sternberg, M.J.** (2001) Automated structure-based prediction of functional sites in proteins: applications to assessing the validity of inheriting protein function from homology in genome annotation and to protein docking. *Journal of Molecular Biology*, **311**, 395-408.
- Aloy, P., Pichaud, M. und Russell, R.B.** (2005) Protein complexes: structure prediction challenges for the 21st century. *Current Opinion in Structural Biology*, **15**, 15-22.
- Amor-Mahjoub, M., Suppini, J.P., Gomez-Vrielyunck, N. und Ladjimi, M.** (2006) The effect of the hexahistidine-tag in the oligomerization of HSC70 constructs. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences*, **844**, 328-334.
- Anantharaman, V. und Aravind, L.** (2000) CACHE - a signaling domain common to animal Ca²⁺-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 535-537.
- Anantharaman, V. und Aravind, L.** (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 579-582.
- Aravind, L. und Ponting, C.P.** (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiology Letters*, **176**, 111-116.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J. und Kieber, J.J.** (2009) Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell & Environment*, **32**, 1147-1160.
- Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J. und Schaller, G.E.** (2008) Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell*, **20**, 2102-2116.
- Bell, C.A., Tynan, J.A., Hart, K.C., Meyer, A.N., Robertson, S.C. und Donoghue, D.J.** (2000) Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 3589-3599.
- Benavente, L.M. und Alonso, J.M.** (2006) Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Molecular BioSystems*, **2**, 165-173.
- Bernard, P. und Couturier, M.** (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, **226**, 735-745.
- Beveridge, C.A., Murfet, I.C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E. und Rameau, C.** (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *The Plant Journal*, **11**, 339-345.

Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. und Simon, M.I. (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell*, **96**, 131-141.

Bilyeu, K.D., Cole, J.L., Laskey, J.G., Riekhof, W.R., Esparza, T.J., Kramer, M.D. und Morris, R.O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology*, **125**, 378-386.

Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P., Kahn, D. und Samama, J.P. (1999) Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure*, **7**, 1505-1515.

Björkman, A.J. und Mowbray, S.L. (1998) Multiple open forms of ribose-binding protein trace the path of its conformational change. *Journal of Molecular Biology*, **279**, 651-664.

Boite, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D. und Satiat-Jeunemaitre, B. (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy*, **214**, 159-173.

Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L. und Schmülling, T. (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, **44**, 314-333.

Bryson, K., McGuffin, L.J., Marsden, R.L., Ward, J.J., Sodhi, J.S. und Jones, D.T. (2005) Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Research*, **33**, W36-38.

Budovskaya, Y.V., Stephan, J.S., Deminoff, S.J. und Herman, P.K. (2005) An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13933-13938.

Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C. und Frommer, W.B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **34**, 13-26.

Calvin, N.M. und Hanawalt, P.C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of Bacteriology*, **170**, 2796-2801.

Casari, G., Sander, C. und Valencia, A. (1995) A method to predict functional residues in proteins. *Nature Structural Biology*, **2**, 171-178.

Charpenteau, M., Jaworski, K., Ramirez, B.C., Tretyn, A., Ranjeva, R. und Ranty, B. (2004) A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein. *Biochemical Journal*, **379**, 841-848.

Chen, C.M. und Kristopeit, S.M. (1981a) Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology*, **68**, 1020-1023.

-
- Chen, C.M. und Kristopeit, S.M.** (1981b) Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiology*, **67**, 494-498.
- Chen, Y.F., Randlett, M.D., Findell, J.L. und Schaller, G.E.** (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 19861-19866.
- Chen, Y.F., Shakeel, S.N., Bowers, J., Zhao, X.C., Etheridge, N. und Schaller, G.E.** (2007) Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 24752-24758.
- Chervitz, S.A. und Falke, J.J.** (1996) Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 2545-2550.
- Cheung, J., Bingman, C.A., Reyngold, M., Hendrickson, W.A. und Waldburger, C.D.** (2008) Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 13762-13770.
- Cheung, J. und Hendrickson, W.A.** (2008) Crystal structures of C₄-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 30256-30265.
- Cheung, J., Le-Khac, M. und Hendrickson, W.A.** (2009) Crystal structure of a histidine kinase sensor domain with similarity to periplasmic binding proteins. *Proteins*, **77**, 235-241.
- Chi, Y.I., Yokota, H. und Kim, S.H.** (1997) Apo structure of the ligand-binding domain of aspartate receptor from *Escherichia coli* and its comparison with ligand-bound or pseudoligand-bound structures. *FEBS Letters*, **414**, 327-332.
- Chiang, W.C. und Knowles, A.F.** (2008) Transmembrane domain interactions affect the stability of the extracellular domain of the human NTPDase 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **472**, 89-99.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H.** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 2172-2175.
- Coba de la Peña, T., Cárcamo, C.B., Almonacid, L., Zaballos, A., Lucas, M.M., Balomenos, D. und Pueyo, J.J.** (2008a) A salt stress-responsive cytokinin receptor homologue isolated from *Medicago sativa* nodules. *Planta*, **227**, 769-779.
- Coba de la Peña, T., Cárcamo, C.B., Almonacid, L., Zaballos, A., Lucas, M.M., Balomenos, D. und Pueyo, J.J.** (2008b) A cytokinin receptor homologue is induced during root nodule organogenesis and senescence in *Lupinus albus* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 219-225.
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacquard, A., Lejeune, P., Van Onckelen, H., Périlleux, C. und Bernier, G.** (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2511-2517.

D'Agostino, I.B., Deruère, J. und Kieber, J.J. (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, **124**, 1706-1717.

de León, B.G., Franco-Zorrilla, J.M., Rubio, V., Dahiya, P., Paz-Ares, J. und Leyva, A. (2004) Interallelic complementation at the *Arabidopsis* CRE1 locus uncovers independent pathways for the proliferation of vascular initials and canonical cytokinin signalling. *The Plant Journal*, **38**, 70-79.

del Sol, A., Pazos, F. und Valencia, A. (2003) Automatic methods for predicting functionally important residues. *Journal of Molecular Biology*, **326**, 1289-1302.

Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P. und Sabatini, S. (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, **17**, 678-682.

Desikan, R., Horák, J., Chaban, C., Mira-Rodado, V., Withhöft, J., Elgass, K., Grefen, C., Cheung, M.K., Meixner, A.J., Hooley, R., Neill, S.J., Hancock, J.T. und Harter, K. (2008) The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. *PLoS One*, **3**, e2491.

Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y.D. und Friml, J. (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology*, **17**, 520-527.

Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T. und Heyl, A. (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal*, **273**, 4631-4644.

Dortay, H., Gruhn, N., Pfeifer, A., Schwerdtner, M., Schmülling, T. und Heyl, A. (2008) Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteome Research*, **7**, 3649-3460.

Du, D., Kato, T., Suzuki, F. und Park, E.Y. (2009) Binding affinity of full-length and extracellular domains of recombinant human (pro)renin receptor to human renin when expressed in the fat body and hemolymph of silkworm larvae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**, 304-309.

Emery, R.J., Ma, Q. und Atkins, C.A. (2000) The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiology*, **123**, 1593-1604.

Endo, Y. und Sawasaki, T. (2006) Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, **17**, 373-380.

Ernst, D., Schäfer, W. und Oesterhelt, D. (1983) Isolation and Identification of a new, naturally-occurring cytokinin (6-benzylaminopurineriboside) from an anise cell-culture (*Pimpinella anisum* L.). *Planta*, **159**, 222-225.

Faiss, M., Zalubilová, J., Strnad, M. und Schmülling, T. (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *The Plant Journal*, **12**, 401-415.

Falke, J.J. und Hazelbauer, G.L. (2001) Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 257-265.

Fernandes, H., Pasternak, O., Bujacz, G., Bujacz, A., Sikorski, M.M. und Jaskolski, M. (2008) *Lupinus luteus* pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. *Journal of Molecular Biology*, **378**, 1040-1051.

Fernandes, H., Bujacz, A., Bujacz, G., Jelen, F., Jasinski, M., Kachlicki, P., Otlewski, J., Sikorski, M.M. und Jaskolski, M. (2009) Cytokinin-induced structural adaptability of a *Lupinus luteus* PR-10 protein. *FEBS Journal*, **276**, 1596-1609.

Fernando, L.P., LeClaire, R.D., Obici, S., Zavodny, P.J., Russell, S.W. und Pace, J.L. (1991) Stable expression of a secreted form of the mouse IFN-gamma receptor by rat cells. *The Journal of Immunology*, **147**, 541-547.

Franco-Zorrilla, J.M., Martin, A.C., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A. und Paz-Ares, J. (2002) Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **32**, 353-360.

Franco-Zorrilla, J.M., Martin, A.C., Leyva, A. und Paz-Ares, J. (2005) Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology*, **138**, 847-857.

Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J.D., Crespi, M. und Szczyglowski, K. (2008) Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science*, **13**, 115-120.

Galichet, A., Hoyerová, K., Kamínek, M. und Gruissem, W. (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **146**, 1155-1164.

Galuszka, P., Frébortová, J., Werner, T., Yamada, M., Strnad, M., Schmölling, T. und Frébort, I. (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat: cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry*, **271**, 3990-4002.

Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmölling, T. und Frébort, I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 255-267.

Gan, S. und Amasino, R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.

Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. und Palme, K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**, 425-428.

Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. und Jürgens, G. (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, **112**, 219-230.

Geldner, N. (2004) The plant endosomal system - its structure and role in signal transduction and plant development. *Planta*, **219**, 547-560.

Geldner, N., Hyman, D.L., Wang, X., Schumacher, K. und Chory, J. (2007) Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes & Development*, **21**, 1598-1602.

Geldner, N. und Robatzek, S. (2008) Plant receptors go endosomal: a moving view on signal transduction. *Plant Physiology*, **147**, 1565-1574.

Gifford, M.L., Robertson, F.C., Soares, D.C. und Ingram, G.C. (2005) *ARABIDOPSIS* CRINKLY4 function, internalization, and turnover are dependent on the extracellular crinkly repeat domain. *The Plant Cell*, **17**, 1154-1166.

Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B. und Frommer, W.B. (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **12**, 291-300.

Gils, M., Kandzia, R., Marillonnet, S., Klimyuk, V. und Gleba, Y. (2005) High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnology Journal*, **3**, 613-620.

Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V. und Gleba, Y. (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14701-14706.

Gleba, Y., Klimyuk, V. und Marillonnet, S. (2005) Magniffection - a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, **23**, 2042-2048.

Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. und Frugier, F. (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, **18**, 2680-2693.

Greenfield, N.J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, **1**, 2876-2890.

Grefen, C., Städele, K., Růžička, K., Obrdlík, P., Harter, K. und Horák, J. (2008) Subcellular localization and in vivo interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. *Molecular Plant*, **1**, 308-320.

Grunberg-Manago, M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annual Review of Genetics*, **33**, 193-227.

Gültekin, H. und Heermann, K.H. (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Analytical Biochemistry*, **172**, 320-329.

Haberlandt, G.J.F. (1913) Zur Physiologie der Zellteilung. in: *Sitzungsberichte der Königlich Preussischen Akademie der Wissenschaften. Phys.-math. Klasse*, 318-345.

-
- Halkides, C.J., McEvoy, M.M., Casper, E., Matsumura, P., Volz, K. und Dahlquist, F.W.** (2000) The 1.9 Å resolution crystal structure of phosphono-CheY, an analogue of the active form of the response regulator, CheY. *Biochemistry*, **39**, 5280-5286.
- Hall, A.E., Findell, J.L., Schaller, G.E., Sisler, E.C. und Bleecker, A.B.** (2000) Ethylene perception by the ERS1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **123**, 1449-1458.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hejátko, J., Pernisová, M., Eneva, T., Palme, K. und Brzobohatý, B.** (2003) The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, **269**, 443-453.
- Hejátko, J., Ryu, H., Kim, G.T., Dobešová, R., Choi, S., Choi, S.M., Souček, P., Horák, J., Pekárová, B., Palme, K., Brzobohatý, B. und Hwang, I.** (2009) The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and *ARABIDOPSIS* HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. *The Plant Cell*, **21**, 2008-2021.
- Hendrickson, W.A.** (2005) Transduction of biochemical signals across cell membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **38**, 321-330.
- Heyl, A. und Schmülling, T.** (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 480-488.
- Heyl, A., Werner, T. und Schmülling, T.** (2006) Cytokinin metabolism and signal transduction. In *Annual Plant Reviews: Plant Hormone Signaling*. Hedden P., Thomas S.G., eds. Blackwell Publishing, Oxford., **24**, 93-123.
- Heyl, A., Wulfetange, K., Pils, B., Nielsen, N., Romanov, G.A. und Schmülling, T.** (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evolutionary Biology*, **7**.
- Heyl, A., Ramireddy, E., Brenner, W.G., Riefler, M., Allemeersch, J. und Schmülling, T.** (2008) The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **147**, 1380-1395.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R. und Kakimoto, T.** (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8821-8826.
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology*, **138**, 196-206.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. und Sakakibara, H.** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 75-83.

Horgan, R., Hewett, E.W., Purse, J.G. und Wareing, P.F. (1973) New cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron Letters*, 2827-2828.

Hudziak, R.M. und Ullrich, A. (1991) Cell transformation potential of a HER2 transmembrane domain deletion mutant retained in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 24109-24115.

Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N. und Coles, M. (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell*, **126**, 929-940.

Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Kieber, J.J. (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, **18**, 3073-3087.

Hwang, I. und Sheen, J. (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, **413**, 383-389.

Innis, C.A., Anand, A.P. und Sowdhamini, R. (2004) Prediction of functional sites in proteins using conserved functional group analysis. *Journal of Molecular Biology*, **337**, 1053-1068.

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.

Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A. und Mizuno, T. (2008) Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **49**, 47-57.

Ito, Y. und Kurata, N. (2006) Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene*, **382**, 57-65.

Iwama, A., Yamashino, T., Tanaka, Y., Sakakibara, H., Kakimoto, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Nagatani, A. und Mizuno, T. (2007) AHK5 histidine kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent abscisic acid and ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **48**, 375-380.

Izumi, K., Nakagawa, S., Kobayashi, M., Oshio, H., Sakurai, A. und Takahashi, N. (1988) Levels of IAA, cytokinins, ABA and ethylene in rice plants as affected by a gibberellin biosynthesis inhibitor, Uniconazole-P. *Plant Cell Physiology*, **29**, 97-104.

Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P. und Tsiantis, M. (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*, **15**, 1560-1565.

Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, **292**, 195-202.

-
- Jones, S. und Thornton, J.M.** (2004) Searching for functional sites in protein structures. *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**, 3-7.
- Kaarsholm, N.C., Kolstrup, A.M., Danielsen, S.E., Holm, J. und Hansen, S.I.** (1993) Ligand-induced conformation change in folate-binding protein. *Biochemical Journal*, **292**, 921-925.
- Kaiser, L., Graveland-Bikker, J., Steuerwald, D., Vanberghem, M., Herlihy, K. und Zhang, S.** (2008) Efficient cell-free production of olfactory receptors: detergent optimization, structure, and ligand binding analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15726-15731.
- Kakimoto, T.** (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, **274**, 982-985.
- Kakimoto, T.** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyldiphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology*, **42**, 677-685.
- Kakimoto, T.** (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 605-627.
- Kalinina, O.V., Mironov, A.A., Gelfand, M.S. und Rakhmaninova, A.B.** (2004) Automated selection of positions determining functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families. *Protein Science*, **13**, 443-456.
- Kalinina, O.V., Gelfand, M.S. und Russell, R.B.** (2009) Combining specificity determining and conserved residues improves functional site prediction. *BMC Bioinformatics*, **10**.
- Kamada-Nobusada, T. und Sakakibara, H.** (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, **70**, 444-449.
- Kamínek, M., Pačes, V., Corse, J. und Challice, J.S.** (1979) Effect of stereospecific hydroxylation of N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenosine on cytokinin activity. *Planta*, **145**, 239-243.
- Kane, J.F.** (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**, 494-500.
- Karimi, M., Inze, D. und Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, **7**, 193-195.
- Katzen, F., Peterson, T.C. und Kudlicki, W.** (2009) Membrane protein expression: no cells required. *Trends in Biotechnology*, **27**, 455-460.
- Kern, D., Volkman, B.F., Luginbühl, P., Nohaile, M.J., Kustu, S. und Wemmer, D.E.** (1999) Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature*, **402**, 894-898.
- Kerppola, T.K.** (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 449-456.

Kiba, T., Yamada, H. und Mizuno, T. (2002) Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 histidine kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **43**, 1059-1066.

Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H. und Mizuno, T. (2005) Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His→Asp phosphorelay circuitry. *Plant Cell Physiology*, **46**, 339-355.

Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T. und Hiraga, S. (1996) RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **178**, 3917-3925.

Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G. und Hwang, I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 814-819.

Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. und Chory, J. (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, **433**, 167-171.

Klammt, C., Löhr, F., Schäfer, B., Haase, W., Dötsch, V., Rüterjans, H., Glaubitz, C. und Bernhard, F. (2004) High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *European Journal of Biochemistry*, **271**, 568-580.

Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V. und Bernhard, F. (2005) Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS Journal*, **272**, 6024-6038.

Klammt, C., Schwarz, D., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V. und Bernhard, F. (2006) Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS Journal*, **273**, 4141-4153.

Klammt, C., Schwarz, D., Eifler, N., Engel, A., Piehler, J., Haase, W., Hahn, S., Dötsch, V. und Bernhard, F. (2007) Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies. *Journal of Structural Biology*, **158**, 482-493.

Klumpler, T., Pekárová, B., Marek, J., Borkovcová, P., Janda, L. und Hejátko, J. (2009) Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the receiver domain of the histidine kinase CKII from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Crystallization Communications*, **65**, 478-481.

Koistinen, K.M., Soininen, P., Venäläinen, T.A., Häyrynen, J., Laatikainen, R., Peräkylä, M., Tervahauta, A.I. und Kärenlampi, S.O. (2005) Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry*, **66**, 2524-2533.

Köllmer, I. (2009) Funktionelle Charakterisierung von CKX7 und cytokininregulierten Transkriptionsfaktorogenen in *Arabidopsis thaliana*. *Doktorarbeit*.

-
- Koncz, C., Olsson, O., Langridge, W.H., Schell, J. und Szalay, A.A.** (1987) Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 131-135.
- Krügel, U., Veenhoff, L.M., Langbein, J., Wiederhold, E., Liesche, J., Friedrich, T., Grimm, B., Martinoia, E., Poolman, B. und Kühn, C.** (2008) Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *The Plant Cell*, **20**, 2497-2513.
- Kubatzky, K.F., Ruan, W., Gurezka, R., Cohen, J., Ketteler, R., Watowich, S.S., Neumann, D., Langosch, D. und Klingmüller, U.** (2001) Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Current Biology*, **11**, 110-115.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. und Kyojuka, J.** (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**, 652-655.
- Kurland, C. und Gallant, J.** (1996) Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 489-493.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landau, M., Mayrose, I., Rosenberg, Y., Glaser, F., Martz, E., Pupko, T. und Ben-Tal, N.** (2005) ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Research*, **33**, W299-302.
- Landy, A.** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, **58**, 913-949.
- Lee, S.Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Berry, E.A. und Wemmer, D.E.** (2001a) Crystal structure of activated CheY. Comparison with other activated receiver domains. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 16425-16431.
- Lee, S.Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Henderson, R.K., King, D.S., Huang, L., Kustu, S., Berry, E.A. und Wemmer, D.E.** (2001b) Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. *Nature Structural Biology*, **8**, 52-56.
- Leibfried, A., To, J.P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J. und Lohmann, J.U.** (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, **438**, 1172-1175.
- Lejeune, P., Bernier, G., Requier, M.-C. und Kinet, J.-M.** (1994) Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. *Physiologia Plantarum*, **90**, 522-528.
- Leonardo, M.R. und Forst, S.** (1996) Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **22**, 405-413.
- Letham, D.S.** (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Science*, **8**, 569-573.

- Li, G., Liu, K., Baldwin, S.A. und Wang, D.** (2003) Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 35732-35742.
- Li, X., Mo, X., Shou, H. und Wu, P.** (2006) Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, **47**, 1112-1123.
- Li, Y., Wang, E. und Wang, Y.** (1999) A modified procedure for fast purification of T7 RNA Polymerase. *Protein Expression and Purification*, **16**, 355-358.
- Lichtarge, O., Bourne, H.R. und Cohen, F.E.** (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *Journal of Molecular Biology*, **257**, 342-358.
- Liguori, L., Marques, B., Villegas-Méndez, A., Rothe, R. und Lenormand, J.L.** (2007) Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Expert Review of Proteomics*, **4**, 79-90.
- Lohrmann, J., Bucholz, 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 Biology*, **1**, 487-594.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A. und Dreyfus, M.** (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Molecular Microbiology*, **33**, 188-199.
- Lottspeich, F. und Engels, J.W.** (2006) Bioanalytik. 2. Aufl.. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Ma, B., Cui, M.L., Sun, H.J., Takada, K., Mori, H., Kamada, H. und Ezura, H.** (2006) Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant Physiology*, **141**, 587-597.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N. und Helariutta, Y.** (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development*, **14**, 2938-2943.
- Mähönen, A.P., Higuchi, M., Törmäkangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y. und Kakimoto, T.** (2006a) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Current Biology*, **16**, 1116-1122.
- Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. und Helariutta, Y.** (2006b) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, **311**, 94-98.
- Malito, E., Coda, A., Bilyeu, K.D., Fraaije, M.W. und Mattevi, A.** (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology*, **341**, 1237-1249.

-
- Marillonnet, S., Giritich, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V. und Gleba, Y.** (2004) In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 6852-6857.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. und Gleba, Y.** (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*, **23**, 718-723.
- Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W.A. und Waldburger, C.D.** (2001) Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 41182-41190.
- Marina, A., Waldburger, C.D. und Hendrickson, W.A.** (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO Journal*, **24**, 4247-4259.
- Marković-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O. und Breiteneder, H.** (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *Journal of Molecular Biology*, **325**, 123-133.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. und Takahashi, H.** (2004) A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *The Plant Journal*, **38**, 779-789.
- Mason, M.G., Li, J., Mathews, D.E., Kieber, J.J. und Schaller, G.E.** (2004) Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **135**, 927-937.
- Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Schaller, G.E.** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **17**, 3007-3018.
- Massonneau, A., Houba-Hérin, N., Pethe, C., Madzak, C., Falque, M., Mercy, M., Kopecny, D., Majira, A., Rogowsky, P. und Laloue, M.** (2004) Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 2549-2557.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Vaclavikova, K., Miyawaki, K. und Kakimoto, T.** (2008) Cytokinin is a central regulator of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 20027-20031.
- Mikosch, M., Hurst, A.C., Hertel, B. und Homann, U.** (2006) Diacidic motif is required for efficient transport of the K⁺ channel KAT1 to the plasma membrane. *Plant Physiology*, **142**, 923-930.
- Milburn, M.V., Privé, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D.E., Jr. und Kim, S.H.** (1991) Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science*, **254**, 1342-1347.
- Miller, C.O., Skoog, F., Vonsaltza, M.H. und Strong, F.M.** (1955a) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 1392-1392.

Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Vonsaltza, M.H. und Strong, F.M. (1955b) Structure and synthesis of Kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 2662-2663.

Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., von Saltza, M.H. und Strong, F.M. (1956) Isolation, structure and synthesis of Kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society*, **78**, 1375-1380.

Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L. und Hughson, F.M. (2004) *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Molecular Cell*, **15**, 677-687.

Mira-Rodado, V., Sweere, U., Grefen, C., Kunkel, T., Fejes, E., Nagy, F., Schafer, E. und Harter, K. (2007) Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2595-2607.

Mirny, L.A. und Shakhnovich, E.I. (1999) Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *Journal of Molecular Biology*, **291**, 177-196.

Miwa, K., Ishikawa, K., Terada, K., Yamada, H., Suzuki, T., Yamashino, T. und Mizuno, T. (2007) Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant Cell Physiology*, **48**, 1809-1814.

Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. und Kakimoto, T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal*, **37**, 128-138.

Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G. und Kakimoto, T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 16598-16603.

Mogensen, J.E., Wimmer, R., Larsen, J.N., Spangfort, M.D. und Otzen, D.E. (2002) The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 23684-23692.

Mok, D.W.S. und Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 89-118.

Mok, M.C., Mok, D.W.S., Armstrong, D.J., Shudo, K., Isogai, Y. und Okamoto, T. (1982) Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry*, **21**, 1509-1511.

Mok, M.C. (1994) Cytokinins and plant development - An overview. In *Cytokinins: chemistry, activity, and function*. ed. Mok D.W.S., Mok M.C.. Boca Raton, Florida: CRC Press, 155-166.

Moore, J.O. und Hendrickson, W.A. (2009) Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure*, **17**, 1195-1204.

-
- Mougel, C. und Zhulin, I.B.** (2001) CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 582-584.
- Müller-Dieckmann, H.J., Grantz, A.A. und Kim, S.H.** (1999) The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1. *Structure*, **7**, 1547-1556.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**, 335-350.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L. und Szczyglowski, K.** (2007) A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science*, **315**, 101-104.
- Naithani, S., Chookajorn, T., Ripoll, D.R. und Nasrallah, J.B.** (2007) Structural modules for receptor dimerization in the S-locus receptor kinase extracellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12211-12216.
- Nebenführ, A., Ritzenthaler, C. und Robinson, D.G.** (2002) Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiology*, **130**, 1102-1108.
- Neiditch, M.B., Federle, M.J., Pompeani, A.J., Kelly, R.C., Swem, D.L., Jeffrey, P.D., Bassler, B.L. und Hughson, F.M.** (2006) Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell*, **126**, 1095-1108.
- Nelson, B.K., Cai, X. und Nebenführ, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal*, **51**, 1126-1136.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., Tähtiharju, S., Elo, A., Decourteix, M., Ljung, K., Bhalerao, R., Keinonen, K., Albert, V.A. und Helariutta, Y.** (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 20032-20037.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und Ueguchi, C.** (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **16**, 1365-1377.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K. und Sandberg, G.** (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8039-8044.
- Onrust, R., Herzmark, P., Chi, P., Garcia, P.D., Lichtarge, O., Kingsley, C. und Bourne, H.R.** (1997) Receptor and betagamma binding sites in the alpha subunit of the retinal G protein transducin. *Science*, **275**, 381-384.

Ordog, V., Stirk, W.A., van Staden, J., Novak, O. und Strnad, M. (2004) Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyta. *Journal of Phycology*, **40**, 88-95.

Ostrander, D.B. und Gorman, J.A. (1999) The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *Journal of Bacteriology*, **181**, 2527-2534.

Ottemann, K.M. und Koshland, D.E., Jr. (1997) Converting a transmembrane receptor to a soluble receptor: recognition domain to effector domain signaling after excision of the transmembrane domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 11201-11204.

Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K. und Koshland, D.E., Jr. (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science*, **285**, 1751-1754.

Paciorek, T., Zažímalová, E., Ruthardt, N., Petrášek, J., Stierhof, Y.D., Kleine-Vehn, J., Morris, D.A., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N. und Friml, J. (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, **435**, 1251-1256.

Pagny, S., Lerouge, P., Faye, L. und Gomord, V. (1999) Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 157-164.

Panchenko, A.R., Kondrashov, F. und Bryant, S. (2004) Prediction of functional sites by analysis of sequence and structure conservation. *Protein Science*, **13**, 884-892.

Pasternak, O., Bujacz, G.D., Fujimoto, Y., Hashimoto, Y., Jelen, F., Otlewski, J., Sikorski, M.M. und Jaskolski, M. (2006) Crystal structure of *Vigna radiata* cytokinin-specific binding protein in complex with zeatin. *The Plant Cell*, **18**, 2622-2634.

Pei, J., Cai, W., Kinch, L.N. und Grishin, N.V. (2006) Prediction of functional specificity determinants from protein sequences using log-likelihood ratios. *Bioinformatics*, **22**, 164-171.

Perron-Savard, P., De Crescenzo, G. und Le Moual, H. (2005) Dimerization and DNA binding of the *Salmonella enterica* PhoP response regulator are phosphorylation independent. *Microbiology*, **151**, 3979-3987.

Pertry, I., Václavíková, K., Depuydt, S., Galuszka, P., Spíchal, L., Temmerman, W., Stes, E., Schmülling, T., Kakimoto, T., Van Montagu, M.C., Strnad, M., Holsters, M., Tarkowski, P. und Vereecke, D. (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 929-934.

Pils, B. und Heyl, A. (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology*, **151**, 782-791.

Pischke, M.S., Jones, L.G., Otsuga, D., Fernandez, D.E., Drews, G.N. und Sussman, M.R. (2002) An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 15800-15805.

-
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C. und Saito, H.** (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, **86**, 865-875.
- Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W., Elhai, J. und Hanahan, D.** (1988) McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1563-1575.
- Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E. und Kieber, J.J.** (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11081-11085.
- Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M. und Madden, D.R.** (2003) The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 39189-39196.
- Reiser, V., Raitt, D.C. und Saito, H.** (2003) Yeast osmosensor SLN 1 and plant cytokinin receptor CRE1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of Cell Biology*, **161**, 1035-1040.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, **18**, 40-54.
- Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S. und Blumwald, E.** (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 19631-19636.
- Rodríguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E. und Bleeker, A.B.** (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science*, **283**, 996-998.
- Romanov, G.A., Spíchal, L., Lomin, S.N., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Analytical Biochemistry*, **347**, 129-134.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N. und Schmülling, T.** (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 4051-4058.
- Romanov, G.A. und Lomin, S.N.** (2009) Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors. *Methods in Molecular Biology*, **495**, 111-120.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. und Scheres, B.** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, **99**, 463-472.
- Sakakibara, H.** (2004) Cytokinin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Davies P.J. (Ed.). Springer Dordrecht, 95-114.

Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 431-449.

Sakamoto, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Yamamoto, Y., Nagasaki, H., Inukai, Y., Sato, Y. und Matsuoka, M. (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology*, **142**, 54-62.

Salomé, P.A., To, J.P., Kieber, J.J. und McClung, C.R. (2006) *Arabidopsis* response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *The Plant Cell*, **18**, 55-69.

Šamaj, J., Read, N.D., Volkmann, D., Menzel, D. und Baluška, F. (2005) The endocytic network in plants. *Trends in Cell Biology*, **15**, 425-433.

Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I. und Estelle, M. (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, **5**, 301-307.

Schaller, G.E. und Bleecker, A.B. (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science*, **270**, 1809-1811.

Schaller, G.E., Ladd, A.N., Lanahan, M.B., Spanbauer, J.M. und Bleecker, A.B. (1995) The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *The Journal Biological Chemistry*, **270**, 12526-12530.

Schell, J. (1978) On the transfer and expression of bacterial plasmid DNA in higher plants [proceedings]. *Archives of International Physiology and Biochemistry*, **86**, 901-902.

Schmitz, R.Y., Skoog, F., Playtis, A.J. und Leonard, N.J. (1972) Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology*, **50**, 702-705.

Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E. und Bartrina y Manns, I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, **116**, 241-252.

Schrimpf, G. (2002) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 3. Aufl.. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Schulze-Gahmen, U., Brandsen, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., Meijer, L., Vesely, J. und Kim, S.H. (1995) Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins*, **22**, 378-391.

Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V. und Bernhard, F. (2007a) Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, **41**, 355-369.

-
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V. und Bernhard, F.** (2007b) Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nature Protocols*, **2**, 2945-2957.
- Schwarz, D., Dötsch, V. und Bernhard, F.** (2008) Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics*, **8**, 3933-3946.
- Scott, W.G. und Stoddard, B.L.** (1994) Transmembrane signalling and the aspartate receptor. *Structure*, **2**, 877-887.
- Séguéla, M., Briat, J.F., Vert, G. und Curie, C.** (2008) Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *The Plant Journal*, **55**, 289-300.
- Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D.R., Herbst-Irmer, R., Sheldrick, G.M., Bott, M., Griesinger, C. und Becker, S.** (2008) A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *Journal of Molecular Biology*, **377**, 512-523.
- Shantz, E.M. und Steward, F.C.** (1955) The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 6351-6353.
- Shimizu-Sato, S., Tanaka, M. und Mori, H.** (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, **69**, 429-435.
- Singh, S.M., Panda A.K.** (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **99**, 303-310.
- Skoog, F., Strong, F.M. und Miller, C.O.** (1965) Cytokinins. *Science*, **148**, 532-533.
- Sohlenkamp, C., Wood, C.C., Roeb, G.W. und Udvardi, M.K.** (2002) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiology*, **130**, 1788-1796.
- Song, Y., Peisach, D., Pioszak, A.A., Xu, Z. und Ninfa, A.J.** (2004) Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **43**, 6670-6678.
- Sowa, M.E., He, W., Slep, K.C., Kercher, M.A., Lichtarge, O. und Wensel, T.G.** (2001) Prediction and confirmation of a site critical for effector regulation of RGS domain activity. *Nature Structural Biology*, **8**, 234-237.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A. und Hawes, C.** (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, **1**, 2019-2025.
- Spíchal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M. und Schmölling, T.** (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiology*, **45**, 1299-1305.

Spiess, L.D. (1975) Comparative activity of isomers of zeatin and ribosyl-zeatin on *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiology*, **55**, 583-585.

Stock, A.M., Robinson, V.L. und Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, **69**, 183-215.

Strimmer, K. und von Haeseler, A. (1996) Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 964-969.

Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, **101**, 674-688.

Sugawara, H., Ueda, N., Kojima, M., Makita, N., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2008) Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 2734-2739.

Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H. und Zou, J. (2005) *Arabidopsis* SOI33/AtENT8 gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta. *Journal of Integrative Plant Biology*, **47**, 588-603.

Sutter, J.U., Sieben, C., Hartel, A., Eisenach, C., Thiel, G. und Blatt, M.R. (2007) Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane. *Current Biology*, **17**, 1396-1402.

Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C. und Mizuno, T. (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**, 2486-2489.

Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H. und Mizuno, T. (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiology*, **42**, 107-113.

Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Bäurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E. und Harter, K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, **294**, 1108-1111.

Swietnicki, W. (2006) Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Current Opinion in Biotechnology*, **17**, 367-372.

Tajima, Y., Imamura, A., Kiba, T., Amano, Y., Yamashino, T. und 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 Physiology*, **45**, 28-39.

Takei, K., Sakakibara, H. und Sugiyama, T. (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 26405-26410.

-
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M. und Sugiyama, T.** (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiology*, **42**, 85-93.
- Takei, K., Takahashi, T., Sugiyama, T., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 971-977.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H.** (2004) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, **45**, 1053-1062.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P.B. und Friml, J.** (2006b) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**, 2738-2754.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. und Mori, H.** (2006a) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, **45**, 1028-1036.
- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M. und Ikura, M.** (1998) NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature*, **396**, 88-92.
- Tarkowská, D., Doležal, K., Tarkowski, P., Åstot, C., Holub, J., Fuksová, K., Schmülling, T., Sandberg, G. und Strnad, M.** (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*, **117**, 579-590.
- Tate, C.G.** (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Letters*, **504**, 94-98.
- Thaminy, S., Miller, J., Stagljar, I.** (2004) The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods in Molecular Biology*, **261**, 297-312.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. und Stougaard, J.** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*, **315**, 104-107.
- To, J.P., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Kieber, J.J.** (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, **16**, 658-671.
- To, J.P., Deruère, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E. und Kieber, J.J.** (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant Cell*, **19**, 3901-3914.

To, J.P. und Kieber, J.J. (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*, **13**, 85-92.

Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S.K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M. und Ikura, M. (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nature Structural Biology*, **6**, 729-734.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 4350-4354.

Tran, L.S., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 20623-20628.

Ueguchi, C., Koizumi, H., Suzuki, T. und Mizuno, T. (2001a) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **42**, 231-235.

Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T. und Tabata, S. (2001b) The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **42**, 751-755.

Umemura, T., Tatsuno, I., Shibasaki, M., Homma, M. und Kawagishi, I. (1998) Intersubunit interaction between transmembrane helices of the bacterial aspartate chemoreceptor homodimer. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 30110-30115.

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. und Shinozaki, K. (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell*, **11**, 1743-1754.

van Loon, L.C. und van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 85-97.

van Overbeek, J., Conklin, M.E. und Blakeslee, A.F. (1941) Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, **94**, 350-351.

Veach, Y.K., Martin, R.C., Mok, D.W.S., Malbeck, J., Vankova, R. und Mok, M.C. (2003) O-glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiology*, **131**, 1374-1380.

Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M. und Schell, J. (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*. *Journal of General Virology*, **26**, 33-48.

-
- Voelker, C., Schmidt, D., Müller-Röber, B. und Czempinski, K.** (2006) Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta. *The Plant Journal*, **48**, 296-306.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. und Baulcombe, D.** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, **33**, 949-956.
- von Schwartzenberg, K., Núñez, M.F., Blaschke, H., Dobrev, P.I., Novák, O., Motyka, V. und Strnad, M.** (2007) Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: Analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiology*, **145**, 786-800.
- Wagner, S., Bader, M.L., Drew, D. und de Gier, J.W.** (2006) Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology*, **24**, 364-371.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. and Kudla, J.** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal*, **40**, 428-438.
- Wang, N., Söderbom, F., Anjard, C., Shaulsky, G. und Loomis, W.F.** (1999) SDF-2 induction of terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum* is mediated by the membrane-spanning sensor kinase DhkA. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 4750-4756.
- Wang, X., Li, X., Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, S., Asami, T. und Chory, J.** (2005) Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental Cell*, **8**, 855-865.
- Weiler, E.W. und Ziegler, H.** (1981) Determination of phytohormones in phloem exudate from tree species by radioimmunoassay. *Planta*, **152**, 168-170.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. und Schmülling, T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 10487-10492.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. und Schmülling, T.** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, **15**, 2532-2550.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. und Schmülling, T.** (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, **8**, 371-381.
- Werner, T. und Schmülling, T.** (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 527-538.
- West, A.H. und Stock, A.M.** (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 369-376.

-
- Wiśniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P.B., Ružička, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B. und Friml, J.** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, **312**, 883.
- Wohlbach, D.J., Quirino, B.F. und Sussman, M.R.** (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant Cell*, **20**, 1101-1117.
- Wolanin, P.M., Thomason, P.A. und Stock, J.B.** (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, **3**, reviews 3013.3011-3013.3018.
- Wormit, A., Traub, M., Florchinger, M., Neuhaus, H.E. und Mohlmann, T.** (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal*, **383**, 19-26.
- Wu, J. und Filutowicz, M.** (1999) Hexahistidine (His₆)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochimica Polonica*, **46**, 591-599.
- Xie, W., Zhou, C. und Huang, R.H.** (2007) Structure of tRNA dimethylallyltransferase: RNA modification through a channel. *Journal of Molecular Biology*, **367**, 872-881.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T. und Mizuno, T.** (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiology*, **42**, 1017-1023.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. und Ori, N.** (2005) *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*, **15**, 1566-1571.
- Yang, Z.** (1994) Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution*, **39**, 306-314.
- Yao, H., Kristensen, D.M., Mihalek, I., Sowa, M.E., Shaw, C., Kimmel, M., Kavraki, L. und Lichtarge, O.** (2003) An accurate, sensitive, and scalable method to identify functional sites in protein structures. *Journal of Molecular Biology*, **326**, 255-261.
- Yeh, J.I., Biemann, H.P., Pandit, J., Koshland, D.E. und Kim, S.H.** (1993) The three-dimensional structure of the ligand-binding domain of a wild-type bacterial chemotaxis receptor. Structural comparison to the cross-linked mutant forms and conformational changes upon ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**, 9787-9792.
- Yeh, J.I., Biemann, H.P., Prive, G.G., Pandit, J., Koshland, D.E., Jr. und Kim, S.H.** (1996) High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor. *Journal of Molecular Biology*, **262**, 186-201.
- Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H. und Mizuno, T.** (2007) Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **48**, 84-96.

Yokoyama, S. (2003) Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**, 39-43.

Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiology*, **134**, 1654-1661.

Yoo, S.D., Cho, Y.H. und Sheen, J. (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, **2**, 1565-1572.

Zelazny, E., Miecielica, U., Borst, J.W., Hemminga, M.A. und Chaumont, F. (2009) An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *The Plant Journal*, **57**, 346-355.

Zhou, C. und Huang, R.H. (2008) Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 16142-16147.

Zhou, Y.F., Nan, B., Nan, J., Ma, Q., Panjekar, S., Liang, Y.H., Wang, Y. und Su, X.D. (2008) C₄-dicarboxylates sensing mechanism revealed by the crystal structures of DctB sensor domain. *Journal of Molecular Biology*, **383**, 49-61.

8 Publikationen

Heyl, A., Wulfetange, K., Pils, B., Nielsen, N., Romanov, G.A. and Schmülling, T. (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evolutionary Biology*, **7**.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich an dieser Stelle gegenüber Herrn Prof. Dr. Thomas Schmülling meine Dankbarkeit ausdrücken, dass er mich als „artfremden“ Nicht-Biologen in seinem Institut aufgenommen und mir diese herausfordernde Aufgabenstellung überlassen hat. Ich danke ihm für seine fortwährende inhaltliche und persönliche Unterstützung ohne die, diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schuster möchte ich mich bedanken, dass er als Gutachter dieser Promotionsarbeit sich zur Verfügung gestellt hat und auch bei manchen Problemen der Proteinbiochemie mir stets mit Rat zur Seite stand.

Herrn Dr. Alexander Heyl gebührt für seine persönliche Betreuung dieser Arbeit ein großes Dankeschön. Stets hatte er ein „offenes Ohr“ für die inhaltlichen Probleme, und ohne seine Anregungen und Ideen wäre die Arbeit nicht in dieser Form entstanden.

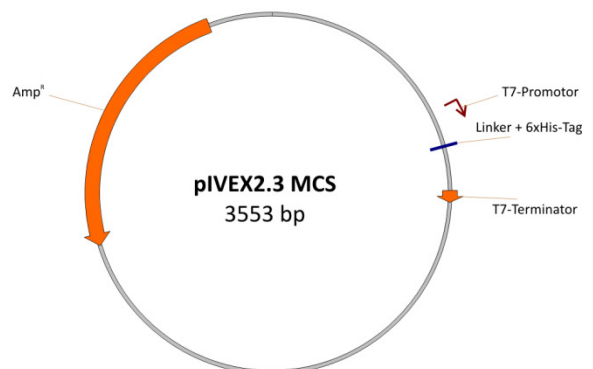
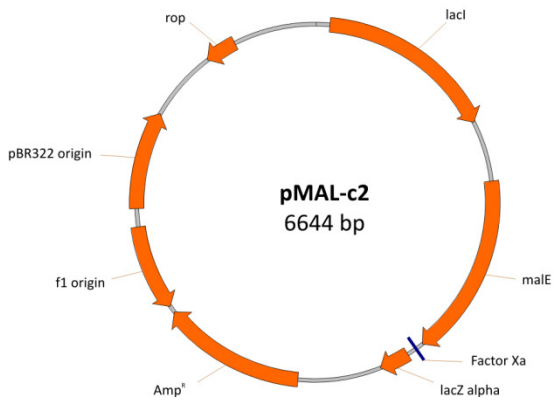
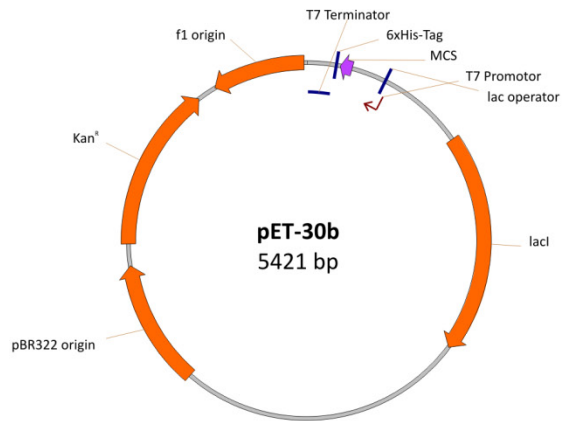
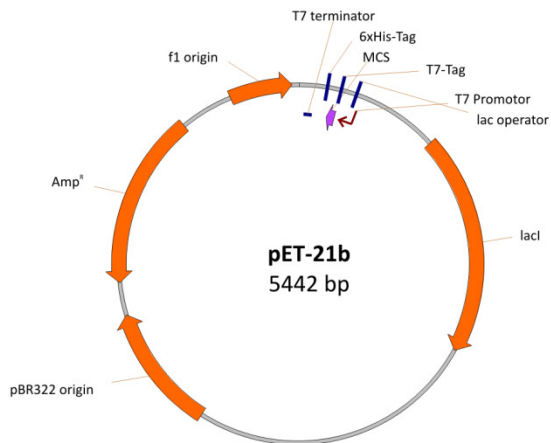
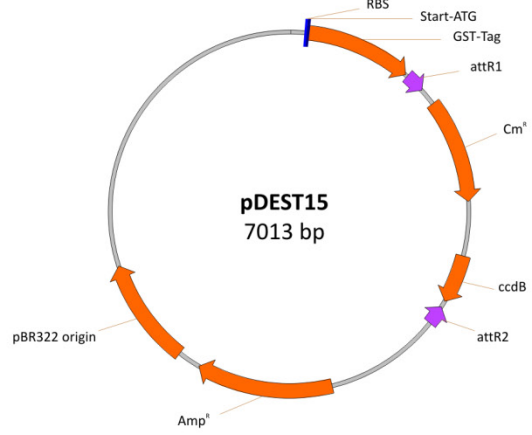
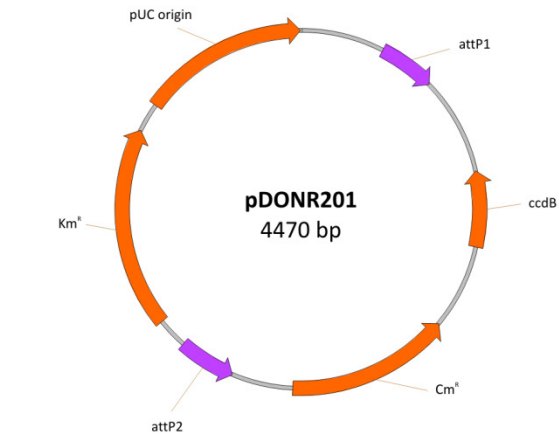
Allen Mitgliedern des Labors 106 möchte ich für die angenehme Atmosphäre in unserer Gruppe und die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft danken. Neben den vielen fachlichen und zugleich „fruchtvollen“ Diskussionen wird mir die stets erheiternde Atmosphäre im Labor 106 immer in Erinnerung bleiben. Speziell muss ich Andreas Pfeifer danken, der in meiner Abwesenheit eine absolut zuverlässig arbeitende Vertretung für mich war und sich hingebungsvoll um „mein“ Protein kümmerte.

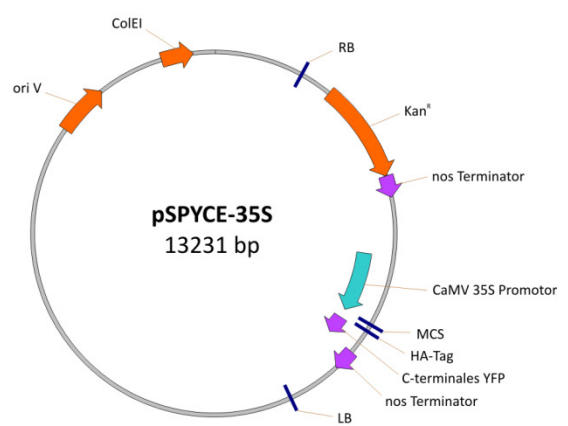
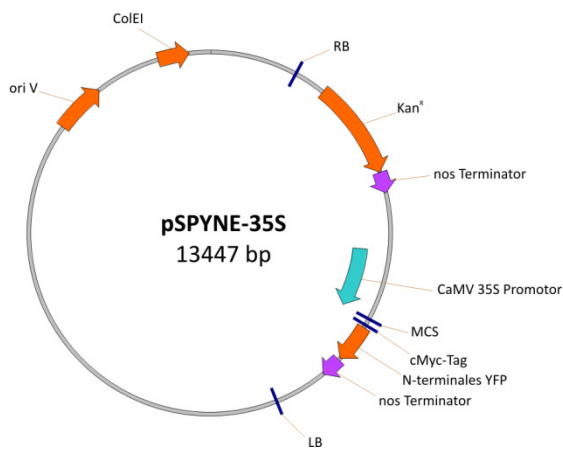
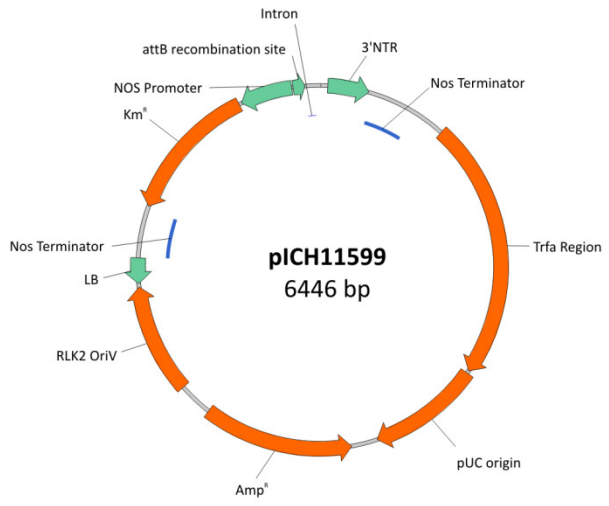
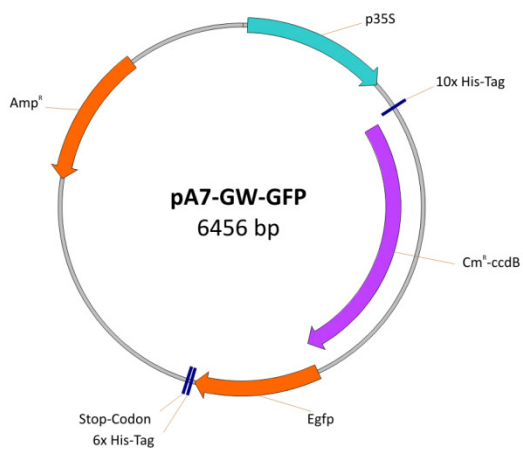
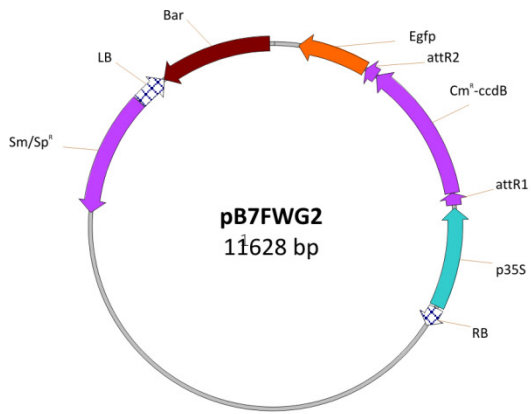
Darüber hinaus dürfen alle weiteren Mitglieder des Instituts nicht unerwähnt bleiben, die maßgeblich für die insgesamt so freundliche Atmosphäre im Haus verantwortlich sind und die das Arbeiten so angenehm gemacht hat.

Zu guter Letzt gilt es meiner Familie zu danken. Meinen Eltern möchte ich für ihre fortwährende moralische und finanzielle Unterstützung während des Studium und der Promotion ganz herzlich danken. Natürlich gebührt ebenso meinen beiden Brüdern, Jan und Malte, ein großes Dankeschön. Die Dankbarkeit, die ich für meine Frau Camilla und meinen Sohn Nils empfinde, kann man kaum in Worte fassen. Ohne Euch zwei, die mir immer den Rücken frei gehalten habt und eine so große Motivationsquelle während dieser Arbeit ward, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

10 Anhang

10.1 Vektorkarten





10.2 Abkürzungen

AA	<i>Aminoacid</i>
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AHK	<i>Arabidopsis</i> Histidin Kinase
AHP	<i>Arabidopsis</i> Histidin Phosphotransferprotein
ARR	<i>Arabidopsis Response</i> Regulator
As	Aminosäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BA	Benzyladenin
β-DDM	N-Dodecyl-β-D-maltosid
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaar
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cirkulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
CHASE	<i>Cyclases/Histidine-Kinase-Associated Sensor Extracellular</i>
CKI	Cytokinin <i>Insensitive</i>
CKX	Cytokininoxidasen/dehydrogenasen
cmc	kritische mizellare Konzentration
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE1	Cytokinin <i>Response 1</i>
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	<i>days post infiltration</i>
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dihydrozeatin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENT	<i>Equilibrative</i> Nukleosid Transporter
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	<i>Ethylene Response Sensor</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
ETR	<i>Ethylene Response</i>
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gm	Gentamycin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-galaktopyranosid
iP	<i>N</i> ⁶ -(Δ ² -isopentenyl)adenin
IPT	Adenosinphosphatisopentenyltransferase
kB	Kilobase
<i>K</i> _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
<i>K</i> _i	Inhibitionskonstante

Km	Kanamycin
KO	<i>Knockout</i>
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	Luria Broth
mA	Milliampere
MALDI-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> -Massenspektrometrie
mAU	Milli-Absorptionseinheit
MCS	<i>Multi-Cloning-Site</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> (Boten) RNA
ms	Millisekunde
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
μM	Mikromolar
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OHK	<i>Oryza</i> Histidin Kinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHK	<i>Pombe</i> Histidin Kinase
pM	Picomolar
PM	Plasmamembran
PUP	Purin-Permease
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rif	Rifampicin
RM	Reaktionsgemisch
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodezylphosphat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Schmelztemperatur
TM	Transmembran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
tZ	<i>trans</i> -Zeatin
tZR	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid
tZRDP	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid-5'-diphosphat
tZRMP	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid-5'-monophosphat
tZRTP	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosid-5'-triphosphat
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
WOL	<i>Wooden leg</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranosid
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
z. B.	zum Beispiel
ZmHK1	<i>Zea mays</i> Histidin Kinase 1
%	Prozent

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 02.12.2009

.....

Klaas Wulfetange