

***Charakterisierung von  
Cytokininrezeptoren aus verschiedenen  
Organismen***

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

Mhyeddeen Halawa  
aus Homs

2015



Diese Arbeit wurde von Januar 2011 bis August 2015 am Lehrstuhl für „Molekulare Entwicklungsbiologie der Pflanzen“ des Instituts für Biologie / Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin unter der Leitung von PD Dr. Alexander Heyl angefertigt.

1. Gutachter: PD. Dr. Alexander Heyl

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Disputation am 02.12.2015

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Phytohormon Cytokinin.....	1
1.2	Cytokininbiosynthese und –metabolismus .....	2
1.3	Cytokininsignaltransduktion in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	5
1.3.1	<i>Arabidopsis</i> -Histidinkinasen (AHKs).....	8
1.3.2	<i>Arabidopsis</i> Histidin-Phosphotransfer-Proteine (AHPs).....	11
1.3.3	<i>Arabidopsis</i> Response Regulator-Proteine (ARRs).....	12
1.3.4	<i>Cytokinin Response Factors</i> (CRFs) .....	14
1.4	Cytokinin in <i>Oryza sativa</i> .....	14
1.4.1	Cytokininbiosynthese und –metabolismus in Reis .....	14
1.4.2	Cytokininsignaltransduktion in Reis .....	15
1.5	Verwendete Organismen zur Erforschung der Cytokininsignaltransduktion.....	17
1.6	Evolution der Cytokininperzeption.....	18
1.7	Proteinstruktur der CHASE Domäne von AHK4.....	19
1.8	Ziel der Arbeit .....	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1	Materialien .....	23
2.1.1	Chemikalien .....	23
2.1.2	Reaktionskits.....	23
2.1.3	Antibiotika .....	24
2.1.4	Enzyme .....	24
2.1.5	Organismen .....	25
2.1.5.1	Mikroorganismen ( <i>E. coli</i> und Hefe).....	25
2.1.5.2	Pflanzen .....	26
2.1.6	Nährmedien.....	26
2.1.6.1	Nährmedien für Bakterien.....	26
2.1.6.2	Nährmedien für Hefen.....	27
2.1.6.3	Nährmedien für Pflanzen .....	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Molekularbiologische Arbeiten .....	29
2.2.1.1	Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen.....	29

2.2.1.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
2.2.1.3	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> Blattepidermiszellen.....	33
2.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	34
2.2.1.5	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	35
2.2.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	36
2.2.1.7	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	37
2.2.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	37
2.2.1.9	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	39
2.2.1.10	Ortsgerichtete Mutagenese .....	39
2.2.1.11	DNA-Restriktionsanalyse .....	39
2.2.1.12	DNA-Sequenzierung .....	39
2.2.1.13	Ligation .....	40
2.2.1.14	<i>Gateway</i> -Klonierung.....	40
2.2.2	Biochemische Methoden.....	42
2.2.2.1	Bradford-Methode als eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung.....	42
2.2.2.2	Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	42
2.2.2.3	Western Blot und Immunodetektion .....	44
2.2.2.4	Ponceaufärbung der PVDF Proteinmembran.....	45
2.2.2.5	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	45
2.2.2.6	Chromatographische Reinigung der nativen CHASE Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 aus <i>Physcomitrella patens</i> .....	46
2.2.2.7	Proteinaufreinigung und Entsalzung durch Gelfiltrationschromatographie .....	48
2.2.2.8	Konzentrieren von Proteinlösungen.....	48
2.2.2.9	Kristallisation-Screens.....	48
2.2.2.10	<i>In vivo</i> Cytokininbindungsassay mit Bakterienzellen.....	49
2.2.2.11	<i>E. coli</i> -Komplementationsassay.....	49
2.2.2.12	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> Massenspektrometrie (MALDI-MS) .....	50
2.2.3	Bioinformatikanalysen.....	51
2.2.4	Arbeiten mit Pflanzen.....	52
2.2.4.1	Isolation von Mesophyllprotoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
2.2.4.2	Protoplasten <i>trans</i> -Aktivierungsassay (PTA) und Transformation von Mesophyllprotoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53
2.2.4.3	Komplementationsanalysen in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	55

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
3.1	Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen zur Untersuchung der Evolution der Cytokininperzeption.....	56
3.1.1	Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren der Klasse A .....	58
3.1.1.1	Bioinformatikanalyse der Rezeptoren.....	58
3.1.1.2	Die <i>acgA</i> - und <i>Slr1759</i> -cDNAs konnten aus genomischer DNA kloniert werden.....	63
3.1.1.3	<i>In vivo</i> Cytokininbindungsassay der Rezeptoren <i>acgA</i> , <i>Slr1759</i> und <i>CTK1</i> in <i>E. coli</i> .....	66
3.1.1.4	<i>E. coli</i> Komplementationsassay ( $\beta$ -Galactosidase Aktivität) für die Rezeptoren <i>acgA</i> , <i>Slr1759</i> und <i>CTK1</i> .....	68
3.1.1.5	Protoplasten- <i>trans</i> Aktivierungsassay (PTA) der Rezeptoren <i>acgA</i> , <i>Slr1759</i> und <i>CTK1</i> .....	71
3.1.2	Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus der Klasse B mit divergierenden Aminosäuren in der CHASE Domäne und konservierten ZKS Domänen. ....	73
3.1.2.1	Bioinformatikanalyse der putativen Cytokininrezeptoren <i>MpCHK1 a</i> und <i>PpCHK4</i> .....	74
3.1.2.2	Ein <i>in vivo</i> Cytokininbindungsassay demonstrierte die Cytokininbindungsaktivität von zwei Mitgliedern der Klasse B, <i>MpCHK1</i> und <i>PpCHK4</i> .....	80
3.1.2.3	Die putativen Cytokininrezeptoren <i>PpCHK4</i> und <i>MpCHK1</i> konnten das Zwei-Komponenten-System (ZKS) <i>in vivo</i> aktivieren.....	81
3.1.2.4	Die Analyse der subzellulären Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteinen in Tabakepidermiszellen wies auf eine Lokalisation von <i>MpCHK1</i> und <i>PpCHK4</i> vorzugsweise im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran hin .....	83
3.1.3	Funktionelle Charakterisierung vom putativen Cytokininrezeptor CHARK ( <i>CHASE domain Receptor-like serine/threonine Kinase</i> ) aus <i>Oryza sativa</i> .....	85
3.1.3.1	Bioinformatikanalyse des Rezeptors .....	86
3.1.3.2	Die <i>CHARK</i> -cDNA konnte aus genomischer DNA kloniert werden.....	89
3.1.3.3	Ein <i>in vivo</i> Cytokininbindungsassay demonstrierte die Cytokininbindungsaktivität von CHARK.....	89
3.1.3.4	Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte das Signal von Cytokinin in einem <i>E. coli</i> -Komplementationsassay nicht zur zellulären Antwort weiterleiten.....	91
3.1.3.5	Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte das Zwei-Komponenten-System (ZKS) in der <i>Arabidopsis</i> Rezeptor-Mutantenlinie <i>ahk2-5/ahk3-7</i> im Protoplasten- <i>trans</i> Aktivierungsassay (PTA) als Antwort für Cytokinin aktivieren.....	92
3.1.3.6	CHARK konnte die <i>Arabidopsis thaliana</i> Rezeptor-Mutanten-Linie <i>ahk2-2/ahk3-3</i> funktionell komplementieren .....	93
3.1.3.7	Die Analyse der subzellulären Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteinen in Tabakepidermiszellen wies auf eine Lokalisation von CHARK zum großen Teil im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran hin.....	96
3.1.3.8	Eine Interaktion von CHARK mit drei <i>Arabidopsis</i> Histidin-Phosphotransfer-Proteinen ( <i>AHP2</i> , <i>AHP4</i> und <i>AHP5</i> ) konnte in einer <i>Yeast Two-Hybrid</i> (Y2H) Analyse nachgewiesen werden.....	97

3.2	Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 aus <i>Physcomitrella patens</i> .....	99
3.2.1	Expression der präparativen nativen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Substratinduktion in <i>E. coli</i> .....	99
3.2.2	Expression der präparativen nativen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Auto-Induktion in <i>E. coli</i> .....	108
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>117</b>
4.1	Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen .....	117
4.1.1	Drei putative Cytokininrezeptoren aus der Klasse A wurden funktionell mit Cytokinin untersucht .....	118
4.1.1.1	Funktionelle Charakterisierung des Histidine Kinase Rezeptors Slr1759 aus <i>Synechocystis sp. PCC 6803</i> .....	118
4.1.1.2	Funktionelle Charakterisierung des acgA Rezeptors aus <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	120
4.1.1.3	Funktionelle Charakterisierung des putativen Cytokininrezeptors CTK1 aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	123
4.1.2	Verschiedene Assays lieferten von zwei Mitgliedern der neuen Klasse, MpCHK1 und PpCHK4 Hinweise für eine Funktion als Cytokininrezeptoren .....	124
4.1.3	Die Aktivität des putativen Cytokininrezeptors CHARK aus <i>Oryza sativa</i> wurde funktionell mit Cytokinin charakterisiert .....	126
4.2	Evolution der Cytokinin-signaltransduktion .....	128
4.3	Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 aus <i>Physcomitrella patens</i> .....	131
4.3.1	Bestimmung der optimalen Bedingungen der löslichen Überexpression der CHASE Domäne von PpCHK4 durch Substratinduktion in <i>E. coli</i> .....	132
4.3.2	Präparative native Überexpression und Reinigung der CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Auto-Induktion in <i>E. coli</i> .....	132
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>156</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>157</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>158</b>
10.1	Plasmide .....	158
10.2	Oligonukleotide .....	162
10.3	Abkürzungen.....	165

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturen von Cytokinin.....	2
Abbildung 2: Modell des Metabolismus isoprenoider Cytokinine.....	5
Abbildung 3: Phosphorylierungskaskade im Zwei-Komponenten-System.....	6
Abbildung 4: Modell der Cytokinin-Signalübertragung in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Cytokininrezeptors aus <i>Arabidopsis thaliana</i> am Beispiel von AHK4.....	8
Abbildung 6: Topologische schematische Darstellung von der Struktur der CHASE Domäne des AHK4/CRE1 Rezeptors.....	21
Abbildung 7: AHK4 bindet Cytokinine mit seiner membrandistalen PAS-Domäne.....	21
Abbildung 8: Phylogenetischer Baum der CHASE Domäne verschiedener Spezies.....	57
Abbildung 9: Klasse A eines phylogenetischen Baumes der CHASE Domäne.....	58
Abbildung 10: Domänenstruktur der Rezeptoren <i>acgA</i> aus <i>Dictyostelium discoideum</i> , <i>Slr1759</i> aus <i>Synechocystis sp. PCC 6803</i> und <i>CTK1</i> aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	59
Abbildung 11: Vorhersage hydrophober Helices der Rezeptoren <i>acgA</i> , <i>Slr1759</i> und <i>CTK1</i> .....	60
Abbildung 12: Vorhersage der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren <i>acgA</i> , <i>Slr1759</i> , <i>CTK1</i> und <i>AHK4</i> .....	62
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung von <i>acgA</i> .....	64
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Klonierung von <i>Slr1759</i> .....	65
Abbildung 15: Bestimmung der Cytokininbindungsaktivität der Rezeptoren <i>acgA</i> , <i>Slr1759</i> und <i>CTK1</i> mittels eines <i>in vivo</i> Bindungsassays.....	67
Abbildung 16: Schematische Darstellung des $\beta$ -Galactosidase Assays.....	68
Abbildung 17: Die Aktivität der Rezeptoren von der Klasse A, <i>acgA</i> ; <i>Slr1759</i> und <i>CTK1</i> , wurde durch einen Komplementationsassay im RCS-Phosphorylierungssystem im <i>E. coli</i> Stamm KMI002 mit verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen untersucht.....	70
Abbildung 18: Die zwei putativen Rezeptoren <i>acgA</i> und <i>CTK1</i> konnten das ZKS in <i>ahk2-5/ahk3-7 Knockout</i> -Mutanten aus <i>A. thaliana</i> in Protoplasten <i>trans</i> -Aktivierungsassay (PTA) in Abhängigkeit von Cytokinin aktivieren.....	72
Abbildung 19: Klasse B eines phylogenetischen Baumes der CHASE Domäne.....	73
Abbildung 20: Domänenstruktur der Rezeptoren <i>MpCHK1</i> und <i>PpCHK4</i> .....	74

Abbildung 21: Vorhersage hydrophober Helices der putativen Cytokininrezeptoren MpCHK1 und PpCHK4.....	75
Abbildung 22: Vorhersage der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren AHK4, PpCHK4 und MpCHK1.....	76
Abbildung 23: Konservierung der Aminosäuren zwischen den CHASE Domänen der neuen identifizierten und der klassischen Cytokininrezeptoren.....	79
Abbildung 24: <i>In vivo</i> Bindungsassay mit Cytokinin und zwei putativen Cytokininrezeptoren, MpCHK1 und PpCHK4, aus der Klasse B .....	81
Abbildung 25: Die Aktivität von MpCHK1 und PpCHK4 wurde durch einen <i>E. coli</i> -Komplementationsassay mit verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen untersucht.....	82
Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation von GFP-MpCHK1 und GFP-PpCHK4 in transient transformierten Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i> .....	84
Abbildung 27: Phylogenetische Analyse der CHASE-Domänen verschiedener Pflanzen (Klasse C).....	86
Abbildung 28: Domänenstruktur des putativen Cytokininrezeptors CHARK.....	86
Abbildung 29: Vorhersage hydrophober Helices des putativen Cytokininrezeptors CHARK.....	87
Abbildung 30: Vorhersage der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren AHK4 und CHARK.....	88
Abbildung 31: Bestimmung der Cytokininbindungsaktivität des CHARK Rezeptors mittels eines <i>in vivo</i> Bindungsassays.....	90
Abbildung 32: Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte die Mutation eines bakteriellen Histidinkinaserzeptors in einem <i>E. coli</i> -Komplementationsassay nicht ersetzen.....	91
Abbildung 33: Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte das Zwei-Komponenten-System in <i>ahk2-5/ahk3-7 Knockout</i> -Mutanten aus <i>A. thaliana</i> im Protoplasten <i>trans</i> -Aktivierungsassay (PTA) in Abhängigkeit von Cytokinin aktivieren.....	93
Abbildung 34: Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte die <i>Arabidopsis thaliana</i> Rezeptor-Mutantenlinie <i>ahk2-2/ahk3-3</i> funktionell komplementieren.....	95
Abbildung 35: Subzelluläre Lokalisation von CHARK-GFP (pB7FWG2-CHARK) in transient transformierten Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i> .....	97
Abbildung 36.: Interaktionsmatrix für die cytoplasmatische CHARK-Sequenz aus <i>Oryza sativa</i> als <i>Bait</i> mit AHP2, AHP4 und AHP5 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> als <i>Prey</i> .....	98
Abbildung 37: Bestimmung der optimalen Bedingungen der Überexpression von der CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Substratinduktion in <i>E. coli</i> .....	100
Abbildung 38: Bestimmung der optimalen Bedingungen der präparativen nativen Expression der CHASE Domäne von PpCHK4 durch Substratinduktion in <i>E. coli</i> .....	101

Abbildung 39: Chromatographische Reinigung natives GST-CHASE Proteins mittels Glutathion-Agarose-Kügelchen.....	102
Abbildung 40: MALDI-MS Analyse des nativen aufgereinigten GST-CHASE Proteins.....	103
Abbildung 41: Chromatogramm der nativen Reinigung der CHASE Domäne des Cytokininsrezeptors PpCHK4 aus <i>Physcomitrella patens</i> .....	104
Abbildung 42: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des GST-CHASE Proteins an einem FPLC-Gerät.....	105
Abbildung 43: SDS-PAGE des aufkonzentrierten GST-CHASE Proteins.....	106
Abbildung 44: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des CHASE-His Proteins an einem FPLC-Gerät.....	109
Abbildung 45: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des Sumo_Stepp II_7x His-CHASE Proteins mittels Strep-Tactin™-Kügelchen.....	109
Abbildung 46: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des GST-CHASE Proteins mittels Glutathion-Agarose-Kügelchen.....	110
Abbildung 47: Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie des nativen gereinigten GST-CHASE Proteins.....	111
Abbildung 48: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der aufkonzentrierten Fraktionen nach Gel-Chromatographie vom Peak 1 und Peak 2 und nach dem Thrombin-Verdau des GST-CHASE Proteins.....	112
Abbildung 49: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des 6His-Trx-CHASE Proteins an einem FPLC-Gerät.....	113
Abbildung 50: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der Reinigung des CHASE-MBP Proteins an einer Dextrinsäule.....	114
Abbildung 51: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der aufkonzentrierten Fraktionen nach Gel-Chromatographie des CHASE-MBP.....	115
Abbildung 52: Verschiedene Ergebnisse der Kristallisation-Screens der CHASE Domäne.....	116
Abbildung 53: Modell einer Cytokininsignaltransduktion in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	121
Abbildung 54: Neues Modell einer Cytokininsignaltransduktion in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	122
Abbildung 55: Modell für die Evolution der Cytokininsignaltransduktion.....	129

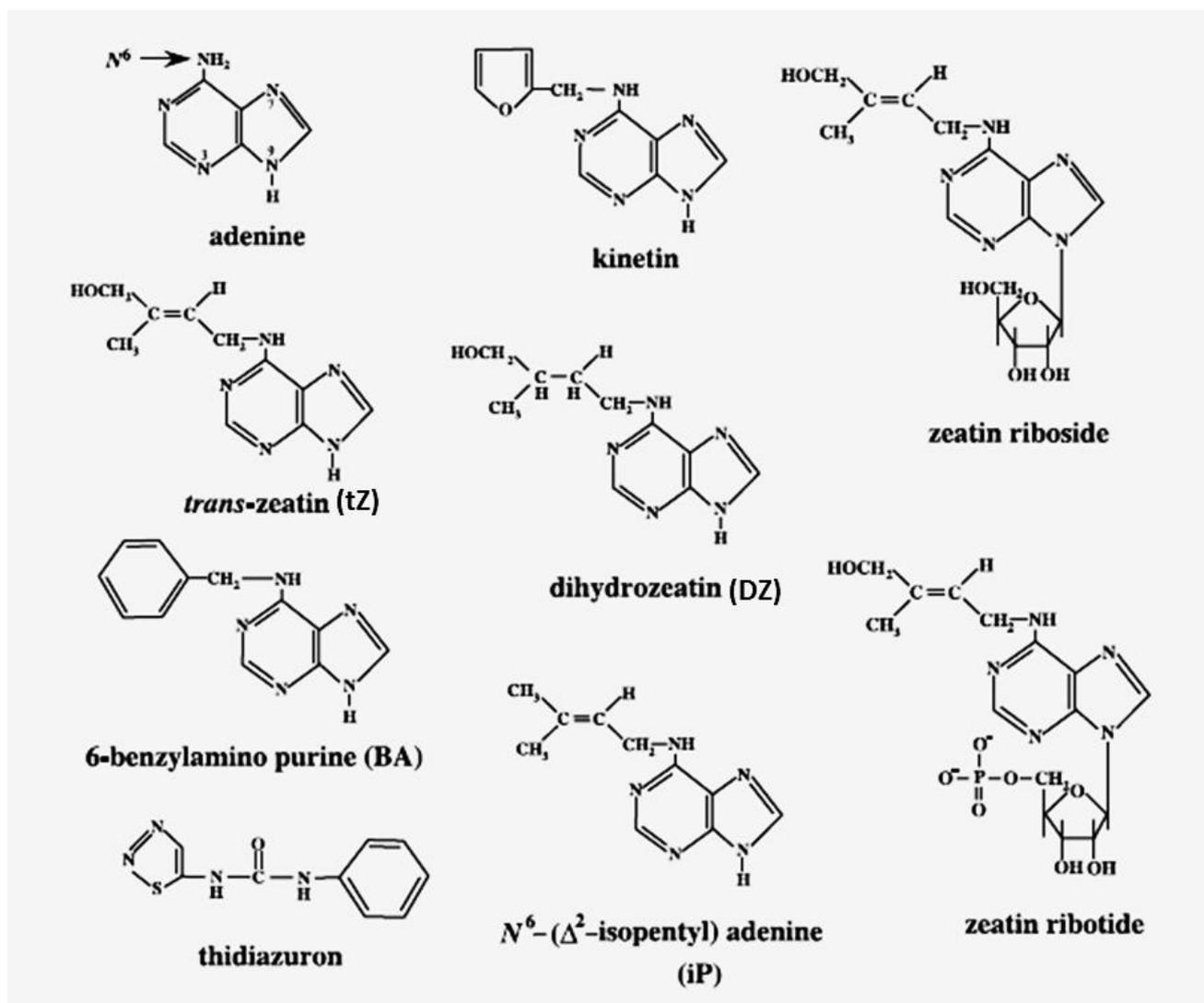
## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionskits.....	23
Tabelle 2: Antibiotika.....	24
Tabelle 3: Enzyme.....	24
Tabelle 4: Bakterienstämme.....	25
Tabelle 5: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamm.....	26
Tabelle 6: Selektivmedien basierend auf dem SD-Medium.....	28
Tabelle 7: Zusammensetzung der Lösungen für die Plasmid Mini-Präparation.....	35
Tabelle 8: Zusammensetzung der für die Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Lösungen.....	36
Tabelle 9: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes.....	37
Tabelle 10: Temperaturprogramm einer Standard-PCR.....	38
Tabelle 11: Zusammensetzung eines typischen Ligation-Ansatzes.....	40
Tabelle 12: Pipettierschema für die BP-Rekombinationsreaktion.....	41
Tabelle 13: Pipettierschema für die LR-Rekombinationsreaktion.....	41
Tabelle 14: Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	42
Tabelle 15: Angabe zur Herstellung vom 10 % SDS-Trenngel und 5 % SDS-Sammelgel.....	43
Tabelle 16: Verwendete Antikörper.....	44
Tabelle 17: Die verwendeten Programme, Datenbanken und Webtools.....	51
Tabelle 18: DNA-Pipettierschema für PTA.....	54
Tabelle 19: Plasmid.....	158
Tabelle 20 : Oligonukleotide (Primer).....	162

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Phytohormon Cytokinin

Cytokinine gehören zu einer Klasse von pflanzlichen Hormonen, die an vielen entwicklungsbiologischen und physiologischen Prozessen beteiligt sind (Mok und Mok, 2001; Heyl und Schmülling, 2003; Argueso *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2012; Kieber und Schaller, 2014). Unter anderem haben Cytokinine einen Einfluss auf die Meristemfunktion in Spross und Wurzel (Werner *et al.*, 2001; 2003; Lohar *et al.*, 2004; Dello Ioio *et al.*, 2007; Kurakawa *et al.*, 2007; Dello Ioio *et al.*, 2008), die Verzögerung der Blattseneszenz (Gan und Amasino, 1995; Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006), die Keimung (Miller, 1958; Mok, 1994), die Stressantwort (Werner und Schmülling, 2009), die Pathogenresistenz (Choi *et al.*, 2011), den zirkadianen Rhythmus (Hanano *et al.*, 2006; Salome *et al.*, 2006), die Plastidenentwicklung (Lerbs *et al.*, 1984; Cortleven *et al.*, 2009; 2011), die symbiotische Ausbildung von Wurzelknöllchen (Laffont *et al.*, 2015) und generell die Antwort auf abiotische und biotische Umweltfaktoren (Argueso *et al.*, 2012). Natürlich vorkommende Cytokinine sind Adeninderivate mit einer aromatischen oder Isoprenoid-Seitenkette an der  $N^6$ -Position des Purin-Ringes (Mok und Mok, 2001) (Abb.1). Die häufigste Klasse von Cytokinin haben Isoprenoid-Seitenketten, darunter sind *trans*-Zeatin (*tZ*) und im geringeren Anteil Isopentenyladenin (*iP*) die am häufigsten vorkommenden Cytokinine in *Arabidopsis thaliana* (Takei *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006), während in Mais (Veach *et al.*, 2003) und Reis (Izumi *et al.*, 1988) *cis*-Zeatin (*cZ*) in beträchtlichen Mengen gefunden wurde. Die *trans*-Form (*tZ*) ist ein aktives Cytokinin in allen Pflanzenarten; die *cis*-Form (*cZ*) ist allgegenwärtig in Pflanzen vorhanden (Gajdošová *et al.*, 2011), aber es zeigte allenfalls eine begrenzte Cytokininaktivität in *Arabidopsis thaliana* (Spichal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Heyl *et al.*, 2012). Die aromatischen Cytokinine sind nur in wenigen Pflanzenspezies zudetektieren (Strnad, 1997).



**Abbildung 1: Chemische Strukturen von Cytokinin.** Adenin ist die Ausgangssubstanz von natürlich vorkommenden Cytokinin, obwohl es keine Cytokinin-Antworten aktiviert; die N<sup>6</sup>-Position des Purin-Rings wurde mit einem Pfeil markiert. Das häufigste Cytokinin in *Arabidopsis* ist *trans*-Zeatin, die freien Basenformen als auch die Riboside- und Ribotide-Formen wurden in der Abbildung dargestellt. Kinetin ist ein künstliches aromatisches Cytokinin; Benzyladenin ist ein Beispiel eines natürlich vorkommenden aromatischen Cytokinins und Thiazuron ist ein Diphenylharnstoff-Typ Cytokinin (Abbildung aus Kieber und Schaller, 2014).

## 1.2 Cytokininbiosynthese und –metabolismus

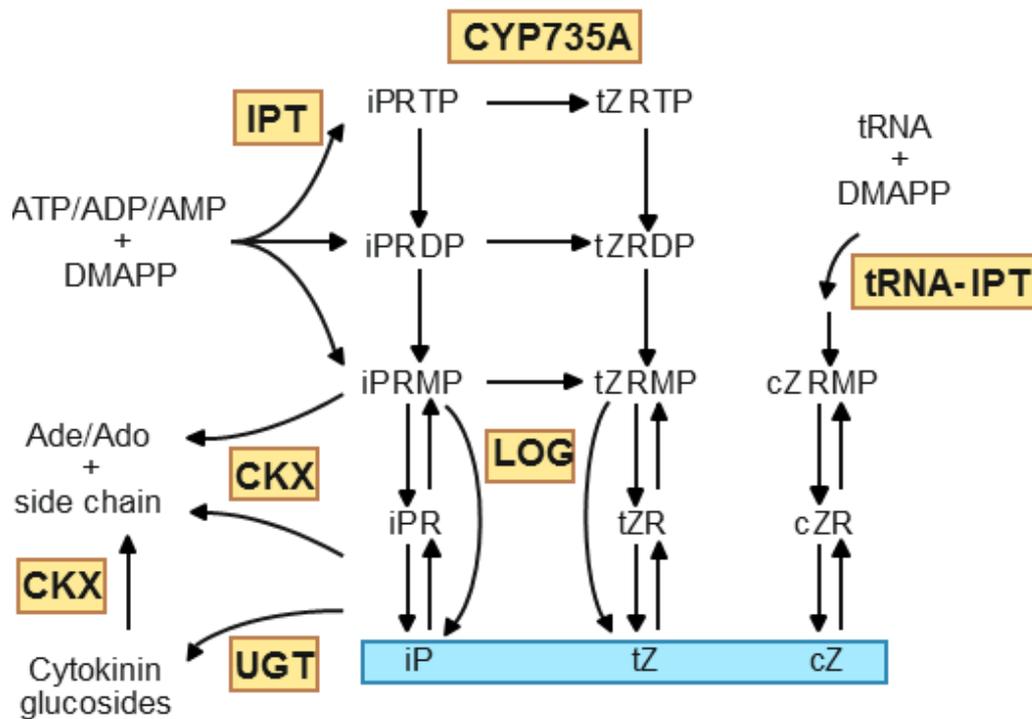
Die Cytokinine werden nach Art ihrer Seitenkette in isoprenoide oder aromatische Cytokinine klassifiziert (Strnad *et al.*, 1992; Mok und Mok, 2001; Sakakibara, 2006). Weil die meisten biologisch aktiven Cytokinine zu der isoprenoiden Klasse gehören (Schmitz und Skoog, 1972; Spiess, 1975; Letham und Zhang, 1989), konzentrierte sich die Forschung hauptsächlich auf die Stoffwechselwege

der isoprenoiden Cytokinine (Werner *et al.*, 2006; Kamada-Nobusada und Sakakibara, 2009). Die Biosynthese und der Metabolismus der aromatischen Cytokinine sind bisher unbekannt. Der erste und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese von Isopentenyladenin (iP) und *trans*-Zeatin (*tZ*) Cytokinin 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 (Kakimoto 2001; Takei *et al.*, 2001a; Miyawaki *et al.*, 2006) (Abb. 2). Eine enzymatische Aktivität, die AMP und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) in das Cytokinin iPRMP (iP-ribosid-5'-monophosphat) konvertiert, wurde zuerst in *Dictyostelium discoideum* identifiziert (Taya *et al.*, 1978). Anschließend zeigten Akiyoshi und Kollegen, dass das *ipt* Gen aus *Agrobacterium tumefaciens* für ein Enzym mit ähnlicher Aktivität kodiert (Akiyoshi *et al.*, 1984). *ipt* Gene wurden auch in mehreren anderen Bakterien identifiziert und IPT-Aktivität in Rohextrakten einer Vielzahl von Pflanzengewebe nachgewiesen (Kieber und Schaller, 2014). Neun *IPT* Gene wurden in *Arabidopsis* identifiziert (*PT1-PT9*), von welchen *IPT6* ein Pseudogen ist (Kakimoto 2001; Takei *et al.*, 2001a). Die Gene wurden nach Art ihres Substrates in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Die sechs Mitglieder der ersten Gruppe (*IPT1*, *IPT3*, *IPT4*, *IPT5*, *IPT7*, *IPT8*) kodieren für ATP/ADP-IPTs und katalysieren die Prenylierung von freien Adenosinphosphaten (unter anderem katalysieren sie die Synthese von Isopentenyladenin (iP) und *trans*-Zeatin (*tZ*)). Die zweite Gruppe enthält zwei Gene (*IPT2* und *IPT9*), die für tRNA-IPTs kodieren und *cis*-Zeatin synthetisieren (s.u.).

Danach entstehen *tZ*-Nukleotide durch die von Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP735A) gesteuerte Umwandlung der iP-Nukleotide. Diese Reaktion wird in *Arabidopsis* von zwei Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP735A1 und CYP735A2) katalysiert (Takei *et al.*, 2004). iP-ribosid-5'-triphosphat (iPRTP), iP-ribosid-5'-diphosphat (iPRDP) und die entsprechenden *tZ*-Nukleotide werden durch Phosphatasen dephosphoryliert, iP-ribosid-5'-monophosphat (iPRMP) und *tZ*-ribosid-5'-monophosphat (*tZRMP*) können durch die Cytokininnukleosid-5'-monophosphat-phosphoribohydrolasen (LONELY GUYS, LOGs) (für die im Genom von *Arabidopsis* neun Gene kodieren (*LOG1-LOG9*)) direkt in die aktiven freien Nukleobasen (iP und *tZ*) umgewandelt werden (Kurakawa *et al.*, 2007; Kuroha *et al.*, 2009). Alternativ werden *cis*-Zeatin (*cZ*) Cytokinine in *Arabidopsis* ausschließlich durch tRNA-IPT katalysierte Prenylierung von tRNAs und anschließende Dephosphorylierung von *cZ*-ribosid-5'-monophosphat (*cZRMP*) gebildet (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001a) (Abb. 2).

Zusätzlich zu den aktiven freien Basenformen der Cytokinine existieren in Pflanzen auch Cytokinine wie Riboside (in welchen ein Riboserest an die *N9*-Position des Purin-Rings gebunden ist) und Ribotide (in welchen der Riboserest eine Phosphatgruppe enthält). Ferner können Cytokinine an den Position *N3*, *N7*, und *N9* des Purin-Ringes (*N*-Glukoside) und an der Hydroxylgruppe von *trans*-, Dihydro- und *cis*-Zeatin (*O*-Glukoside) glykosyliert werden. Cytokinin-*O*-Glykoside werden nicht durch Cytokininoxidasen abgebaut (s.u.) (Galuszka *et al.*, 2007) und durch die  $\beta$ -Glukosidase deglykosyliert. Wegen dieser Eigenschaften wurde vermutet, dass *O*-Glykoside als Cytokinin-Speichermoleküle verwendet werden könnten (Brzobohaty *et al.*, 1993). Die *N*-Glykosylierung der Cytokinine ist dagegen irreversibel, die Cytokinin-*N*-Glykoside können dadurch nicht wieder in freie Basen umgewandelt werden und repräsentieren somit wahrscheinlich eine Inaktivierungsform der Cytokinine (Sakakibara, 2006).

Die Degradation und die Inaktivierung der biologisch aktiven Nucleobasen erfolgt zum einen durch Cytokininoxidasen/dehydrogenasen (CKX) und zum anderen durch Glykosylierung mittels Glykosyltransferasen (UGT) (Abb. 2). Wang und Kollegen zeigten, dass eine *N*-Glykosyltransferase (UGT76C2) bei der homöostatischen Regulation von Cytokinin beteiligt ist und die Expressionsniveaus bekannter Cytokininsignalisierungsgene beeinflusst (Wang *et al.*, 2011). In *Arabidopsis* wurden sieben teilweise redundante *CKX*-Gene identifiziert (*AtCKX1-AtCKX7*), die in verschiedenen Pflanzenteilen exprimiert werden (Bilyeu *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003; Köllmer *et al.*, 2009). Die *CKX* Enzyme können sich in ihren biochemischen Aktivitäten als auch in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden (Werner *et al.*, 2003; 2006; Galuszka *et al.*, 2007; Köllmer *et al.*, 2009). Die Überexpression von *CKX* Genen in transgenen Pflanzen führte zu einer starken Reduktion der Cytokininkonzentration und verursacht verschiedene phänotypische Merkmale, die als Cytokinindefizienzsyndrom bezeichnet werden (Werner *et al.*, 2001; Schmülling *et al.*, 2003). Die Hauptmerkmale dieses Syndroms sind die Bildung von verkürzten Sprossen mit kleinen Blättern, ein ausgeprägteres Wurzelsystem und größere Samen (Werner *et al.*, 2001; 2003; Riefler *et al.*, 2006). *CKX*-ähnliche Gene wurden auch im Genom von Prokaryoten wie *Rhodococcus fascians* detektiert (Schmülling *et al.*, 2003). In der letzten Zeit wurden *IPT* und *CKX* Gene aus Cyanobakteria identifiziert (Frebort *et al.*, 2011), was die Behauptung verstärkt hat, dass der Cytokinin-Stoffwechsel aus bakterieller Herkunft stammt und ins Pflanzengenom über primäre Endosymbiose eingetragen wurde (Frebort *et al.*, 2011; Spichal, 2012).

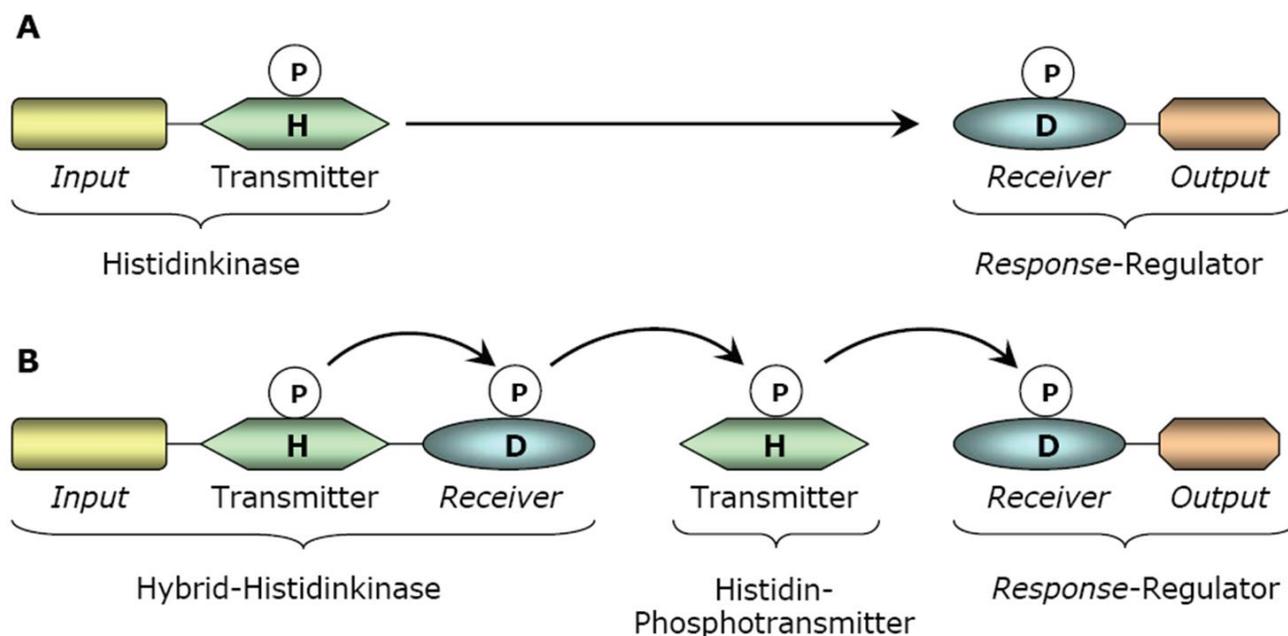


**Abbildung 2: Modell des Metabolismus isoprenoider Cytokinine.** Die Biosynthese von Isopentenyladenin (iP) und *trans*-Zeatin (tZ) Cytokinen beginnt mit der Bildung von iP-Nucleotiden durch die Reaktion von ATP/ADP/AMP mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als Prenyldonor, welche durch Adenosinphosphatisopentenyltransferasen (IPT) katalysiert wird. Danach entstehen tZ-Nucleotide durch die von Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP735A) gesteuerte Umwandlung der iP-Nucleotide. iP-ribosid-5'-triphosphat (iPRTP), iP-ribosid-5'-diphosphat (iPRDP) und die entsprechenden tZ-Nucleotide werden durch Phosphatasen dephosphoryliert, iP-ribosid-5'-monophosphat (iPRMP) und tZ-ribosid-5'-monophosphat (tZRMP) können durch die Cytokininnucleosid-5'-monophosphat-phosphoribohydrolasen (LOG) direkt in die aktiven freien Nucleobasen (iP und tZ) umgewandelt werden. *cis*-zeatin (cZ) Cytokinine werden in *Arabidopsis* ausschließlich durch tRNA-IPT katalysierte Prenylierung von tRNAs und anschließende Dephosphorylierung von cZ-ribosid-5'-monophosphat (cZRMP) gebildet. Die Inaktivierung der biologisch aktiven Nucleobasen erfolgt zum einen durch Cytokininoxidasen/dehydrogenasen (CKX) und zum anderen durch Glykosylierung mittels Glykosyltransferasen (UGT) (modifiziert nach Werner und Schmülling, 2009). Biologisch aktive Cytokinine (iP, tZ und cZ) sind blau hinterlegt.

### 1.3 Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis thaliana*

Das Cytokininsignaltransduktionssystem in *Arabidopsis thaliana* basiert auf dem Zwei-Komponenten-System (ZKS), welches in Prokaryoten in großer Zahl vorhanden ist. Ein solches System besteht aus einer membrangebundenen Rezeptor-Histidinkinase mit einer Sensor-Domäne, welche das Signal wahrnimmt und dadurch an einer Transmitter-Domäne autophosphoryliert wird, sowie einem *Response*-Regulator, auf den das Phosphorylierungssignal übertragen wird und der

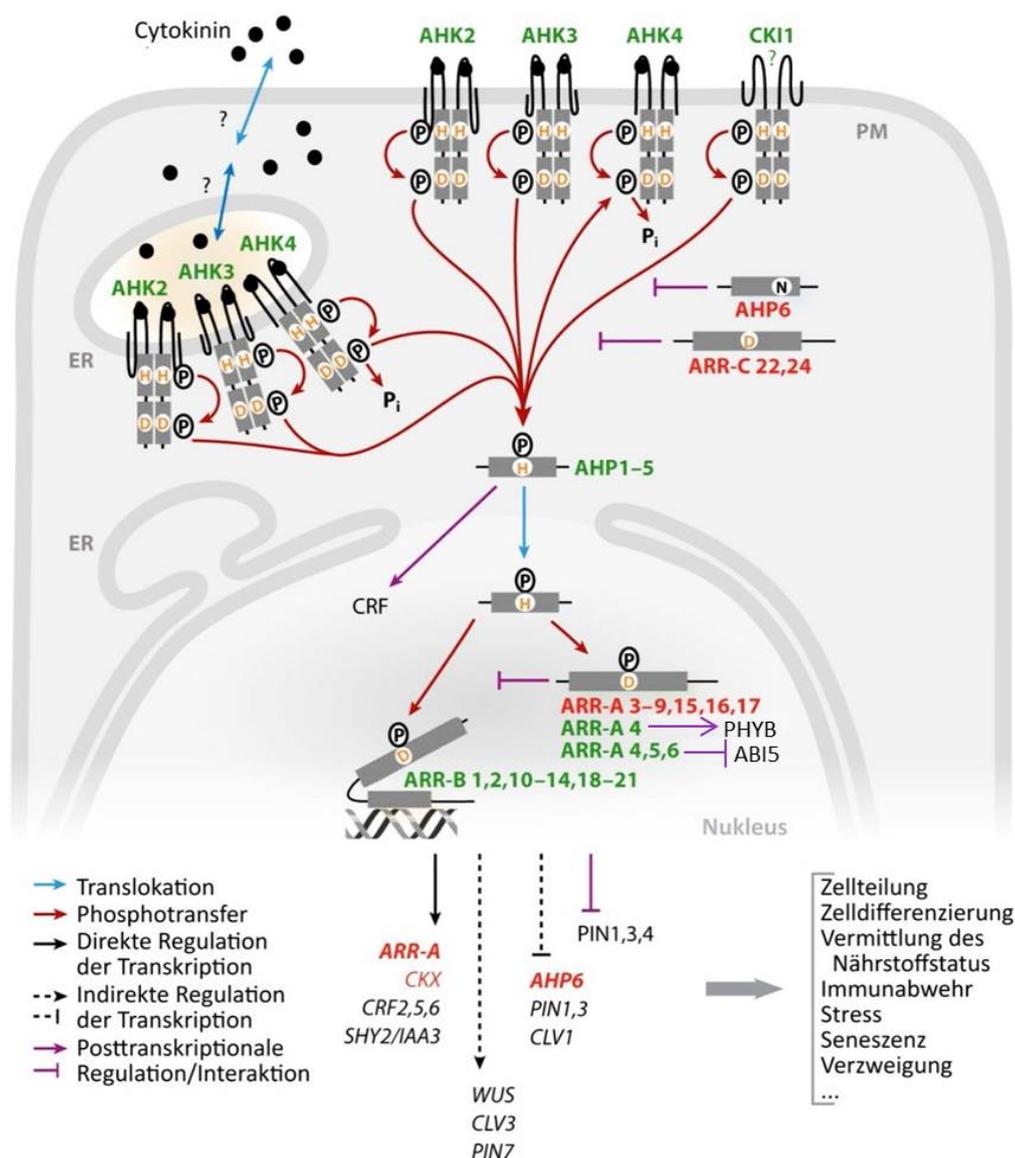
dadurch seine Zielgene beeinflusst (Abb. 3A) (West und Stock, 2001). In eukaryotischen Organismen befindet sich ein erweitertes Zwei-Komponenten-System, das eine Sensor Hybrid-Histidinkinase mit einer *Receiver*-Domäne; ein Histidin-Phosphotransferprotein; einen Typ-A Response-Regulator und einen Typ-B Response-Regulator enthält (Abb. 3B) (Kakimoto, 2003; Schaller, 2011).



**Abbildung 3: Phosphorylierungskaskade im Zwei-Komponenten-System. (A)** Einfaches Zwei-Komponenten-System: Die Histidinkinase besteht aus einer *Input*- und einer *Transmitter*-Domäne, der *Response*-Regulator aus einer *Receiver*- und einer *Output*-Domäne. Das Phosphat wird direkt von der Histidinkinase auf den Response-Regulator übertragen. **(B)** Komplexes Zwei-Komponenten-System: Die Hybrid-Histidinkinase enthält neben *Input*- und *Transmitter*-Domäne eine *Receiver*-Domäne. Das Phosphat wird innerhalb der Histidinkinase von der *Transmitter*- auf die *Receiver*-Domäne und dann über einen zwischengeschalteten Histidin-Phosphotransmitter auf den *Response*-Regulator übertragen. H = Histidinrest; D = Aspartatrest; P = Phosphat (Abbildung von Schaller *et al.*, 2008).

Im gegenwärtigen Modell der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* bindet Cytokinin an die Rezeptor-Histidinkinase über ihre CHASE-Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) und löst damit die Autophosphorylierung an der *Transmitter*-Domäne des Rezeptors aus. Im nächsten Schritt wird die Phosphorylgruppe vom konservierten Histidinrest des Rezeptors auf den Aspartatrest des Rezeptors übertragen. Die Phosphorylgruppe wird dann auf den Histidinrest eines Histidin-Phosphotransfer-Proteins überführt. Durch das Histidin-Phosphotransfer-Protein wird die Phosphorylgruppe anschließend in den Zellkern gebracht, wo sie auf die Typ-B ARRs übertragen wird. Diese aktivieren die Transkription verschiedener Zielgene, u.a. der Typ-A ARRs. Die Typ-A ARRs können über einen negativen „feedback“-Mechanismus die

Signaltransduktion regulieren und dienen der Kopplung des Cytokinin-Signalweges mit anderen Signalwegen (Abb. 4) (Hwang und Sheen, 2001; Kakimoto, 2003; Heyl *et al.*, 2006; Steklow *et al.*, 2013). Die folgenden Komponenten der Cytokinin-Signaltransduktion wurden im *Arabidopsis*-Genom identifiziert: Drei Cytokininrezeptoren, fünf Histidin-Phosphotransferproteine, 11 Typ-B ARR und 10 Typ-A ARR (Heyl und Schmülling, 2003; To und Kieber, 2008; Werner und Schmülling, 2009).



**Abbildung 4: Modell der Cytokinin-Signalübertragung in *Arabidopsis thaliana*.** Nach der Bindung von Cytokinin an die CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) der Rezeptorhistidinkinasen (AHK2, AHK3, AHK4) erfolgt eine Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest des Rezeptors, die anschließend auf den Aspartatrest des Rezeptors übertragen wird. Diese Autophosphorylierung wird letztendlich auf den Histidinrest der AHP Proteine überführt, die in den Zellkern translozieren, wo sie den Phosphatrest entweder auf Typ-B *Response*-Regulatoren oder auf CRF Proteine übertragen. Die dadurch aktivierten Transkriptionsfaktoren regulieren die Transkription verschiedener Cytokininzielgene, u.a. der Typ-A ARRs. Die Typ-A *Response*-Regulatoren können über

einen negativen „feedback“-Mechanismus die Signaltransduktion regulieren. Weitere negative Regulatoren der Cytokininsignaltransduktion sind AHP6 und die Typ-C *Response*-Regulatoren. Grün markiert die positive und rot die negative Regulation. Abkürzungen: AHK, *Arabidopsis* Histidinkinase; ARR, *Arabidopsis Response*-Regulator; CKI1, Cytokinin insensitiv 1; CRF, *Cytokinin Response Factor*; D, Aspartatrest; H, Histidinrest; P, Phosphatgruppe; ER, Endoplasmatisches Retikulum; PM, Plasmamembran (modifiziert nach Hwang *et al.*, 2012).

### 1.3.1 *Arabidopsis*-Histidinkinasen (AHKs)

Das *Arabidopsis*-Genom kodiert für zahlreiche Histidinkinasen u. a: AHK2, AHK3, CRE1/AHK4, AtHK1, CKI1 und AHK5/CKI2 (Kakimoto *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001a; Yamada *et al.*, 2001). AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 besitzen in ihrem N-terminalen Bereich eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular), die von zwei (AHK4) bis drei (AHK2 und AHK3) hydrophoben transmembranständigen Bereichen flankiert ist. Im cytoplasmatischen Bereich der Proteine befinden sich eine Histidinkinase A Domäne, eine Histidinkinase ähnliche ATPase Domäne und zwei *Response*-Regulator Domänen (Abb.5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Cytokininrezeptors aus *Arabidopsis thaliana* am Beispiel von AHK4.** TM, Transmembrandomäne; CHASE, (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular); HisKA, Histidinkinase A; HATPase\_c, Histidinkinase ähnliche ATPase; Respons-reg, *Response*-Regulator.

AtHK1, CKI1 und AHK5/CKI2 haben ähnliche Strukturen, aber sie besitzen keine CHASE-Domäne. AHK5/CKI2 fehlen auch die N-terminalen Transmembrandomänen (Kakimoto *et al.*, 1996; Kakimoto 2003). Die Histidinkinase und *Response*-Regulator Domänen im cytoplasmatischen Bereich aller Proteine haben eine essentielle Funktion für die Signalübertragung im Zwei-Komponenten-System. CRE1/AHK4 zeigte neben der Kinase- auch eine Phosphataseaktivität, die in Abwesenheit von Cytokinin zu einer Dephosphorylierung der Histidin-Phosphotransfer Proteine (AHPs) führt (Mähönen *et al.*, 2006a). Der erste Cytokininrezeptor CRE1/AHK4 wurde als Mutante in einem *Screen* identifiziert, in dem die Mutante (*cre1-1*) zu einer veränderten Zellproliferation und Sprossbildung führte (Inoue *et al.*, 2001). Anschließend wurden zwei enge homologe Proteine AHK2 und AHK3 ebenfalls identifiziert (Suzuki *et al.*, 2001a; Yamada *et al.*, 2001). Diese drei AHKs fungieren als funktionell überlappende positive Regulatoren der Cytokininsignaltransduktion (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Die Cytokininmoleküle werden

durch die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors (CHASE Domäne) (Anantharaman und Aravind 2001; Mougél und Zhulin, 2001; Heyl *et al.*, 2007; Miwa *et al.*, 2007), mit einer Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich gebunden (Yamada *et al.*, 2001; Spichal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006). Die Affinitäten für die drei Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und AHK4 sind unterschiedlich, so zeigten AHK2 und AHK4 die höchste und ähnliche Affinität für iP und tZ, während für AHK3 die höchste Affinität für tZ nachgewiesen wurde (Heyl *et al.*, 2012; Lomin *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2011). In Übereinstimmung mit der Cytokininspezifität konnte AHK4 AHK2 aber nicht AHK3 in einem genetischen Komplementationsassay ersetzen (Stolz *et al.*, 2011). Alle bisher untersuchten Cytokininrezeptoren zeigten Antwort auf Cytokinin-Riboside (Heyl *et al.*, 2012), allerdings zeigten die Cytokinin-9-Ribosiden (tZR und iPR) in einem pflanzlichen Assay eine schwache Aktivität mit den Cytokininrezeptoren (Lomin *et al.*, 2015). Das deutet darauf hin, dass die Cytokinin-Riboside als gemeinsame Transportform der Cytokinine fungieren und keine oder sehr schwache Cytokininaktivität besitzen, was die zentrale Rolle der freien Cytokinine als die einzigen biologischen aktiven Cytokinine unterstützt (Lomin *et al.*, 2015). Die Ligandbindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors Hybrid-Histidinkinase und löst eine Autophosphorylierung an einem konservierten Histidinrest (Miwa *et al.*, 2007; Hothorn *et al.*, 2011), die dann intramolekular zum Aspartatrest der *Response*-Regulator Domäne übertragen wird. Jedoch wurde gemäß einer Kristallographie Analyse der CHASE Domäne des AHK4 Cytokininrezeptors gezeigt, dass die CHASE Domäne Komplexe mit verschiedenen freien Basen Cytokininen bildet, aber nicht mit tZ-Ribosiden (Hothorn *et al.*, 2011).

Die Aktivität der Cytokininrezeptoren AHK4 und AHK3 wurde in einem Zwei-Komponenten-System (ZKS) einer *SLN1*-defizienten Hefemutante (*Saccharomyces cerevisiae*) getestet. Die Rezeptoren konnten den Phänotyp komplementieren und das führte zu einem Cytokinin-abhängigen Wachstum (Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001a; Ueguchi *et al.*, 2001b). In anderen Zwei-Komponenten-Systemen wie *Schizosaccharomyces pombe* und *E. coli*, die für die Histidinkinasen PHK1/2/3 bzw. die Histidinkinase RcsC defizient waren, konnte für AHK4 eine Komplementation und Aktivität mit Cytokinin gezeigt werden, aber die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 konnten die entsprechenden Mutationen nicht komplementieren (Suzuki *et al.*, 2001a). Hwang und Sheen zeigten in einem Protoplasten *trans*-Aktivierungsassay (PTA), dass die Cytokininrezeptoren AHK2; AHK3 und AHK4 den *ARR6*-Promotor als Reaktion auf Cytokinin aktivieren konnten (Hwang und Sheen 2001). Die *wol*-Mutation (T301I) (Mähönen *et al.*, 2000), die in der CHASE-Domäne des AHK4

Rezeptors liegt, führte zu einem vollständigen Verlust der Cytokininbindungsaktivität des AHK4 Rezeptors (Heyl *et al.*, 2007). Expressionsanalysen zeigten, dass AHK4 stärker in den Wurzeln exprimiert ist, während die anderen beiden Rezeptoren AHK2 und AHK3 eine höhere Expression im Spross zeigten (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Kieber und Schaller 2014). Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Cytokininrezeptoren mittels GFP-(*Green Fluorescent Protein*)-Fusionsproteine in Tabakepidermiszellen wies auf eine Lokalisation der Rezeptoren vorzugsweise im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran hin (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011; Lomin *et al.*, 2011). Die Homo- und Heterodimerisierung der Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 wurden in *Yeast two-hybrid* Assays (Dortay *et al.*, 2006) und für AHK3 und AHK4 in Pflanzen gezeigt (Wulfetange *et al.*, 2011). Um die biologische Funktion der drei Cytokininrezeptoren zu überprüfen, wurden Einzel-, Doppel- und Tripelrezeptormutanten generiert und auf eine veränderte Cytokininantwort untersucht (Riefler *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Die Analyse der Einzel-, Doppel- und Tripelrezeptor-Mutanten aus *Arabidopsis* zeigten, dass die drei Rezeptoren zumindest eine teilweise Überlappung in ihrer positiven regulatorischen Funktion der Cytokininsignaltransduktion besitzen (Nishimura *et al.*, 2004). Mutationen der einzelnen Rezeptoren sowie die Doppelmutanten *ahk2 ahk4* und *ahk3 ahk4* zeigten keinen signifikanten Phänotyp, während die *ahk2 ahk3* Doppelmutante einen *semi-dwarfed* Phänotyp (Nishimura *et al.*, 2004) mit einer deutlichen Reduktion im Rosettendurchmesser zeigte (Higuchi *et al.*, 2004). Die Blatt-Zellzahl sowie der Chlorophyllgehalt waren verringert, aber die Wurzelanzahl war erhöht (Riefler *et al.*, 2006). Die *loss-of-function*, allelische Mutation von AHK4 *Wooden leg (WOL)* zeigte Defekte in der Entwicklung der Leitgewebe (Mähönen *et al.*, 2000). Die Mutation von allen drei Rezeptoren *ahk2 ahk3 ahk4* verursacht eine Hyposensitivität zu Cytokinin und eine starke Hemmung des Pflanzenwachstums (u. a. geringe Keimlingsgröße, starke verkürzte Wurzel und kleine Rosettenblätter) (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Der Tripelrezeptor-*Knockout ahk2 ahk3 ahk4* ist noch fähig, zu keimen, wachsen und Samen zu bilden, wenn die Pflanzen auf einem Saccharose-Medium gezüchtet werden (Higuchi *et al.*, 2004), aber die Wachstumsfähigkeit dieser Mutation ist von der Zugabe exogenen Zuckers abhängig (Skylar *et al.*, 2010).

Eine phylogenetische Analyse der Histidinkinase Domänen zeigte, dass die *Arabidopsis* Cytokininrezeptoren enger zu ihren respektiven Mais Orthologen als zu den anderen *Arabidopsis* Histidinkinasen verwandt sind (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004; Pils und Heyl 2009). Darüber

hinaus wurden Proteine mit einer CHASE-Domäne in den frühen divergierenden Landpflanzen wie *Physcomitrella patens* oder in Grünalgen wie *Clamydomonas* und *Volvox* identifiziert (Pils und Heyl, 2009). Während die Zwei-Komponenten-Systeme höherer Pflanzen vergleichbar sind, ist über diesen Signalweg in den frühen divergierenden Landpflanzen, Grünalgen oder in anderen Organismen noch nicht viel bekannt (Gruhn *et al.*, 2014).

### 1.3.2 *Arabidopsis* Histidin-Phosphotransfer-Proteine (AHPs)

Die Übertragung der Phosphatgruppe von den Cytokininrezeptoren auf die *Response*-Regulatoren wird in *Arabidopsis* durch Histidin-Phosphotransferproteine (AHPs) vermittelt, die für die Funktion im His-zu-Asp Relais einen konservierten Histidinrest enthalten (Abb. 3 und 4). Histidin-Phosphotransfer-Proteine existieren auch in Bakterien und Hefen (Hutchison *et al.*, 2006). Die AHP-Proteinfamilie besteht in *Arabidopsis* aus sechs Mitgliedern, von denen fünf (AHP1-AHP5) den konservierten Histidinrest (XHQXKGSSXS) besitzen und als Histidin-Phosphotransferproteine in der Cytokinin-signaltransduktion fungieren und einem Pseudo-AHP Protein (AHP6), dem der konservierte Histidinrest fehlt (Suzuki *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2002; Mähönen *et al.*, 2006b; Schaller *et al.*, 2008). Für alle AHPs konnten Lokalisationen im Kern und auch im Cytoplasma sowie Interaktionen mit (AHKs) und auch mit ARRs (Typ-B und Typ-A) detektiert werden (Imamura *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2001b; Tanaka *et al.*, 2004; Dortay *et al.*, 2006; Dortay *et al.*, 2008). Die Analysen der subzellulären Verteilung von AHPs zeigten eine Cytokinin unabhängige Verteilung Zellkern/Cytoplasma in der Zelle (Punwani und Kieber, 2010) und ein kontinuierliches *shuttling* von AHPs zwischen Zellkern und Cytoplasma (Punwani *et al.*, 2010).

In einem funktionellen Komplementationassay in Hefe zeigten AHP1, AHP2 und AHP3 eine Komplementation von Hefe HPT-Mutanten (Suzuki *et al.*, 1998). Eine Expression konnte in Wurzel und Spross für *AHP1*; in Keimling, Wurzel, Blättern, Spross und Blüten für *AHP2*, *AHP3* und *AHP5* und in Blättern für *AHP4* nachgewiesen werden (Hradilova und Brzobohaty, 2007). Die phänotypischen Analysen von *AHPs* zeigten, dass Einzel- und Doppelmutanten der *AHPs* zu keinen phänotypischen Veränderungen führten, was auf eine Redundanz innerhalb der AHP-Familie deutet (Hutchison *et al.*, 2006). Eine Insensitivität gegen exogenes Cytokinin konnte in Hypokotyl- und Wurzelassays der *AHPs* Drei- und Vierfachmutanten gezeigt werden (Hutchison *et al.*, 2006). Die *ahp1 ahp2 ahp3 ahp4 ahp5* Fünffachmutante zeigte eine reduzierte durch Cytokinin vermittelte Induktion der Typ-A ARR Transkripte und ähnelt der Dreifachrezeptormutante in seinem primären

Wurzelphänotyp, was auf eine positive Regulation der Cytokininsignaltransduktion hindeutet (Hutchison *et al.*, 2006). Nishiyama und Kollegen zeigten eine negative Regulation von AHP2, AHP3 und AHP5 im Rahmen der Antwort auf Trockenstress (Nishiyama *et al.*, 2013). Die *ahp6* Mutante konnte die *wol* Mutation teilweise unterdrücken und zeigte hypersensitive Antwort auf Cytokinin in den vaskulären Geweben der Wurzeln, deshalb wurde AHP6 als negativer Regulator der Cytokininsignaltransduktion identifiziert (Mähönen *et al.*, 2006b). Mit einem, bis jetzt unbekanntem Mechanismus, blockiert AHP6 wahrscheinlich die Phosphatübertragung von den anderen AHPs auf die Typ-B ARR (Mähönen *et al.*, 2006b). Insgesamt betrachtet, zeigten AHPs (AHP1-AHP5) eine redundante positive und AHP6 eine negative Regulation der Cytokininsignaltransduktion (Bishopp *et al.*, 2011a).

### 1.3.3 *Arabidopsis* Response Regulator-Proteine (ARRs)

Die *Response*-Regulatoren stellen den dritten und letzten Teil der Cytokininsignaltransduktion dar. Die insgesamt 23 ARR Gene im *Arabidopsis*-Genom sind aufgrund ihrer Sequenz, Domänenstrukturen und Induktionsfähigkeit durch Cytokinin in vier verschiedenen Untergruppen (Typ-A, -B, -C und *pseudo* ARRs) eingeteilt (Kiba *et al.*, 1999; Imamura *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 2008). Alle ARRs besitzen die *Response*-Regulator Domäne, die den konservierten Aspartatrest enthält.

Die Gruppe der Typ-B *Response*-Regulatoren besteht aus 11 Mitgliedern (ARR1, ARR2, ARR10, ARR11, ARR12, ARR13, ARR14, ARR18, ARR19, ARR20 und ARR21), die sich in eine Hauptgruppe von sieben Mitgliedern (ARR1, ARR2, ARR10, ARR11, ARR12, ARR14 und ARR18) und zwei Nebengruppen mit jeweils von zwei Mitgliedern (ARR13, ARR21 und ARR19, ARR20) einteilen lassen (Tajima *et al.*, 2004; To *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2005; Heyl *et al.*, 2008). Die Typ-B *Response*-Regulatoren besitzen neben der *Receiver*-Domäne zusätzlich am C-terminalen Bereich des Proteins eine DNA-bindende Domäne (Myb-Domäne) und eine *Output*-Domäne. Ihre Funktion in der Cytokininsignaltransduktion ist die transkriptionelle Aktivierung von primären Cytokininantwortgenen u. a. der Typ-A ARRs und einigen *Cytokinin Response-Factors* (CRFs) (Hwang und Sheen, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Rashotte *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2005; Rashotte *et al.*, 2006; Taniguchi *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2007). Die Expression der B-Typ ARR Gene wird nicht durch Cytokinin beeinflusst (Lohrmann *et al.*, 1999; Brenner *et al.*, 2005). *knockout*-Mutanten Analysen zeigten eine zunehmende Insensitivität gegenüber Cytokinin von Mehrfach-*knockouts* der

Mitglieder der Typ-B ARR Hauptgruppe, was auf eine hohe funktionelle Redundanz der Typ-B ARRs hindeutet (Mason *et al.*, 2005; Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008). In einigen Komplementationsanalysen konnte eine Komplementierung von *arr1 arr12* durch Mitglieder von verschiedenen Typ-B ARR Subgruppen nachgewiesen werden (Hill *et al.*, 2013), was auf eine Redundanz innerhalb dieser Proteinfamilie hinweist.

In *Arabidopsis thaliana* existieren zehn Typ-A ARRs (ARR3, ARR4, ARR5, ARR6, ARR7, ARR8, ARR9, ARR15, ARR16, und ARR17) (Mason *et al.*, 2004), die zusätzlich zur *Receiver*-Domäne kurze Erweiterungen am C-terminalen Bereich des Proteins besitzen. Sie stellen die primären Antwortgene für Cytokinin dar und ihre Funktion wird als negative *feedback*-Regulation der Cytokininsignaltransduktion betrachtet (Hwang and Sheen, 2001; To *et al.*, 2004). Die Expression der Typ-A ARRs kann durch Cytokinin induziert werden (D'Agostino *et al.*, 2000; Rashotte *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005). Für einige der A-Typ ARRs konnte eine erhöhte Stabilität des Proteins nach der Phosphorylierung gezeigt werden (To *et al.*, 2007). Leibfried und Kollegen zeigten eine Funktion der A-Typ ARRs in der Regulation des sprossapikalen Meristems (Leibfried *et al.*, 2005). Andere Funktionen der A-Typ ARRs sind ihre Beteiligung an verschiedenen Prozessen wie der Antwort auf Rotlicht (Mira-Rodado *et al.*, 2007; Sweere *et al.*, 2001) und der Kontrolle der zirkadianen Rhythmik (Salomé *et al.*, 2006). Außerdem zeigten die Expressionsniveaus einiger Typ-A ARRs eine Abhängigkeit vom Stickstoffgehalt und von verschiedenen Umweltstressen (Sakakibara *et al.*, 1998; Urao *et al.*, 1998; Kiba *et al.*, 1999), und die Expression von ARR7 und ARR15 wurde auch durch anderen Signalweg des Auxinhormons im Apikalmeristem reguliert (Zhao *et al.*, 2010).

Die dritte Gruppe der ARRs ist die Typ-C ARR, die mit nur einer *Receiver*-Domäne in ihrer Domäne-Architektur der Typ-A ARR Gruppe ähnelt und aus zwei Mitgliedern (ARR22 und ARR24) besteht. Die Expression der Typ-C ARRs konnte nicht durch Cytokinin induziert werden (Kiba *et al.*, 2004). Eine Phosphorylierung von ARR22 durch AHP5 konnte *in vitro* gezeigt werden und die Überexpression von ARR22 führte zu einem *dwarf* Phänotyp in Pflanzen (Kiba *et al.*, 2004).

Die letzte Gruppe der ARRs ist die Pseudo *Response*-Regulatoren (APRRs), die aus sieben Mitgliedern besteht. Der konservierte Aspartatrest in der *Receiver*-Domäne ist bei APRRs mit einem Glutamatrest substituiert, wodurch sie nicht über das Cytokinin-Signalisierungssystem (*His-to-Asp phosphorelay*) aktiviert werden können (Mizuno, 2004). Die Expression von einigen der APRRs-Gen konnte durch Cytokinin reguliert werden (Brenner *et al.*, 2005). Die Pseudo-*Response*-Regulatoren

zeigten eine Rolle in der Regulation des zirkadianen Rhythmus (Mizuno, 2004; Nakamichi *et al.*, 2010).

### 1.3.4 Cytokinin Response Factors (CRFs)

Andere Cytokinin-Antwortgene sind einige Mitglieder aus der Familie der *Cytokinin Response Factors* (CRFs), die als cytokininregulierte Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden und zur AP2/ERF Transkriptionsfaktorfamilie gehören (Rashotte *et al.*, 2003; 2006; Rashotte und Goertzen, 2010). Die CRF-Familie besteht in *Arabidopsis thaliana* aus 12 Mitgliedern (CRF1-CRF12), für drei von ihnen (CRF2, CRF5 und CRF6) konnte eine durch die Typ-B ARR transkriptionelle Aktivierung nachgewiesen werden (Kiba *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2006; Rashotte *et al.*, 2006; 2010). Sie können auch direkt mit AHPs interagieren und Homo- und Heterodimere bilden (Cutcliffe *et al.*, 2011). Nach Cytokinin-Zugabe werden CRFs vom Cytoplasma in den Zellkern in Abhängigkeit von AHPs translokalisiert (Rashotte *et al.*, 2006).

## 1.4 Cytokinin in *Oryza sativa*

Die Reispflanze (*Oryza sativa*) gehört zusammen mit Gerste, Weizen, Mais und Sorghum zur Gräserfamilie (Poaceae), die für die globale Nahrungsmittelversorgung von essentieller Bedeutung sind. Weil alle diese Pflanzen eine monophyletische Herkunft haben, sind die Analysen und Untersuchungen mit Reispflanzen hilfreich für die anderen Getreidespezies (Clark *et al.*, 1995). In *Arabidopsis thaliana* wurde das Zwei-Komponenten-System (ZKS) der Cytokinintransduktion gut erforscht (Heyl *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2012; Kieber und Schaller 2014), während nur wenige Studien über den Cytokinin-Signalweg in Reis vorhanden sind (Ito und Kurata 2006; Du *et al.*, 2007; Hellmann *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012)

### 1.4.1 Cytokininbiosynthese und –metabolismus in Reis

Der erste und wichtige Schritt der Cytokininbiosynthese wird durch Adenosinphosphat-isopentenyltransferasen (IPT) katalysiert (Kakimoto 2001; Takei *et al.*, 2001a; Miyawaki *et al.*, 2006) (Abb.2). Im *Oryza sativa*-Genom wurden zehn IPT-Gene (*OsIPT1-OsIPT10*) identifiziert (Sakamoto *et al.*, 2006), von denen acht Gene (*OsIPT1-OsIPT8*) eine Funktion in der Cytokininbiosynthese zeigten und die restlichen zwei Gene (*IPT9* und *IPT10*) für tRNA-IPTs

kodieren (Sakamoto *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2012). Die Behandlung von Reispflanzen mit Cytokinin ergab eine Reduktion der *OsIPTs*-Expression, was auf eine negative *Feedback*-Regulation des Cytokininniveaus auf die *OsIPTs*-Expression in Reis und in *Arabidopsis thaliana* hindeutet (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2012). Darüber hinaus enthält das Reis-Genom 11 Cytokininnukleosid-5'-monophosphat-phosphoribohydrolasen (LONELY GUY, LOGs), die Cytokinin-aktivierenden Enzyme sind und beim letzten Schritt der Cytokininbiosynthese beteiligt sind (Kurakawa *et al.*, 2007). Wenn LOG-Aktivität in Reis eliminiert wird, erleben die Pflanzen einen vorzeitigen Abbruch des Sprossmeristems. (Kurakawa *et al.*, 2007; Kuroha *et al.*, 2009). Die Degradation und die Inaktivierung der biologisch aktiven Nucleobasen erfolgt auch in Reis zum einen durch Cytokininoxidasen/dehydrogenasen (CKX) und zum anderen durch Glykosylierung mittels Glykosyltransferasen (UGT) (Abb. 2). Das Reis-Genom kodiert für 11 *OsCKX*-Gene (Sakamoto, 2006). Die Expression mehrerer *OsCKX*-Gene wurde als Antwort auf Cytokinin in Wurzeln oder/und Spross induziert (Hirose *et al.*, 2007). Reduzierte *OsCKX2* Expression verursacht eine Cytokinin-Akkumulation in den Blütenstand-Meristemen von Reis (Ashikari *et al.*, 2005). Dies führt zu einer erhöhten Anzahl von Reproduktionsorganen und erweiterten Getreideertrag, was auf eine wichtige Rolle von Cytokinin in der Regulation und Kontrolle der Meristemaktivität und des Getreideertrags in Reis hindeutet (Ashikari *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Cytokininsignaltransduktion in Reis

Die Cytokininsignaltransduktion verläuft in *Arabidopsis thaliana* durch das Zwei-Komponenten-System (siehe Abschnitt 1.4). Die beiden Modelle, Monokotyledone (*Oryza sativa*) und Dikotyledone (*Arabidopsis thaliana*), besitzen die gleichen Elemente der Cytokininsignaltransduktion (Pareek *et al.*, 2006). Die ersten Mitglieder im Cytokininsignaltransduktionsweg in Reis sind die membranständigen Histidinkinasen. Reis besitzt vier Histidinkinasen (*OsHK3*, *OsHK4*, *OsHK5*, *OsHK6*), die zu den drei beschriebenen Cytokininrezeptoren in *Arabidopsis thaliana* (*AHH2*, *AHK3*, *AHK4*) homolog sind und die gleiche Domänenstruktur (CHASE Domäne, Histidinkinase Domäne und *Response*-Regulator Domäne) besitzen (Ito and Kurata, 2006; Du *et al.*, 2007; Schaller *et al.*, 2007). Die einzige Ausnahme ist der putative Cytokininrezeptor CHARK (*CHASE domain Receptor-like serine/threonine Kinase*), während dessen CHASE Domäne eng mit den CHASE Domänen anderer Cytokininrezeptoren verwandt ist (67 % aller Aminosäuren sind identisch mit der CHASE-Domäne von *AHK4*), weist CHARK nur eine

Serin/Threonin Kinase zur Signalweiterleitung auf (Han *et al.*, 2004; Ito and Kurata, 2006; Du *et al.*, 2007; Gruhn *et al.*, 2014). Han und Kollegen zeigten, dass CHARK den *Arabidopsis*-Phänotyp *cre1-1* komplementieren konnte und vor allem in Wurzeln und entwickelten *Spikelets* in Reis exprimiert wird (Han *et al.*, 2004). Es ist bis jetzt unbekannt, ob der atypische putative Cytokininrezeptor CHARK aus Reis eine unbekannte Cytokininsignaltransduktion gegenüber den klassischen Cytokininrezeptoren aufweist und wie dieses Signal mit der konventionellen Cytokininsignaltransduktion integriert.

Die AHP-Proteinfamilie besteht in Reis aus fünf Mitgliedern, von denen zwei (OsHP1 und OsHP2) den konservierten Histidinrest (XH<sub>2</sub>QXKGSSXS) besitzen und als Histidin-Phosphotransferproteine in der Cytokininsignaltransduktion fungieren können und drei Pseudo-AHP Proteine (OsPHP1-OsPHP3), denen der konservierte Histidinrest fehlt (Du *et al.*, 2007; Schaller *et al.*, 2007). Die Histidin-Phosphotransferproteine OsHP1 und OsHP2 zeigten eine positive Regulation in der Cytokininsignaltransduktion und eine spezifische Rolle in der Stresstoleranz in Reis (Sun *et al.*, 2014). Die Pseudo-AHP Proteine (OsPHP1-OsPHP3) wurden dagegen als negative Regulatoren der Cytokininsignaltransduktion in Reis identifiziert (Tsai *et al.*, 2012).

Wie in *Arabidopsis thaliana* stellen die *Response*-Regulatoren den letzten Teil der Cytokininsignaltransduktion in Reis dar (Imamura *et al.*, 1999). Die insgesamt 36 *OsRR* Gene im Reis-Genom sind aufgrund ihrer Sequenz, Domänenstrukturen und Induktionsfähigkeit durch Cytokinin in vier verschiedenen Untergruppen (Typ-A, -B, -C und *pseudo* *OsRRs*) eingeteilt (13 Gene kodieren für Typ-A, 13 Gene für Typ-B, zwei Gene für Typ-C und acht Gene für *pseudo Response*-Regulatoren) (Schaller *et al.*, 2007). Verschiedene Studien analysierten die Rollen der unterschiedlichen *Response*-Regulatoren von Reis (Jain *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2012). Beispielsweise führte die Überexpression der Typ-A *Response*-Regulatoren OsRR3, OsRR5 oder OsRR6 in Reis zu einer reduzierten Sensitivität gegen Cytokinin, was auf eine negative Regulation der Typ-A *OsRRs* der Cytokininsignaltransduktion in Reis wie in *Arabidopsis thaliana* hindeutet (Hirose *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2010). Jain und Kollegen zeigten eine induzierte Expression des *OsRR6* Gens durch die Behandlungen mit Salz, Dehydration und niedriger Temperatur, was auf eine wichtige Rolle von OsRR6 als Antwort auf abiotischen Stress in Reis hindeutet (Jain *et al.*, 2006).

## 1.5 **Verwendete Organismen zur Erforschung der Cytokininsignaltransduktion**

Die Evolution der Cytokininrezeption wurde in dieser Arbeit durch die funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen analysiert. Die untersuchten putativen Cytokininrezeptoren wurden entsprechend der phylogenetischen Analyse der CHASE Domäne (Gruhn *et al.*, 2014) aus den folgenden Organismen ausgewählt:

### ***Physcomitrella patens***

Das kleine Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*) ist ein Laubmoos und gehört zur Familie der Funariales (Klasse Bryophyta). Es ist eine weit verbreitete Moosart, die offenen Lebensraum in kalten gemäßigten Zonen kolonisiert (Schaefer *et al.*, 1994). Wegen eines kurzen Lebenszyklus von 4 Wochen, eines haploiden Genoms sowie einer effizienten homologen Rekombination, dient *Physcomitrella patens* als Modellorganismus der Pflanzenwissenschaften; besonders für die Evolutions-, Entwicklungs- und Physiologie-Analyse (Cove und Knight 1993; Reski 1998; Frahm 2001). Das Genom von *Physcomitrella patens* mit 510 Mbp, die in 27 Chromosomen organisiert sind, wurde vollständig sequenziert (Lang *et al.*, 2008; Rensing *et al.* 2008). Mutanten-Analysen zeigten eine wichtige Rolle der klassischen Cytokininrezeptoren aus *Physcomitrella patens* (PpCHK1, PpCHK2 und PpCHK3) in der Knospen-Induktion (von Schwarzenberg *et al.*, eingereicht).

### ***Dictyostelium discoideum***

Die sozialen Amöben *Dictyostelium* sind eine Gruppe einzelliger Organismen. In der Hungerphase wird dieser Organismus mehrzellig durch Aggregation und bildet dann Fruchtkörper mit Stielzellen und Sporen. Diese Verlagerungsfähigkeit zwischen Uni- und Multizellularität macht diesen Organismus ideal für die Untersuchung genetischer Veränderungen, die an der Schnittstelle zwischen ein- und mehrzelligem Leben auftreten (Loomis, 2014). Dieser Entwicklungszyklus ist eine Antwort auf Hunger und beinhaltet sowohl eine hochkoordinierte Zellbewegung und ein streng kontrolliertes Programm der Zelldifferenzierung (Gaudet, 2008). Eine evolutionäre Analyse zeigte, dass soziale Amöben zur Supergruppe von Amoebozoa gehören (eine Schwestergruppe von der Klasse der Opisthokonta), die Tiere und Pilze enthält (Schaap, 2011).

### ***Chlamydomonas reinhardtii***

*Chlamydomonas reinhardtii* ist eine 10 µm große, einzellige und lebende Grünalge aus der Gattung *Chlamydomonas*. Dieser Organismus gehört zur Klasse Chlorophyta und besitzt mehrere Mitochondrien, zwei vordere Geißeln für die Motilität; Paarung; und einen Chloroplasten, welcher den Photosyntheseapparat und die kritischen Stoffwechselwege beherbergt (Merchant *et al.*, 2007). *Chlamydomonas* dient zur Analyse der eukaryotischen Photosynthese (Harris *et al.*, 2001). Es ist auch ein Modell für die Aufklärung der eukaryotischen Flagellen und basalen Körperfunktionen sowie der Funktionsstörung durch pathologische Effekte (Keller *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006).

### ***Cyanobacteria***

Die Cyanobakterien unterscheiden sich von allen anderen Bakterien durch ihre Fähigkeit zur Photosynthese. Sie gehören zur Klasse Cyanophyceae (Blaualgen) und besitzen im Gegensatz zu Algen keinen echten Zellkern. Einige Cyanobakterien enthalten einen besonderen Farbstoff (Phycocyanin) und deshalb zeigen sie eine blaugrüne Farbe (Allaby, 1992; Lee, 2008). Gemäß der Endosymbiosetheorie wurden die Chloroplasten aus Cyanobakterien in die Pflanzen und eukaryotischen Algen über primäre Endosymbiose eingetragen (Keeling, 2013).

## **1.6 Evolution der Cytokininperzeption**

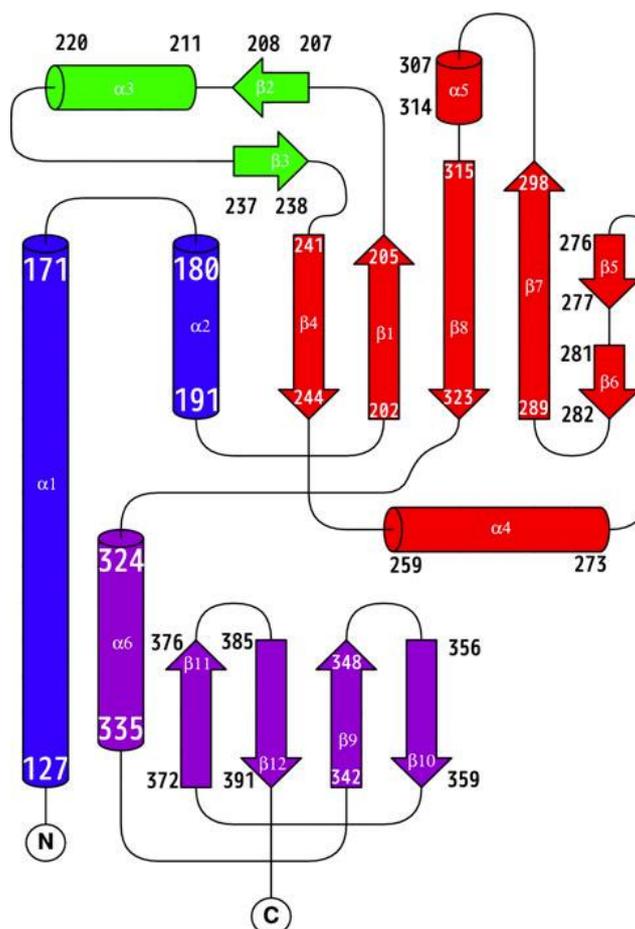
Es wurde vermutet, dass die Zwei-Komponenten-Systeme (ZKS) über primäre Endosymbiose ins Pflanzengenom eingetragen wurden (Koretke *et al.*, 2000; Duplessis *et al.*, 2007; Frebort *et al.*, 2011; Spichal, 2012). Putative Cytokininrezeptoren mit einer CHASE-Domäne wurden in verschiedenen Organismen z. B. in Grünalgen wie *Chlamydomonas* und *Volvox* gefunden. Drei klassische Cytokininrezeptoren aus *Physcomitrella patens* (PpCHK1, PpCHK2, PpCHK3) mit hoher Konservierung in den Aminosäuren der CHASE Domäne und konservierten Domänen (ZKS) wurden auch identifiziert (Pils und Heyl, 2009). Ishida und Kollegen zeigten eine Aktivität von PpCHK2 in *E. coli*-Komplementationsassays (Ishida *et al.*, 2010). Eine Aktivität der drei putativen Cytokininrezeptoren wurde später in verschiedenen Systemen gezeigt (von Schwarzenberg *et al.*, eingereicht). Eine phylogenetische Analyse zeigte drei Klassen von putativen Cytokininrezeptoren: Eine Klasse aus Cyanobakterien, Amöben und *Chlorophyceae* Algen mit diversen CHASE Domänen und unbekanntem anderen Domänen (ZKS) (Klasse A), eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren mit divergierenden Aminosäuren in der CHASE Domäne und konservierten

Domänen (ZKS), die nur in *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* gefunden wurden (Klasse B) und eine Klasse von klassischen Cytokininrezeptoren mit einem hohen Konservierungsgrad in den Aminosäuren der CHASE Domäne und konservierten Domänen (ZKS) (Klasse C) (Abb. 8) (Gruhn *et al.*, 2014; 2015). Anjard und Loomis, (2008) zeigten eine positive Regulation von Cytokinin in der Sporulationsinduktion in *Dictyostelium*, zwei Mitglieder; eine Histidinkinase DhkB und eine Adenylatzyklase AcrA waren an dieser Cytokininsignaltransduktion beteiligt. Aber wie das Cytokinin-Signal in *Dictyostelium* transduziert wird, ist bis jetzt nicht bekannt.

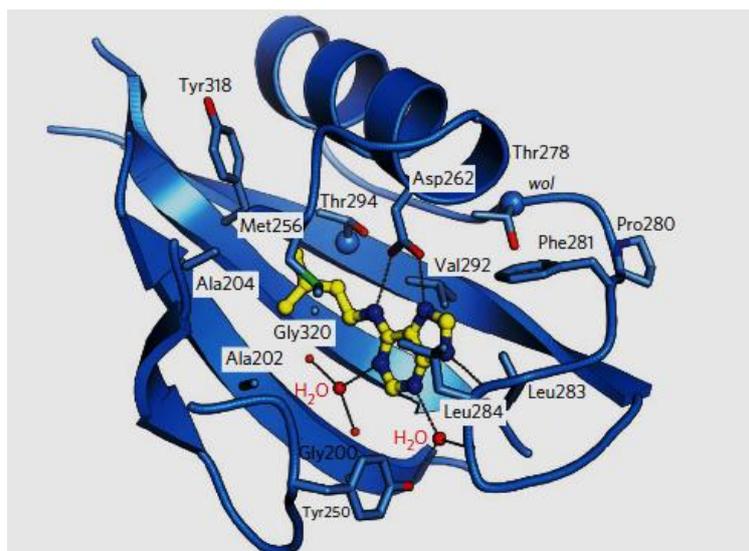
### 1.7 Proteinstruktur der CHASE Domäne von AHK4

Rezeptor-Histidinkinasen sind Multidomänen-Proteine und kombinieren Sensor- und Effektor-Module (Hwang *et al.*, 2002; Kakimoto, 2003; Heyl und Schmölling, 2003; Bishopp *et al.*, 2009; Romanov, 2009; Shi und Rashotte, 2012; Lomin *et al.*, 2012). Cytokininrezeptoren treten als Dimere ähnlich wie ihre prokaryotischen bakteriellen Histidinkinasen Vorfahren auf. Die Sensor-Domäne des Cytokininrezeptors wurde als CHASE (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) benannt (Anantharaman und Aravind, 2001; Mougel und Zhulin, 2001) und dient der Cytokininbindung (Heyl *et al.*, 2007). Zum besseren Verständnis der Cytokininbindung an die CHASE Domäne des Cytokininrezeptors war die Kristallisation und die Lösung der Tertiärstruktur des CHASE-Proteins sehr entscheidend. Die erste kristallisierte CHASE Domäne eines Cytokininrezeptors war die CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors (Hothorn *et al.*, 2011). Die strukturellen Daten dieser Domäne zeigten, dass der N-Terminus des Sensormoduls eine lange  $\alpha$ -Helix ( $\alpha 1$ ) besitzt. Diese Helix bildet eine Aufhänge-Struktur zwischen zwei verschiedenen PAS (Per-Arnt-Sim)-like Domänen, die durch einen helicalen *Linker* verbunden sind (Abb.6). Der N-terminale Teil der  $\alpha 1$  Helix ist über eine Disulfidbrücke an das  $\beta 12$  Faltblatt kovalent verbunden, was die flankierenden Membran-Helices in unmittelbarer Nähe bringt (Hothorn *et al.*, 2011). Die gleiche strukturelle Anordnung wurde zuvor mit der bakteriellen Familie 1 Histidinkinase Sensor Domänen gesehen, trotz eines sehr geringen Grades an Sequenzkonservierung zwischen diesen Bakterienrezeptoren und AHK4 (Zhang *et al.*, 2010). Beide, AHK4 und die bakterielle Sensor Domäne, bilden durch  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Helices Homodimere in Kristallen. Das  $N^6$ -Isopentenyladenin (iP) wurde zusammen mit der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors aufgereinigt und schließlich kristallisiert (Hothorn *et al.*, 2011).  $N^6$ -Isopentenyladenin ist ein natürliches Cytokinin, welches auch in Bakterien vorhanden ist, wo es

beispielsweise beim Abbau von tRNA erzeugt wird (Caillet *et al.*, 1988; Gray *et al.*, 1996). Für die Cytokininerkennung und Bindung benutzt die CHASE Domäne des CRE1/AHK4 Rezeptors die membrandistale PAS-Domäne (Abb. 6 und 7). Die beiden  $N^6$ -Isopentenyladenin Teile (Adenin und Isopentenyl) werden von der AHK4 Ligand-Bindungstasche gebunden (Hothorn *et al.*, 2011). Strukturen der Sensor-Domäne im Komplex mit verschiedenen Cytokinen sind sehr ähnlich (Hothorn *et al.*, 2011). Der untere Teil der Cytokinin-Bindungstasche wird von den zentralen  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta 7$ - $\beta 8$ ) der PAS-Domäne gebildet und durch kleine hydrophobe Aminosäurereste begrenzt. Die hydrophobe Obergrenze der Bindungstasche wird durch die Schleifen ( $\beta 3$ - $\alpha 4$ ) gebildet (Hothorn *et al.*, 2011). Die Adenineinheit vom Cytokinin-Molekül ist in der Bindungstasche durch Wasserstoffbrücken mit Asp262 und Leu284 orientiert. Ein wichtiges Wassermolekül ist in der Nähe vom Cytokinin-Schwanz lokalisiert und bindet Wasserstoffbrücken mit Thr294, Asp262 und der Hydroxylgruppe von *trans*-Zeatin (Hothorn *et al.*, 2011). Zwei Zeatin-Typ-Cytokine, *trans*- und *cis*-zeatin, unterscheiden sich in der Position der OH-Gruppe der Seitenkette. Die Strukturdaten zeigten, dass *trans*-Zeatin eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxyl-Seitenkette und Thr294-Rest bildet, eine solche Bindung in *cis*-Zeatin fehlt (Hothorn *et al.*, 2011). Diese Tatsache erklärt, warum CRE1/AHK4 *trans*-Zeatin viel stärker als *cis*-Zeatin bindet (Romanov *et al.*, 2006). Der Bindungsmodus der aromatischen Cytokine wurde durch Kinetin und  $N^6$ -benzyladenine erklärt. Ähnlich der Isoprenoid-Gruppe von *trans*-Zeatin bildet die Furfuryl-Gruppe von Kinetin eine Wasserstoffbindung mit dem Thr294-Rest (Hothorn *et al.*, 2011). Mit Thidiazuron, einem künstlichen Phenylureacytokinin, wurde bestätigt, dass der CRE1/AHK4 Rezeptor die  $N^6$ -Adenin oder Phenylharnstoff Cytokinin-Derivaten in der gleichen Position der Cytokinin-Bindungstasche bindet (Romanov *et al.*, 2006; Hothorn *et al.*, 2011).



**Abbildung 6: Topologische schematische Darstellung von der Struktur der CHASE Domäne des AHK4/CRE1 Rezeptors.** Der N-Terminus des Sensormoduls besitzt ein lange  $\alpha$ -Helix ( $\alpha 1$ ). Diese Helix bildet eine Rahmenstruktur zwischen zwei verschiedenen PAS (Per-Arnt-Sim)-like Domänen (rot und lila), die durch einen helicalen *Linker* (grün) verbunden sind (Abbildung von Steklov *et al.*, 2013).



**Abbildung 7: AHK4 bindet Cytokinine mit seiner membrandistalen PAS-Domäne.** Nahaufnahme der Cytokinin Bindungstasche im Komplex mit  $N^6$ -Isopentenyladenin (Innenbindungen-Darstellung) (Abbildung von Hothorn *et al.*, 2011).

## 1.8 Ziel der Arbeit

Die zentrale Aufgabenstellung dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen, um die Evolution der Cytokininperzeption zu analysieren.

Wichtige Komponenten des Stoffwechsels und des Signalwegs des Phytohormons Cytokinin wurden in den Genomen und EST-Daten von einer Vielzahl von verschiedenen Arten aus Bakterien und Algen zu modernen Landpflanzen identifiziert (Gruhn *et al.*, 2014). Neben den klassischen Cytokininrezeptoren (Klasse C) zeigte diese phylogenetische Analyse eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren, die bisher nur in *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* gefunden wurden (Klasse B). Weiterhin wurde eine dritte Klasse von Rezeptoren aus Cyanobakterien, Amöben und *Chlorophyceae* Algen nachgewiesen (Klasse A) (Abb.8).

Um die Evolution der Cytokininperzeption nach dieser phylogenetischen Analyse näher zu analysieren, sollte die Cytokininaktivität einiger Rezeptoren von verschiedenen Klassen und Organismen in verschiedenen Systemen untersucht werden.

1. Von der Klasse A sollten putative Cytokininrezeptoren aus Organismen untersucht werden, bei denen bislang nicht klar ist, ob Cytokinin als Signalmolekül benutzt wird.
2. Von der Klasse B sollten putative Cytokininrezeptoren aus *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* untersucht werden, die die gleiche Domänenstruktur wie die klassischen Cytokininrezeptoren aufweisen.

Bindungsassays und Komplementationsassays lieferten Hinweise für eine solche Funktion von Cytokinin bei zwei Mitgliedern der Klasse B, PpCHK4 aus *Physcomitrella patens* und MpCHK1 aus *Marchantia polymorpha* (Gruhn *et al.*, 2014). Zum besseren Verständnis der Evolution der Cytokininbindung an die diverse CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors, ist die Kristallisation und die Lösung der Tertiärstruktur des CHASE-Proteins entscheidend.

3. Von der Klasse C sollte die Cytokinin-signaltransduktion des putativen Cytokininrezeptors CHARK aus *Oryza sativa* mit hohen konservierten CHASE Domäne Aminosäuren und nur einer Serin/Threonin Domäne untersucht werden, weil es einige Hinweise gibt, dass CHARK einen anderen evolutionären Ursprung als die anderen klassischen Cytokininrezeptoren hat.

## 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. Die flüssigen Medien und Agar für Bakterien und Pflanzen wurden von BD Biosciences (Heidelberg), Difco Laboratories (Detroit, USA) und Duchefa (Haarlem, Niederlande) hergestellt.

#### 2.1.2 Reaktionskits

Die in dieser Arbeit verwendeten Reaktionskits sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Reaktionskits**

Reaktionskit	Verwendungszweck	Hersteller
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Geextraktion von DNA-Fragmenten und Aufreinigung von PCR Produkten	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid Easy Pure	Plasmid-Mini- Präparation	Machery-Nagel, Düren
Nucleobond Xtra Maxi	Plasmid-Maxi-Präparation	Machery-Nagel, Düren
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis	Ortsgerichtete Mutagenese	Stratagene, La Jolla, USA
Gateway Cloning Technology	Rekombinante Klonierungstechnologie	Invitrogen, Karlsruhe
Protein Assay Kit	Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration	Bio-Rad, München

### 2.1.3 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Antibiotika**

Antibiotika	Stammlösung (mg/ml)	Arbeitskonzentration (µg /ml)	Lösungsmittel
Carbenicillin	50	50	H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34	34	Ethanol
Gentamycin	25	25	H <sub>2</sub> O
Kanamycin	100	100	H <sub>2</sub> O
Phosphinothricin	10	10	H <sub>2</sub> O
Rifampicin	50	50	DMSO
Spektinomycin	50	50	H <sub>2</sub> O
Tetracyclin	10	10	Ethanol
Zeocin	100	100	H <sub>2</sub> O

### 2.1.4 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3: Enzyme**

Enzyme	Verwendungszweck	Hersteller
Cellulase R-10	Isolierung von <i>Arabidopsis</i> Mesophyllprotoplasten	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Macerozym R-10	Isolierung von <i>Arabidopsis</i> Mesophyllprotoplasten	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Restriktionsendonukleasen	DNA-Restriktionsanalysen	Fermentas, St. Leon-Rot; New England Bio Labs, Frankfurt
T4 DNA Ligase	DNA-Ligation	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerasekettenreaktion (PCR)	Hauseigene Herstellung
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerasekettenreaktion (PCR)	Hauseigene Herstellung
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Polymerasekettenreaktion (PCR), für die langen oder schwierigen DNA-Amplifikate	New England Bio Labs, Frankfurt

## 2.1.5 Organismen

### 2.1.5.1 Mikroorganismen (*E. coli* und Hefe)

Die Bakterienstämme und der *S. cerevisiae*-Stamm, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

**Tabelle 4: Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
BL21 (DE3) pLysS ( <i>E. coli</i> )	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> <i>(DE3)pLysS (Cam<sup>R</sup>)</i>	Proteinexpression	Grunberg-Manago, 1999; Lopez <i>et al.</i> , 1999
Rosetta2 ( <i>E. coli</i> )	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> <i>pRARE2 (Cam<sup>R</sup>)</i>	Proteinexpression	Kane, 1995; Kurland und Gallant, 1996
BL21 Star (DE3)pLysS ( <i>E. coli</i> )	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> <i>rne131 (DE3)pLysS (Cam<sup>R</sup>)</i>	Proteinexpression	Kido <i>et al.</i> , 1996; Lopez <i>et al.</i> , 1999
Origami B (DE3)pLysS ( <i>E. coli</i> )	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1</i> <i>ahpC (DE3) gor522:: Tn10 trxB pLysS</i> <i>(Cam<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)</i>	Proteinexpression	Zur Verfügung gestellt von Dr. Martinez, FU Berlin
KMI002 ( <i>E. coli</i> )	<i>ΔrcsC ::Kmr, ara thi Δ (pro - lac)</i> <i>Δ(wza - wca), wza :: lacZ, Δ cps</i> <i>operon</i>	Proteinexpression, <i>E. coli</i> - Komplementationsassay	Mizuno and Yamashino, 2010
ArcticExpress (DE3)RP ( <i>E. coli</i> )	<i>E. coli B F- ompT hsdS(rB- mB-)</i> <i>dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte</i> <i>[cpn10 cpn60 Gentr]</i>	Proteinexpression bei niedrigen Temperaturen	Agilent Technologies
DH10B ( <i>E. coli</i> )	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1</i> <i>endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697</i> <i>galU galK λ<sup>-</sup> rpsL nupG</i>	Klonierung	Calvin und Hanawalt, 1988; Raleigh <i>et al.</i> , 1988
DB3.1 ( <i>E. coli</i> )	<i>F gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB</i> <i>mrr hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) supE44 ara14</i> <i>galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm<sup>r</sup>) xyl5</i> <i>Δleu mtl1</i>	Klonierung	Hanahan, 1983; Bernard und Couturier, 1992

GV3101::pMP90 ( <i>A. tumefaciens</i> )	<i>Rif<sup>R</sup> Gm<sup>R</sup></i>	Pflanzentransformation	Koncz <i>et al.</i> , 1987; Schell, 1978
C58C1::pCH32 ( <i>A. tumefaciens</i> )	<i>Rif<sup>R</sup> Gm<sup>R</sup> Km<sup>R</sup></i>	Unterdrückung von posttranskriptionellem <i>genesilencing</i> mittels p19 Protein <i>in planta</i>	Voinnet <i>et al.</i> , 2003
XL1 blue ( <i>E. coli</i> )	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F` proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Mutagenese	Stratagene, La Jolla, USA

**Tabelle 5: *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm**

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
L40ccua	<i>MATa his3Δ200 trp1- 901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lacZ ADE2::(lexAop)8- URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2</i>	Hefe Zweihybrid-System (Y2H, Yeast two-hybrid)	Goehler <i>et al.</i> , 2004

### 2.1.5.2 Pflanzen

Für die Pflanzen-Komplementationsanalysen wurden *Arabidopsis thaliana* Col-0 (Wildtyp) und die *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* verwendet (Stolz *et al.*, 2011). Für den Protoplasten *trans*-Aktivierungsassay (PTA) wurde die *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linien *ahk2-5/ahk3-7* benutzt (Riefler *et al.*, 2006). Die subzelluläre Lokalisation wurde mit *Nicotiana benthamiana* durchgeführt.

### 2.1.6 Nährmedien

#### 2.1.6.1 Nährmedien für Bakterien

Zum Zweck der Anzucht von *E. coli* Bakterien wurde LB-, TB-, YEB- und Autoinduktionsmedium (ZYP-5052) benutzt.

### LB-Medium

Zur Herstellung dieses Mediums wurden (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Natriumchlorid) eingewogen. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,2 eingestellt. Für Fest-LB-Medium wurde zusätzlich 15 g Agar pro Liter LB-Medium zugefügt. Das Medium wurde schließlich 15 Minuten autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

### TB-Medium

Für dieses Medium wurden 12 g/l Bacto-Tryptone, 24 g/l Bacto-Yeast und 4 ml/l Glycerol verwendet. Die Lösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 900 ml aufgefüllt, autoklaviert und auf etwa 50 °C abkühlt. Schließlich wurden 100 ml von der sterilen 10 × TB Phosphat-Lösung zugefügt und bei RT aufbewahrt.

Zur Ansetzung der 10 × TB Phosphat-Lösung wurden 2,31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (= 0.17 M) und 12.54 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (= 0.72 M) in 90 ml Wasser gelöst. Danach wurde das Volumen bis 100 ml mit Wasser eingestellt und die Lösung schließlich für 15 Minuten autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

### YEB-Medium

Zur Herstellung dieses Medium wurden 5 g/l Bacto-Pepton, 1 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Beef-Extrakt, 5 g/l Saccharose und 493 mg/l MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O verwendet. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,2 eingestellt. Das Medium wurde schließlich 15 Minuten autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

### Autoinduktionsmedium (ZYP-5052)

Für dieses Medium wurden 958ml/l ZY [ZY: 10 g/l Trypton und 5 g/l Hefeextrakt]; 20 ml/l 50x M [50x M: 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl und 5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]; 20ml/l 50x 5052 [50x 5052: 250 g/l Glycerol, 25 g/l Glukose und 100 g/l α-Lactose]; 2 ml/l 1 M MgSO<sub>4</sub> und 0.2 ml/l 1000x *trace elements* [1000x *trace elements*: 50 mM FeCl<sub>3</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM ZnSO<sub>4</sub>, 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 2 mM CuCl<sub>2</sub>, 2 mM NiCl<sub>2</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> und 2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>] verwendet (Studier *et al.*, 2005).

#### 2.1.6.2 Nährmedien für Hefen

Zum Zweck der Anzucht des Hefestamms *S. cerevisiae* L40ccua wurde YPD- und SD-Medium verwendet.

### YPD-Medium

Für die Herstellung von YPD-Medium wurden 20 g/l Pepton und 10 g/l Hefe-Extrakt benutzt. Der pH-Wert wurde auf 5,8 mit 1 N HCl eingestellt. Das Gemisch wurde anschließend mit ddH<sub>2</sub>O auf 950 ml aufgefüllt, autoklaviert und mit 50 ml/l steriler Glukose (40 %ige Stocklösung) versetzt. Für Fest-YPD-Medium wurde zusätzlich 15 g Agar pro Liter YPD-Medium zugefügt.

### SD-Medium

Für die Selektion von Hefen wurde das *synthetic defined* (SD) Medium verwendet (6.7 g/l Yeast Nitrogen Base). Der pH-Wert wurde auf 5,8 mit 1 N HCl eingestellt. Das Gemisch wurde anschließend autoklaviert und mit 50 ml/l steriler Glukose (40 %ige Stocklösung) versetzt. Zur Herstellung von Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugegeben. Für das *Yeast-two-hybrid*-Experiment wurden verschiedene SD-Platten je nach Selektion mit einer oder mehreren der folgenden Aminosäuren (jeweils mit der Endkonzentration 0,002%) benutzt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Selektivmedien basierend auf dem SD-Medium**

Selektionsmedium	Aminosäurezusätze
SDI	Histidin, Uracil, Tryptophan oder Leucin
SDII	Histidin und Uracil
SDIV	Ohne Aminosäuren

Für SDIV-Platten wurde zusätzlich 5 mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) zur Unterdrückung leichter Autoaktivierungsaktivitäten hinzugefügt.

#### 2.1.6.3 Nährmedien für Pflanzen

Für die Sterilkultur von *Arabidopsis thaliana* wurde 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 und 9 g/l Agar) verwendet (Murashige und Skoog, 1962). Zur Selektion transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen wurde dem Medium 10 µg/ml Phosphinotricin (PPT) hinzugefügt.

Für die unsterilen Pflanzenkulturen wurden *Arabidopsis*- bzw. Tabaksamen im Gewächshaus auf Erde (2:2:1 P-Erde:T-Erde:Perlit) bei 22 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) ausgesät oder die auf MS-Medium vorselektierten Pflanzen ca. 14 Tage nach der Keimung auf Erde pikiert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten**

#### **2.2.1.1 Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen**

##### **Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen**

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach der TSS-Methode durchgeführt (Chung *et al.*, 1989). Zuerst wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurde 1 ml von dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt, für 5 min bei 4 °C und 4000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml steriler TSS Lösung (85 % LB, 10 g PEG6000, 5 % DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Schließlich wurden 200 µl eiskaltes 87 % Glycerin zugegeben, die Zellen zu 100 µl aliquotiert und bis zur nächsten Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden zunächst die eingefrorenen chemisch kompetenten Zellen des entsprechenden *E. coli* Stamms auf Eis aufgetaut und (1 – 100 ng) DNA hinzupipettiert. Nachdem die Zellen für 15 Minuten auf Eis stehen gelassen wurden, wurde ein Hitzeschock von 42 °C für 90 Sekunden appliziert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gestellt und dann 900 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzupipettiert. Schließlich wurde das Reaktionsgefäß in den 37 °C beheizten Schüttler für 1 Stunde inkubiert. Verschiedene Volumen des Transformationsansatzes wurden auf festem LB-Medium (mit Selektionsmarker) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Chung *et al.*, 1989).

### **Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen**

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm beimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 100 ml einer mit 1 ml Vorkultur frisch beimpften Bakterienkultur wurden bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 15 Minuten auf Eis gekühlt, für 5 min bei 4 °C und 4000 x g abzentrifugiert und das Pellet mit 20 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen und wieder wie oben beschrieben abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt und das Pellet wurde schließlich mit 1 ml 10 %-igem eiskaltem Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert (Calvin und Hanawalt, 1988).

Für die Transformation wurden die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und nach der Zugabe von der zu transformierenden DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Der Zellenansatz wurde schließlich in eine Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) pipettiert und im Elektroporator (MicroPulser™, Bio-Rad, München) ein Puls von 1,8 kV appliziert. Anschließend wurden 900 µl vorgewärmtes LB-Medium sofort zum Transformationsansatz pipettiert und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Verschiedene Volumen des Transformationsansatzes wurden auf festem LB-Medium (mit Selektionsmarker) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Calvin und Hanawalt, 1988).

### **Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen**

Die Herstellung und die Transformation von elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen erfolgten nach den gleichen Bedingungen wie die von *E. coli*. Aber mit Ausnahme, dass der Transformationsansatz nach der Zugabe von LB-Medium zwei Stunden bei 28 °C geschüttelt wurde und nach dem Ausplattieren auf Agarplatten mit LB-Selektionsmedium zwei Tage bei 28 °C inkubiert wurde (Sambrook und Russell, 2001).

### **Herstellung und Transformation von kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen**

Weil die Kompetenz von kompetenten Hefen-Zellen bei der längeren Lagerung schnell abnimmt, müssen die kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen frisch hergestellt und sofort mit DNA transformiert werden.

### Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen mit geringen DNA-Mengen

Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40ccU3 wurde auf festem YPD-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Für die Hefetransformation im kleinen Maßstab wurden 30 ml YPD-Flüssigmedium mit einer Hefekolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden ca. 1,5 ml der Übernachtskultur zu 29 ml YPD-Flüssigmedium überführt und eine optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,3 eingestellt. Der Kultur wurde danach für ca. 3 Stunden bei 30°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7-0,9 schüttelnd inkubiert und anschließend bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 10 ml Mix 1 [1,0 ml LiAc (0,1 M), 5 ml Sorbitol (2 M), 0,5 ml TE (10fach) und 3,5 ml ddH<sub>2</sub>O] resuspendiert. Dann wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und das Zellpellet in 1 ml Mix 1 resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde pro Transformation 1 µg Plasmid-DNA, 5 µl Träger-DNA (Herings-Sperma, 10 ng/µl), 230 µl Mix 2 [1,0 ml LiAc (1 M), 10 ml PEG3350 (60 %), 1,5 ml TE (10fach) und 2 ml ddH<sub>2</sub>O] und 100 µl der Hefezellen zusammengemischt. Der Transformationsansatz wurde dann für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert, 30 µl DMSO hinzupipettiert und für 15 Minuten in einem 42 °C-Wasserbad inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurde das Gemisch für 1 Minute bei 4000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 300 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Schließlich wurde die Hefesuspension auf SD-Selektivmedium (siehe 2.1.6.2) ausplattiert und für 5-7 Tage bei 30 °C inkubiert (Gietz und Woods, 2002).

### Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen mit einer cDNA-Bibliothek für *das Yeast two-hybrid Screening*

Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40ccU3 wurde mit dem entsprechenden Bait-Vektor transformiert. Für die Transformation im großen Maßstab mit cDNA-Bibliothek aus *Arabidopsis thaliana* wurde der mit dem *Bait*-Vektor transformierte Hefe-Stamm auf SDI-Selektivmedium ausgestrichen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. 30 ml YPD-Flüssigmedium wurden mit einer Hefekolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur zu 100 ml YPD-Flüssigmedium überführt und eine optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,3 eingestellt. Die Kultur wurde dann für ca. 3 Stunden bei 30°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7-0,9 schüttelnd inkubiert und dann bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Träger-DNA (Herings-Sperma, 10 ng/µl) wurde für 15 Minuten bei 95 °C vorerhitzt, zwischendurch gevortext und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt

und das Zellpellet in 15 ml Mix 1 [2,0 ml LiAc (0,1 M), 6,0 ml Sorbitol (2 M), 1,5 ml TE (10fach) und 5,5 ml ddH<sub>2</sub>O] resuspendiert. Dann wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt, das Zellpellet in 15 ml Mix 1 resuspendiert und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Mix 1 resuspendiert und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde für die Transformation 50 µg eiskalter Prey c-DNA-Bibliothek, 500 µl Träger-DNA, 7 ml Mix 2 [1,0 ml LiAc (1 M), 10 ml PEG3350 (60%), 1,5 ml TE (10fach) und 2 ml ddH<sub>2</sub>O] und 1 ml der Hefezellen zusammengemischt und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 900 µl DMSO dazugegeben, gevortext und für 20 Minuten im 42 °C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und in 4 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Das gesamte Volumen (Zellen + Mix) wurde danach genau bestimmt. 2 µl und 10 µl wurden jeweils in 70 µl bidest. Wasser überführt und auf SDII-Medium (siehe 2.1.6.2) ausplattiert, um die Transformationsrate zu bestimmen. Der restliche Transformationsansatz wurde auf vier SDIV-Platten ausplattiert und die Platten wurden schließlich sieben Tage bei 30 °C inkubiert.

Das *Yeast two-Hybrid* (Y2H) System wurde *in vivo* zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen in eukaryotischen Hefezellen verwendet (Drees, 1999; Knippers, 2001). Die Konstrukte wurden zuerst in die *Bait*- und *Prey*-Expressionsvektoren (pBTM116-D9-GW bzw. pACT2-GW) kloniert und auf ihre Interaktion in diesem System untersucht. Dieses System ermöglicht den Nachweis transienter und schwacher Protein-Protein-Interaktionen und basiert auf der Trennung der Aktivierungs- und DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors (Stephens und Banting, 2000). Wenn zwei miteinander interagierenden Proteine an die beiden Domänen fusioniert wurden, wird der GAL4 Transkriptionsfaktor funktionell rekonstituiert und kann an Promotoren von Reportergenen im Hefegenom binden und deren Expression aktivieren. Für die Detektion der Interaktionen wurden verschiedene Reportergene (URA3, HIS3 und LacZ) und Auxotropiemarker benutzt, damit nur die Hefeklonen auf dem defizienten Medium wachsen können, bei denen das Reportergen durch die Protein-Proteininteraktion aktiviert wird. Die für Y2H Experimente verwendeten Lösungen und Medien (SD Medium, YPD Medium, SD II, SD I, SD IV) sind im Abschnitt 2.1.6.2 beschrieben.

### 2.2.1.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde die *floral dip* Methode nach Clough und Bent, 1998 durchgeführt. Nach der Elektrotransformation von Agrobakterien des *A. tumefaciens*-Stammes GV3101 mit dem entsprechenden Plasmid (siehe 2.2.1.1), wurden 5 ml LB-Vorkultur mit einer einzelnen Kolonie beimpft, über Nacht bei 28 °C geschüttelt und am nächsten Morgen in eine neue 300 ml LB-Hauptkultur überführt. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 28 °C wurde die gewachsene Kultur für 15 Minuten bei 4500 x g und RT pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 300 ml Transformationslösung [MS Salze 0,42 % (w/v), Saccharose 5 % (w/v), Silwet L-77 0,02 % (v/v); pH 5,7 mit 1 N NaOH eingestellt) gut resuspendiert. Die vier bis fünf Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden mit den Blüten für 45 Sekunden in die Transformationslösung getaucht, in eine Plastikschaale gelegt und anschließend über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert. Schließlich wurden die transformierten Pflanzen am nächsten Morgen zurück ins Gewächshaus gestellt. Nach der Transformation in *Arabidopsis thaliana* wurden die transformierten Pflanzen mit Phosphinothricin (PPT) selektiert.

### 2.2.1.3 Transiente Transformation von *N. benthamiana* Blattepidermiszellen

Die 5-6 Wochen alten Tabakpflanzen wurden nach einem modifizierten Protokoll von (Sparkes *et al.*, 2006) transformiert. Dafür wurden die Expressionsplasmide mit den entsprechenden Konstrukten, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, in *A. tumefaciens* transformiert. Eine einzelne Agrobakterien-Kolonie, wurde in 10 ml YEB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der gewachsenen Kultur bei 4000 rpm und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml frischem Infiltrationsmedium [MES (500 mM, pH 5,7); MgCl<sub>2</sub> (1 M); Acetosyringon (1 M) und 250 mg D-Glucose] resuspendiert. Anschließend wurde der Waschschritt wiederholt, um die restlichen Antibiotika zu entfernen. Nach dem Waschschritt wurde das Zellpellet in 2 ml Infiltrationsmedium resuspendiert und die OD<sub>600</sub> mit einer 1:10 Verdünnung ermittelt. Da der Agrobakteriumstamm mit dem Konstrukt und dem *silencing inhibitor* (P19-Stamm) immer co-infiltrierte wurde, musste eine Zellsuspension mit dem OD<sub>600</sub> Verhältnis von 0,1:0,1 (GFP-Fusionsvektor:P19-Vektor) mit dem Infiltrationsmedium eingestellt werden. Vor der Infiltration wurde die Zellsuspension für zwei Stunden bei RT inkubiert, damit sich die Zellen an das veränderte Medium anpassen konnten. Schließlich wurde die Zellsuspension in die Unterseite des vierten bis sechsten Blattes langsam

eingespritzt. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen drei bis sieben Tagen inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Pflanzen am konfokalen Mikroskop (Leica) auf Expression der fluoreszierenden Proteine untersucht. Hierfür wurde GFP mit dem Argon-Laser bei 488 nm angeregt, die Emission wurde bei 512 nm gemessen. Das mCherry ER-Markerprotein für Co-Lokalisationsstudien wurde bei 587 nm angeregt, die Emission bei 610 nm gemessen. Die Fluoreszenz vom Plasmamembranmarker-FM4-64 lag zwischen 625 und 665 nm. Zur Analyse der Proteinexpression in den Pflanzenblättern mittels SDS-PAGE wurden Blattscheiden an bestimmten Zeitpunkten ausgestanzt, zerschreddert und mit 5x SDS-Probenpuffer (siehe 2.2.2.2) aufgekocht. Nach einer folgenden Zentrifugation wurde 20 µl vom Überstand auf einem SDS-Gel aufgetragen und der Proteingehalt schließlich analysiert.

#### **2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

##### **Mini-Präparation von Plasmid-DNA modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979**

Zum Zweck der Isolierung von Plasmid-DNA aus einzelnen *E. coli* Kolonien, wurden die auf dem LB-Agar gewachsenen Kolonien in 5 ml LB Medium mit den entsprechenden Antibiotika überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Kultur für 1 Minute bei 16000 x *g* abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl RNase-haltiger Lösung 1 (siehe Tabelle 7) resuspendiert. Danach wurden für die Zelllyse 500 µl Lösung 2 (siehe Tabelle 7) hinzugegeben, vorsichtig 5-mal invertiert und für maximal 5 Minuten inkubiert bis das Lysat klar war. 350 µl Lösung 3 (siehe Tabelle 7) wurden dazupipettiert, wieder 5-mal invertiert und für 5 Minuten bei 4 °C und 16000 x *g* zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 850 µl entnommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 850 µl Isopropanol gemischt. Dann folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 4 °C und 16000 x *g*, der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand erneut vollständig entfernt und das entstehende Pellet bei 37 °C getrocknet und in 30 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Sequenzierung wurden die Proben mit dem *NucleoSpin Plasmid Easy Pure Kit* (Machery-Nagel, Düren) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde schließlich in 50 µl Elutionslösung eluiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Lösungen für die Plasmid Mini-Präparation

Lösung	Zusammensetzung
Lösung 1	6,06 g Tris 3,72 g Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O pH mit HCl auf 8,0 eingestellt, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml aufgefüllt 100 mg RNase A hinzugegeben
Lösung 2	8,0 g NaOH Pellets in 950 ml ddH <sub>2</sub> O gelöst 50 ml 20 % SDS (w/v)
Lösung 3	294,5 g Kaliumacetat in 500 ml ddH <sub>2</sub> O gelöst pH mit Eisessig auf 5,5 eingestellt, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml aufgefüllt

### Amplifizierung und Maxi-Präparation von einer cDNA-Bank

Für das *Yeast two-hybrid Screening* mit der cDNA-Bibliothek aus *Arabidopsis thaliana* (von Csaba Koncz, MPI, Köln) wurde die cDNA amplifiziert und im großen Maßstab durch Maxi-Präparation isoliert. Es folgte zuerst ein Vortest, um die Kompetenz der elektrokompetenten Zellen zu prüfen und die benötigte Menge an cDNA zu berechnen. Danach wurde die entsprechende Menge von cDNA-Bank mit *E. coli*-Zellen nochmal transformiert (siehe 2.2.1.1) und schließlich in 24 ml flüssigem LB-Medium überführt. Anschließend wurden je zu erwartenden 100000 Kolonien auf je eine Agarplatte mit LB-Selektionsmedium (23 cm x 23 cm) verteilt, ca. 10 kleine autoklavierte Glaskügelchen (425-606 Microns, Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf jede Platte hinzugeben und bis zur Trocknung geschwenkt. Die Glaskügelchen wurden dann entfernt und die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die angewachsenen Klone wurden danach von den Platten geschabt. Schließlich wurde die cDNA durch das *NucleoBond Xtra Kit* (Machery-Nagel, Düren) präpariert. Die Aufreinigung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.1.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Hefen wurde die Methode mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:24:1) verwendet (Hoffman and Winston, 1987). Je 3 ml SD(-Leucin)-Flüssigmedium wurden mit einer Hefe-Kolonie angeimpft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Danach wurden je 2 ml der gewachsenen Hefekulturen zentrifugiert und das Pellet im Restmedium resuspendiert. Dann wurden 200 µl Puffer-A und 200 µl

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1), sowie ca. 0,3 g in Säure gewaschener Glaskügelchen hinzugeben. Das Gemisch wurde für 2 Minuten gevortext und 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. 200 µl der oberen Phase wurden in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 160 µl Isopropanol und 20 µl 3 M NaAcetat versetzt und invertiert. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13200 rpm für 25 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 150 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 3 Minuten. Schließlich wurde das Pellet getrocknet und in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001). Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,7 bis 2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde erst in TAE-Puffer (siehe Tabelle 8) aufgekocht und anschließend wurden 50 ml (für ein kleines Gel) mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) vermischt und in einen Gelschlitten gegossen. Danach wurden die Proben zusammen mit Ladepuffer (10x Orange G) pipettiert. Zur Zuordnung der Fragmentgrößen wurden 2,5 µl Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde) auf das Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auftrennung für 45 Minuten bei 75 V und 400 mA.

**Tabelle 8: Zusammensetzung der für die Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Lösungen**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
TAE Puffer (50x)	2 M Tris Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8,0 mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml aufgefüllt
DNA-Ladepuffer	33,5 g Saccharose 200 mg Orange G 5ml EDTA, 500mM, pH 8 auf 50 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen

Die Detektion und Dokumentation von der im Gel aufgetrennten DNA erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes (Syngene, Cambridge, UK).

### 2.2.1.7 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Mittels NanoDrop (Thermo Scientific/ Peqlab, Erlangen) wurde die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Messung entspricht eine  $OD_{260}$  von 1 einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA. Das Verhältnis von  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Information über die DNA-Reinheit und sollte bei einer hochreinen DNA-Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### Standardmethode zur Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) ist eine Methode, um DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. Dazu benötigt man zwei Oligonukleotide (Primer) (siehe Anhang, Tabelle 20), die mit jeweils einem Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren und eine hitzebeständige DNA-Polymerase (*Taq* oder *Pfu*-Polymerase). Die PCR-Reaktion wurde im T1 *Thermocycler* (Biometra, Göttingen) in verschiedenen Volumina durchgeführt. Der Standard-PCR-Ansatz (50  $\mu\text{l}$ ) für eine spezifische Amplifikation wurde in der Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: 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 $\mu\text{M}$
DNA-Polymerase	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O bidest	ad 50 $\mu\text{l}$

Das Programm für eine Standard-PCR-Reaktion wurde in der Tabelle 10 gegeben.

**Tabelle 10: Temperaturprogramm einer Standard-PCR**

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

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels *high fidelity phusion* Enzym**

Um lange und schwierige DNA-Amplifikate mittels PCR zu amplifizieren wurde *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase (New England Bio Labs, Frankfurt) benutzt. Laut Herstellerangaben ist die Genauigkeit des Enzymes (Fehlerrate =  $4,4 \times 10^{-7}$ ) 50-fach höher als die *Taq*-DNA-Polymerase und die Geschwindigkeit 15-30 sek/kb. Die PCR mittels *high fidelity phusion* Enzyms wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **Touchdown PCR (TD-PCR)**

Um die Sensitivität und die Spezifität von den Primern zu erhöhen, wurde die Touchdown PCR (TD-PCR) verwendet. Das Standardpipettierschema der PCR (siehe Tabelle 12) wurde hier benutzt. Mit Veränderungen des Temperaturprogramms der Standard-PCR (siehe Tabelle 13) startet die Anlagerungsphase im ersten Zyklus mit 80 °C und sinkt nach jeweils zwei Wiederholungen pro Zyklus um 2 °C. Bei der niedrigsten Annealingtemperatur (50 °C) wurden statt zwei Wiederholungen zwanzig Wiederholungen appliziert (modifiziert von Korbie *et al.*, 2008).

### **Überlappende PCR**

Mit der überlappenden PCR können zwei beliebige DNA-Fragmente kombiniert und amplifiziert werden. Um die aus genomischer DNA und *introns* enthaltenen DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurde diese Methode in dieser Arbeit durchgeführt. Wenn z.B. das DNA-Fragment in der genomischen DNA ein *intron* enthielt, wurde zu zwei DNA-Abschnitten (cDNA) vor und nach dem *intron* geteilt. Die zwei Primer für jeden DNA-Abschnitt sollten so erzeugt werden, dass ein Primer

komplementär zum gewünschten Ende des gesamten Fragments ist, und ein Primer ca. 20-40 Basenpaare von dem anderen Abschnitt zusätzlich enthält. Danach wurde jeder Abschnitt alleine durch die Standard-PCR mit den entsprechenden Primern amplifiziert. Schließlich wurden die zwei DNA-Abschnitte durch eine überlappende PCR kombiniert und mit den äußeren Primern der gesamten gewünschten Sequenz spezifisch zusammenamplifiziert.

#### **2.2.1.9 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Zur Aufreinigung der PCR-Proben und zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *NucleoSpin Gel* und *PCR Clean-up Kit* (Machery-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte in 50 µl Wasser oder Elutionslösung, anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels *NanoDrop* (siehe 2.2.1.7) und Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.6) bestimmt.

#### **2.2.1.10 Ortsgerichtete Mutagenese**

Zum Zweck der Veränderung der Aminosäuresequenz eines Proteins wurde die gerichtete Mutagenese der kodierenden DNA mit Hilfe des *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene, La Jolla, USA) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Schließlich wurde die Mutagenese durch Sequenzierung bestätigt.

#### **2.2.1.11 DNA-Restriktionsanalyse**

Die DNA-Restriktionsanalyse ist eine Methode zur Überprüfung von Plasmiden durch die Behandlung mit spezifischen Restriktionsenzymen (Restriktionsendonukleasen). Die Größe der entstandenen Restriktionsfragmente wurde mittels Gelelektrophorese bestimmt und mit den durch das Programm *VectorNTI* (Version 9) berechneten DNA-Fragmentgrößen verglichen.

#### **2.2.1.12 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der Basensequenz eines DNA-Abschnittes, wie z.B. eines in einen Vektor inklonierten DNA-Fragmentes oder eines PCR-Produktes. Die DNA-Sequenzierung wurde mit 20-30 µl Volumen, 20-100 ng/µl Konzentration der aufgereinigten Plasmid-DNA und mit spezifischen Primern von der Firma (GATC Biotech, Konstanz) durchgeführt.

### 2.2.1.13 Ligation

Zur klassischen Klonierung nach (Sambrook und Russell, 2001) wurde in dieser Arbeit die Ligation benutzt. Für diese Methode wurden 100 ng Konzentration von Vektor-DNA verwendet. Die Insert-Konzentration wurde mittels dieser Formel berechnet:

$$(\text{Insert-Konzentration}) = (3 \times \text{Vektor}_{\text{ng}} \times \text{Insert}_{\text{bp}}) / \text{Vektor}_{\text{bp}}$$

Die Ligation wurde entsprechend dem Pipettierschema in der Tabelle 11 durchgeführt und bei 16 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ligation für 10 Minuten bei 65 °C abgestoppt, dialysiert und in *E. coli* transformiert.

**Tabelle 11: Zusammensetzung eines typischen Ligation-Ansatzes**

Substanz	Konzentration bzw. Volumen
Vektor-DNA	100 ng
Insert-DNA	X ng: von der Formel berechnet
10-fach T4-DNA-Ligase Puffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O bidest	ad 20 µl

### 2.2.1.14 Gateway-Klonierung

Die *Gateway*-Klonierung ist eine Methode, die auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bacteriophagen  $\lambda$  basiert (Landy, 1989). Diese Klonierung besteht aus einer BP und LR Clonase-Reaktion, bei denen spezifische *att*-Sites für die Interaktion der DNA-Moleküle nötig sind. Die Klonierung wurde leicht modifiziert nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt (s.u.).

#### BP-Rekombinationsreaktion

Der BP-Reaktionsansatz wird in Tabelle 12 dargestellt. 0,5-2 µl BP-Clonase I und 1 µl Topoisomerase I (8 U/µl) wurden der Probe zugefügt. Dann wurde der Ansatz über Nacht bei 25 °C im Thermoschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 µl Proteinase K und die Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C abgestoppt. Der Ansatz konnte jetzt für eine elektrische Transformation benutzt werden.

**Tabelle 12: Pipettierschema für die BP-Rekombinationsreaktion**

Substanz	Konzentration/Menge
attB-PCR-Produkt	100 fmol
Donor-Vektor	100 fmol
5 x BP <i>Clonase Reaction Puffer</i>	4 µl
TE-Puffer	auf 20 µl aufgefüllt

**LR-Rekombinationsreaktion**

Der LR-Reaktionsansatz wird in Tabelle 13 dargestellt. 0,5-2 µl LR-Clonase I wurden der Probe zuletzt zugefügt. Dann wurde der Ansatz über Nacht bei 25 °C im Thermoschüttler inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 µl Proteinase K nach der Inkubation hinzupipettiert und der Ansatz für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz konnte jetzt für eine elektrische Transformation benutzt werden.

**Tabelle 13: Pipettierschema für die LR-Rekombinationsreaktion**

Substanz	Konzentration/Menge
Donor-Vektor	300 ng
Zielvektor	300 ng
5 x LR <i>Clonase Reaction Puffer</i>	4 µl
TE-Puffer	auf 20 µl aufgefüllt

## 2.2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.2.1 Bradford-Methode als kolorimetrische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung

Der Bradford-Test ist eine empfindliche photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen bis zu Konzentration im Bereich Mikrogramm pro Milliliter (Bradford, 1976). Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte standardmäßig mit dem Protein Assay Kit (Bio-Rad, München) nach den Angaben des Herstellers. Im Experiment wurde die Proteinprobe mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl aufgefüllt und 500 µl der Bradford-Lösung wurden zugegeben und gemischt. Schließlich wurde die Extinktion innerhalb eines Zeitraums von 2 bis 60 Minuten bei 595 nm gegen einen Leerwert (Puffer statt Proteinlösung) gemessen. Zur Eichung wurde eine Reihe mit BSA als Protein-Standard mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

### 2.2.2.2 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Zweck der Auftrennung und der Molekulargewichtsabschätzung eines Proteingemisches wurde SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14: Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Lösung	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 (181,71 g Tris) H <sub>2</sub> O ad 1 l bei 4 °C aufbewahren
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (60,57 g Tris) H <sub>2</sub> O ad 1 l bei 4 °C aufbewahren
Acrylamidlösung	40 % Lösung (Roth, Karlsruhe)
Elektrodenpuffer (Laufpuffer)	25 mM Tris pH 8,8 ( 3,03 g) 192 mM Glycin (14,41 g) SDS 0,1 % ( 1,00 g) H <sub>2</sub> O ad 1 l

APS	Ammoniumpersulfat 100 mg/ml ca. 1 Woche haltbar bei 4 °C
Probenpuffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 (0,757 g) SDS 2 % (2,00 g) Saccharose 10 % (10,00 g) Bromphenolblaulösung (3 %) DDT (10 mM) H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Entfärbelösung	Methanol 40 % 400 ml Eisessig 7 % 70 ml ddH <sub>2</sub> O 530 ml
Färbelösungsmittel	0,1 % Coomassie R250 40 % Methanol 10 % Essigsäure
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)-Lösungsmittel	SDS 10 % w/v

### Die Herstellung von Sammel- und Trenngel

Die Zusammensetzungen vom Sammelgel 10 % und Trenngel 5 % wurden in den Tabellen 15 aufgeführt.

**Tabelle 15: Angabe zur Herstellung vom 10 % SDS-Trenngel und 5 % SDS-Sammelgel**

Substanz	Trenngel - Volumen (ml)	Sammelgel - Volumen (ml)
ddH <sub>2</sub> O bidest	4,8	3,64
40 % Acryl-Bisacrylamid	2,5	0,625
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	2,5	0,625
Sammelgelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)		
10 % Natriumdodecylphosphat (SDS)	0,1	0,05
10 % Ammoniumpersulfat	0,1	0,05
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,004	0,005

Die zu analysierenden Proteinproben wurden zunächst vor dem Gelauftrag mit 5× konzentriertem SDS-Probenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht (Laemmli, 1970). Als Größenstandard wurden 5 µl Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, München) parallel mit aufgetragen. Zur Detektion der Proteine wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung mindestens eine Stunde inkubiert und anschließend mit dem Entfärbepuffer über Nacht entfärbt (Schrimpf, 2002).

### 2.2.2.3 Western Blot und Immunodetektion

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe 2.2.2.2) wurden im Tankblotverfahren über Nacht bei 4 °C auf PVDF-Membranen (Millipore, Schwalbach) geblottet (Gültekin und Heermann, 1988). Der Transfer wurde in Towbin-Puffer (0,25 M Tris; 1,92 M Glycin) (Towbin *et al.*, 1979) bei einer Spannung von 40 mA durchgeführt. Die über Nacht geblottete PVDF-Membran wurde zunächst mit 5 % Magermilchpulver in T-PBS Puffer [(1 x PBS Phosphat-gepufferte Saline: 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 2,7 mM KCl); 0,1 % Tween] für 30 Minuten bei RT geblockt. Anschließend erfolgte eine- bis dreistündige Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 17) (1:1000 in T-PBS verdünnt). Nach der Inkubation wurde die Membran zweimal mit jeweils 10 ml T-PBS Puffer für 5 Minuten gewaschen, dann mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 16) (1:2000 in T-PBS verdünnt) für 2 h bei RT inkubiert und schließlich dreimal mit je 5 ml T-PBS Puffer für 10 Minuten gewaschen. Die Detektion wurde im Dunkellkammer bei RT mit dem *Enhanced Chemoluminescent* (ECL) Reagenz (Pierce scientific, Schwerte) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

**Tabelle 16: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Firma
mouse Anti-GFP	Roche, Mannheim
mouse Anti-GST	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
mouse Anti-myc	Millipore, Molsheim
anti mouse IgG -HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
StrepTactin-HRP conjugate	IBA GmbH, Göttingen

#### 2.2.2.4 Ponceaufärbung der PVDF Proteinmembran

Um die mittels Western Blot (siehe 2.2.2.3) vom Gel in eine PVDF Membran transferierte Proteine zu kontrollieren wurde eine Ponceau-Färbung der Membran durchgeführt. Die PVDF Membran wurde in Ponceau Färbelösung [2 % (W/V) Ponceau S, 30 % (W/V) Trichloressigsäure und 30 % (W/V) Sulfosalicylsäure] für fünf Minuten bei RT geschwenkt, gefärbt und schließlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen bis die Proteinbanden deutlich wurden.

#### 2.2.2.5 Proteinexpression in *E. coli*

##### Gezielte Überexpression durch Substratinduktion

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen der Proteinexpression in *E. coli* wurden Expressionsversuche im analytischen Maßstab mit verschiedenen *E. coli* Stämmen (siehe Tabelle 4) in 10 ml LB- und TB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) durchgeführt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 und 1,0 wurde mit IPTG in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 1 bzw. 2 mM) bei 22 °C, 30 °C und 37 °C die Proteinexpression induziert. 1 ml Kultur wurde jeweils nach verschiedenen Zeitpunkten (2, 4, 6 bis 24 Stunden) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 5× SDS Probenpuffer resuspendiert, 5 Minuten aufgeköcht und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Expression im präparativen Maßstab wurde in 100 ml bis 400 ml LB- oder TB-Medium durchgeführt, die mit 1 ml bzw. 4 ml einer Vorkultur angeimpft wurden (Sambrook, 2001). Die Proteinexpression für den radioaktiven *in vivo* Cytokinin-Bindungsassay wurde mit dem *E. coli*-Stamm KMI002 (siehe Tabelle 4) in M9-Medium (+ 0,1 % Casaminsäuren und 0,025 mM IPTG) für 2 Tage bei 22 °C durchgeführt.

##### Auto-Induktion

Um das überexprimierte Protein in hoher Konzentration, nativ und löslich in der Lösung zu erhalten, wurde die Auto-Induktion in dieser Arbeit nach dem Protokoll von (Studier, 2005) bei der AG Wahl (FU Berlin) durchgeführt. Die Expression wurde mit *E. coli*-Stamm ArcticExpress (DE3)RP im großen Maßstab ein bis sechs Liter Autoinduktion-Medium (ZYP-5052) (siehe 2.1.6.1) (mit den entsprechenden Antibiotika) 2 Tage bei 16 °C unter Schütteln durchgeführt.

### 2.2.2.6 Chromatographische Reinigung der nativen CHASE Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 aus *Physcomitrella patens*

Um das Protein im nativen, aktiven und im löslichen Zustand zu erhalten, wurde die native Reinigung mit verschiedenen Tags (His-Tag, GST-Tag, Strep-Tag und Maltose-Bindungsprotein MBP-Tag) mittels Affinitätschromatographie in dieser Arbeit durchgeführt.

#### Aufreinigung His-getaggtter Proteine

Die native Reinigung von His-getaggtten Proteinen wurde an einem FPLC-Gerät (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg) mit je nach Probenvolumen 1 oder 5 ml Ni-Sepharose-Säulen (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Nach der *E. coli* Proteinexpression (siehe 2.2.2.5) wurde die Kultur für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in Bindungspuffer (25 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM Imidazol; pH 7,8) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend mit Ultraschall für ca. 3 Minuten bei 70 % Leistung mittels Sonopuls HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH, Berlin). Danach wurde die Suspension für 30 min bei 4°C inkubiert und dann für 45 Minuten bei 21500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand an die äquilibrierte Säule gebunden und das Protein über einen Stufengradienten von Imidazol (0, 25, 50, 100, 250 und 500 mM) mit Elutionspuffer (25 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7,8) zu 1-2 ml Fraktionen eluiert. Die Flussrate betrug stets 1-2 ml/min. 20 µl der gewünschten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

#### Aufreinigung GST-getaggtter Proteine

Nach der *E. coli* Proteinexpression (siehe 2.2.2.5) wurde die Kultur für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml GST-Lysispuffer (PBS, pH 7,3; 1 mM EDTA; 0,2 % Triton-X-100; 1 mM PMSF) pro 10 ml Kultur resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend mit Ultraschall für ca. 3 Minuten bei 70 % Leistung mittels Sonopuls HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH, Berlin). Danach wurde die Suspension für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend für 45 Minuten bei 4 °C und 21500 rpm ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde mit Glutathion-Agarose-Kügelchen (30 mg/ml H<sub>2</sub>O; Sigma, München) für 1 Stunde unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch für 1 Minute bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, die Kügelchen viermal mit Lysepuffer gewaschen und wie oben abzentrifugiert. Die Elution des Proteins wurde durch die Zugabe von Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion; 250 mM KCl; 50 mM

Tris-HCl, pH 8,0) auf die Kügelchen und die Inkubation für 10 Minuten bei RT schwenkend durchgeführt. Das Gemisch wurde schließlich bei 4000 rpm und 4 °C für 1 Minute abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand und auch die Glutathion-Agarose-Kügelchen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Expression im präparativen Maßstab wurde an einem FPLC-Gerät mit 5 ml GSTrap FF-Säulen (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Nun wurde der Überstand nach der Proteinexpression, dem Zellaufschluss und der Zentrifugation an die äquilibrierte Säule gebunden und das Protein entweder über einen Stufengradienten von Glutathion (0, 5, 10, 20, 50 und 100%) oder über lineare steigende Glutathion-Konzentration mit Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion; 250 mM KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) zu 1-2 ml Fraktionen eluiert. Die Flussrate betrug stets 1-2 ml/min. 20 µl der gewünschten Fraktionen wurden schließlich mittels SDS-PAGE analysiert.

### **Aufreinigung MBP-getaggtter Proteine**

Wenn ein Protein mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) fusioniert wurde, konnte es mittels Affinitätschromatographie an einer Dextrinsäule spezifisch aufgereinigt werden. Nach der *E. coli* Proteinexpression (siehe 2.2.2.5) wurde die Kultur für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in Bindungspuffer (25 mM Tris, pH 8,5; 500 mM NaCl) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend durch Sonifizierung für ca. 7 Minuten bei 70 % Leistung mittels Sonopuls HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH, Berlin). Danach wurde die Suspension für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend für 45 Minuten bei 4 °C und 21500 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand an die mit Bindungspuffer äquilibrierte Dextrinsäule gebunden und die Säule mit Bindungspuffer gewaschen, um die unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine herunterzuwaschen. Dies wurde durch den Bradford-Test (siehe 2.2.2.1) überprüft. Für die Elution wurde die Säule mit Elutionspuffer (25 mM Tris, pH 8,5; 500 mM NaCl; 20 mM D-Maltose) gewaschen. Dieser enthält 20 mM D-Maltose, die das Dextrin aus der MBP-Bindungstasche verdrängt und so die Proteine von der Säule löst. 10 ml der proteinhaltigen Fraktionen wurden schließlich gesammelt und 20 µl davon mittels SDS-PAGE analysiert.

### **Aufreinigung Strep-getaggtter Proteine**

Für die Aufreinigung von Strep-getaggtter Proteine wurde die Zellkultur nach der Proteinexpression (siehe 2.2.2.5) für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in Strep-Lysispuffer (25mM Tris, pH 7,6; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,2 % Triton-X-100; 1 mM PMSF; 100

µg/ml Avidin) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Sonifizierung mittels Sonopuls HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH, Berlin). Danach wurde die Suspension für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend für 45 Minuten bei 4 °C und 21500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 40 µl Strep-Tactin™ Macrorep™ (IBA GmbH, Göttingen) für 1 Stunde unter bei 4 °C schwenkend inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch für 1 Minute bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, die Kügelchen viermal mit Lysepuffer gewaschen und wie oben abzentrifugiert. Die Elution des Proteins wurde durch die Zugabe von Elutionspuffer (5mM Biotin; 25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA) auf die Kügelchen und die Inkubation für 10 Minuten bei RT Schwenkend durchgeführt. Das Gemisch wurde schließlich bei 4000 rpm und 4 °C für 1 Minute abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand und auch die Kügelchen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Expression im präparativen Maßstab wurde an einem FPLC-Gerät mit 5 ml Strep Trap-Säulen (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt.

#### **2.2.2.7 Proteinaufreinigung und Entsalzung durch Gelfiltrationschromatographie**

Zur Trennung des nativ aufgereinigten Proteins von den anderen unspezifischen Banden folgte eine weitere Aufreinigung durch die Gelfiltrationschromatographie mittels HiLoad™16/60 Superdex 75 oder 100 (GE Healthcare, Freiburg). Nach der chromatographischen nativen Proteinaufreinigung wurden die Elutionsfraktionen gepoolt, aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9) und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Laufpuffer wurde hier 25 mM Tris, pH 8,5; 500 mM NaCl verwendet. Die Proteine wurden schließlich nach ihrer Größen zu 2-5 ml Fraktionen eluiert. Die Fraktionen wurden danach gepoolt, aufkonzentriert und auf einem 10 %igen SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.2.8 Konzentrieren von Proteinlösungen**

Nach der Reinigung und Entsalzung wurden die Proteinfractionen durch Ultrafiltration in Zentrifugationsröhrchen (Ultracel, MWCO 10 kDa oder 30 kDa, Millipore, Irland) über Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa oder 30 kDa aufkonzentriert. Die Aufkonzentration erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.9 Kristallisation-Screens**

Nachdem das Protein in einer höheren Konzentration exprimiert, nativ und löslich aufgereinigt wurde, wurde die Stabilität und die Kristallisationsbedingungen des Proteins in neun verschiedenen

96 *Well Crystallization*-Platten (Jede Platte hatte 96 verschiedene Kristallisationsbedingungen) überprüft. Die Kristallisation-*Screens* (Master-Block: MB1, MB2, MB24, MB25, MB26, MB27; MDL MemGold; Magic1; Magic2) wurden mit Hilfe von Claudia Alings (AG Wahl, FU Berlin) durchgeführt.

#### 2.2.2.10 *In vivo* Cytokininbindungsassay mit Bakterienzellen

Zur Untersuchung der Cytokinin-Bindungseigenschaften von Cytokininrezeptoren wurde ein *in vivo* Bindungsassay mit Bakterienzellen und *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin leicht modifiziert wie zuvor beschrieben (Mizuno and Yamashino, 2010) durchgeführt. Nach der Blau/Weiß-Selektion (siehe 2.2.2.13) wurde die M9-Medium-Vorkultur (siehe 2.1.6.1) mit einer blauen aktiven Kolonie angeimpft und für zwei bis sechs Tage bei 20 °C im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Nach einer neuen Inkubation von der M9-Hauptkultur über Nacht bei 20 °C, wurde am nächsten Morgen ein Aliquot (0.9 ml) von den Zellen gesammelt und 1-2 pmol von *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin hinzugegeben. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des Proteins wurde in einem zweiten Ansatz zusätzlich nicht radioaktiv markiertes *trans*-Zeatin in 3000x molarem Überschuss hinzupipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 5 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig abgesaugt und 0,2 ml 99 % Ethanol wurden zum Pellet gegeben. Das Pellet wurde dann für 1 Stunde schüttelnd extrahiert. Die Radioaktivität von 190 µl Ethanol-Extrakt wurde anschließend in ACS-II-Szintillations-Cocktail (Amersham Biosciences, UK) bestimmt. Schließlich konnte die spezifische Bindungsaktivität des Proteins aus der Differenz von gesamter und unspezifischer Bindung berechnet werden. Proteinexpression wurde durch Western-Blot bestätigt. Tritium markiertes *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin (592 GBq/mmol) wurde von *Isotope Laboratory of the Institute of Experimental Botany* (Prag, Tschechische Republik) erhalten.

#### 2.2.2.11 *E. coli*-Komplementationsassay

Die Aktivität von Cytokininrezeptoren wurde durch einen Komplementationsassay im *E. coli* Stamm KMI002 mit dem Rcs-Phosphorylierungssystem (leicht modifiziert nach Mizuno and Yamashino, 2010) untersucht. Wenn die RcsC→YojN→RcsB-Signalkaskade aktiv ist, resultiert in diesem System einer Synthese der β-Galactosidase. Die Aktivität der β-Galactosidase beziehungsweise die Aktivität der Cytokininrezeptoren kann durch zwei enzymatische Tests (Blau/Weiß-Selektion und ONPG-Test) nachgewiesen werden. Die Blau/Weiß-Selektion dient dem qualitativen Nachweis der cytokininabhängigen Aktivität des Rezeptors. Zur Durchführung dieses Tests wurde der Rezeptor in

den Vektor pDEST15 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert und danach mit dem mutierten *E. coli* Stamm KMI002 transformiert. Die *E. coli*-Zellen wurden anschließend direkt auf LB-Agar-Platten plattiert, die X-Gal (40 µg/ml); die Selektionsmarkers des Plasmids (Carbencillin, 50 mg/ml); 5µM von Cytokinin oder Adenin und 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid) enthielten. Die Platten wurden schließlich für 2 Tage bei 20 °C inkubiert. Für den ONPG-Test wurde die M9-Medium-Vorkultur (siehe 2.1.6.1) nach der Blau/Weiß-Selektion mit einer blauen aktiven Kolonie angeimpft und für zwei bis sechs Tage bei 20 °C im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Nach einer neuen Inkubation von der M9-Hauptkultur über Nacht bei 20 °C, wurde am nächsten Morgen ein Aliquot von den Zellen durch Zentrifugation gesammelt, in Z-Puffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 2H<sub>2</sub>O; 30,12 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2H<sub>2</sub>O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O; 1 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und dann die optische Dichte der Suspension bei 600 nm (OD<sub>600</sub> nm) direkt gemessen. Danach folgte der Zellaufschluss durch die Zugabe von 10 µl Chloroform und die Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C. Die Messung der β-Gal-Aktivität folgte anschließend bei 30 °C. Dazu wurde ONPG (o-Nitrophenyl-β-Glucopyranosid) frisch im Z-Puffer (4 mg/ml) hergestellt. Um die Reaktion zu starten, wurde die ONPG-Lösung (100 µl) ins Eppendorfgefäß zugegeben. Wenn die Farbe der Reaktionsmischung gelb wurde, wurde die Reaktion mit 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 ml) gestoppt. Die Reaktionszeiten wurden dann so genau wie möglich (Sekundengenau) notiert, anschließend die optischen Dichten des Reaktionsgemischs bei OD<sub>420</sub> nm und OD<sub>550</sub> nm gemessen und schließlich die β-Gal-Aktivität in relativen Einheiten mit der folgenden Formel berechnet:  $1000 \times [(OD_{420} \text{ nm} - OD_{550} \text{ nm} \times 1,75) / t \text{ (min) vol. (ml) OD}_{600} \text{ nm}]$ .

#### **2.2.2.12 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS)**

Für die MALDI-MS Analyse wurden Proteinbanden aus einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE ausgeschnitten. Die Elution der Proteine aus dem Gel fand nach folgendem Protokoll statt (erhalten von Dr. Weise, Freie Universität Berlin).

Die Coomassie-gefärbten Banden wurden zunächst in kleine Gelstücke von etwa 1x1 mm zerschnitten, in einem kleinen Eppendorfgefäß (500 µl) in 20 µl Acetonitril: 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1:1) 15 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 20 µl Acetonitril ersetzt und die Proben inkubiert, bis die Gelstücke milchig weiß geworden waren (ca. 5 Minuten). Danach wurde Acetonitril entfernt und die Gelstücke ca. 10 Minuten unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Gelstücke zur Öffnung der Disulfidbrücken in 20 µl

100 mM DTT (frisch hergestellt) in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert. Dann wurden die Proben kurz zentrifugiert und das Volumen des Überstandes bestimmt. Es folgte eine Zugabe von 20 µl Acetonitril zu den Gelstücken. Die Gelstücke waren nun milchig weiß geworden, der Überstand wurde anschließend abgenommen, 20 µl 55 mM Iodacetamid (frisch hergestellt) in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> zu den Gelstücken gegeben und 20 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Proben wurden danach kurz zentrifugiert, Überstand abgenommen und verworfen und die Gelstücke in 20 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte erneut eine Inkubation in 20 µl Acetonitril für 5 Minuten. Der Überstand wurde danach vollständig abgenommen und der Vorgang wiederholt und die Gelstücke für ca. 10 Minuten unter Vakuum getrocknet. 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<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (frisch) zugegeben, gevortext und die fertige Trypsinlösung (12,5 ng/µl finale Konz.) auf Eis gelagert. Zu den Gelstücken wurde ein Volumen von Trypsinlösung entsprechend dieser Formel ( $V_{\text{Trypsinlösung}} = 20 \mu\text{l} - \text{Überstand-Volumen} + 3 \mu\text{l}$ ) zupipettiert. 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 MALDI-MS Messung der Proben wurde von Dr. Weise (Freie Universität Berlin) durchgeführt.

### 2.2.3 Bioinformatikanalysen

Alle Programme, Datenbanken und Webtools, die in dieser Arbeit zur Bioinformatikanalyse verwendet wurden, sind in der Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 17: Die verwendeten Programme, Datenbanken und Webtools**

Name	Das Programm	Website
ExpASY	Proteindatenbank	<a href="http://expasy.org/tools/">http://expasy.org/tools/</a>
PSIPred v3.4	Proteinsekundärstrukturvorhersage	<a href="http://bioinfadmin.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinfadmin.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a> von (Buchan <i>et al.</i> , 2013)
Aramemnon	Datenbank für pflanzliche Membranproteine	<a href="http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/">http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/</a>
NCBI/GenBank	allgemeine Sequenzdatenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
TAIR	allgemeine Sequenzdatenbank	<a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a>

<b>Vector NTI 9</b>	Analyse und Bearbeitung von Sequenzdaten	Invitrogen, Karlsruhe
<b>TMHMM Server v2.0</b>	Vorhersage der Transmembrandomänen eines Proteins	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
<b>GenScript</b>	Gensynthese und Molekularbiologie Dienstleistungen	<a href="http://www.genscript.com/">http://www.genscript.com/</a>
<b>Pfam</b>	Datenbank für Modell der Domänenstrukturen von Proteinen	<a href="http://pfam.sanger.ac.uk/">http://pfam.sanger.ac.uk/</a> (Finn <i>et al.</i> , 2014)
<b>ClustalW2</b>	Sequenzen-Alignments	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
<b>MEGA6</b>	Generierung von phylogenetischen Stammbäumen	<a href="http://www.megasoftware.net/megaccusage.php">http://www.megasoftware.net/megaccusage.php</a>

## 2.2.4 Arbeiten mit Pflanzen

### 2.2.4.1 Isolation von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden zunächst für fünf bis sechs Wochen unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht), Schwachlicht (75-100  $\mu$ -Einstein), konstanter Temperatur (23 °C) und konstanter Luftfeuchtigkeit (65 %) in einem Percival AR-66L Kammer (CLF Plant Climatics, Wertlingen) inkubiert. Nach der Inkubation sollten die Pflanzen mindestens eine Stunde vor der Präparation aus dem Inkubationsschrank genommen werden, damit sie sich an die veränderten Umweltbedingungen gewöhnen können. Für die Isolation von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurden die Blätter sechs bis acht mit einem Skalpell entlang der Mittelrippe geschnitten, die beiden Blatthälften angeritzt bis das ganze Blattstück einheitlich dunkler aussah und über Nacht in der Enzymlösung (0,4 M Mannitol; 20 mM KCl; 20 mM MES; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,25 % Cellulase R-10; 0,3 % Macerozyme R-10; pH 5,7; 650 mOs) bei 21 °C im Kulturraum im Dunkeln inkubiert. Die entstehenden Protoplasten wurden am nächsten Morgen mittels eines Nylonfilter mit 60  $\mu$ m Porengröße in einem Trichter von den andern pflanzlichen Zellbestandteilen getrennt, danach mit 10 ml W5-Lösung (154 mM NaCl; 125 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 2 mM MES; pH 5,7; 650 mOs) zweimal gewaschen und schließlich in 10 ml W5-Lösung vorsichtig resuspendiert (modifiziert nach Hwang und Sheen, 2001).

#### 2.2.4.2 Protoplasten *trans*-Aktivierungsassay (PTA) und Transformation von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Der Protoplasten-*trans*-Aktivierungsassay (PTA) ist eine transiente Methode zur Untersuchung der potentiellen Bindung eines Transkriptionsfaktors mit einer Ziel-DNA-Sequenz *in vivo*. Dabei wird die potentielle DNA-Bindestelle vor ein Reporter-gen kloniert. Nach Zugabe des Transkriptionsfaktors kann dessen Bindung über die Expression des Reporter-gens ermittelt werden. Durch dieses System konnte auch die Aktivität eines putativen Cytokininrezeptors durch die Komplementierung von der Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5*, *ahk3-7* in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten mit Cytokinin untersucht werden (Choi *et al.*, 2012).

Der hier verwendete Assay wurde *in vivo* in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5*, *ahk3-7* (Riefler *et al.*, 2006) Mesophyllprotoplasten durchgeführt. Dazu wurden die Protoplasten zunächst aus *Arabidopsis* Rosettenblättern isoliert und aufgereinigt (siehe 2.2.6.1). Anschließend wurde das Reporterkonstrukt (*GUS*), der Transkriptionsfaktor und der zu untersuchende putative Cytokinin Rezeptor mittels PEG-vermittelter Transformation in die Protoplasten transformiert. Zusätzlich zu diesen beiden Konstrukten wurde ein weiteres Plasmid in die Protoplasten eingebracht. Die auf diesem Plasmid kodierte Neuraminidase dient bei der späteren Auswertung der Normalisierung der Ergebnisse (Choi *et al.*, 2012). Wenn der putative Cytokininrezeptor die Mutation in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5*, *ahk3-7* komplementieren könnte, hätte dies einen positiven Einfluss auf die Signaltransduktion von Cytokinin bis zum *trans*-Aktivierungssignal. In diesem Fall zeigten die mit Cytokinin behandelten Proben höhere Aktivität als die nicht mit Cytokinin behandelten Proben. Für die Transformation von *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten mit den PTA-Konstrukten wurden die vorher isolierten und aufgereinigten Protoplasten (siehe 2.2.6.1) 5 Stunden auf Eis inkubiert, danach bei 100 x g und einer Beschleunigungs- und Bremsstufe von drei bzw. eins in einer Haereus Multifuge 3SR+ Zentrifuge (Thermo Scientific, Langenselbold) abzentrifugiert und dann in MMg-Lösung (0,4 M Mannitol; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 4 mM MES; pH 5,7; 650 mOs) resuspendiert. Pro Transformation wurden 40 µg des DNA-Gemischs nach folgenden Ansätzen zusammengemischt (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: DNA-Pipettierschema für PTA:

DNA	pARR6 Negativkontrolle	ARR2+AHK2 Positivkontrolle	ARR2+ Putativer Cytokininrezeptor
pARR6 (Promotorfragment mit <i>GUS</i> Reporterkonstrukt)	9 µg	9 µg	9 µg
NAN (für die Normalisierung)	3 µg	3 µg	3 µg
pB2GW7-leer	28 µg	-	
ARR2 (Transkriptionsfaktor)	-	14 µg	14 µg
AHK2 (Positivkontrolle)	-	14 µg	-
Putativer Cytokininrezeptor	-	-	14 µg

Zu dem DNA-Gemisch wurden 200 µl der Protoplastensuspension gegeben und vorsichtig mehrfach invertiert. Nach Zugabe von 220 µl PEG-Lösung (4 g PEG 4000; 2,8 ml 0,8 M Mannitol; 1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>; 3 ml ddH<sub>2</sub>O) wurde das DNA-Protoplastengemisch so lange invertiert bis es gut zusammengemischt war und dann für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 800 µl W5-Lösung zu dem PEG-Protoplasten-Gemisch gegeben und vorsichtig vermischt. Die Protoplasten-PEG-Lösung wurde danach bei TR für 3 Minuten bei 100 x g im Ausschwingrotor einer Heraeus Multifuge 35SR+ bei Beschleunigungsstufe 5 und Bremsstufe 5 zentrifugiert, der Überstand komplett entfernt, die Protoplasten schließlich in 1 ml WI-Lösung (0,5 M Mannitol; 4 mM MES; 20 mM KCl; pH 5,7; 650 mOs) resuspendiert und über Nacht bei 21 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Protoplasten für 3 Minuten bei Beschleunigungsstufe 3 und Bremsstufe 1 zentrifugiert, der Überstand komplett entnommen und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Protoplasten konnten dann bei -20 °C gelagert werden bis mit der Auswertung begonnen wurde.

Die Auswertung wurde nach einem modifizierten Protokoll von (Ehlert *et al.*, 2006) durchgeführt. Zunächst wurden die Protoplasten bei RT aufgetaut und danach in 150 µl GUS-Extraktionspuffer (GEB; 50 mM Na-Phosphat; 10 mM EDTA; 0,1 % Triton X-100; 0,1 % N-Laurylsarkosyl; 0,05 % β-Mercaptoethanol; pH 7,2) resuspendiert. Dann wurden 100 µl und 10 µl von dieser Suspension mit 100 µl GEB pH 7,5 plus 4 mM MUG Trihydrate (Duchefa, Haarlem, Niederlande) beziehungsweise mit 10 µl GEB pH 7,0 plus 1 mM 2'-(4-Methylumbelliferyl)-alpha-D-N acetylneuraminic acid (MUN, Biosynth, Staad, Schweiz) vermischt wurden. Die zwei entstehenden Gemische wurden für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden anschließend 100 µl des MUG

Gemisches in 100 µl 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3,33 µl des MUN Gemisches in 200 µl 330 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hinzupipettiert (dieser Zeitpunkt wurde als T0 für die Auswertung betrachtet). Der Rest der Protoplastensuspensionen wurde danach für weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und schließlich wie oben gestoppt (dieser Zeitpunkt wurde als T1 betrachtet). Die Auswertung von dem Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay erfolgte an einem *plate reader*-Gerät (Synergy 2, Biotek, Bad Friedrichshall), durch Errechnung der GUS/NAN Einheiten bei einer Anregung/Emission von 360/460 nm.

#### **2.2.4.3 Komplementationsanalysen in *Arabidopsis thaliana***

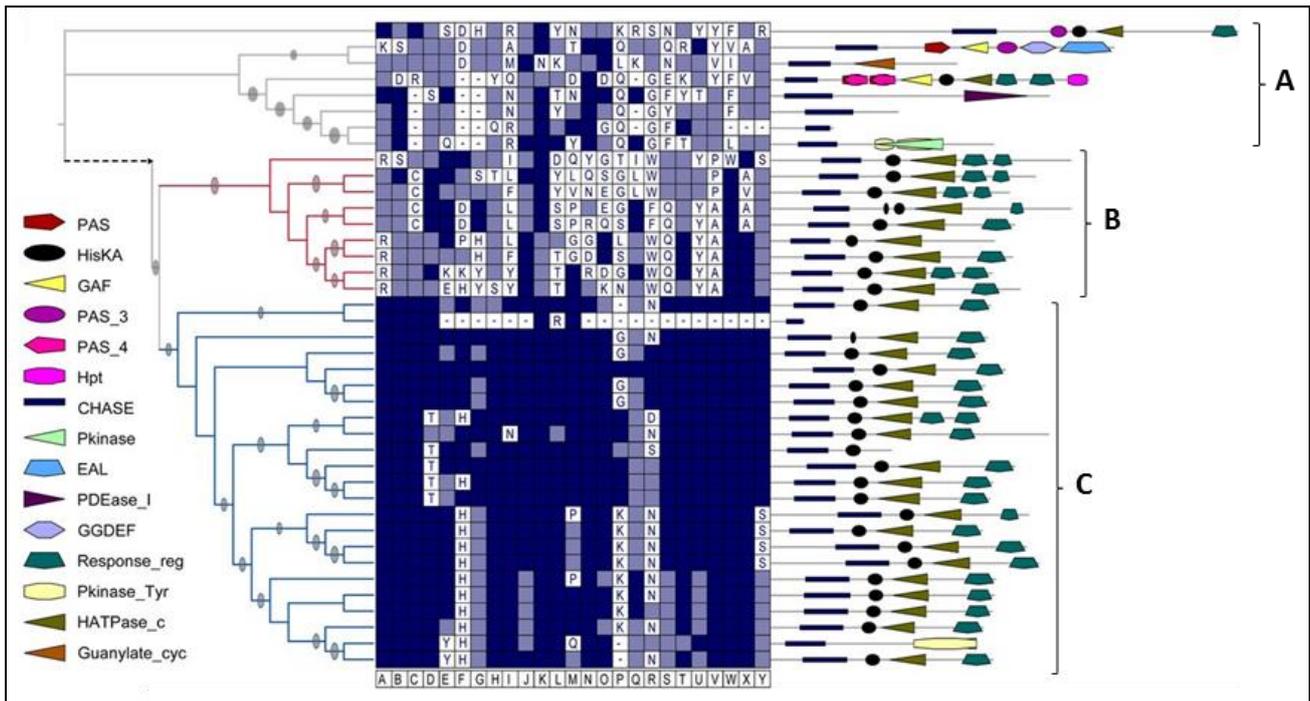
Um die Aktivität des putativen Cytokininrezeptors CHARK aus *Oryza sativa* im Pflanzen zu untersuchen wurden Komplementationsanalysen in der *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2*, *ahk3-3* durchgeführt (Stolz *et al.*, 2011). Der CHARK Rezeptor wurde zuvor mit dem *AHK2*-Promoter in den Vektor pB7m34GW kloniert, der eine C-terminale Fusion mit einem myc-Tag ermöglichte. Die zu untersuchenden Konstrukte waren: *pAHK2-CHARK* und *pAHK2-AHK2* als Positivkontrolle. Nach den Segregationsanalysen wurden die homozygoten Linien von den beiden Konstrukten durch zwei Analysen (Rosettendurchmesser und Sprosslänge) für die Komplementation der Mutanten-Linie *ahk2-2*, *ahk3-3* getestet. Ein detailliertes Protokoll für die Durchführung dieser in *Arabidopsis thaliana* Komplementationsanalysen ist von Stolz *et al.*, 2011 beschrieben.

### 3 Ergebnisse

Cytokinine gehören zu einer Klasse von pflanzlichen Hormonen, die an vielen entwicklungsbiologischen und physiologischen Prozessen beteiligt sind (Mok und Mok, 2001). Das Cytokininsignaltransduktionssystem basiert auf dem Zwei-Komponenten-System (ZKS), welches in Prokaryoten in großer Zahl vorhanden ist (West und Stock, 2001). Um die Evolution von der Cytokininperzeption zu analysieren, sollte die Cytokininaktivität von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen in verschiedenen Systemen in dieser Arbeit untersucht werden. Zum besseren Verständnis der Evolution der Cytokininbindung an die diverse CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors aus *Physcomitrella patens*, ist die Kristallisation und die Lösung der Tertiärstruktur des CHASE-Proteins entscheidend.

#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen zur Untersuchung der Evolution der Cytokininperzeption

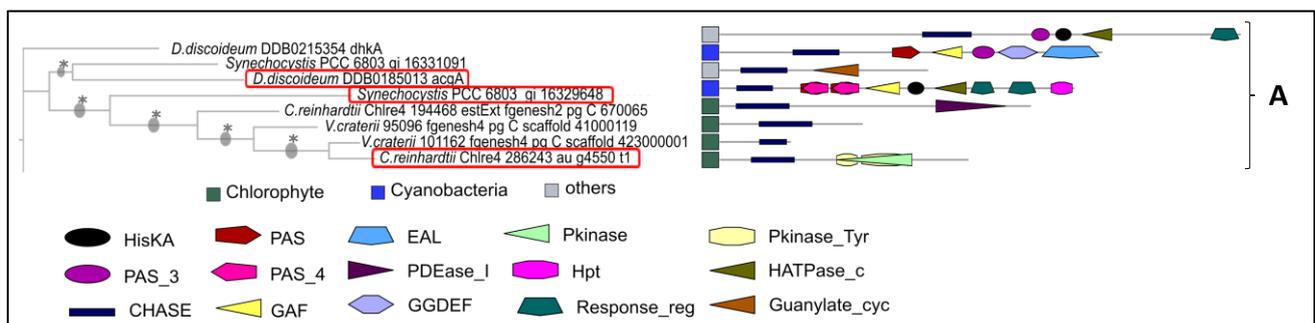
Um Einblicke in die Entstehung und Entwicklung des Cytokininregulierungssystems zu gewinnen, wurden wichtige Komponenten des Stoffwechsels und Signalwegs dieses Phytohormons in den Genomen und EST-Daten von einer Vielzahl von verschiedenen Arten aus Bakterien und Algen zu modernen Landpflanzen identifiziert (Gruhn *et al.*, 2014). Diese phylogenetische Analyse zeigte drei Klassen von putativen Cytokininrezeptoren: Eine Klasse mit divergierenden Aminosäuren in der CHASE Domäne und unbekannt anderen Domänen (Klasse A), eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren mit divergierenden Aminosäuren in der CHASE Domäne und konservierten Domänen (ZKS), die nur in *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* gefunden wurden (Klasse B) und eine Klasse von klassischen Cytokininrezeptoren mit einer hohen Konservierung in den Aminosäuren der CHASE Domäne und konservierten Domänen (ZKS) (Klasse C) (Abb.8) (Gruhn *et al.*, 2014). Zum Zweck der Analyse von der Evolution der Cytokininperzeption, sollte die Cytokininaktivität für einige Rezeptoren aus verschiedenen Klassen (A, B und C) und Organismen in verschiedenen Systemen in dieser Arbeit untersucht werden.



**Abbildung 8: Phylogenetischer Baum der CHASE Domäne verschiedener Spezies.** Für die CHASE Domäne tragenden Proteine aus Pflanzen und verschiedenen Organismen wurde mit Hilfe der *Maximum Likelihood*-Methode ein Stammbaum berechnet. Die Positionen (A-Y) markieren die Konservierung von den Aminosäuren, die für die Struktur und die Funktion von der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors aus *Arabidopsis thaliana* kritisch sind (Hothorn *et al.*, 2011). Dunkelblaue Positionen zeigen die Identität mit der Sequenz der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors aus *Arabidopsis thaliana*, hellblau markiert die konservativen Substitutionen und die weißen Positionen markieren die diversen Aminosäurepositionen. Die Domänenstruktur der gesamten Proteine ist auf der rechten Seite dargestellt. Diese phylogenetische Analyse zeigte drei Klassen von putativen Cytokininrezeptoren: Eine Klasse mit diversen CHASE Domäne Aminosäuren und unbekanntem Domänen (Klasse A) (graue Linie), eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren mit diversen CHASE Domäne Aminosäuren und konservierten Domänen (ZKS), die nur in *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* gefunden wurden (Klasse B) (rote Linie) und eine Klasse von klassischen Cytokininrezeptoren mit hohen konservierten CHASE Domäne Aminosäuren und konservierten Domänen (ZKS) (Klasse C) (blaue Linie) (modifiziert nach Gruhn *et al.*, 2014).

### 3.1.1 Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren der Klasse A

Die Klasse A aus der phylogenetischen Analyse der CHASE Domäne enthält putative Cytokininrezeptoren aus Cyanobakterien, Amöben und *Chlorophyceae* Algen mit diversen CHASE Domänen und unbekannt anderen Domänen (Abb. 9). Um die Evolution und die Entwicklung der Cytokininperzeption zu untersuchen, sollte die biologische Funktion für einige Rezeptoren von der Klasse, *acgA* (*adenylyl cyclase germination protein A*) aus der Amöbe *Dictyostelium discoideum*; Slr1759 (Hik14) (*Hybrid histidine kinase 14*) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp. PCC 6803* und Chler4 286243 au.g4550 t1 *CHASE domain containing tyrosine kinase 1* (CTK1) aus der *Chlorophyceae* Alge *Chlamydomonas reinhardtii* in verschiedenen Systemen (*in vivo* Cytokininbindungsassay, *E. coli*-Komplementationsassay und Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA)) mit Cytokinin untersucht werden.

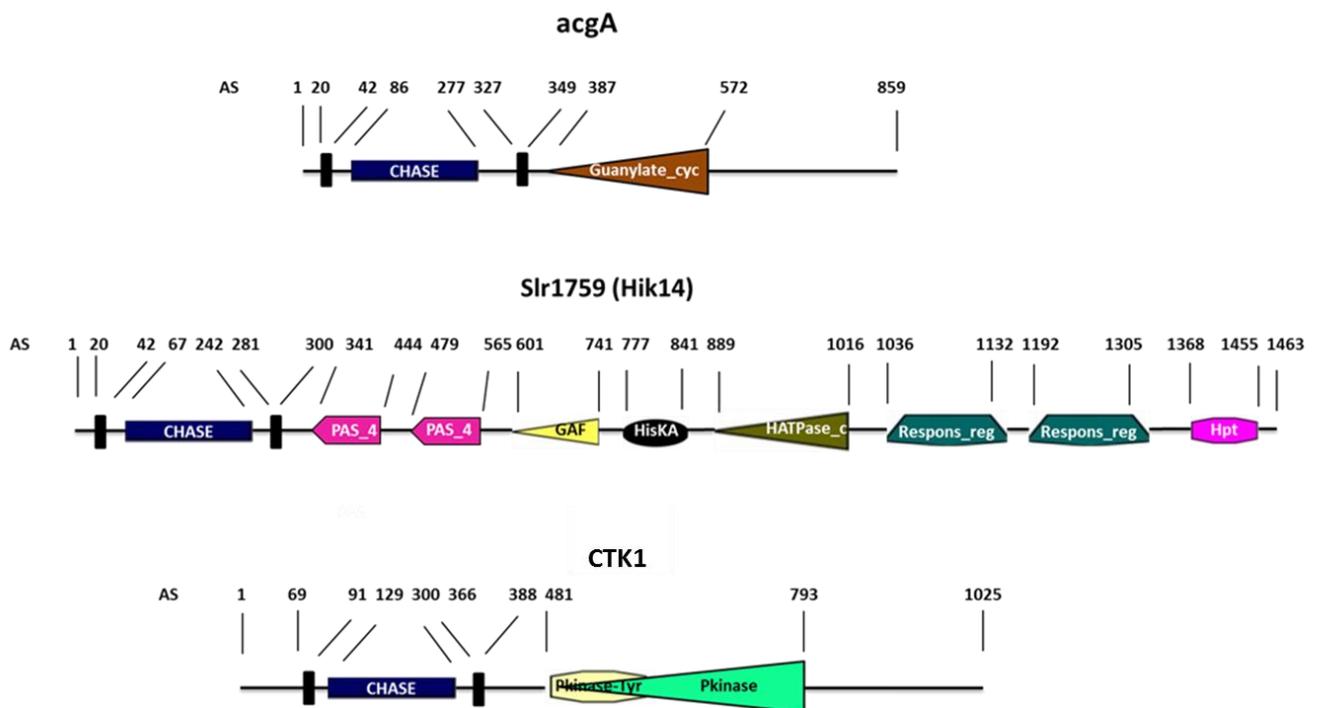


**Abbildung 9: Klasse A eines phylogenetischen Baumes der CHASE Domäne.** Diese Klasse enthält Rezeptoren aus Cyanobakterien, Amöben und *Chlorophyceae* Algen mit diversen CHASE Domäne Aminosäuren und unbekannt Domänen (ZKS). Hier in der Abbildung ist nur ein Teilbereich der phylogenetischen Analyse (Abb. 8). Die roten Kästen markieren die Rezeptoren, die aus dieser Klasse in dieser Arbeit untersucht wurden: *acgA* aus der Amöbe *Dictyostelium discoideum* (oberer Kasten) bzw. Slr1759 (Hik14) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp. PCC 6803* (mittlerer Kasten) und CTK1 aus der *Chlorophyceae* Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (unterer Kasten). Die Domänenstruktur der gesamten Proteine ist auf der rechten Seite dargestellt (modifiziert nach Gruhn *et al.*, 2014).

#### 3.1.1.1 Bioinformatikanalyse der Rezeptoren

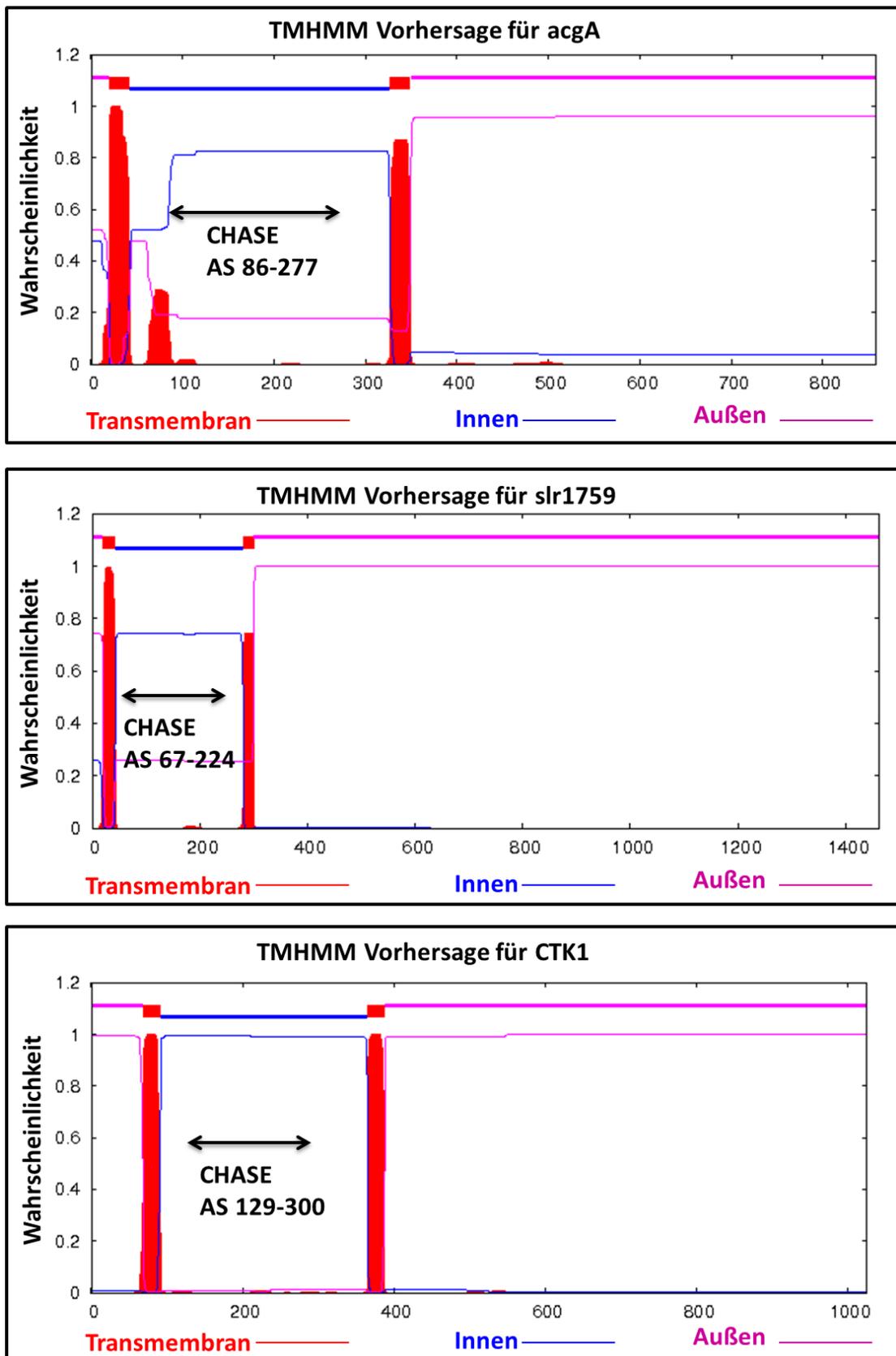
Die Domänenstruktur der Rezeptoren *acgA* aus *Dictyostelium discoideum*, Slr1759 (Hik14) aus *Synechocystis sp. PCC 6803* und CTK1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurden durch die Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) und den TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) analysiert. Die drei Rezeptoren besitzen in ihrem N-terminalen Bereich eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellulär), die in allen Rezeptoren

von zwei hydrophoben transmembranständigen Bereichen flankiert ist. Im cytoplasmatischen Teil der Proteine befinden sich nur eine Granulatezyklase Domäne des Rezeptors *acgA*; zwei PAS\_4 Domänen, eine GAF Domäne, eine Histidinkinase A Domäne, eine Histidinkinase ähnliche ATPase Domäne, zwei *Receiver* Domänen, eine Histidin *Phosphotransmitter*-Domäne des Rezeptors *Slr1759* und zwei Proteinkinase Domänen (Pkinase\_Tyr, Pkinase) des Rezeptor *CTK1* (Abb. 10 und 11).



**Abbildung 10: Domänenstruktur der Rezeptoren *acgA* aus *Dictyostelium discoideum*, *Slr1759* aus *Synechocystis sp. PCC 6803* und *CTK1* aus *Chlamydomonas reinhardtii*.** Eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) mit zwei flankierenden hydrophoben transmembranständigen Domänen gehört zu den drei Rezeptoren in ihrem N-terminalen Bereich. Andere Domänen befinden sich im cytoplasmatischen Teil der Proteine, die nur eine Granulatezyklase Domäne für *acgA*; zwei PAS\_4 Domänen, eine GAF Domäne, eine Histidinkinase A Domäne, eine Histidinkinase ähnliche ATPase Domäne, zwei *Receiver* Domänen, eine Histidin *Phosphotransmitter*-Domäne für *Slr1759* und zwei Proteinkinase Domänen (Pkinase\_Tyr-Pkinase) für *CTK1* sind. Die Abbildung wurde anhand der Vorhersagen der Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) und TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) erstellt, AS ist Aminosäurepositionen.

Die Wahrscheinlichkeit hydrophober Helices der Rezeptoren *acgA*, *Slr1759* und *CTK1* wurde anschließend durch den TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) analysiert. Die Analyse zeigte, dass alle Rezeptoren in ihrem N-terminalen Bereich zwei hydrophobe transmembranständige Domänen (TM Domänen) besitzen, die eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) umschließen (Abb. 11).



**Abbildung 11: Vorhersage hydrophober Helices der Rezeptoren acgA, Slr1759 und CTK1.** Die Primärstruktur von acgA, Slr1759 und CTK1 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.

Um Einblicke über die Sekundärstruktur von der CHASE Domäne der Rezeptoren acgA aus *Dictyostelium discoideum*, Slr1759 aus *Synechocystis sp. PCC 6803* und CTK1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* zu gewinnen und mit der Sekundärstruktur von der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors AHK4 aus *Arabidopsis thaliana* zu vergleichen, wurde die Vorhersage der Sekundärstruktur jeder CHASE Domäne mittels der PSIPred v3.4 Software (Buchan *et al.*, 2013) vorgenommen (Abb. 12). Anhand dieser Vorhersage wurden schließlich die prozentualen Anteile an der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren acgA, Slr1759 und CTK1 berechnet und mit den prozentualen Anteilen an der Sekundärstruktur der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors verglichen (Tabelle 20).

Die CHASE Domänen der Rezeptoren acgA, Slr1759 und AHK4 weisen ähnliche prozentuale Anteile der Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *Coil*) in der Vorhersage auf (Abb. 12; Tabelle 20). Die CHASE Domänen der Rezeptoren Slr1759 und AHK4 besitzen die gleiche lange  $\alpha$ -Helix im N-Terminalen Bereich des Proteins, die für die Struktur-Stabilität der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors wichtig ist (Hothorn *et al.*, 2011). Die CHASE Domänen der Rezeptoren acgA und CTK1 sind kürzer als die CHASE Domänen der Rezeptoren Slr1759 und AHK4. Die CHASE Domäne des CTK1 Rezeptors ist die kürzeste CHASE Domäne mit nur drei  $\alpha$ -Helices. Interessanterweise zeigte die phylogenetische Analyse divergierende Aminosäuren in der CHASE Domäne der Rezeptoren acgA, Slr1759 und CTK1 im Vergleich mit den Aminosäuren der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors, die für die Cytokininbindung wichtig sind (Abb. 8) (Gruhn *et al.*, 2014).

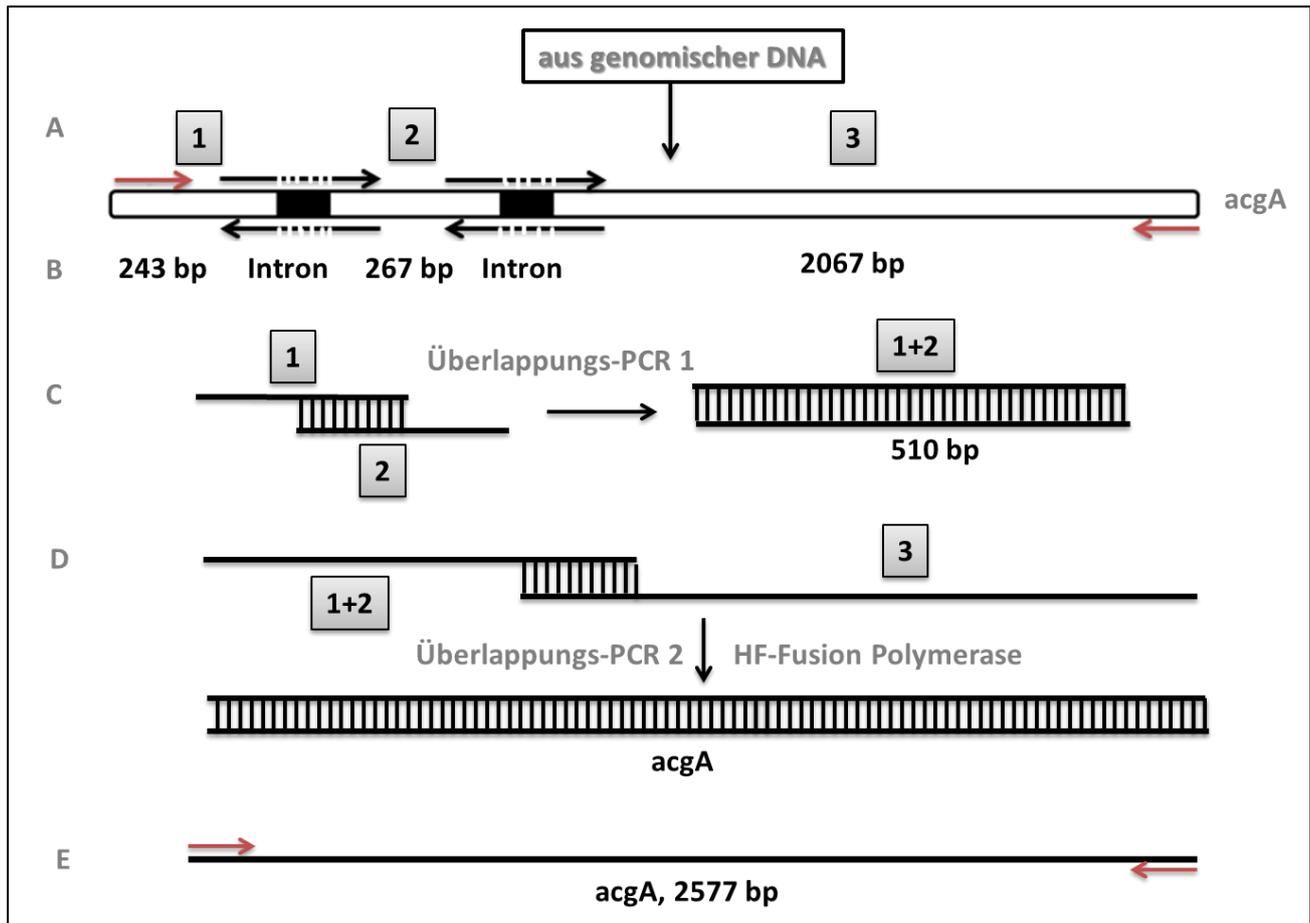


**Tabelle 20: Die prozentualen Anteile an der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren *acgA*, *Slr1759*, *CTK1* und *AHK4*.**

Prozentuale Anteile an der Sekundärstruktur (PSIPRED v3.4)	CHASE Domäne- <i>acgA</i>	CHASE Domäne- <i>Slr1759</i>	CHASE Domäne- <i>CTK1</i>	CHASE Domäne- <i>AHK4</i>
$\alpha$ -Helix (%)	19,23	18,75	12,5	17,64
$\beta$ -Faltblatt (%)	30,76	31,25	37,5	32,35
<i>Coil</i> (%)	50	50	50	50

### 3.1.1.2 Die *acgA*- und *Slr1759*-cDNAs konnten aus genomischer DNA kloniert werden

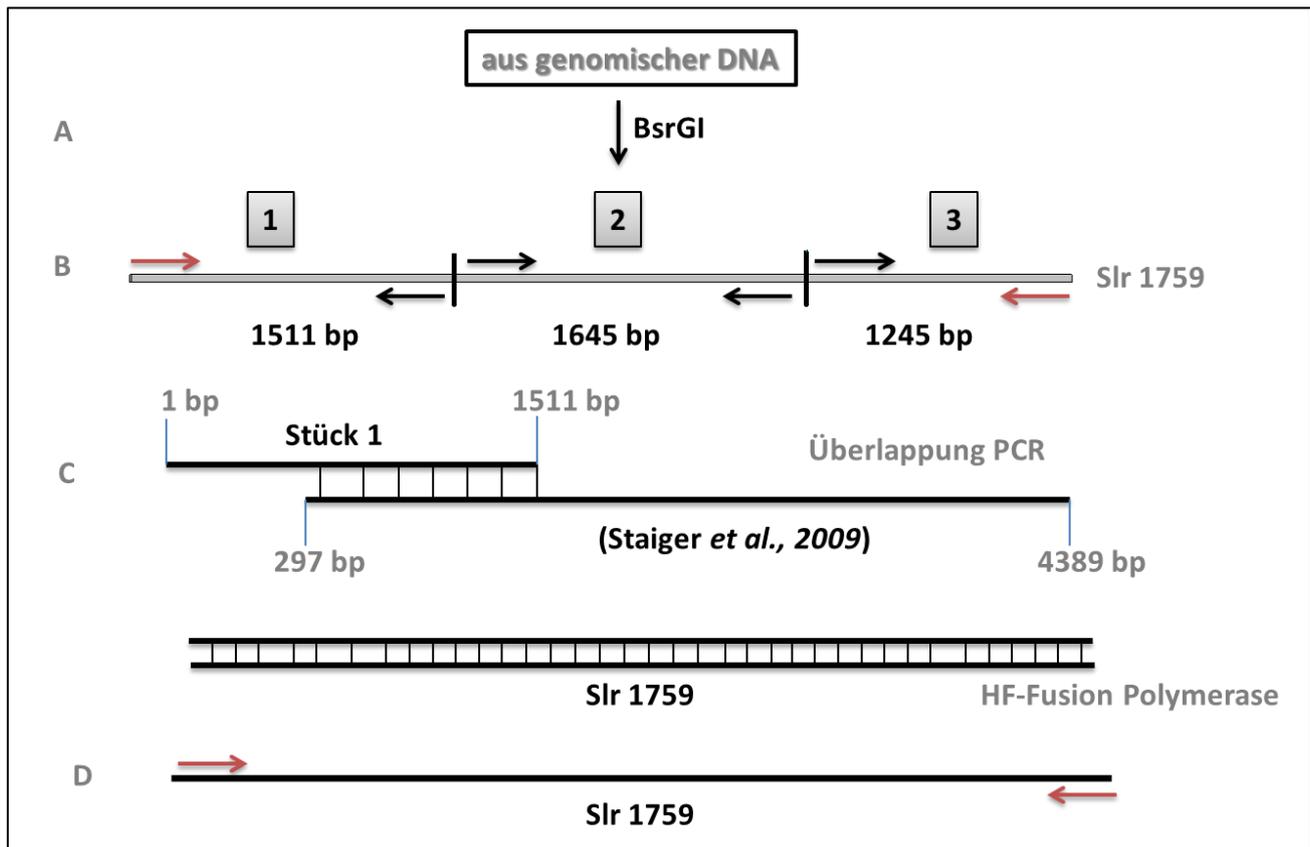
Die genomische DNA aus *Dictyostelium discoideum* Stamm AX2 wurde von Dr. Thewes (FU Berlin) erhalten und die genomische DNA aus *Synechocystis sp. PCC 6803* wurde von Prof Dr. Annegret Wilde (Universität Freiburg) erhalten. Die Analysen von den *acgA*, *Slr1759* und *CTK1* DNA-Sequenzen wurden mit NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), dictyBase (<http://www.dictybase.org/>), CynoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis>), *Chlamydomonas reinhardtii* v4.0 (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html>), Phytozome v10 (<http://www.phytozome.net/chlamy.php>) und UniProt (<http://www.uniprot.org/>) Genbanken durchgeführt. Weil die *acgA* genomische DNA zwei Introns enthält, wurde die *acgA*-cDNA mittels der Überlappungs-PCR amplifiziert (siehe 2.2.1.8). Die drei Exons in der genomischen DNA wurden in drei einzelne DNA-Abschnitte (1, 2 und 3) aufgeteilt und die spezifischen Primer für jeden Abschnitt mit ca. 20 bp als überlappendes Stück zwischen den benachbarten DNA-Abschnitten entworfen (Abb. 13). Am Anfang wurde jeder DNA-Abschnitt mittels PCR mit seinen entsprechenden Primern alleine amplifiziert (siehe 2.2.1.8). Danach wurde eine erste überlappende PCR zwischen den DNA-Abschnitten 1 und 2 durchgeführt und der entstehende DNA-Abschnitt 1+2 mit den entsprechenden Primern spezifisch amplifiziert. Dann folgte eine zweite überlappende PCR zwischen DNA-Abschnitt 1+2 und DNA-Abschnitt 3 mittels des *high fidelity phusion* Enzyms (siehe 2.2.1.8) und anschließend wurde die gesamte gewünschte DNA-Sequenz von *acgA* mit den äußeren Primern spezifisch zusammenamplifiziert. Schließlich wurde die *acgA*-cDNA durch Gateway-Klonierung (BP- und LR-Reaktion) in die passenden Vektoren kloniert (siehe 2.2.1.15).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung von *acgA*.** Die *acgA*-cDNA wurde mittels einer überlappenden PCR amplifiziert (siehe 2.2.1.8). **A:** Die drei Exons in der genomischen DNA wurden in drei einzelne DNA-Abschnitte (1, 2 und 3) aufgeteilt und die spezifischen Primer für jeden Abschnitt mit ca. 20 bp als überlappendes Stück zwischen den benachbarten DNA-Abschnitten entworfen. **B:** Am Anfang wurde jeder DNA-Abschnitt mittels PCR mit seinen entsprechenden Primern alleine amplifiziert (siehe 2.2.1.8). **C:** Danach wurde eine erste überlappende PCR zwischen den DNA-Abschnitten 1 und 2 durchgeführt und der entstehende DNA-Abschnitt 1+2 mit den entsprechenden Primern spezifisch amplifiziert. **D:** Dann folgte eine zweite überlappende PCR zwischen DNA-Abschnitt 1+2 und DNA-Abschnitt 3. **E:** Anschließend wurde die gesamte gewünschte DNA-Sequenz von *acgA* mit den äußeren Primern spezifisch zusammenamplifiziert und schließlich durch *Gateway*-Klonierung (BP- und LR-Reaktion) in die passenden Vektoren kloniert (siehe 2.2.1.15).

Um die Amplifikation von *Slr1759* (4389 bp) aus genomischer DNA zu vereinfachen, wurde die cDNA in drei einzelnen DNA-Abschnitten (1, 2 und 3) aufgeteilt und die spezifischen Primer für jeden Abschnitt entworfen (Abb. 14). Am Anfang wurde ein enzymatischer Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *BsrGI* (*BsrGI* schneidet nicht in *Slr1759*) durchgeführt (siehe 2.2.1.11), um die genomische DNA aus *Synechocystis sp. PCC 6803* für die Polymerase zugänglicher zu machen. Danach konnte nur der DNA-Abschnitt 1 (1511 bp) amplifiziert werden. Ein anderer DNA-Abschnitt

(297-4389 bp) von *Slr1759* wurde von Prof. Staiger (Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde eine überlappende PCR zwischen den beiden Abschnitten mittels des *high fidelity phusion* Enzyms durchgeführt (siehe 2.2.1.8). Dann wurde die gesamte gewünschte DNA-Sequenz von *Slr1759* mit den äußeren Primern spezifisch zusammenamplifiziert. Schließlich konnte die *Slr1759*-cDNA durch *Gateway*-Klonierung (BP- und LR-Reaktion) in die passenden Vektoren kloniert werden (siehe 2.2.1.15).



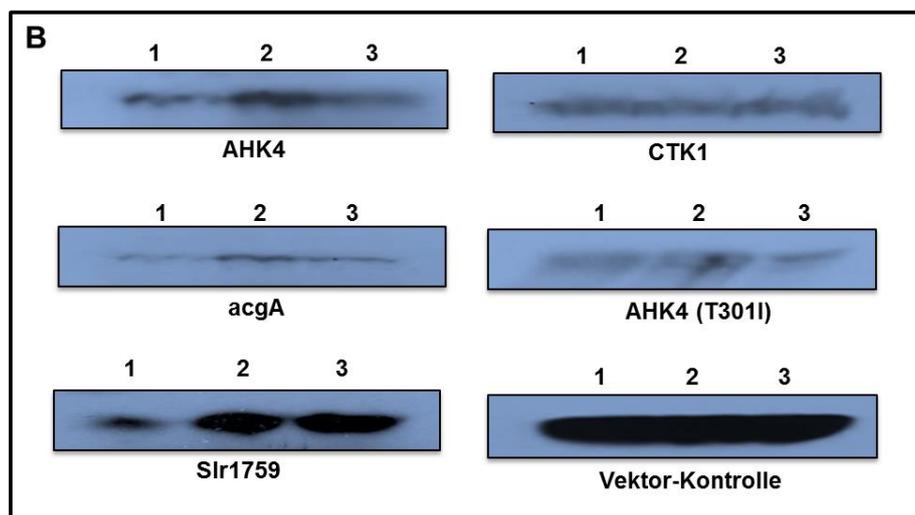
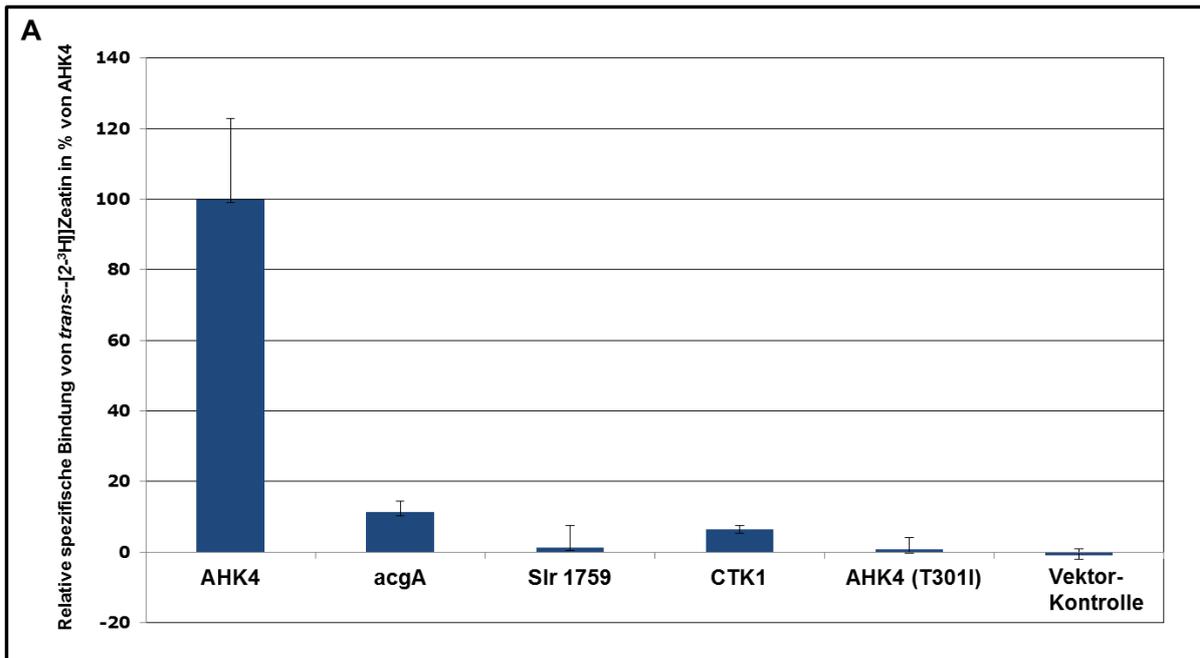
**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Klonierung von *Slr1759*.** *Slr1759* wurde mittels der überlappenden PCR aus genomischer DNA amplifiziert (siehe 2.2.1.8). **A:** Um die genomische DNA aus *Synechocystis sp. PCC 6803* für die Polymerase zugänglich zu machen, wurde zuerst ein enzymatischer Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *BsrGI* durchgeführt (siehe 2.2.1.11). **B:** Die cDNA wurde in drei einzelnen DNA-Abschnitten (1, 2 und 3) aufgeteilt und die spezifischen Primer für jeden Abschnitt wurden entworfen. Aber nur der DNA-Abschnitt 1 (1511 bp) konnte danach amplifiziert werden. Ein anderer DNA-Abschnitt (297-4389 bp) von *Slr1759* wurde von Prof. Staiger (Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt. **C:** Anschließend wurde eine überlappende PCR zwischen den beiden Abschnitten mittels des *high fidelity phusion* Enzyms durchgeführt (siehe 2.2.1.8). **D:** Dann wurde die gesamte gewünschte DNA-Sequenz von *Slr1759* mit den äußeren Primern spezifisch zusammenamplifiziert und schließlich konnte die *Slr1759*-cDNA durch *Gateway*-Klonierung (BP- und LR-Reaktion) in die passenden Vektoren kloniert werden (siehe 2.2.1.15).

Weil die *CTK1* genomische DNA 16 Introns enthält, wurde die *CTK1*-cDNA (3078 bp) kommerziell synthetisiert (GenScript, New Jersey, USA).

### 3.1.1.3 *In vivo* Cytokininbindungsassay der Rezeptoren *acgA*, *Slr1759* und *CTK1* in *E. coli*

Um die Funktionalität der CHASE Domäne der Rezeptoren *acgA*, *Slr1759* und *CTK1* mit Cytokinin zu untersuchen, wurde ein *in vivo* Bindungsassay mit den GST-getaggten Proteinen und *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin im *E. coli* Stamm KMI002 durchgeführt (siehe 2.2.2.12) (Mizuno and Yamashino, 2010). Die spezifische Cytokininbindung dieser drei Rezeptoren wurde mit der Bindungskapazität des Cytokininrezeptors AHK4 (Positivkontrolle) und mit der Bindungskapazität des leeren Vektors bzw. AHK4 (T301I) (Heyl *et al.*, 2007) (Negativkontrollen) verglichen und relativ zur Bindung von AHK4 (100 %) angegeben. Zwei Mitglieder der Klasse A, *acgA* und *CTK1*, zeigten eine sehr schwache Cytokininbindungsaktivität (11,33 % für *acgA*) und (6,42 % für *CTK1*), aber diese Aktivität war stärker als die Aktivität der Negativkontrollen AHK4 (T301I) (0,72 %) und Vektor-Kontrolle (0 %). Der Rezeptor *Slr1759* konnte keine spezifische Bindungsaktivität mit *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin zeigen (1,34 %) (Abb. 15A). Der Nachweis für die Expression der Fusionsproteine in den drei unabhängigen Bakterienkolonien (1, 2, 3), die in diesem Assay untersucht wurden, wurde durch Western-Blot (siehe 2.2.2.3) mit einem GST-(Glutathion S-transferase)-spezifischen Antikörper ermittelt (Abb. 15B). Diese Expressionsanalyse zeigte eine etwa gleich starke Expression der Proteine AHK4, *CTK1* und AHK4 (T301I), aber die Expression von *acgA* war schwächer. Für *Slr1759* wurde die stärkste Expression detektiert.

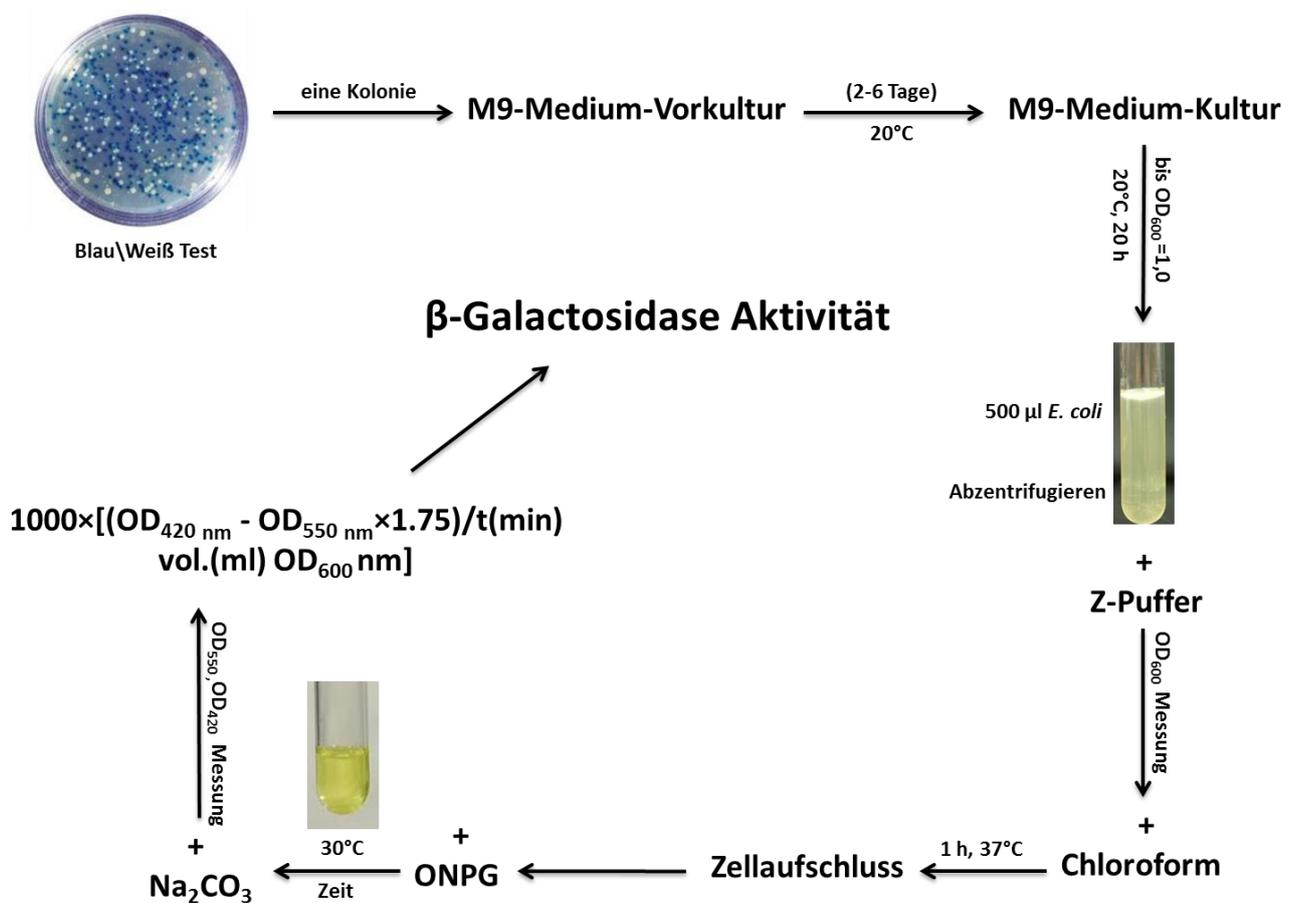
Insgesamt betrachtet, konnte für zwei putative Cytokininrezeptoren der Klasse A, *acgA* und *CTK1*, eine sehr schwache spezifische Bindungsaktivität für das Cytokinin *trans*-Zeatin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay beobachtet werden.



**Abbildung 15. Bestimmung der Cytokininbindungsaktivität der Rezeptoren acgA, Slr1759 und CTK1 mittels eines *in vivo* Bindungsassays. A:** Die drei Rezeptoren wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* (KMI002) exprimiert und deren spezifische Bindung mit *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin relativ zur Bindungsaktivität von AHK4 angegeben (siehe 2.2.2.12) (Mizuno and Yamashino, 2010). Als Positivkontrolle für den Bindungsassay wurde AHK4 und als Negativkontrolle wurde der leere Vektor bzw. AHK4 (T301I) verwendet. Der Assay wurde mit drei unabhängigen Bakterienkolonien für jeden Rezeptor durchgeführt und die Bindungsaktivität für jede Kolonie doppelt gemessen. **B:** Expressionskontrolle der Fusionsproteine in den drei unabhängigen Bakterienkolonien (1, 2, 3), die in A untersucht wurden. GST enthaltende Banden wurden mit einem GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe 2.2.2.3).

### 3.1.1.4 *E. coli* Komplementationsassay ( $\beta$ -Galactosidase Aktivität) für die Rezeptoren *acgA*, *Slr1759* und *CTK1*

Damit ein Protein als Cytokininrezeptor funktionieren kann, muss die Bindung vom Cytokinin im Zwei-Komponenten-System (ZKS) zur zellulären Antwort weiterleiten. Deshalb wurde die Funktionalität der drei putativen Cytokininrezeptoren von der Klasse A *acgA*, *Slr1759* und *CTK1* in einem bakteriellen Komplementationsassay überprüft. Der *E. coli* Komplementationsassay ( $\beta$ -Galactosidase assay) wurde nach Mizuno und Yamashino (2010) leicht modifiziert und wie in der Abbildung 16 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung des  $\beta$ -Galactosidase Assays.** Nach der Blau/Weiß-Selektion (siehe 2.2.2.13) wurde die M9-Medium-Vorkultur (siehe 2.1.6.1) mit einer blauen aktiven Kolonie beimpft und für zwei bis sechs Tage bei 20 °C im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Nach einer neuen Inkubation von der M9-Hauptkultur über Nacht bei 20 °C, wurde am nächsten Morgen ein Aliquot von den Zellen durch Zentrifugation gesammelt, in Z-Puffer (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 30,12 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und dann die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600 \text{ nm}}$ ) der Suspension direkt gemessen. Danach folgte der Zellaufschluss durch die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Chloroform und die Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C. Die Messung der  $\beta$ -Gal-Aktivität folgte anschließend bei 30 °C. Dazu wurde ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -Glucopyranosid) frisch im Z-Puffer (4 mg/ml) zugefügt. Um die Reaktion zu starten, wurde die ONPG-Lösung (100  $\mu\text{l}$ ) in das Reaktionsgefäß zugegeben. Wenn die Farbe der

Reaktionsmischung gelb wurde, wurde die Reaktion mit 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 ml) gestoppt. Die Reaktionszeiten wurden dann (sekundengenau) notiert, anschließend die optischen Dichten des Reaktionsgemischs bei OD<sub>420</sub> nm und OD<sub>550</sub> nm gemessen und schließlich die β-Galactosidase Aktivität in relativen Einheiten mit der folgenden Formel berechnet:  $1000 \times [(OD_{420 \text{ nm}} - OD_{550 \text{ nm}} \times 1,75) / t \text{ (min) vol. (ml) OD}_{600 \text{ nm}}]$  (modifiziert nach Mizuno and Yamashino, 2010).

Wenn ein putativer Cytokininrezeptor die Histidinkinase Mutation in diesem *E. coli* Zwei-Komponenten-System komplementieren und eine zelluläre Antwort bei verschiedenen Cytokininkonzentrationen zeigen kann (siehe 2.2.2.13), wird dieser Rezeptor als Cytokininrezeptor identifiziert. Als Positivkontrolle für den Assay wurde AHK4 und als Negativkontrolle wurde der leere Vektor bzw. AHK4 (T3011) (Heyl *et al.*, 2007) verwendet. Dieser Test wurde mit verschiedenen Cytokinin und Adenin in verschiedenen Konzentrationen (0,01; 1 und 10 μM) durchgeführt. Die Positivkontrolle AHK4 aus *Arabidopsis thaliana* zeigte hohe Aktivitäten mit den verwendeten Cytokinin (*tZ>iP>BA>cZ*). Adenin, das strukturell ähnlich zu Cytokinin aber biologisch nicht aktiv ist, konnte keine Antwort mit den getesteten Rezeptoren auslösen. Die drei putativen Rezeptoren *acgA*; *Slr1759* und *CTK1* zeigten keine Aktivität in diesem Assay und konnten damit das Cytokinin signal auf die nächsten Mitglieder dieses *E. coli* Zwei-Komponenten-Systems nicht übertragen (Abb. 17).

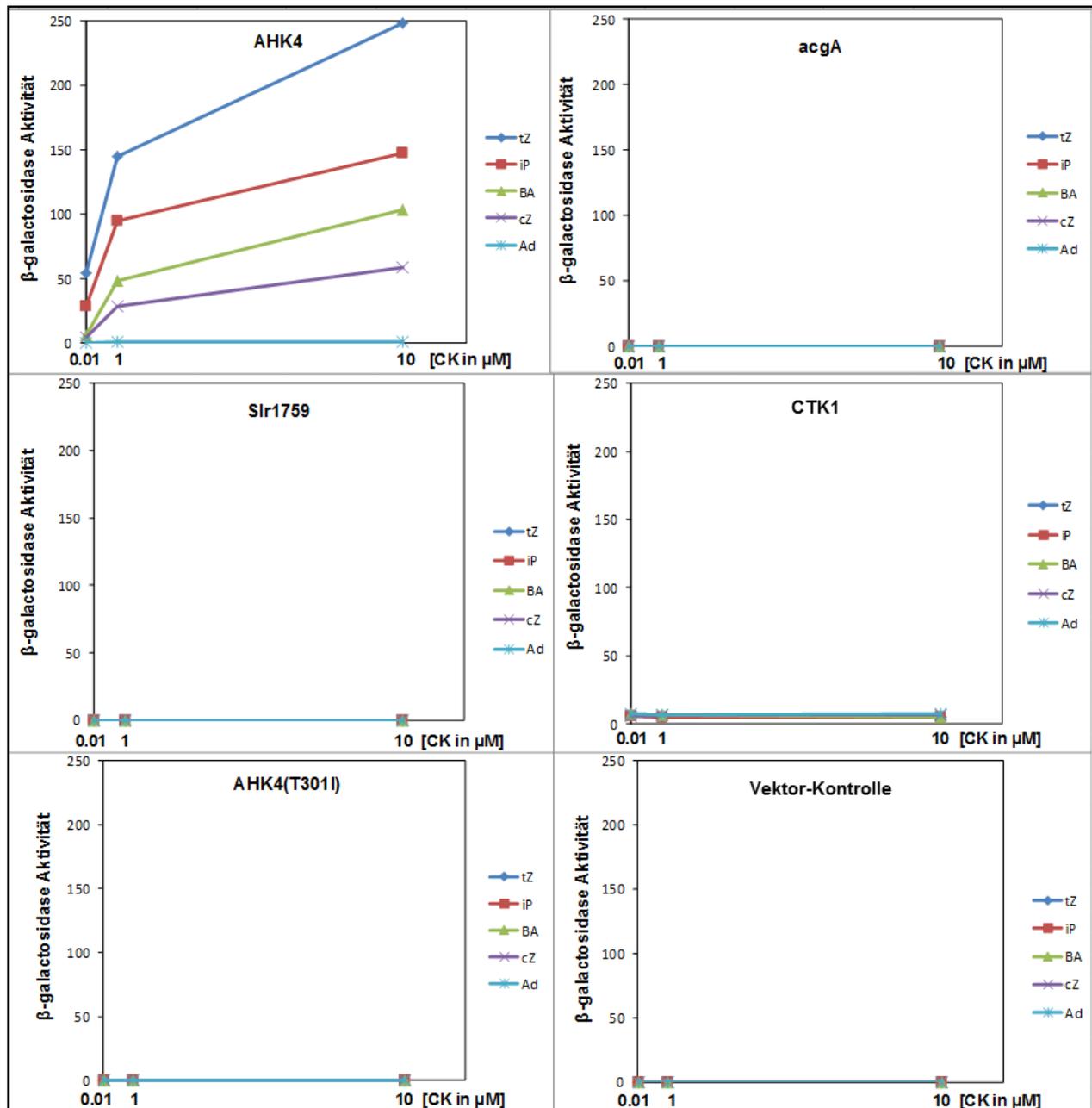


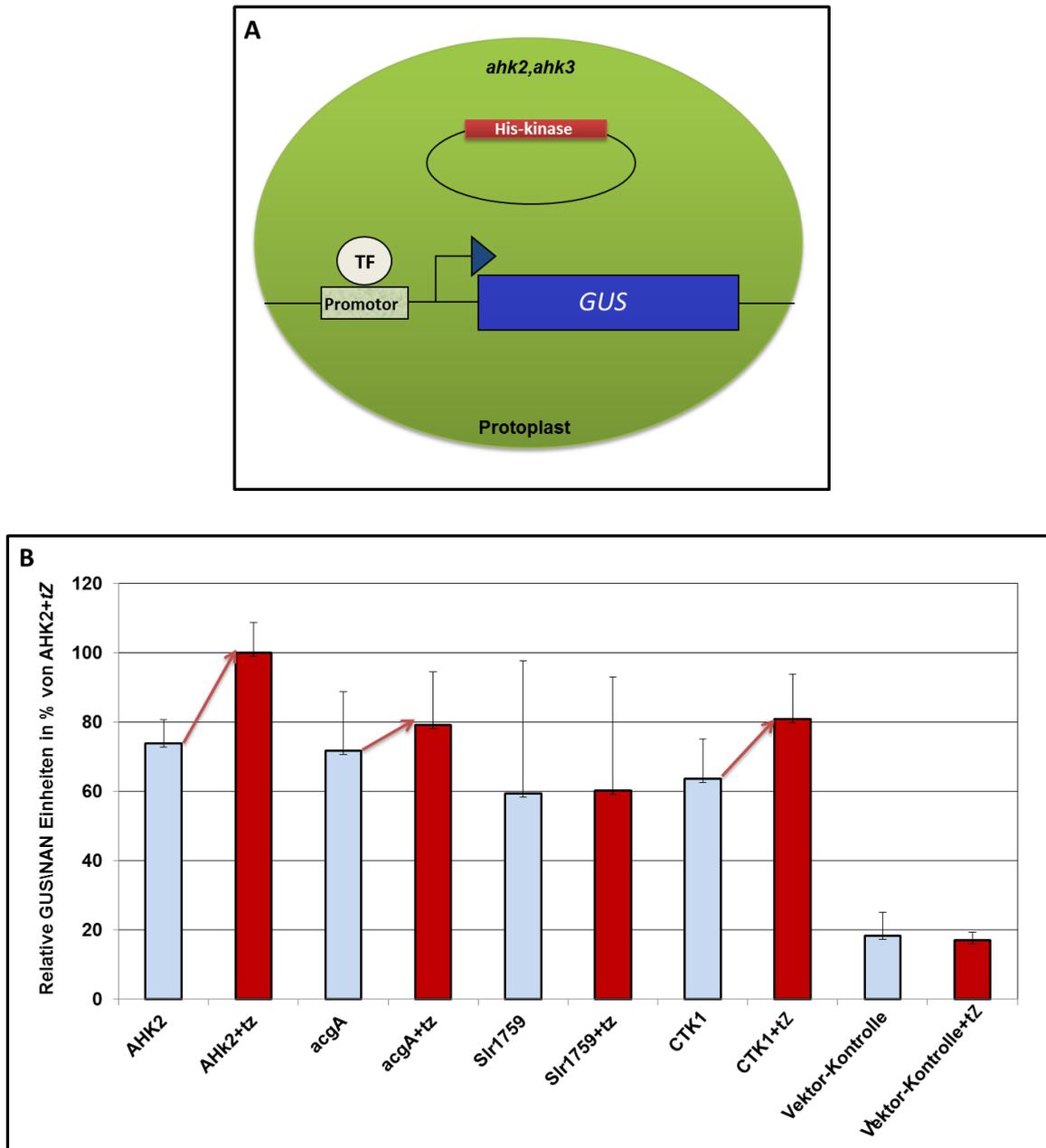
Abbildung 17: Die Aktivität der Rezeptoren von der Klasse A, *acgA*; *Slr1759* und *CTK1*, wurde durch einen Komplementationsassay im RCS-Phosphorylierungssystem im *E. coli* Stamm KMI002 mit verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen untersucht. Die Rezeptoren wurden in den Vektor pDEST15 kloniert und danach in *E. coli* Stamm KMI002 transformiert. Der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätstest wurde nach Mizuno und Yamashino (2010) leicht modifiziert durchgeführt. Als Positivkontrolle für den Assay wurde *AHK4* aus *Arabidopsis thaliana* verwendet und als Negativkontrollen wurde der leere Vektor und *AHK4* $\Delta$ T301I verwendet. Der Assay wurde mit drei unabhängigen Bakterienkolonien für jeden Rezeptor durchgeführt und die Aktivität für jede Kolonie doppelt gemessen. Die Rezeptoren wurden mit verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen getestet. Ade, Adenin; BA, Benzyladenin; cZ, *cis*-Zeatin; iP, Isopentenyl; tZ, *trans*-Zeatin.

### 3.1.1.5 Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) der Rezeptoren acgA, Slr1759 und CTK1

Um die Aktivität von den putativen Cytokininrezeptoren der Klasse A, acgA Slr1759 und CTK1, in Abhängigkeit von Cytokinin in Pflanzen zu überprüfen, wurde ein Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) mit diesen drei Rezeptoren, AHK2 als Positivkontrolle und dem leeren Vektor als Negativkontrolle in Mesophyllprotoplasten in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* (Riefler *et al.*, 2006) wie im Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Wenn ein putativer Cytokininrezeptor diese Mutationen komplementieren und das Cytokininsignal zur zellulären Antwort in diesem ZKS weiterleiten kann, wird ein positiver Einfluss für diesen Rezeptor auf die Cytokininsignaltransduktion bis zum *trans*-Aktivierungssignal erwartet (Abb. 18A). In diesem Fall sollten die mit Cytokinin induzierten Proben eine höhere Aktivität als die nicht induzierten Proben zeigen.

Die Aktivität von AHK2+tZ wurde als (100 %) gesetzt und alle anderen Werte sind als Prozent relativ zu AHK2+tZ angegeben. Die Positivkontrolle zeigte in diesem Assay die höchste Aktivität (100 % mit tZ und 73,76 % ohne tZ) und die höchste Induktion mit Cytokinin (0,26-fach). Der putative Rezeptor CTK1 konnte eine hohe Aktivität (80,76 % mit tZ und 63,65 % ohne tZ) und interessanterweise eine relativ hohe Induktion mit Cytokinin zeigen (0,17-fach). Der putative Rezeptor acgA zeigte auch eine hohe Aktivität (79,17 % mit tZ und 71,72 % ohne tZ), aber eine schwache Induktion mit Cytokinin (0,07-fach). Obwohl der putative Rezeptor Slr1759 aus *Synechocystis sp. PCC 6803* eine hohe Aktivität in diesem Assay (60,16 % mit tZ und 59,37 % ohne tZ) zeigen konnte, war diese Aktivität nicht von Cytokinin (tZ) abhängig (Induktion mit Cytokinin 0,007-fach), im Vergleich mit der Aktivität (2,48 % mit tZ und 6,72 % ohne tZ) bzw. mit der Induktion (-0,04-fach) der Negativkontrolle (Abb. 18B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass zwei Rezeptoren, acgA und CTK1, das Zwei-Komponenten-System (ZKS) in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* in Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) in Antwort auf Cytokinin (tZ) aktivieren konnten. Der putative Rezeptor Slr1759 zeigte in diesem Assay eine hohe Grundaktivität, aber diese Aktivität war nicht von Cytokinin (tZ) abhängig.

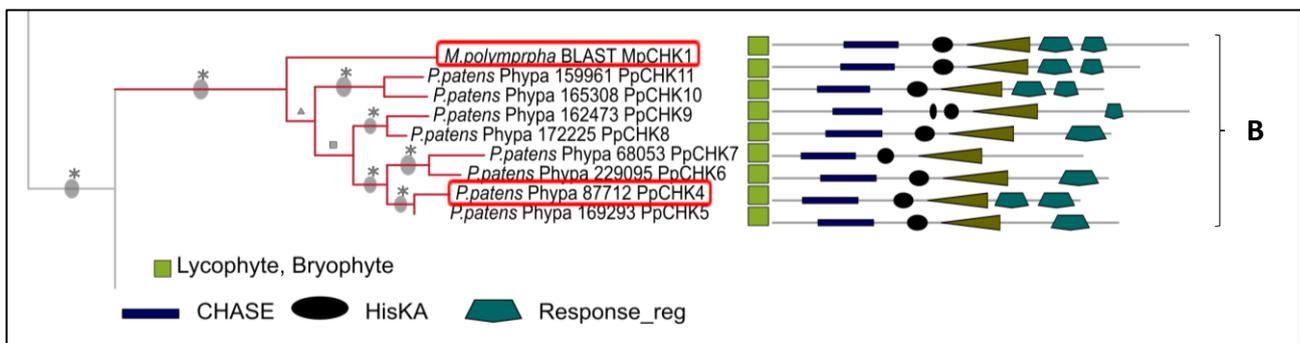


**Abbildung 18:** Die zwei putativen Rezeptoren *acgA* und *CTK1* konnten das ZKS in *ahk2-5/ahk3-7* *Knockout*-Mutanten aus *A. thaliana* im Protoplasten *trans*-Aktivierungsassay (PTA) in Abhängigkeit von Cytokinin aktivieren. **A:** Schematische Darstellung des Protoplasten-*trans* Aktivierungsassays (PTA) in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7*. Der hier verwendete Assay wurde *in vivo* in Mesophyllprotoplasten der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* (Riefler *et al.*, 2006) durchgeführt. Dazu wurden die Protoplasten zunächst aus *Arabidopsis* Rosettenblättern isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurden das Reporterkonstrukt (*GUS*), der Transkriptionsfaktor (TF) und der untersuchende putative Cytokininrezeptor (z.B. eine Histidinkinaserzeptor: His-Kinase) mittels PEG-vermittelter Transformation in die Protoplasten transformiert (siehe 2.2.5.1 und 2.2.5.2). **B:** Der Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) wurde wie im Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle und Negativkontrolle für den Assay wurde *AHK2* aus *Arabidopsis thaliana* bzw. der leere Vektor

verwendet. Der Assay wurde dreimal wiederholt und jede Messung als Duplikat durchgeführt. Die roten Pfeile zeigen die Induktion mit *trans*-Zeatin.

### 3.1.2 Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus der Klasse B mit divergierenden Aminosäuren in der CHASE Domäne und konservierten ZKS Domänen.

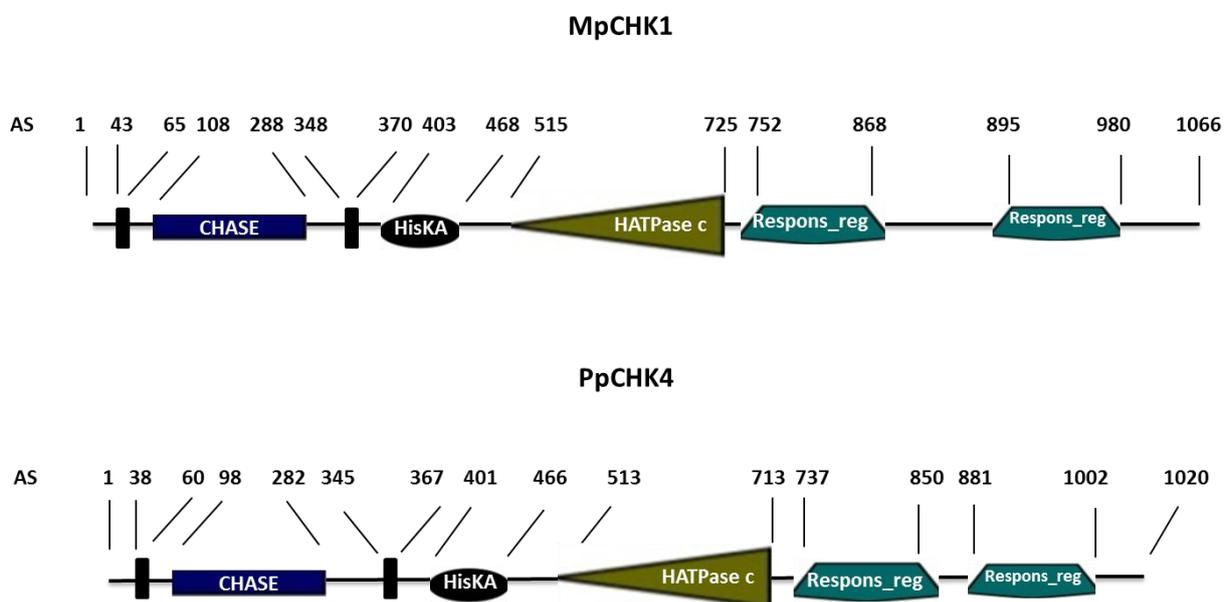
Eine phylogenetische Analyse zeigte eine Klasse von putativen Cytokininrezeptoren (Klasse B), die nur in den früh divergierenden Landpflanzen, in *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* gefunden, wurden (siehe 3.1) (Gruhn *et al.*, 2014). Um experimentell zu testen, ob Mitglieder dieser neuen Klasse als Cytokininrezeptoren funktionieren können, wurden zwei Proteine, MpCHK1 aus *Marchantia polymorpha* und PpCHK4 aus *Physcomitrella patens*, als Beispiele dieser Klasse ausgewählt. MpCHK1 (*Marchantia polymorpha* CHASE domain containing His kinase receptor1) ist der einzige entdeckte putative Cytokininrezeptor aus *Marchantia polymorpha* (die früheste divergierende Landpflanze in dieser Analyse). Für die drei PpCHKs aus *Physcomitrella patens* mit EST-Nachweis in *Physcomitrella patens* wurde ein putativer Cytokininrezeptor PpCHK4 (*Physcomitrella patens* CHASE domain containing His kinase receptor4) für weitere Analysen ausgewählt (Abb. 19)(Gruhn *et al.*, 2014).



**Abbildung 19: Klasse B eines phylogenetischen Baumes der CHASE Domäne.** Eine phylogenetische Analyse der CHASE Domäne zeigte eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren (Klasse B) mit divergierenden Aminosäuren in der CHASE Domäne und konservierten ZKS Domänen, die nur in den früh divergierenden Landpflanzen, in *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens*, gefunden wurden. Hier in der Abbildung ist nur ein Teilbereich der phylogenetischen Analyse (Abb. 8). Die roten Kästen markieren die Rezeptoren, die aus dieser Klasse in dieser Arbeit untersucht wurden: MpCHK1 aus *Marchantia polymorpha* (oberer Kasten) bzw. PpCHK4 aus *Physcomitrella patens* (unterer Kasten). Die Domänenstruktur der gesamten Proteine ist auf der rechten Seite dargestellt (modifiziert nach Gruhn *et al.*, 2014).

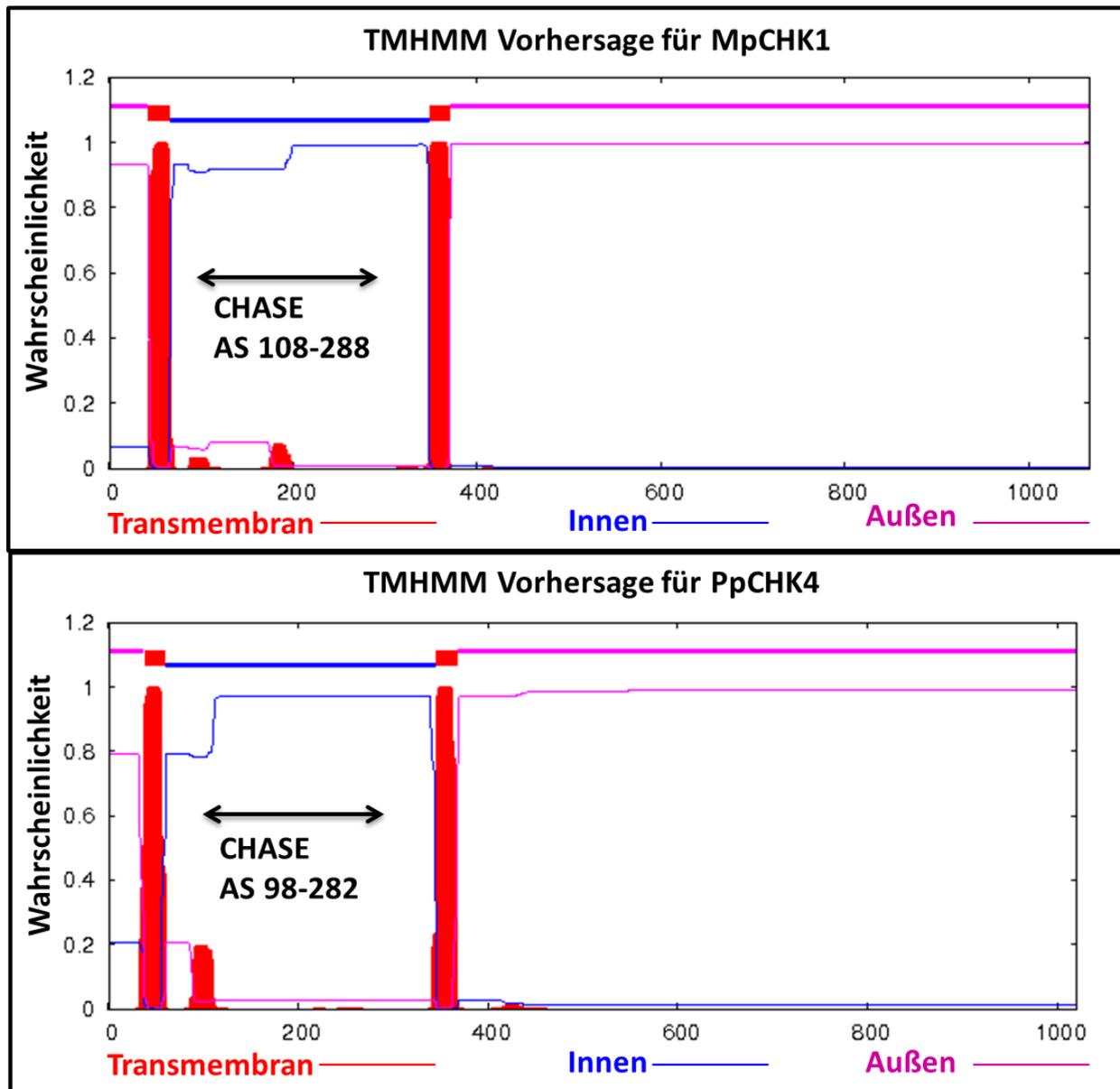
### 3.1.2.1 Bioinformatikanalyse der putativen Cytokininrezeptoren MpCHK1 und PpCHK4

Die Domänenstruktur der putativen Cytokininrezeptoren MpCHK1 und PpCHK4 wurden durch die Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>, Finn *et al.*, 2014) und den TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) analysiert. Beide Rezeptoren besitzen in ihrem N-terminalen Bereich eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular), die von zwei hydrophoben transmembranständigen Bereichen flankiert ist. Im cytoplasmatischen Teil beider Proteine befinden sich eine Histidinkinase A Domäne, eine Histidinkinase ähnliche ATPase Domäne und zwei *Receiver* Domänen (Abb. 20 und Abb. 21).



**Abbildung 20: Domänenstruktur der Rezeptoren MpCHK1 und PpCHK4.** Eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) mit zwei flankierenden hydrophoben transmembranständigen Domänen gehört zu den beiden Rezeptoren in ihrem N-terminalen Bereich. Im cytoplasmatischen Teil der Proteine befinden sich eine Histidinkinase A Domäne, eine Histidinkinase ähnliche ATPase Domäne und zwei *Receiver* Domänen sind. Die Abbildung wurde anhand der Vorhersagen der Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>, Finn *et al.*, 2014) und dem TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) erstellt, AS ist Aminosäurepositionen.

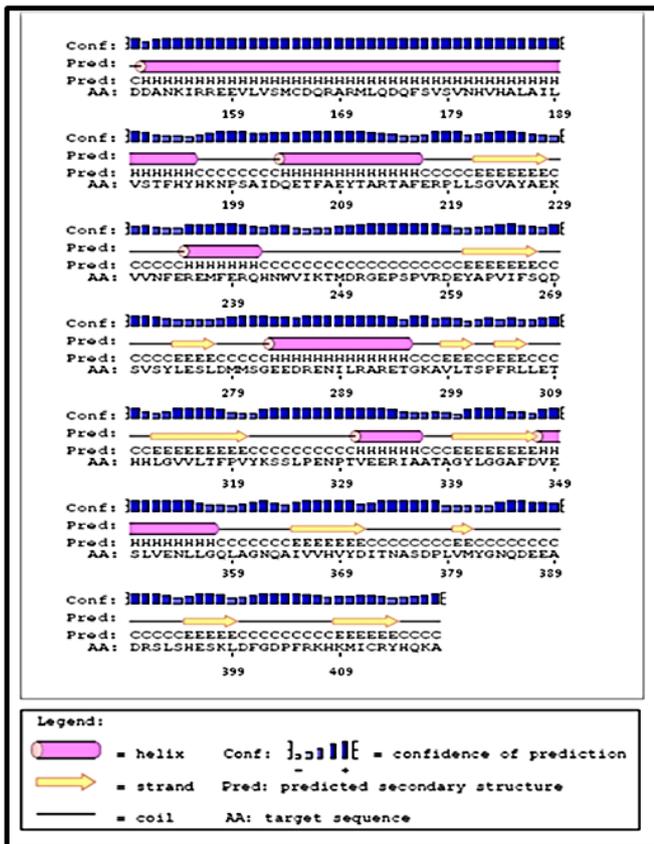
Die Wahrscheinlichkeit hydrophober Helices von MpCHK1 und PpCHK4 wurde anschließend durch den TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) analysiert. Die Analyse zeigte, dass die beiden Rezeptoren aus der Klasse B in ihrem N-terminalen Bereich zwei hydrophobe transmembranständige Domänen (TM Domänen) besitzen, die eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) umschließen (Abb.21).



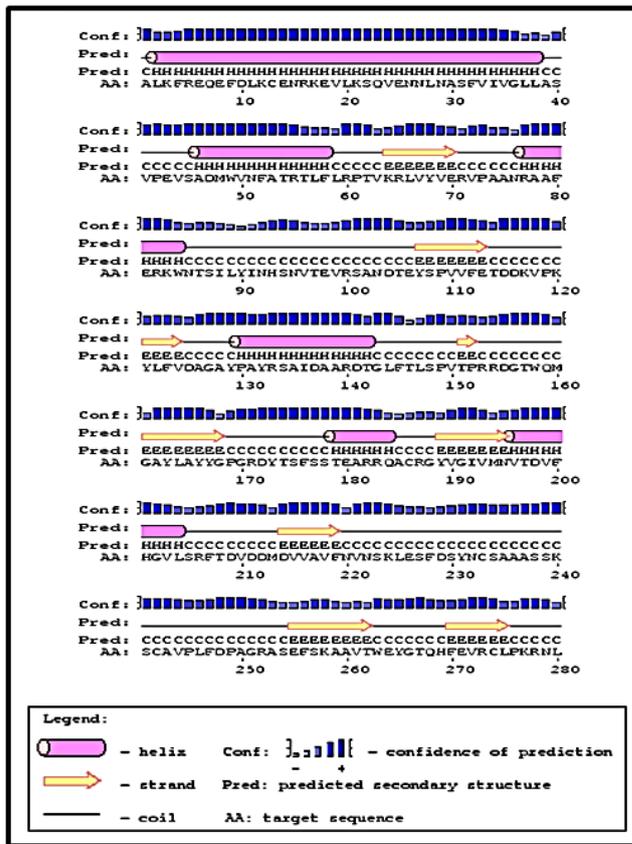
**Abbildung 21: Vorhersage hydrophober Helices der putativen Cytokininrezeptoren MpCHK1 und PpCHK4.** Die Primärstrukturen von MpCHK1 und PpCHK4 wurden mit Hilfe des TMHMM Servers v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) auf das Vorhandensein transmembranständiger Bereiche (dargestellt als rote Balken) überprüft.

Um Einblicke über die Sekundärstruktur von der CHASE Domäne der putativen Cytokininrezeptoren PpCHK4 und MpCHK1 zu gewinnen und mit der Sekundärstruktur von der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors AHK4 zu vergleichen, wurde die Vorhersage der Sekundärstruktur jeder CHASE Domäne mittels der PSIPred v3.4 Software (Buchan *et al.*, 2013) vorgenommen (Abb. 22).

### CHASE Domäne-AHK4



### CHASE Domäne -PpCHK4



### CHASE Domäne -MpCHK1

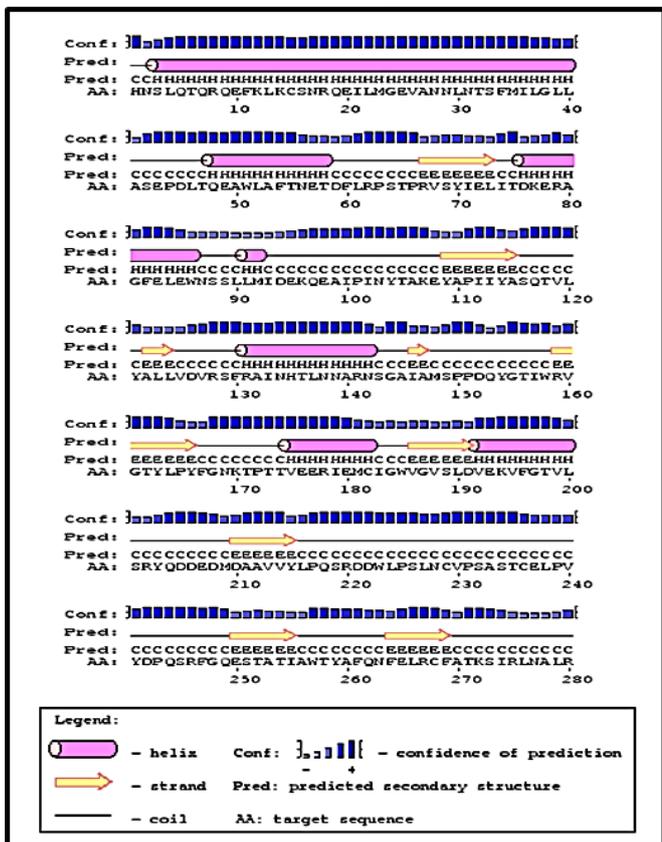


Abbildung 22: Vorhersage der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren AHK4, PpCHK4 und MpCHK1. Die Proteinsekundärstrukturvorhersage der CHASE Domänen erfolgte mittels der PSIPred v3.4 Software (Buchan *et al.*, 2013).

Anhand der Vorhersage (Abb. 22) wurden schließlich die prozentualen Anteile an der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren PpCHK4 und MpCHK1 berechnet und mit den prozentualen Anteilen an der Sekundärstruktur der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors verglichen (Tabelle 21).

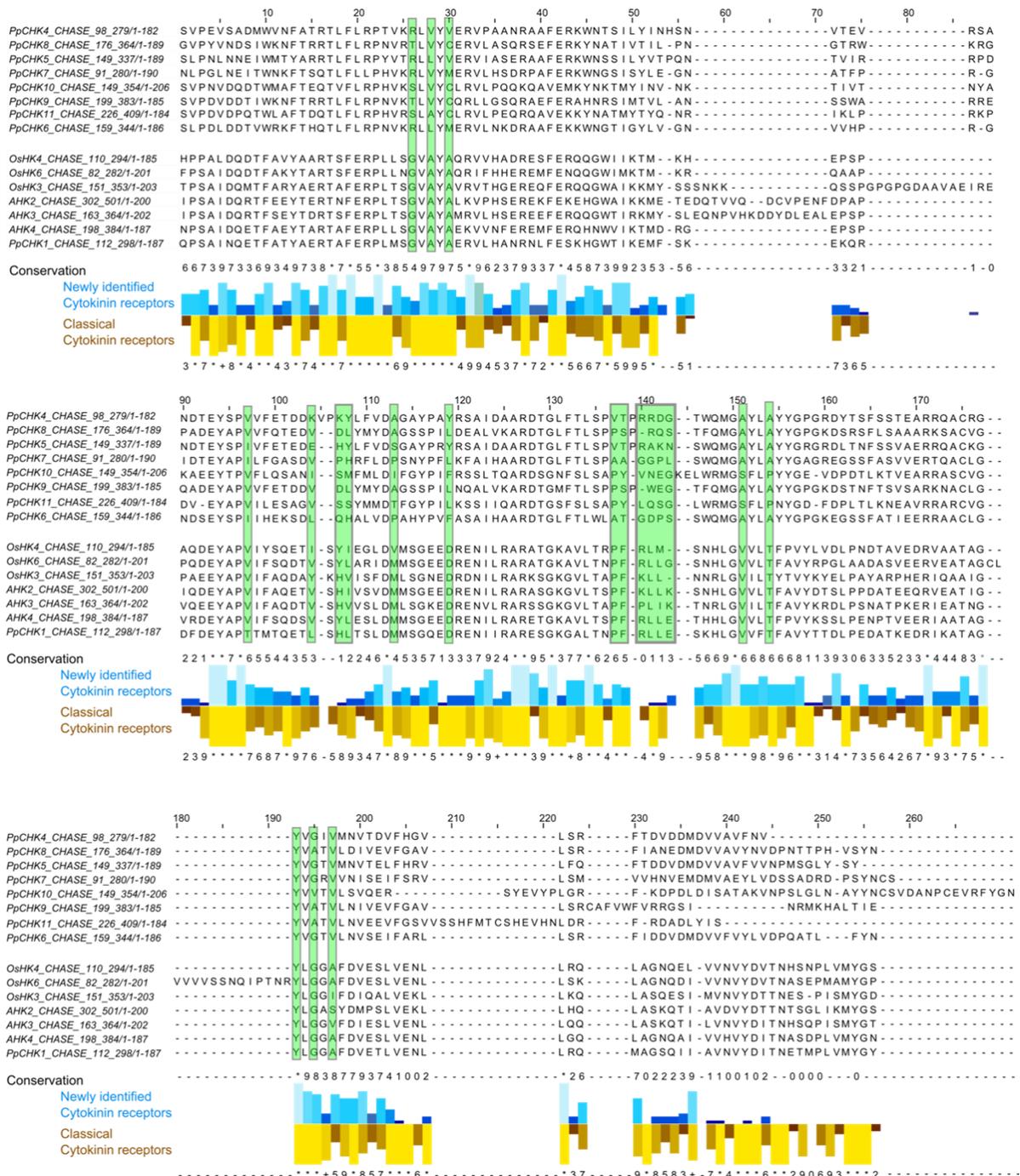
**Tabelle 21: Die prozentualen Anteile an der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren AHK4, PpCHK4 und MpCHK1.**

Prozentuale Anteile an der Sekundärstruktur (PSIPRED v3.4)	CHASE Domäne-AHK4	CHASE Domäne-PpCHK4	CHASE Domäne-MpCHK1
<b><math>\alpha</math>-Helix (%)</b>	17,64	20	21,87
<b><math>\beta</math>-Faltblatt (%)</b>	32,35	30	28,12
<b>Coil (%)</b>	50	50	50

Die CHASE Domänen der Rezeptoren PpCHK4, MpCHK1 und AHK4 weisen ähnliche prozentuale Anteile der Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *Coil*) in der Vorhersage auf (Abb. 22; Tabelle 21). Alle CHASE Domänen haben die gleiche lange  $\alpha$ -Helix im N-Terminalen Bereich des Proteins, die für die Struktur-Stabilität der CHASE Domäne beim AHK4 Rezeptor wichtig ist (Hothorn *et al.*, 2011). Interessanterweise zeigte die phylogenetische Analyse divergierende Aminosäuren in der CHASE Domäne der putativen Cytokininrezeptoren PpCHK4 und MpCHK1 im Vergleich mit den Aminosäuren der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors, die für die Cytokininbindung wichtig sind (Abb. 8) (Gruhn *et al.*, 2014).

Ein detaillierter Vergleich über die Konservierung von den Aminosäuren der CHASE Domänen zwischen den neuen (Klasse B) und den klassischen Cytokininrezeptoren (Klasse C) der phylogenetischen Analyse der CHASE Domäne, und zwischen den Rezeptoren in jeder Klasse wurde von Gruhn und Kollegen durchgeführt (Abb. 23) (Gruhn *et al.*, 2015). Diese Analyse zeigte moderate Niveaus der Ähnlichkeit zwischen den neuen und den klassischen Cytokininrezeptoren (zwischen 38 und 48 % Aminosäureidentität). Aber die klassische und auch die neue identifizierte Klasse zeigten ein höheres Niveau der Konservierung untereinander (71-96 % bzw. 47-81 %) (mit einem niedrigen Konservierungsgrad in der neuen Klasse). Eine Analyse zwischen den Mitgliedern

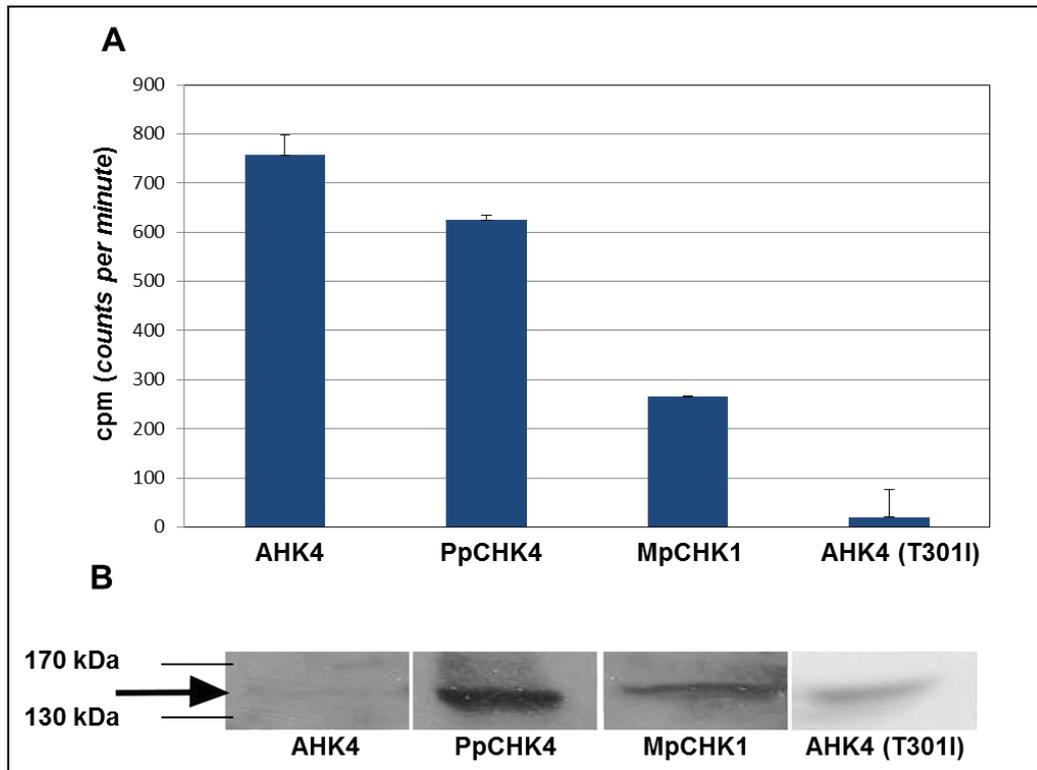
der beiden Rezeptorfamilien zeigte viele Bereiche innerhalb der CHASE Domänen der klassischen Rezeptoren, in denen die Aminosäuresequenzen identisch oder sehr ähnlich sind. Aber in diesen Bereichen sind nur wenige Reste der CHASE Domänen der neuen identifizierten Cytokininrezeptoren hoch konserviert. Diese Aminosäuren, die in den beiden diversen Klassen konserviert sind, sind für die Funktionalität der Rezeptoren mit Cytokinin wahrscheinlich wichtig und gute Kandidaten und für weitere Untersuchungen. Die CHASE Domäne Reste, die für die Cytokininbindung der klassischen Cytokininrezeptoren wichtig sind (Heyl *et al.*, 2007; Hothorn *et al.*, 2011), zeigten ein niedrigeres Niveau der Konservierung zwischen den Mitgliedern der neuen Rezeptorfamilie (6,5 % Identität), aber diese Konservierung ist bei den klassischen Rezeptoren deutlich höher (50 %). 19 Aminosäuren am C-terminalen Ende der CHASE Domänen (Positionen 238 bis 256), die hoch in der klassischen Rezeptorfamilie konserviert sind, zeigten keine Konservierung zwischen den neuen identifizierten Cytokininrezeptoren (Abb. 23).



**Abbildung 23: Konservierung der Aminosäuren zwischen den CHASE Domänen der neuen identifizierten und der klassischen Cytokininrezeptoren.** Alle CHASE Domänen wurden in einem einzigen multiplen Sequenz-Alignment mit MAFFT (Katoh *et al.*, 2009) ausgerichtet. Konservierung wurde mittels Jalview 2,719 für die beiden Gruppen unabhängig abgeleitet. Blau zeigt die Konservierung innerhalb der neuen identifizierten Rezeptoren und braun zeigt die Konservierung innerhalb der klassischen Cytokininrezeptoren. Der *conservation Score* ist in Zahlen von 0 (die niedrigste) bis 10 (die höchste) angegeben. Höhe der Balken: Höhere Balken stellen eine höhere Aminosäurekonservierung dar. Die leichteste Farbe repräsentiert die stärkste Konservierung und die dunkle Farbe repräsentiert die niedrigste Konservierung. Die grün markierten Reste repräsentieren die Aminosäuren, die wichtig für die Cytokininbindung in der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors sind (Hothorn *et al.*, 2011; Gruhn *et al.*, 2015).

### 3.1.2.2 Ein *in vivo* Cytokininbindungsassay demonstrierte die Cytokininbindungsaktivität von zwei Mitgliedern der Klasse B, MpCHK1 und PpCHK4

Um experimentell zu testen, ob die CHASE Domänen der ausgewählten Rezeptoren der Klasse B, PpCHK4 und MpCHK1, Cytokinin binden können, wurde ein *in vivo* Bindungsassay mit den GST-getaggten Proteinen und *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin im *E. coli* Stamm KMI002 durchgeführt (siehe 2.2.2.12) (Mizuno and Yamashino, 2010). Die *PpCHK4* (3063 bp) und *MpCHK1* (3201 bp) konnten nicht kloniert werden, deshalb wurden kommerziell synthetisiert (GenScript, New Jersey, USA). Die spezifische Cytokininbindung beider Rezeptoren wurde mit der Bindungskapazität des Cytokininrezeptors AHK4 aus *Arabidopsis thaliana* (Positivkontrolle) und mit der Bindungskapazität von AHK4 (T301I) (Negativkontrolle) verglichen. Dieser Assay zeigte starke Cytokininbindungsaktivität des Moos-Rezeptors PpCHK4 mit *trans*-Zeatin im Vergleich mit der Bindung des AHK4 Rezeptors, der die stärkste Cytokininbindungsaktivität zeigen konnte. Für MpCHK1 war die Cytokininbindung schwächer als PpCHK4 aber deutlich stärker als die detektierte Bindung der Negativkontrolle AHK4 (T301I) (Abb. 24A). Der Nachweis der Expression der Fusionsproteine wurde durch Western-Blot (siehe 2.2.2.3) mit einem GST-(Glutathion S-transferase)-spezifischen Antikörper bestätigt. Die Expressionsanalyse zeigte eine starke Expression von PpCHK4, aber die Expression von MpCHK1 und AHK4 (T301I) war schwächer. Obwohl der Rezeptor AHK4 am schwächsten exprimiert wurde, konnte die stärkste spezifische Bindung gezeigt werden, was für eine hohe Affinität dieses Rezeptors mit *trans*-Zeatin spricht (Abb. 24B). Aufgrund der verschiedenen Proteinexpressionsniveaus, ist der Vergleich der Bindungskapazität mit *trans*-Zeatin zwischen den verschiedenen Rezeptoren schwierig.

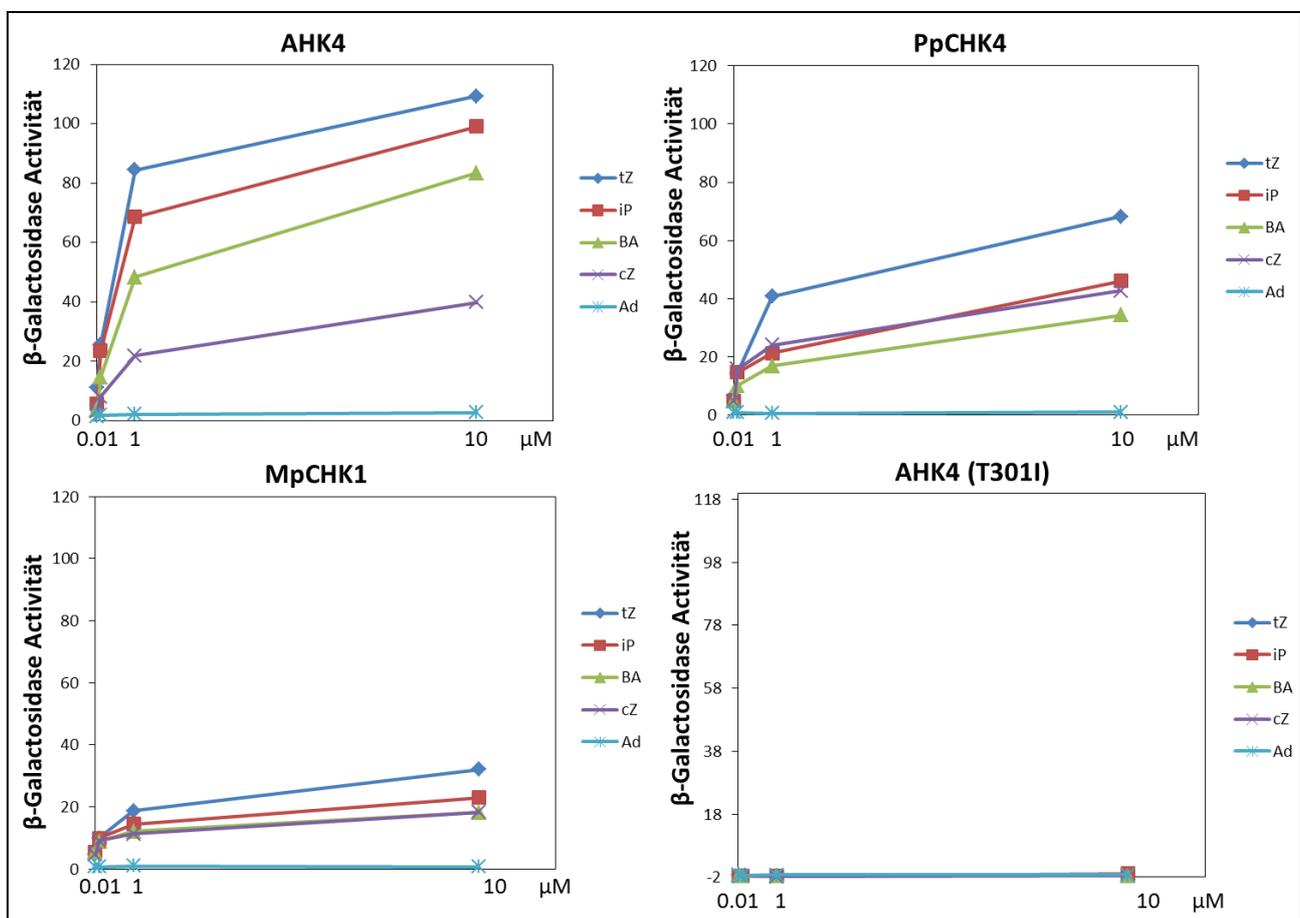


**Abbildung 24: In vivo Bindungsassay mit Cytokinin und zwei putativen Cytokininrezeptoren, MpCHK1 und PpCHK4, aus der Klasse B.** **A:** Beide Rezeptoren wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* (KMI002) exprimiert und deren spezifische Bindung mit *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin in cpm (*counts per minute*) bestimmt (siehe 2.2.2.12) (Mizuno and Yamashino, 2010). Als Positivkontrolle und Negativkontrolle für den Bindungsassay wurden AHK4 aus *Arabidopsis thaliana* bzw. AHK4 (T301I) verwendet. Der Assay wurde mit drei unabhängigen Bakterienkolonien für jeden Rezeptor durchgeführt und die Bindungsaktivität für jede Kolonie doppelt gemessen. **B:** Expressionskontrolle der Fusionsproteine, die in A untersucht wurden. GST-enthaltende Banden wurden mit einem GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe 2.2.2.3). Der Pfeil markiert die detektierte Bande von AHK4.

### 3.1.2.3 Die putativen Cytokininrezeptoren PpCHK4 und MpCHK1 konnten das Zwei-Komponenten-System (ZKS) *in vivo* aktivieren

Die Funktionalität der putativen Cytokininrezeptoren, PpCHK4 und MpCHK1, von der Klasse wurde in einem bakteriellen Komplementationsassay überprüft. Der *E. coli* Komplementationsassay ( $\beta$ -Galactosidase Assay) wurde leicht modifiziert, wie vorher beschrieben im Abschnitt 2.2.2.13, durchgeführt (Mizuno und Yamashino, 2010). Wenn ein putativer Cytokininrezeptor die Histidinkinase Mutation komplementieren und eine zelluläre Antwort bei verschiedenen Cytokininkonzentrationen in diesem *E. coli* Zwei-Komponenten-System zeigen kann, wird dieser Rezeptor als Cytokininrezeptor identifiziert. Als Positivkontrolle für den Assay wurde AHK4 und als Negativkontrolle wurde der leere Vektor bzw. AHK4 (T301I) verwendet. Dieser Test wurde mit

verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen (0,01; 1 und 10  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Die Positivkontrolle AHK4 aus *Arabidopsis thaliana* zeigte die höchsten Aktivitäten und verschiedene Affinitäten mit den verwendeten Cytokinin- ( $tZ>iP>BA>cZ$ ). Adenin, das strukturell ähnlich zu Cytokinin aber biologisch nicht aktiv ist, konnte keine Antwort mit den getesteten Rezeptoren auslösen. Beide putativen Cytokininrezeptoren, PpCHK4 und MpCHK1, konnten das Reporter-gen in einer konzentrationsabhängigen Weise in diesem System aktivieren, aber im höheren Niveau für PpCHK4 und im niedrigeren Niveau für MpCHK1. Die höchste Reporter-genaktivität wurde für die beiden Rezeptoren gefunden, wenn *trans*-Zeratin verwendet wurde (Abb. 25). Die gemessenen Reporter-genaktivitäten nach der Behandlung mit den anderen getesteten Cytokinin- zeigten ähnliche Aktivitäten, deshalb konnte keine Aussage über die Bindungsaffinitäten von PpCHK4 und MpCHK1 mit einigen Cytokinin- gezogen werden. Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die beiden putativen Cytokininrezeptoren aus der Klasse B, MpCHK1 und PpCHK4, das Reporter-gen spezifisch als Reaktion auf verschiedene Cytokinin- mit verschiedenen Konzentrationen im Vergleich mit der Negativkontrolle AHK4 (T3011) aktivieren konnten.

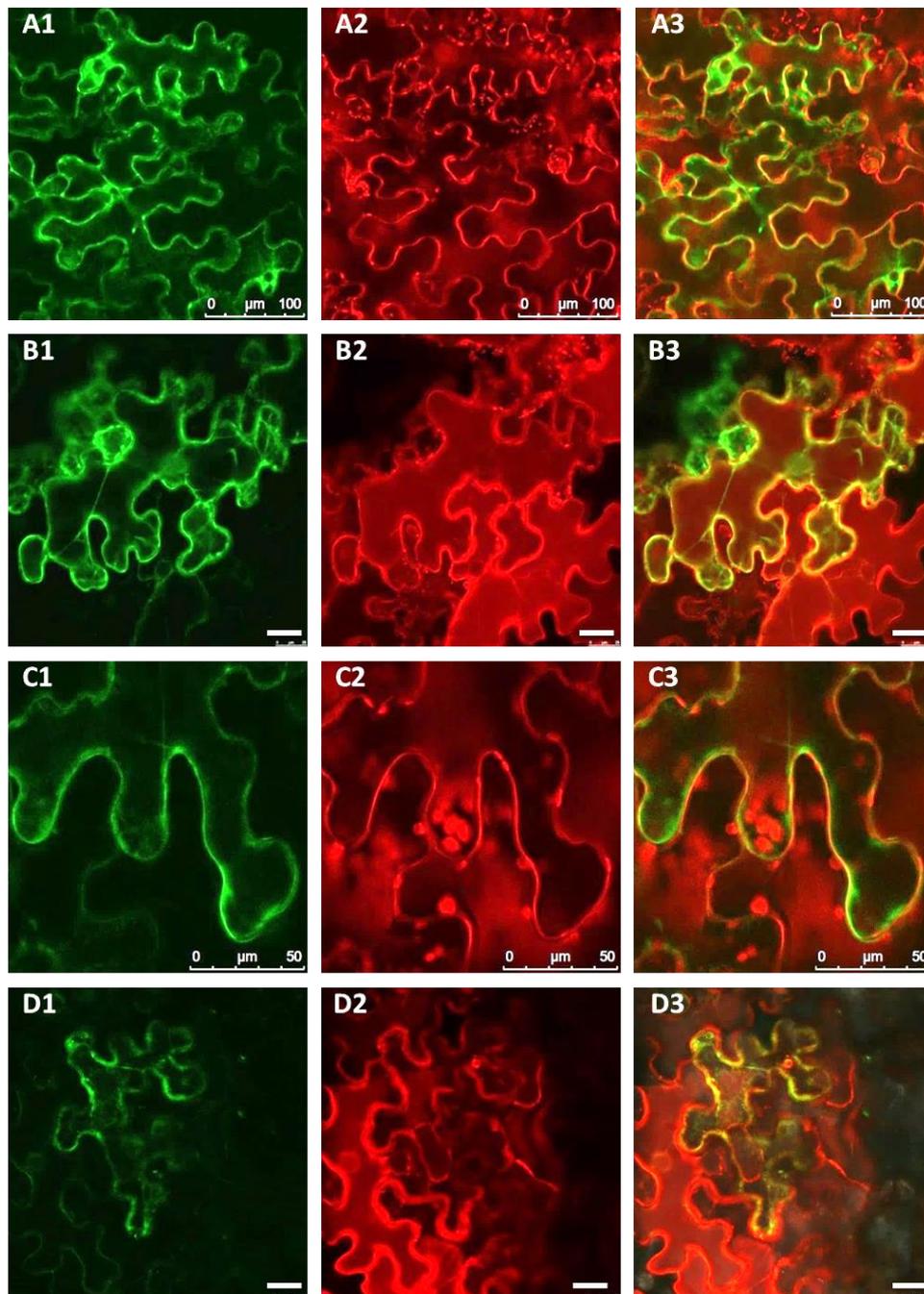


**Abbildung 25: Die Aktivität von MpCHK1 und PpCHK4 wurde durch einen *E. coli*-Komplementationsassay mit verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen untersucht.** Die Rezeptoren wurden im Vektor pDEST15 kloniert und danach in den *E. coli* Stamm KMI002 transformiert. Der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätstest wurde leicht modifiziert wie vorher beschrieben im Abschnitt 2.2.2.13, durchgeführt (Mizuno und Yamashino, 2010). Als Positivkontrolle und Negativkontrolle für den Bindungsassay wurden AHK4 aus *Arabidopsis thaliana* bzw. AHK4 (T301I) verwendet. Der Assay wurde mit drei unabhängigen Bakterienkolonien für jeden Rezeptor durchgeführt und die Aktivität für jede Kolonie doppelt gemessen. Die Rezeptoren wurden mit verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen getestet. Ade, Adenin; BA, Benzyladenin; cZ, *cis*-Zeatin; iP, Isopentenyl; tZ, *trans*-Zeatin.

### **3.1.2.4 Die Analyse der subzellulären Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteinen in Tabakepidermiszellen wies auf eine Lokalisation von MpCHK1 und PpCHK4 vorzugsweise im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran hin**

Um ein genaues Bild über die intrazelluläre Lokalisation der Cytokininrezeptoren PpCHK4 und MpCHK1 zu erhalten und mit der intrazellulären Lokalisation der klassischen Cytokininrezeptoren zu vergleichen, wurde die subzelluläre Lokalisation beider Proteine in Tabakepidermiszellen als Expressionssystem durchgeführt. Die Vektorkonstrukte, die N-terminale GFP-Fusionsproteine von MpCHK1 und PpCHK4 unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimieren, wurden in *Nicotiana benthamiana* Blätter transient transformiert (siehe 2.2.1.3). Nach der Infiltration wurden die Pflanzen sieben Tage inkubiert. Danach wurden die transformierten Pflanzen am konfokalen Mikroskop auf Expression der fluoreszierenden Proteine untersucht. Hierfür wurde GFP mit dem Argon-Laser bei 488 nm angeregt und die Emission bei 512 nm gemessen. Das mCherry ER-Markerprotein für Co-Lokalisationsstudien wurde bei 587 nm angeregt und die Emission bei 610 nm gemessen. Die Fluoreszenz vom Plasmamembranmarker-FM4-64 lag zwischen 625 nm und 665 nm (siehe 2.2.5.3). Die GFP-MpCHK1 Protein zeigte Fluoreszenzsignale in den perinukleären ähnlichen Regionen und zumindest partielle Co-Lokalisation mit dem ER-Markerprotein mCherry-HDEL (Abb. 26 B1-B3). In geringerem Umfang wurde auch eine Co-Lokalisation des Rezeptors mit der Plasmamembran Farbstoff FM4-64 erkannt (Abb. 26 A1-A3). Die Fluoreszenz von GFP-PpCHK4 lokalisiert auch in den gleichen Bereichen, die von dem ER-Markerprotein mCherry-HDEL markiert wurden (Abb. 26 D1-D3). Außerdem wurde auch ein mit der Plasmamembran co-lokalisiertes Signal erkannt (Abb. 26 C1-C3). Somit wies die subzelluläre Lokalisation mittels GFP-(*Green Fluorescent Protein*)-Fusionsproteine in Tabakepidermiszellen auf eine Lokalisation von MpCHK1 und PpCHK4 zum großen Teil im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran hin. Diese

subzelluläre Lokalisation ist ähnlich der vorher beschriebenen Lokalisation für die klassischen Cytokininrezeptoren (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011; Lomin *et al.*, 2011).



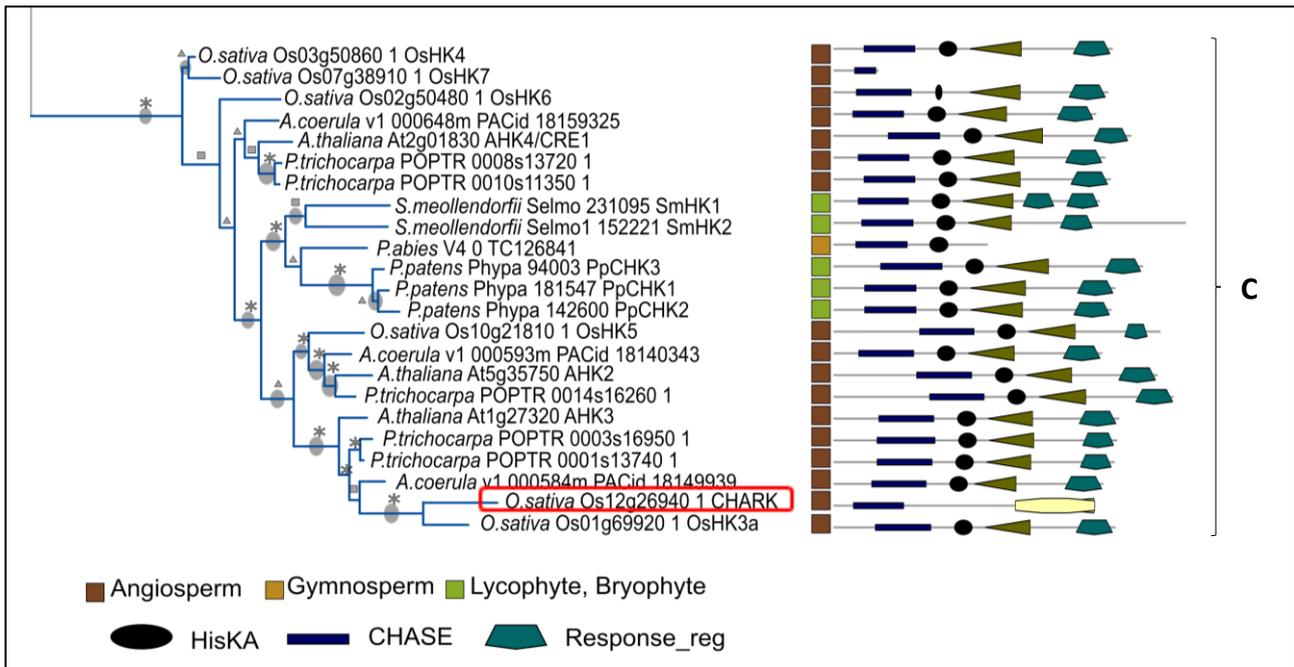
**Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation von GFP-MpCHK1 und GFP-PpCHK4 in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*.** Beide putativen Cytokininrezeptoren wurden als Fusionsproteine mit GFP unter Kontrolle des 35S-Promotors in Tabakblättern transient exprimiert. Die Fluoreszenz wurde sieben Tage nach der Infiltration in den vorbereiteten Blattepidermiszellen analysiert. A1 und B1 bzw. C1 und D1 repräsentieren die GFP-Fluoreszenz von GFP-MpCHK1 bzw. GFP-PpCHK4; A2 und C2 repräsentieren die Fluoreszenz vom

Plasmamembranmarker-FM4-64; B2 und D2 repräsentieren die Fluoreszenz vom mCherry ER-Markerprotein; A3, B3, C3 und D3 repräsentieren die Überlagerung von den ersten Fluoreszenzkanälen. Weißer Balken = 25  $\mu$ M.

### 3.1.3 Funktionelle Charakterisierung vom putativen Cytokininrezeptor CHARK (*CHASE domain Receptor-like serine/threonine Kinase*) aus *Oryza sativa*

Die phylogenetische Analyse der CHASE-Domänen-haltigen Proteine zeigte eine Klasse von klassischen Cytokininrezeptoren (Landpflanzen-Cytokininrezeptoren) mit hoher Konservierung in den Aminosäuren der CHASE Domäne und konservierten Zwei-Komponenten-System (ZKS) Domänen (Histidinkinase und Response-Regulator Domänen) (Klasse C) (siehe 3.1) (Gruhn *et al.*, 2014). Die meisten CHASE-Domänen-tragenden Proteine dieser Klasse sind bekannte aktive Hybrid-Histidinkinase-Cytokininrezeptoren und leiten das Cytokininsignal über das Zwei-Komponenten-System (ZKS) weiter. Die einzige Ausnahme ist CHARK (*CHASE domain Receptor-like serine/threonine Kinase*) aus *Oryza sativa*. Während die CHASE Domäne eng mit den CHASE Domänen der anderen Cytokininrezeptoren verwandt ist, weist CHARK nur eine Serin/Threonin Kinase und keine Histidinkinase Domäne und/oder *Receiver*-Domäne zur Signalweiterleitung auf (Abb. 27).

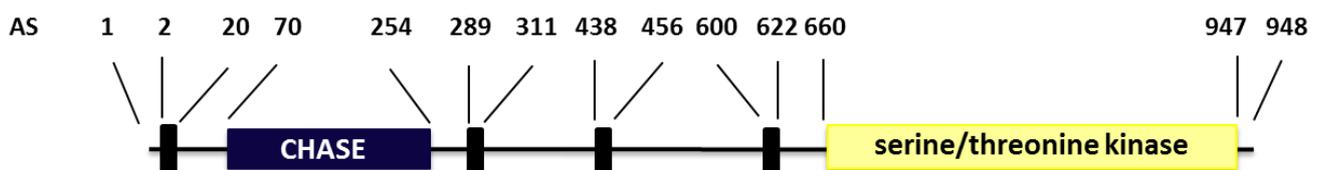
Um zu untersuchen, ob der atypische putative Cytokininrezeptor CHARK aus Reis einen alternativen Cytokininsignalweg gegenüber den klassischen Cytokininrezeptoren aufweist und wie dieses Signal mit der konventionellen Cytokininsignaltransduktion integriert ist, wurde die Aktivität dieses Rezeptors unter Verwendung verschiedener Assays in dieser Arbeit charakterisiert.



**Abbildung 27: Phylogenetische Analyse der CHASE-Domänen verschiedener Pflanzen (Klasse C).** Für die CHASE-Domäne tragenden Proteine aus verschiedenen Pflanzen wurde mit Hilfe der *Maximum Likelihood*-Methode ein Stammbaum berechnet. Hier in der Abbildung ist nur ein Teilbereich der phylogenetischen Analyse (Abb. 8). Die Domänenstruktur der gesamten Proteine ist auf der rechten Seite dargestellt (Domänen: HisKA = Histidinkinase; Response\_reg = Responseregulator; Pkinase = Ser/Thr Kinase). Der rote Kasten markiert den CHARK Rezeptor (*CHASE domain Receptor-like serine/threonine Kinase*) aus *Oryza sativa* (modifiziert nach Gruhn *et al.*, 2014).

### 3.1.3.1 Bioinformatikanalyse des Rezeptors

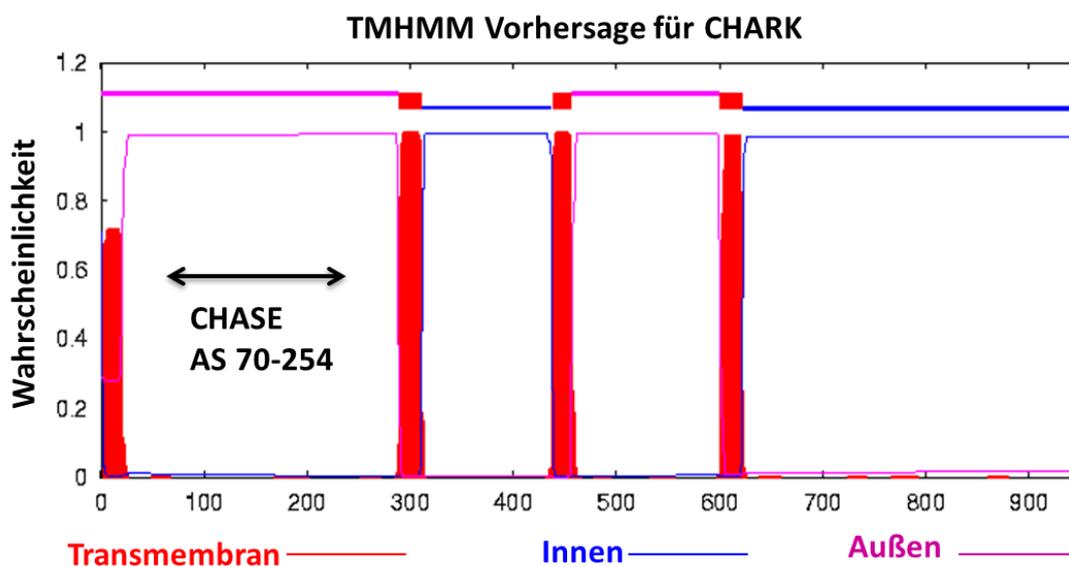
Die Domänenstruktur des putativen Cytokininrezeptors CHARK wurde durch die Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>, Finn *et al.*, 2014) und den TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) analysiert. Dieser Rezeptor besitzt in seinem N-terminalen Bereich eine CHASE Domäne (*C*yclase/*H*istidine-kinase-*A*ssociated *S*ensory *E*xtracellular), die von vier hydrophoben transmembranständigen Bereichen flankiert wird. Im cytoplasmatischen Teil befindet sich nur eine Ser/Thr Kinase Domäne (Abb. 28 und 29).



**Abbildung 28: Domänenstruktur des putativen Cytokininrezeptors CHARK.** Eine CHASE Domäne (*C*yclase/*H*istidine-kinase-*A*ssociated *S*ensory *E*xtracellular) mit vier flankierenden hydrophoben transmembranständigen Domänen gehört zu diesem Rezeptor in seinem N-terminalen Bereich. Im cytoplasmatischen Teil des Proteins befindet sich nur eine

Ser/Thr Kinase Domäne. Die Abbildung wurde anhand der Vorhersagen der Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>, Finn *et al.*, 2014) und dem TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) erstellt, AS ist Aminosäurepositionen.

Die Wahrscheinlichkeit hydrophober Helices des putativen Cytokininrezeptors CHARK wurde anschließend durch den TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) analysiert. Die Analyse zeigte, dass dieser Rezeptor in seinem N-terminalen Bereich vier hydrophobe transmembranständige Domänen (TM Domänen) besitzt und eine CHASE Domäne (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular), die von den N-terminalen TM Domänen flankiert ist (Abb. 29).

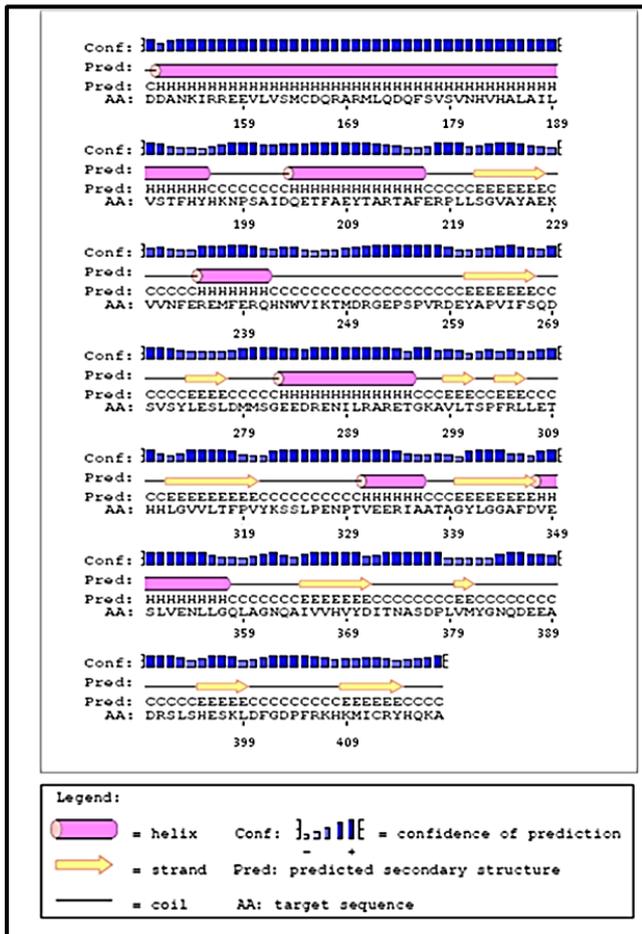


**Abbildung 29: Vorhersage hydrophober Helices des putativen Cytokininrezeptors CHARK.** Die Primärstruktur von CHARK wurde mit Hilfe des TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) auf das Vorhandensein transmembranständiger Bereiche (dargestellt als rote Balken) überprüft.

Um Einblicke über die Sekundärstruktur der CHASE Domäne des putativen Cytokininrezeptors CHARK zu gewinnen und mit der Sekundärstruktur der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors AHK4 zu vergleichen, wurde die Vorhersage der Sekundärstruktur der CHASE Domäne mittels der PSIPred v3.4 Software (Buchan *et al.*, 2013) vorgenommen (Abb. 30).

Anhand der Vorhersage (Abb. 30) wurden schließlich die prozentualen Anteile an der Sekundärstruktur der CHASE Domäne des putativen Cytokininrezeptors CHARK berechnet und mit den prozentualen Anteilen an der Sekundärstruktur der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors verglichen (Tabelle 22).

CHASE Domäne-AHK4



CHASE Domäne-CHARK

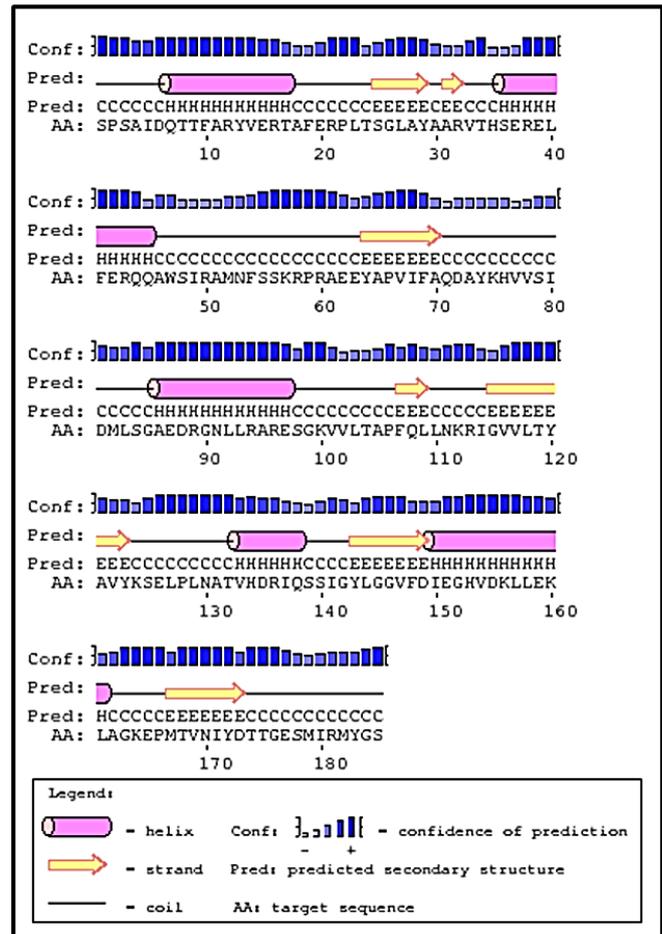


Abbildung 30: Vorhersage der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren AHK4 und CHARK. Die Proteinsekundärstrukturvorhersage der CHASE Domänen erfolgte mittels der PSIPred v3.4 Software (Buchan *et al.*, 2013).

Tabelle 22: Die prozentualen Anteile an der Sekundärstruktur der CHASE Domänen der Rezeptoren AHK4 und CHARK.

Prozentuale Anteile an der Sekundärstruktur (PSIPRED v3.4)	CHASE Domäne-AHK4	CHASE Domäne-CHARK
α-Helix (%)	17,64	20,83
β-Faltblatt (%)	32,35	29,16
Coil (%)	50	50

Die CHASE Domänen der Rezeptoren CHARK und AHK4 weisen ähnliche prozentuale Anteile der Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *Coil*) in der Vorhersage auf (Abb. 30; Tabelle 22). Die CHASE Domäne des CHARK Rezeptors ist kürzer als die CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors und ihr fehlen die lange  $\alpha$ -Helix im N-Terminalen Bereich und die letzten drei  $\beta$ -Faltblätter im C-Terminalen Bereich des Proteins, die für die Struktur der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors besonders wichtig sind (Hothorn *et al.*, 2011). In der Struktur der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors bildet die lange  $\alpha$ -Helix an der Membran einen Stiel, der für die Struktur-Stabilität wichtig ist, und das letzte  $\beta$ -Faltblatt verknüpft kovalent an die lange  $\alpha$ -Helix durch eine Disulfidbrücke, die die flankierenden Membran-Helices in enge Nachbarschaft bringt (Hothorn *et al.*, 2011). Interessanterweise zeigte die phylogenetische Analyse einen hohen Konservierungsgrad in den Aminosäuren der CHASE Domäne des CHARK Rezeptors im Vergleich mit den Aminosäuren der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors, die für die Cytokininbindung wichtig sind (Abb. 8) (Gruhn *et al.*, 2014). Um besser zu verstehen, ob die CHASE Domäne des putativen Cytokininrezeptors CHARK unterschiedliche strukturelle Anordnung in der Tertiärstruktur als die kristallisierte Tertiärstruktur der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors besitzt und ob diese CHASE Domäne Cytokinin in andere Weise als die CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors bindet, ist die Kristallisation und die Lösung der Tertiärstruktur dieser Domäne entscheidend.

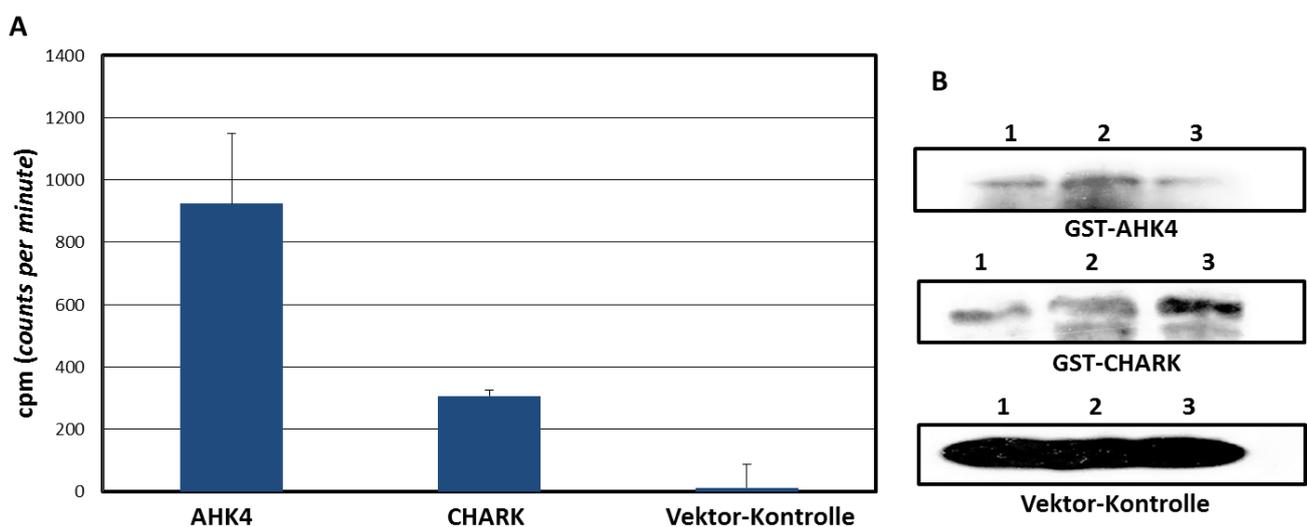
### 3.1.3.2 Die *CHARK*-cDNA konnte aus genomischer DNA kloniert werden

Die Analyse von *CHARK* genomischer DNA zeigte, dass *CHARK* keine Introns enthält, deshalb wurde *CHARK*-cDNA mittels der *Touchdown* PCR (TD-PCR) aus *Oryza sativa* genomischer DNA (Geschenk von Dr. Ramireddy) amplifiziert (siehe 2.2.1.8). Schließlich wurde das amplifizierte *CHARK* durch Gateway-Klonierung (BP- und LR-Reaktion) in die passenden Vektoren kloniert (siehe 2.2.1.15). Die bioinformatischen Analysen für die *CHARK* DNA-Sequenz wurde mit den Genbanken NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Phytozome v10 (<http://www.phytozome.net/chlamy.php>) und UniProt (<http://www.uniprot.org/>) durchgeführt.

### 3.1.3.3 Ein *in vivo* Cytokininbindungsassay demonstrierte die Cytokininbindungsaktivität von CHARK

Um experimentell zu testen, ob die CHASE Domäne des putativen Cytokininrezeptor CHARK als Cytokininrezeptor funktionieren kann, wurde ein *in vivo* Bindungsassay mit dem GST-getaggten Protein und *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin im *E. coli* Stamm KMI002 durchgeführt (siehe 2.2.2.12) (Mizuno und

Yamashino, 2010). Die spezifische Cytokininbindung dieses Rezeptors wurde mit der Bindungskapazität des Cytokininrezeptors AHK4 (Positivkontrolle) und mit der Bindungskapazität des leeren Vektors (Negativkontrolle) verglichen. Bei CHARK konnte eine schwache Bindung von Cytokinin im Vergleich mit der Bindung von AHK4 nachweisen werden, die deutlich über der Vektorkontrolle lag (Abb. 31A). Der Nachweis für die Expression der Fusionsproteine in den drei unabhängigen Bakterienkolonien (1, 2, 3), die in diesem Assay untersucht wurden, wurde durch Western-Blot (siehe 2.2.2.3) mit einem GST-spezifischen Antikörper ermittelt (Abb. 31B). Diese Expressionsanalyse zeigte ein gutes Expressionslevel von CHARK. Das Expressionslevel von AHK4 war ein bisschen schwächer. Insgesamt betrachtet, konnte für den putativen Cytokininrezeptor CHARK eine schwache spezifische Bindungsaktivität für das Cytokinin *trans*-Zeatin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay beobachtet werden.



**Abbildung 31: Bestimmung der Cytokininbindungsaktivität des CHARK Rezeptors mittels eines *in vivo* Bindungsassays.** **A:** Der putative Cytokininrezeptor CHARK wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* (KMI002) exprimiert und seine spezifische Bindung mit *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin bestimmt (siehe 2.2.2.12) (Mizuno and Yamashino, 2010). Als Positivkontrolle und Negativkontrolle für den Assay wurde AHK4 bzw. der leere Vektor verwendet. Der Assay wurde mit drei unabhängigen Bakterienkolonien für jeden Rezeptor durchgeführt und die Bindungsaktivität für jede Kolonie doppelt gemessen. **B:** Expressionskontrolle der Fusionsproteine in den drei unabhängigen Bakterienkolonien (1, 2, 3), die in A untersucht wurden. GST enthaltende Banden wurden mit einem GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe 2.2.2.3).

### 3.1.3.4 Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte das Signal von Cytokinin in einem *E. coli*-Komplementationsassay nicht zur zellulären Antwort weiterleiten

Um als Rezeptor zu funktionieren, muss die Bindung eines Liganden zu einer physiologischen Reaktion in der Zelle führen. Da mit der Ausnahme von CHARK alle Cytokininrezeptoren Histidinkinasen sind, wurde dieser Effekt in einem bakteriellen Komplementationsassay überprüft. Der *E. coli*-Komplementationsassay wurde, leicht modifiziert, nach Mizuno und Yamashino, 2010 durchgeführt (siehe 2.2.2.13). Als Positivkontrolle für den Assay wurde AHK4 und als Negativkontrolle wurde der leere Vektor verwendet. Dieser Test wurde mit verschiedenen Cytokinin und Adenin in verschiedenen Konzentrationen (0,01; 1 und 10  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Die Positivkontrolle AHK4 zeigte eine hohe Aktivität mit den verwendeten Cytokinin ( $tZ>iP>BA>cZ$ ). Adenin, das strukturell ähnlich zu Cytokinin aber biologisch nicht aktiv ist, konnte keine Antwort mit den getesteten Rezeptoren auslösen. Der putative Cytokininrezeptor CHARK zeigte keine Aktivität in diesem Assay und konnte damit das Cytokininsignal nicht auf die nächsten Mitglieder dieses Systems im Vergleich mit AHK4 und der Negativkontrolle übertragen (Abb. 32).

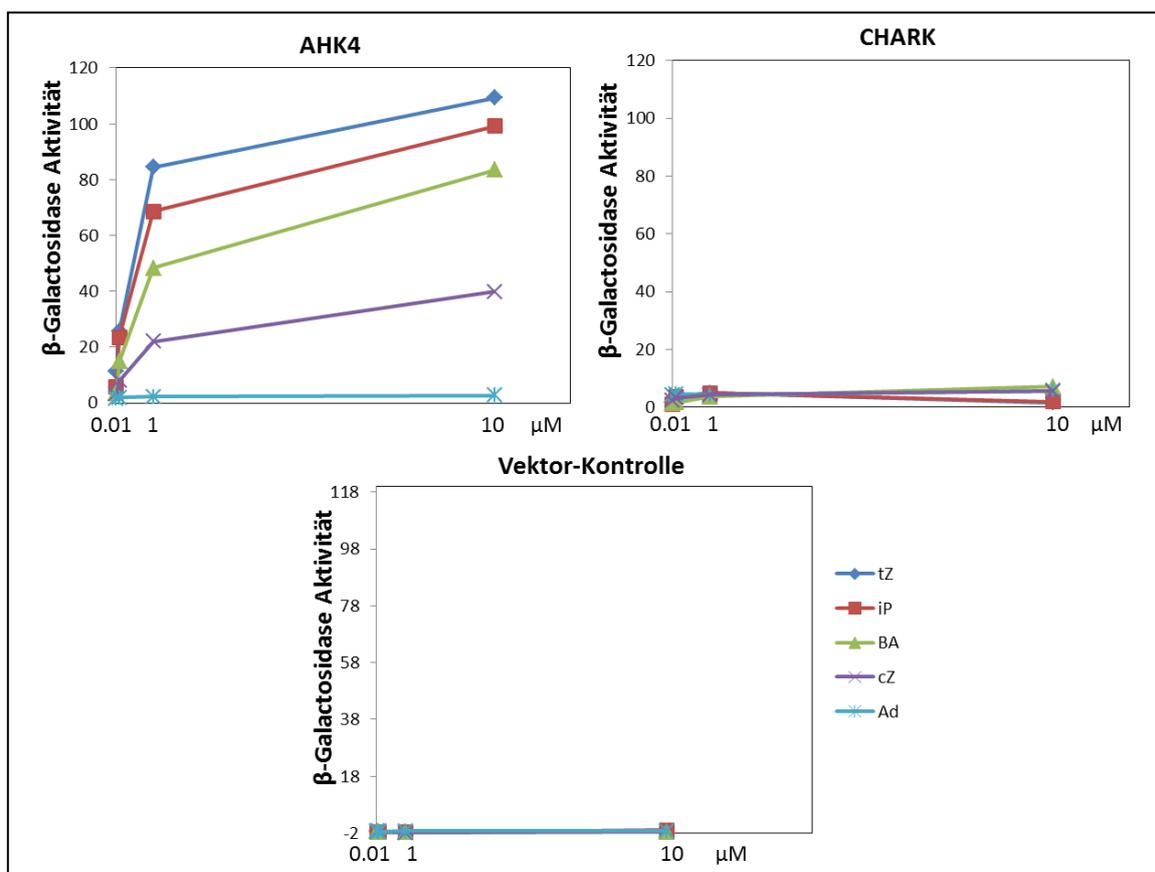


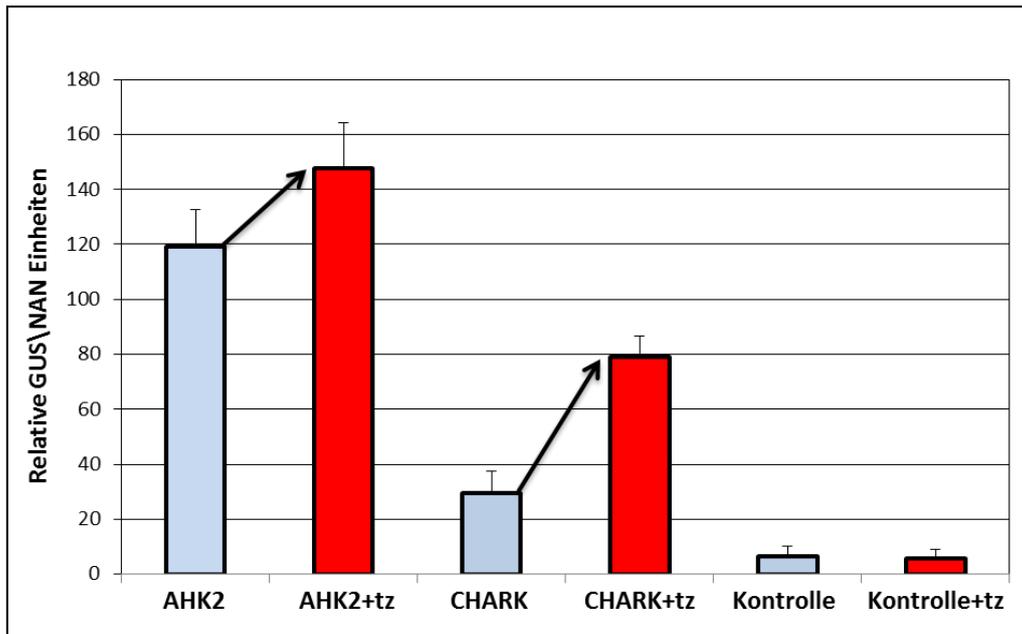
Abbildung 32: Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte die Mutation eines bakteriellen Histidinkinaserzeptors in einem *E. coli*-Komplementationsassay nicht ersetzen. Die Aktivität des CHARK Rezeptors wurde durch einen

Komplementationsassay im RCS-Phosphorylierungssystem, leicht modifiziert, nach Mizuno und Yamashino, 2010 untersucht. Als Positivkontrolle und Negativkontrolle für den Assay wurde AHK4 bzw. der leere Vektor verwendet. Der Assay wurde mit drei unabhängigen Bakterienkolonien für jeden Rezeptor durchgeführt und die Aktivität für jede Kolonie doppelt gemessen. Der CHARK Rezeptor bzw. die Kontrollen wurden mit verschiedenen Cytokinin- und Adenin-Konzentrationen getestet. Ade, Adenin; BA, Benzyladenin; cZ, *cis*-Zeatin; iP, Isopentenyl; tZ, *trans*-Zeatin.

### **3.1.3.5 Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte das Zwei-Komponenten-System (ZKS) in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* im Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) als Antwort für Cytokinin aktivieren**

Um die Aktivität des putativen Cytokininrezeptors CHARK in Abhängigkeit von Cytokinin in Pflanzen zu überprüfen, wurde ein Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) mit diesem Rezeptor, AHK2 als Positivkontrolle und dem leeren Vektor als Negativkontrolle in Mesophyllprotoplasten der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* (Riefler *et al.*, 2006) wie im Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Wenn der putative Cytokininrezeptor CHARK diese Mutationen funktionell ersetzen und das Cytokininsignal zur zellulären Antwort in diesem ZKS weiterleiten kann, wird ein positiver Einfluss für diesen Rezeptor auf die Cytokininsignaltransduktion bis zum *trans*-Aktivierungssignal erwartet (Abb. 18A). In diesem Fall sollten die mit Cytokinin induzierten Proben höhere Aktivität als die nicht induzierten Proben zeigen.

Die Expression der Positivkontrolle AHK2 führte zu einer Komplementation, was zu einer hohen Reporterogenaktivität führte. Die Zugabe von Cytokinin (tZ) führte zu einer Steigerung der Reporterogenaktivität. In Gegensatz dazu wurde in der Vektorkontrolle nur eine Hintergrundaktivität für das Reporter gen gemessen, die auch nach Cytokininzugabe unverändert blieb. Bei der Expression von CHARK wurde eine deutlich erhöhte Reporterogenaktivität detektiert, die sich bei Inkubation der Protoplasten mit Cytokinin mehr als verdoppelte. Obwohl die Aktivität von CHARK geringer als die Aktivität von AHK2 in diesem Assay war (ohne Cytokinin ca. vierfach und mit Cytokinin ca. 1,8-fach geringer), konnte CHARK eine hohe Induktion mit Cytokinin ungefähr zweimal höher als die Induktion von AHK2 zeigen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CHARK die *ahk2/ahk3* Mutante zumindest in diesem Assay komplementieren kann und somit als Cytokininrezeptor in *Arabidopsis* aktiv ist (Abb. 33).



**Abbildung 33:** Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte das Zwei-Komponenten-System in *ahk2-5/ahk3-7* *Knockout*-Mutanten aus *A. thaliana* im Protoplasten *trans*-Aktivierungsassay (PTA) in Abhängigkeit von Cytokinin aktivieren. Der Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) wurde wie im Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle und Negativkontrolle für den Assay wurde AHK2 aus *Arabidopsis thaliana* bzw. der leere Vektor verwendet. Der Assay wurde dreimal wiederholt und jede Messung als Duplikat durchgeführt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Induktion mit *trans*-Zeatin.

### 3.1.3.6 CHARK konnte die *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* funktionell komplementieren

Um die Aktivität des putativen Cytokininrezeptors CHARK in ganzen Pflanzen zu untersuchen, wurden Komplementationsanalysen in der *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* wie vorher im Abschnitt 2.2.5.5 beschrieben durchgeführt (Stolz *et al.*, 2011). Der CHARK Rezeptor wurde zuvor mit dem AHK2-Promoter in den Vektor pB7m34GW kloniert, der eine C-terminale Fusion mit einem myc-Tag ermöglichte. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden *pAHK2:AHK2* bzw. die nicht transformierten Mutanten-Pflanzen *ahk2-2/ahk3-3* verwendet (Stolz *et al.*, 2011). Die Konstrukte *pAHK2-CHARK* und *pAHK2-AHK2* wurden danach in die *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* durch die *floral dip* Methode transformiert (siehe 2.2.1.2) (Clough und Bent, 1998). Nach den Segregationsanalysen wurden die homozygoten Linien von den beiden Konstrukten durch verschiedene Analysen (Rosettendurchmesser und Sprosslänge) auf Komplementation dieser Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* getestet. Für *pAHK2-CHARK* und *pAHK2:AHK2* wurden sechs homozygote Linien gefunden. Nach 25 DAG (*days after germination*) wurde den Rosettendurchmesser und nach 34 DAG wurde die Sprosshöhe für alle Pflanzen

gemessen und relativ zum Wildtyp (WT) (100 %) berechnet (Abb. 34). Interessanterweise zeigte CHARK in fünf von den sechs homozygoten Linien eine vollständige Komplementierung (Linie II-VI) der *ahk2/ahk3* Mutanten (Abb. 34). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CHARK *AHK2* oder *AHK3* funktionell ersetzen konnte und somit als Cytokininrezeptor in *Arabidopsis* aktiv ist.

Diese Experimente sind noch nicht abgeschlossen, weitere Untersuchungen (z.B. Western-Blot für die Expressionskontrolle des CHARK Rezeptors in allen homozygoten Linien, RT-PCR, Chlorophyllgehalt) müssen noch durchgeführt werden, um die vollständige Komplementierung von CHARK in den Linie II-VI zu validieren und zu bestätigen.

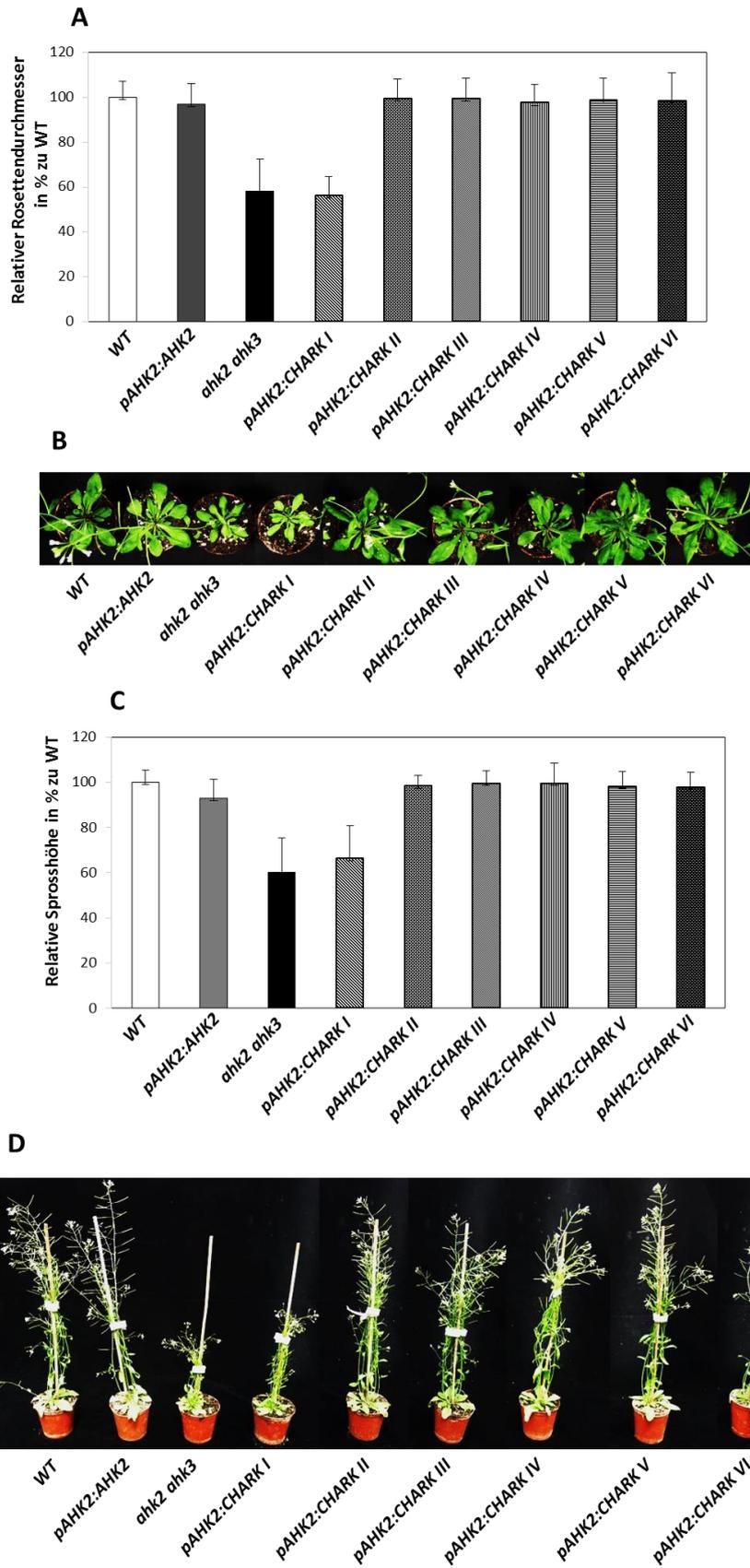
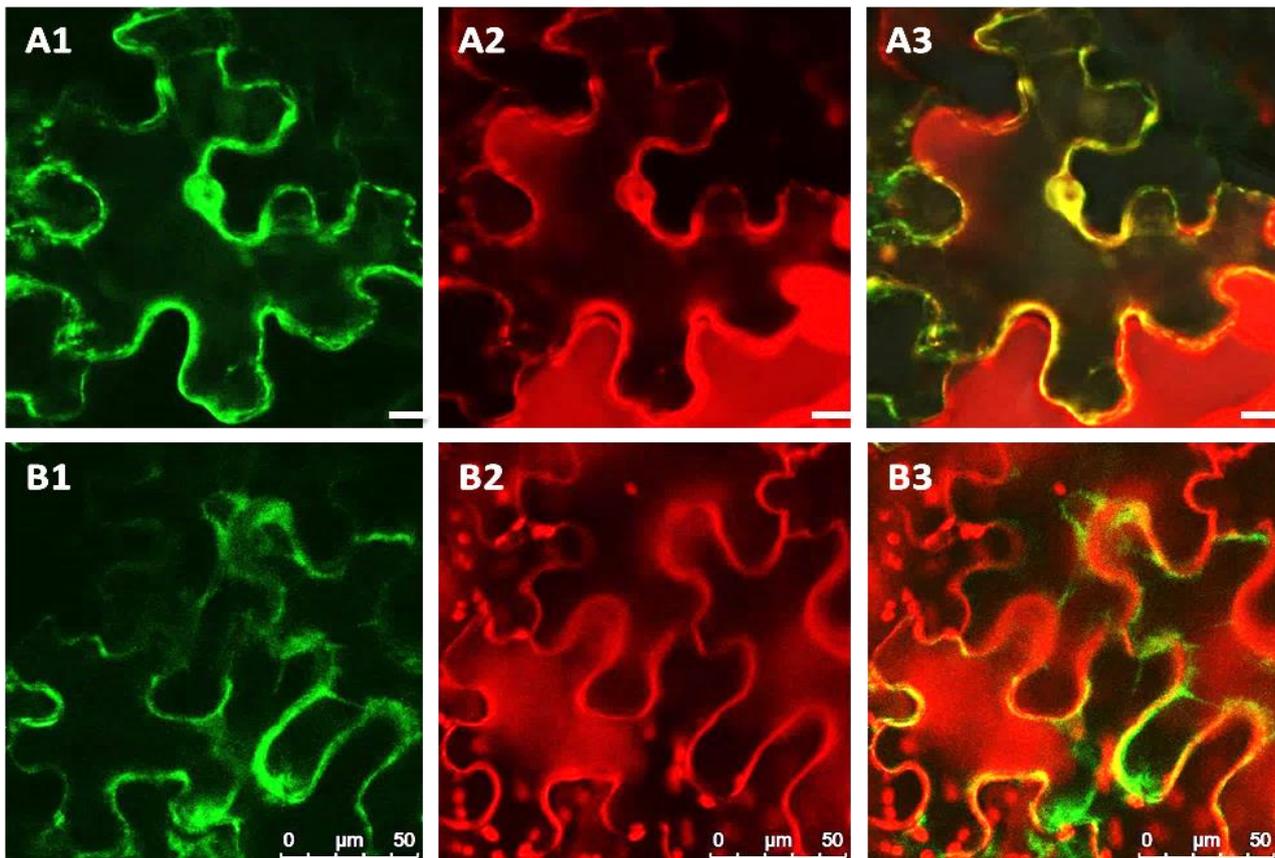


Abbildung 34: Der putative Cytokininrezeptor CHARK konnte die *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* funktionell komplementieren. Um die Aktivität des putativen Cytokininrezeptors CHARK in Pflanzen zu

untersuchen, wurden Komplementationsanalysen in der *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* durchgeführt (Stolz *et al.*, 2011). Die untersuchenden Konstrukte waren: *pAHK2:CHARK* und *pAHK2:AHK2* als Positivkontrolle. Nach den Segregationsanalysen wurden die sechs homozygoten Linien (Line I-VI) analysiert. **A: Rosettendurchmesser:** Nach 25 DAG (*days after germination*) wurde der Rosettendurchmesser für alle Pflanzen gemessen und relativ zum WT (100 %) berechnet. **B:** Die abgebildeten Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Aufnahme 25 Tage alt. **C: Sprosshöhe:** Nach 34 DAG (*days after germination*) wurde die Sprosshöhe für alle Pflanzen gemessen und relativ zum WT (100 %) berechnet. **D:** Die abgebildeten Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Aufnahme 34 Tage alt.

### **3.1.3.7 Die Analyse der subzellulären Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteinen in Tabakepidermiszellen wies auf eine Lokalisation von CHARK zum großen Teil im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran hin**

Um ein Bild über die intrazelluläre Lokalisation des putativen Cytokininrezeptors CHARK zu erhalten und mit der bekannten intrazellulären Lokalisation von den klassischen Cytokininrezeptoren zu vergleichen, wurde die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins in Tabakepidermiszellen als Expressionssystem durchgeführt. Das Vektorkonstrukt, das ein C-terminales GFP-Fusionsprotein von CHARK unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert, wurde in *Nicotiana benthamiana* Blätter transient transformiert (siehe 2.2.1.3). Nach der Infiltration wurden die Pflanzen sieben Tage inkubiert. Danach wurden die transformierten Pflanzen am konfokalen Mikroskop auf Expression der fluoreszierenden Proteine untersucht (siehe 2.2.5.3). Die Analyse der subzellulären Lokalisation zeigte Fluoreszenzsignale vom CHARK-GFP Protein in den perinukleären Regionen und zumindest partielle Co-Lokalisation mit dem ER-Markerprotein mCherry-HDEL (Abb. 35 A1-A3). Eine Co-Lokalisation des Rezeptors wurde auch mit dem Plasmamembran Farbstoff FM4-64 aber in schwächerem Umfang detektiert (Abb. 35 B1-B3). Interessantweise war diese subzelluläre Lokalisation ähnlich der vorher beschriebenen Lokalisation für die klassischen Cytokininrezeptoren (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011; Lomin *et al.*, 2011).



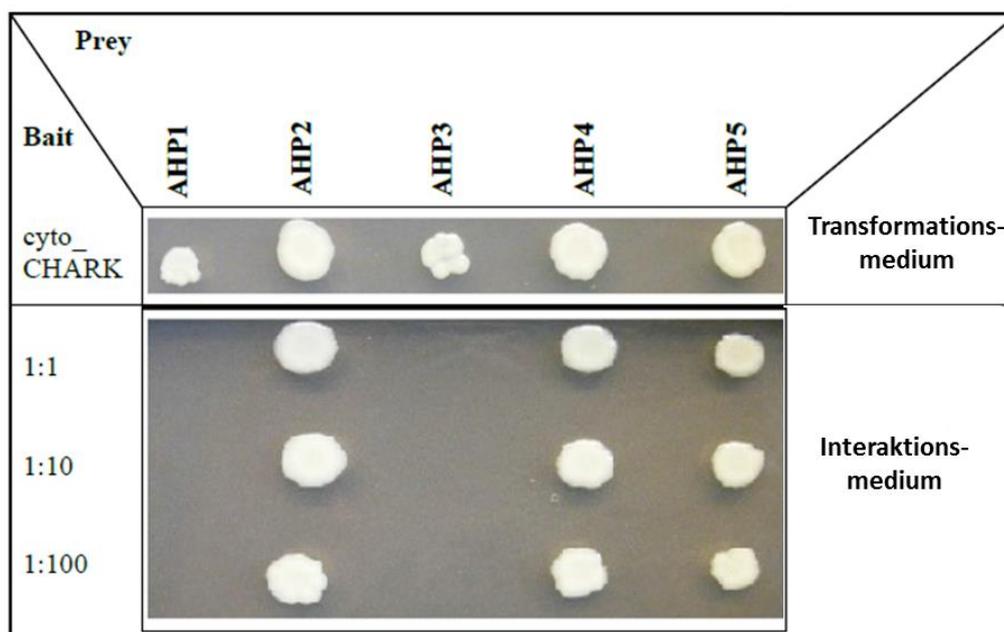
**Abbildung 35: Subzelluläre Lokalisation von CHARK-GFP (pB7FWG2-CHARK) in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*.** Der putative Cytokininrezeptor CHARK wurde als Fusionsprotein mit GFP unter Kontrolle des 35S Promotors in Tabakblättern transient exprimiert. Die Fluoreszenz wurde sieben Tage nach der Infiltration in den vorbereiteten Blattepidermiszellen analysiert. A1 und B1 zeigen die GFP-Fluoreszenz; A2 zeigt die Fluoreszenz vom mCherry ER-Markerprotein; B2 zeigt die Fluoreszenz vom Plasmamembranmarker-FM4-64; A3 und B3 zeigen jeweils die Überlagerung der ersten beiden Fluoreszenzkanäle. Weißer Balken = 10 µM.

### 3.1.3.8 Eine Interaktion von CHARK mit drei *Arabidopsis* Histidin-Phosphotransfer-Proteinen (AHP2, AHP4 und AHP5) konnte in einer *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) Analyse nachgewiesen werden

Um das Signal des putativen Cytokininrezeptors CHARK besser zu verstehen, sollten die möglichen Interaktionen von CHARK mit unbekanntem Proteinen identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) Analyse zwischen CHARK und einer cDNA-Bibliothek aus *Arabidopsis thaliana* (die cDNA wurde aus einem Wurzelkallus isoliert und von Csaba Koncz (MPIZ) zur Verfügung gestellt) durchgeführt. Hierfür wurde die cytoplasmatische CHARK-Sequenz als *Bait*-Konstrukt im Vektor pBTM116 gegen die cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* als *Prey*-Konstrukt im Vektor pACT gescreent. Die Transformationsrate lag bei 903000 Kolonien / 50 µg. Auf dem Interaktionsmedium wurden 36 Kolonien gezählt, die Plasmid-DNA von jeder Kolonie wurde danach

isoliert. Die DNA von den interagierenden Proteinen mit CHARK wurden danach sequenziert und schließlich gegen die *Arabidopsis* Proteindatenbank (<http://www.arabidopsis.org/BLAST/>) durchmustert. Die Analyse zeigte, dass alle Sequenzen für das gleiche Protein *light-dependent short hypocotyls 1* (LSH1) kodieren, das in der Phytochromsignaltransduktion involviert ist (Daten nicht gezeigt).

Die Protein-Protein-Interaktionen des cytoplasmatischen Teils von CHARK mit AHP2, AHP4 und AHP5 aus *Arabidopsis thaliana* konnten im einem gezielten *Yeast Two-Hybrid (Y2H) Screen* nachgewiesen werden (Kristin Helbig, 2013) (Abb. 36). Anhand dieses Protein-Protein-Interaktionsexperiments lässt sich somit vorschlagen, dass CHARK ähnlich wie die AHKs mit AHPs interagiert und die Cytokininsignaltransduktion von CHARK der von AHKs ähnelt.



**Abbildung 36.: Interaktionsmatrix für die cytoplasmatische CHARK-Sequenz aus *Oryza sativa* als Bait mit AHP2, AHP4 und AHP5 aus *Arabidopsis thaliana* als Prey.** Die cytoplasmatische CHARK-Sequenz wurde als Bait-Konstrukt im Vektor pBTM116 in *S. cerevisiae* exprimiert und mit verschiedenen AHPs Prey-Konstrukten auf deren Interaktion getestet. Jeweils 5  $\mu$ l der entsprechenden Kulturen ( $OD_{600}=0,2$ ) wurden auf Transformationsmedium (+His; +Ura) und auf Interaktionsmedium (-His; -Ura) mit einer Verdünnung von 1:1, 1:10 und 1:100 aufgetragen (Kristin Helbig, 2013).

## 3.2 Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der CHASE

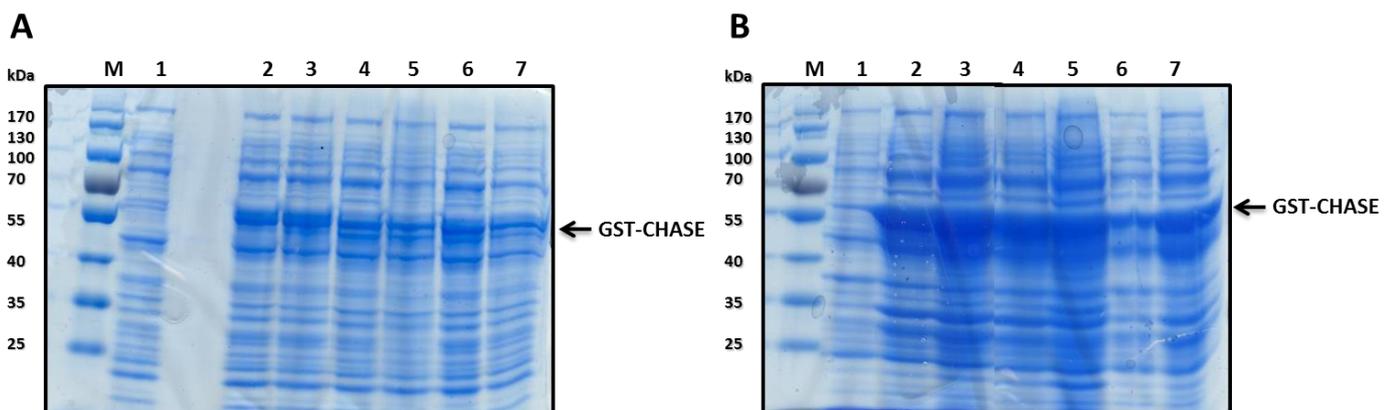
### Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 aus *Physcomitrella patens*

Die Tertiärstruktur der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors AHK4, der zur Klasse C gehört, wurde durch Kristallographie gelöst (Hothorn *et al.*, 2011). Die Aminosäuren in der Cytokininbindungstasche der CHASE Domäne, die für die Cytokininbindung kritisch sind, wurden auch identifiziert (Heyl *et al.*, 2007; Hothorn *et al.*, 2011). Die phylogenetische Analyse zeigte eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren (Klasse B) (Gruhn *et al.*, 2014). Gruhn und Kollegen zeigten moderate Niveaus der Ähnlichkeit zwischen den neuen und den klassischen Cytokininrezeptoren (zwischen 38 % und 48 % Aminosäureidentität) (Gruhn *et al.*, 2015). Aber die klassische als auch die neue identifizierte Klasse zeigten ein höheres Niveau der Konservierung untereinander (71-96 % bzw. 47-81 %) (mit einem niedrigeren Konservierungsgrad in der neuen Klasse). Die Reste der CHASE Domäne, die für die Cytokininbindung der klassischen Cytokininrezeptoren wichtig sind (Heyl *et al.*, 2007; Hothorn *et al.*, 2011), zeigten ein niedrigeres Niveau der Konservierung zwischen den Mitgliedern der neuen Rezeptorfamilie (6,5 % Identität), aber diese Konservierung ist bei den klassischen Rezeptoren deutlich höher (50 %) (Gruhn *et al.*, 2015). Zum besseren Verständnis der Evolution der Cytokininbindung an die diverse CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors, sollte die Tertiärstruktur dieses CHASE-Proteins durch die Kristallisation aufgeklärt werden.

#### 3.2.1 Expression der präparativen nativen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Substratinduktion in *E. coli*

Die CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors wurde zuerst in den Vektor pGEX-4T-3 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) kloniert, der eine N-terminale Fusion mit einem GST-Tag ermöglichte. Zum nativen Exprimieren der CHASE Domäne in hoher Konzentration wurden die optimalen Bedingungen der Expression in den *E. coli* Stämmen Origami B (DE3)pLysS (Abb. 37A) und Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL (Abb. 37B) untersucht. Die CHASE Domäne wurde in 100 ml LB-Medium (mit den Antibiotika Carbencillin und Chloramphenicol) exprimiert (siehe 2.2.2.5). Nach Erreichen einer  $OD_{600}=0.5$  wurde mit 1 mM IPTG für 4 Stunden und 24 Stunden bei 20 °C, 30 °C und 37 °C die Proteinexpression induziert. Eine nicht-induzierte Kontrolle (vor der Induktion) wurde parallel auf

dem SDS-Gel mit aufgetragen (Abb. 37A und Abb. 37B). Die Pfeile zeigen die überexprimierte CHASE Domäne mit GST-Tag bei ca. 57,5 kDa (Abb. 37A und Abb. 37B). Anhand der SDS-Gele (Abb. 37A und Abb. 37B) war unter allen der getesteten Bedingungen eine starke Proteinbande bei ca. 57,5 kDa für GST-CHASE nach der Induktion zu sehen, im Vergleich mit der gleichen nicht-induzierten Proteinbande. Die Expression von der CHASE Domäne war im *E. coli* Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL viel stärker als im Stamm Origami B (DE3)pLysS und die Induktion bei 20 °C nach 24 Stunden im *E. coli* Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL zeigte stärkere Bande als die nach 4 Stunden Induktion

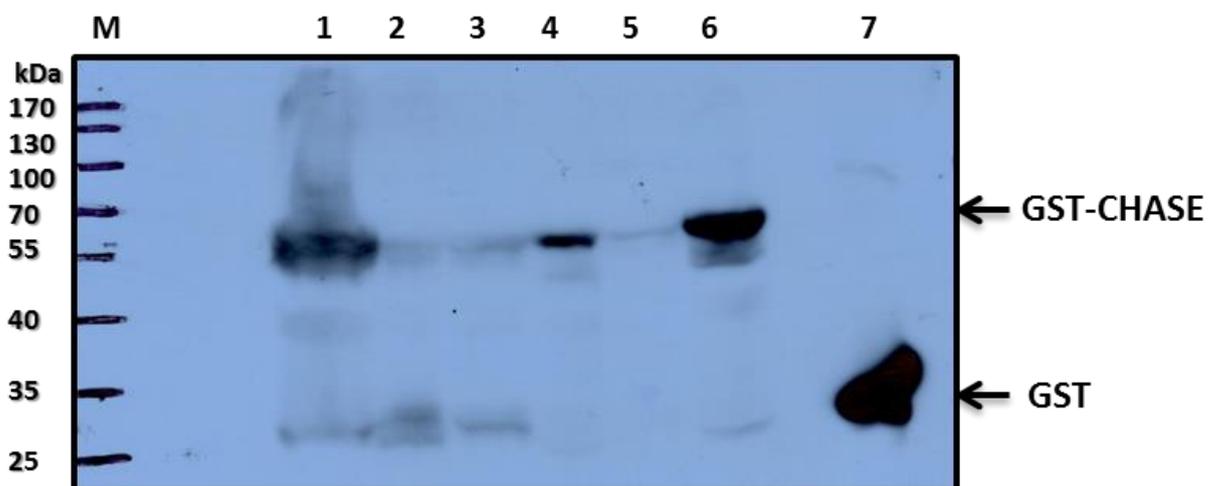


**Abbildung 37: Bestimmung der optimalen Bedingungen der Überexpression von der CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Substratinduktion in *E. coli*.** Die CHASE Domäne (Aminosäuren 98-282, ~31,46 kDa) wurde als GST-getaggtetes Protein (pGEX-4T-3; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) im *E. coli* Stamm Origami B (DE3)pLysS (A) oder BL21 (DE3)pLysS-RIL Stamm (B) in LB-Medium exprimiert (siehe 2.2.2.5). Nach der Induktion mit 1 mM bei  $OD_{600}=0,5$  für 4 Stunden und 24 Stunden bei 20 °C (A; Spur 2 bzw. 3 und B; Spur 6 bzw. 7), 30 °C (A; Spur 6 bzw. 7 und B; Spur 2 bzw. 3) und 37 °C (A; Spur 4 bzw. 5 und B; Spur 4 bzw. 5) wurde das Gesamtzelllysat von 1 ml Kultur in SDS-Probenpuffer aufgekocht und 10  $\mu$ l in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Eine nicht-induzierte Kontrolle (vor der Induktion) wurde parallel mit aufgetragen (A und B; Spur 1). 5  $\mu$ l des *PageRuler Prestained Protein Ladders* (Thermo Scientific, Lithuania) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Die Pfeile zeigen die überexprimierte CHASE Domäne mit GST-Tag bei ca. 57,5 kDa.

Die Länge der Induktion für 24 Stunden wurde für die Expression der CHASE Domäne von PpCHK4 im *E. coli* Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL und Stamm Origami B (DE3)pLysS als die optimale Länge bestimmt.

Um zu untersuchen, ob das CHASE Protein im nativen löslichen Zustand im *E. coli* exprimiert wurde, sollten der Überstand und das Pellet nach dem Zellaufschluss analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach der oben beschriebenen Expression der CHASE Domäne im *E. coli* Stamm

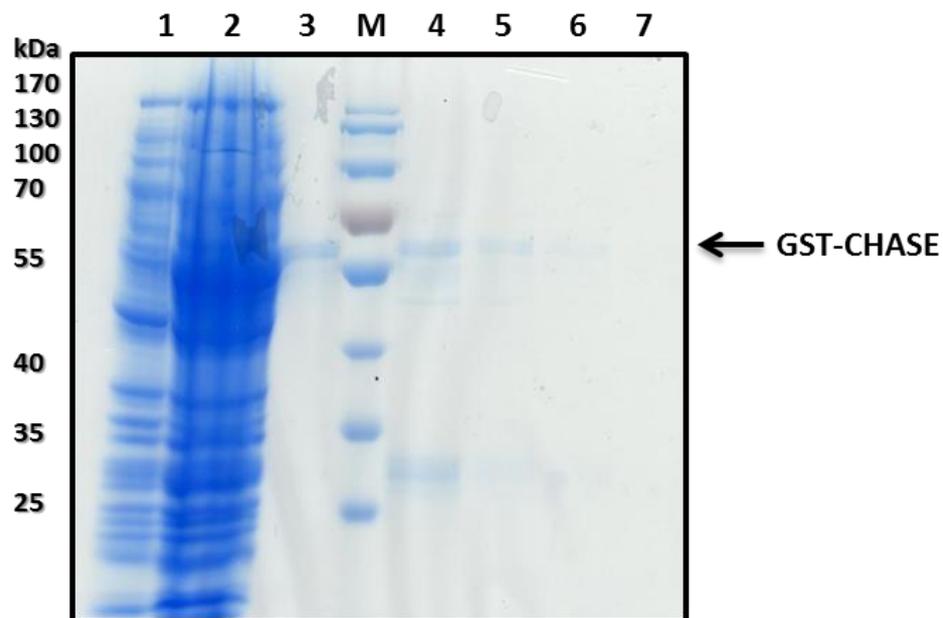
Origami B (DE3)pLysS (Abb. 38; Spuren 1-3) oder im Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL (Abb. 38; Spuren 4-6) durch Ultraschall aufgeschlossen (siehe 2.2.2.7). 10 µl wurden vom Überstand in einem 10 %ige SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend wurden die GST-enthaltenden Banden mit einem GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe 2.2.2.3) (Abb. 38). Die CHASE Domäne konnte in den beiden *E. coli* Stämmen und bei allen untersuchten Temperaturen löslich im Überstand exprimiert werden. Die Expression war bei 20 °C im Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL sehr stark (Abb. 38; Spur 6), ein bisschen schwächer bei 20 °C im Stamm Origami B (DE3)pLysS (Abb. 38; Spur 1), schwächer bei 30 °C im Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL (Abb. 38; Spur 4) und sehr schwach bei den anderen untersuchten Temperaturen der beiden Stämmen (Abb.38; Spuren 2, 3, 5). Weil die CHASE Domäne vier Cystein-Reste enthält und die Möglichkeit für die Bildung von Disulfidbrücken sehr hoch ist, wurde der *E. coli* Stamm Origami B (DE3)pLysS für die Expression der CHASE Domäne weiterverwendet, da in diesem Stamm die beiden Gene, Thioredoxinreduktase (*trxB*) und Glutathion-Reduktase (*gor*), mutiert sind, was die Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma unterschützen kann. Anhand der Ergebnisse (Abb. 37 und Abb. 38) wurden die optimalen Bedingungen der präparativen nativen Expression der CHASE Domäne von PpCHK4 durch Substratinduktion in *E. coli* als (*E.coli* Stamm Origami B (DE3)pLysS im LB Medium; bei 20 °C; ab OD<sub>600</sub>=0.5; IPTG= 1mM und 24h) bestimmt und für die nächsten Proteinexpressionsuntersuchungen verwendet.



**Abbildung 38: Bestimmung der optimalen Bedingungen der präparativen nativen Expression der CHASE Domäne von PpCHK4 durch Substratinduktion in *E. coli*.** Die CHASE Domäne (Aminosäuren 98-282, ~31,46 kDa) wurde als GST-getaggtetes Protein (pGEX-4T-3; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) im *E. coli* Stamm Origami B (DE3)pLysS (Spuren 1-3) oder Stamm BL21 (DE3)pLysS-RIL (Spuren 4-6) im LB-Medium exprimiert (siehe 2.2.2.5). Nach der Induktion mit 1 mM bei OD<sub>600</sub>=0,5 für 24 Stunden bei 20 °C (Spur 1 und 6), 30 °C (Spur 3 und 4) und 37 °C (Spur 2 und 5) wurden die

Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen (siehe 2.2.2.7) und 10  $\mu\text{l}$  vom Überstand in SDS-Probenpuffer aufgeköcht und in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. 5  $\mu\text{l}$  des *PageRuler Prestained Protein Ladders* (Thermo Scientific, Lithuania) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Das Gel wurde anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und eine Immunodetektion mit einem GST-spezifischen Antikörper durchgeführt (siehe 2.2.2.3). Als Kontrolle wurde der leere Vektor verwendet (Spur 7). Die Pfeile zeigen die überexprimierte CHASE Domäne mit (GST-Tag) bei ca. 57,5 kDa bzw. GST-Protein bei ca. 26 kDa (Kontrolle).

Der Überstand, in dem das GST-CHASE Protein entsprechend der optimalen Bedingungen exprimiert wurde (siehe oben), wurde mittels Affinitätschromatographie mit Glutathion-Agarose-Kügelchen (30 mg/ml H<sub>2</sub>O; Sigma, München) aufgereinigt (siehe 2.2.2.7). Nach der Elution des Proteins mit 10 mM reduziertem Glutathion wurden die Elutionsfraktionen und auch die Glutathion-Agarose-Kügelchen mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 39). Das Gel zeigte eine schwache Proteinbande beim erwarteten Molekulargewicht von ca. 57,5 kDa des GST-CHASE Proteins in den Elutionsfraktionen. Eine untere Bande, die dem GST-Molekulargewicht bei ca. 26 kDa entspricht, wurde auch im Gel detektiert (Abb. 39).



**Abbildung 39: Chromatographische Reinigung natives GST-CHASE Proteins mittels Glutathion-Agarose-Kügelchen.**

Nach der Elution des Proteins mit 10 mM reduziertem Glutathion (siehe Abschnitt 2.2.2.7) wurden 15  $\mu\text{l}$  der Elutionsfraktionen (Spuren 4-7) und der Agarose-Kügelchen (Spur 3) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. 5  $\mu\text{l}$  des *PageRuler Prestained Protein Ladders* (Thermo Scientific, Lithuania) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Eine nicht-induzierte (Spur 1) und induzierte Kontrolle (Spur 2) wurden parallel mit aufgetragen. Der Pfeil zeigt die überexprimierte CHASE Domäne mit GST-Tag bei ca. 57,5 kDa.

Um experimentell abzusichern, ob es sich bei dem gereinigten Protein (siehe Abb. 39, markiert mit einem Pfeil) um die CHASE Domäne handelte, wurde eine MALDI-MS Analyse von (Dr. Weise, Institut für Biochemie, Freie Universität Berlin) vorgenommen. Hierfür wurde eine Bande beim Molekulargewicht des GST-CHASE Proteins aus dem 10 %igen SDS-Gel, wie im Abschnitt 2.2.2.15 beschrieben, eluiert.

Die Messung ergab, dass die CHASE Domäne in der eluierten Bande vorhanden war, da ein Datenbankgleich für diese Analyse als beste und statistisch signifikante Zuordnung „*sensory histidine protein kinase Physcomitrella patens*“ ergab. Die Peptidsequenzen, die den gemessenen Peptidmassen entsprachen, konnten der CHASE Domäne zugeordnet werden (Abb. 40). Die Peptidmassen vom GST-Protein wurden auch in dieser Bande detektiert (Daten nicht gezeigt).

A

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence	
4 - 12	1211.6093	1210.6020	1210.5982	3	1 K.FREQEFDLK.C	
56 - 64	1074.6651	1073.6578	1073.6597	-2	0 R.TLFLRPTVK.R	
65 - 71	934.5316	933.5243	933.5396	-16	1 K.RLVYVER.V	
66 - 71	778.4180	777.4107	777.4385	-36	0 R.LVYVER.V	
66 - 77	1386.7903	1385.7830	1385.7779	4	1 R.LVYVERVPAANR.A	
71 - 81	1201.6872	1200.6799	1200.6363	36	1 R.VPAANRAAFER.K	
83 - 100	2174.1071	2173.0998	2173.1280	-13	1 R.KWNTSILYINHNSVTEVR.S	
84 - 100	2046.0169	2045.0096	2045.0330	-11	0 K.WNTSILYINHNSVTEVR.S	
101 - 117	1916.8463	1915.8390	1915.8323	3	0 R.SANDTEYSPVVFETDDK.V	
101 - 120	2241.0283	2240.0210	2240.0485	-12	1 R.SANDTEYSPVVFETDDKVPK.Y	
121 - 133	1505.7482	1504.7409	1504.7350	4	0 K.YLFVDAGAYPAYR.S	
150 - 163	1403.7655	1402.7582	1402.7457	9	0 R.DTGLFTLSFVTPR.R	
164 - 171	2077.9390	2076.9317	2076.9476	-8	1 R.RDGTWQMAYLAYGPGR.D	Oxidation (M)
165 - 171	1905.8406	1904.8334	1904.8516	-10	0 R.DGTWQMAYLAYGPGR.D	
165 - 171	1921.8416	1920.8343	1920.8465	-6	0 R.DGTWQMAYLAYGPGR.D	Oxidation (M)
172 - 182	1263.5630	1262.5557	1262.5415	11	0 R.DYTSFSSSTEAR.R	
207 - 224	2030.9229	2029.9157	2029.9303	-7	0 R.FTDVDDMDVVAVFNVNSK.L	Oxidation (M)
225 - 240	1736.7397	1735.7324	1735.7359	-2	0 K.LESFDYNSCAAASSK.S	
241 - 252	1289.6384	1288.6311	1288.6234	6	0 K.SCAVPLFDPAER.A	
259 - 2	1793.8542	1792.8469	1792.8533	-4	0 K.AAVTWEYGTQHFV.R.C	

B

```

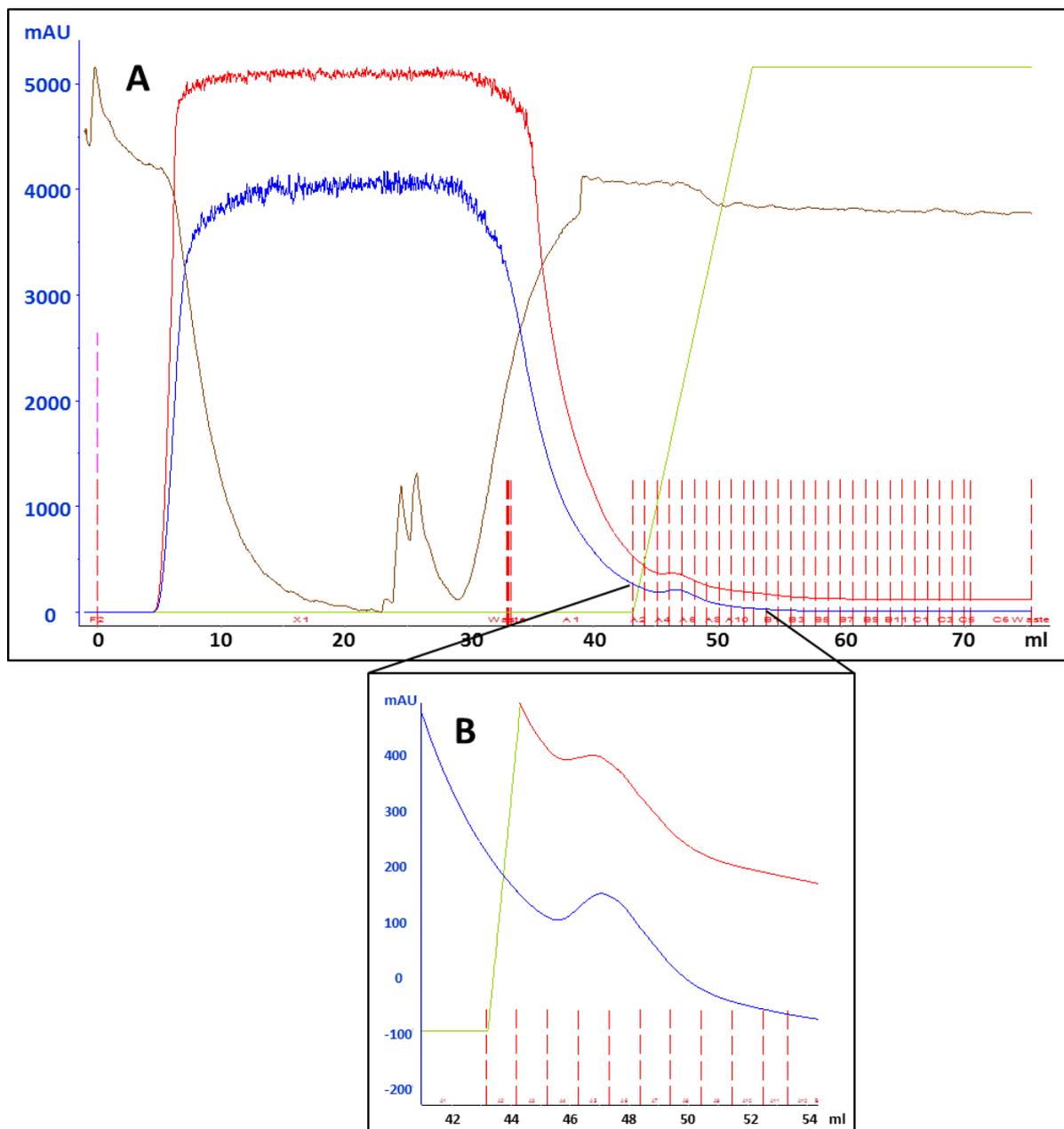
1  ALKFREQEFD LKCENRKEVL KSQVENNLNA SFVIVGLIAS VPEVSADMWV NFATRTLFLR
61  PTVKRLVYVE RVPAANRAAF ERKWNTSILY INHNSVTEVR SANDTEYSPV VFETDDKVPK
121 YLFVDAGAYP AYRSAIDAAR DTGLFTLSPV TPRRDGTWQM GAYLAYGPG RDYTSFSSTE
181 ARRQACRGYV GIVMNVTDVF HGVLSRFTDV DDMDVVAVFN VNSKLESFDS YNCSAAASSK
141 SCAVPLFDPA GRASEFSKAA VTWEYGTQHF EVRCLPKRNL

```

**Abbildung 40: MALDI-MS Analyse des nativen aufgereinigten GST-CHASE Proteins.** A: Peptidmassen-Analyse der vorgenommenen MALDI-MS Messung. B: Die CHASE Protein-Sequenz. Die Peptide, die den Peptidmassen entsprechen, sind in der CHASE-Sequenz rot markiert (Analyse von Dr. Weise, Institut für Biochemie, Freie Universität Berlin).

Zum nativen Expressieren der CHASE Domäne in höherer Konzentration, die für die nächsten Aufreinigungsschritte und schließlich für die Kristallisation des Proteins nötig ist, wurde die Expression entsprechend den optimalen Bedingungen im großen Maßstab in 1l LB-Medium durchgeführt (siehe 3.2.1). Die Aufreinigung erfolgte an einem FPLC-Gerät (ÄKTA Purifier100<sup>TM</sup>, GE

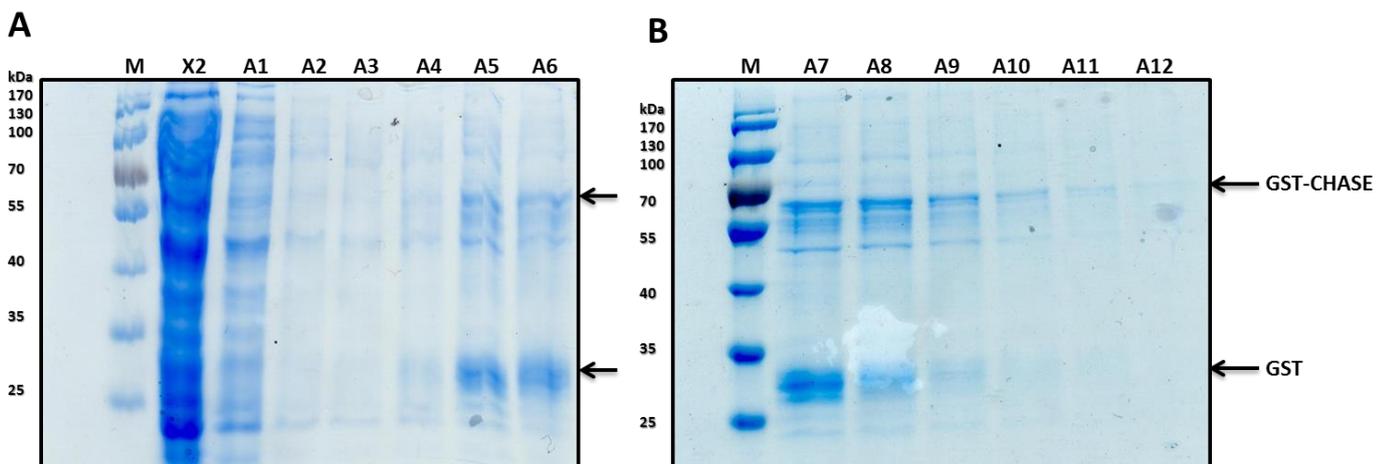
Healthcare, Freiburg) mit 5 ml GStrap FF-Säulen (GStrap™ FF, GE Healthcare, Freiburg) (siehe 2.2.2.7). Hierzu wurde das native GST-CHASE Protein im Überstand nach der Expression und dem Zellaufschluss zunächst an eine Säule für die Reinigung GST-getaggtter Proteine spezifisch gebunden. Nach dem Waschen mit GST-Bindungspuffer (PBS; pH 7,3), konnte das GST-CHASE Protein über einen Gradienten von reduziertem Glutathion von der Säule eluiert werden. Im resultierenden Chromatogramm wurde ein Peak erhalten, der sich über einen niedrigen Glutathionkonzentrationsbereich erstreckte (Abb. 41B).



**Abbildung 41: Chromatogramm der nativen Reinigung der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 aus *Physcomitrella patens*.** Nach der Expression der CHASE Domäne entsprechend den optimalen Bedingungen (siehe

3.2.1) erfolgte eine native Aufreinigung des Proteins an einem FPLC-Gerät (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg) mit 5 ml GSTrap FF-Säulen (GSTrap™ FF, GE Healthcare, Freiburg) (siehe 2.2.2.7). Hierzu wurde das GST-CHASE Protein an die Säule spezifisch gebunden. Nach dem Waschen mit GST-Bindungspuffer (PBS; pH 7,3) für 10 Säulenvolumen (*Column volume*, CV), konnte das GST-CHASE Protein über einen Gradienten von reduziertem Glutathion von der Säule eluiert werden. x-Achse; Volumen (ml), y-Achse; UV-Absorption bei 280 nm (mAU). Die grüne Linie (*conc.*) zeigt die ansteigende Konzentration vom Elutionspuffer, die Elutionsfraktionen zwischen 42 ml und 54 ml sind zusätzlich als Ausschnitt (B) vergrößert.

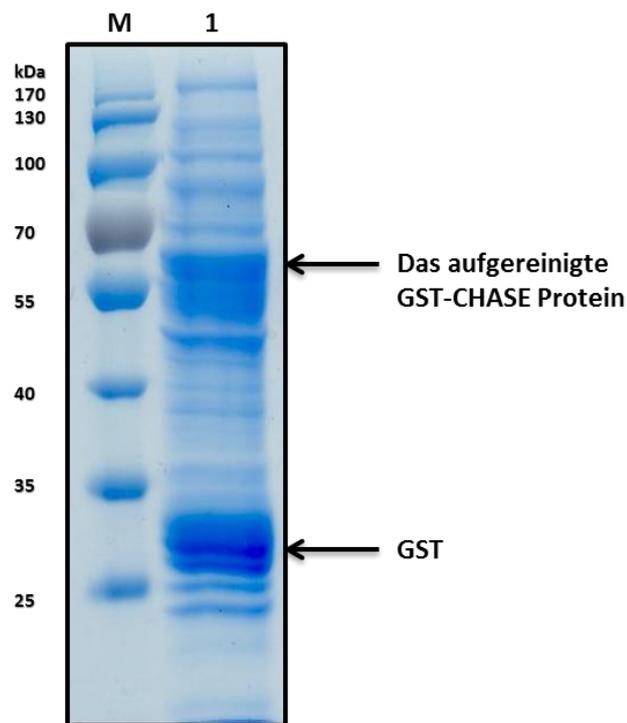
Anschließend wurden die Elutionsfraktionen (A1-A12) auf zwei 10 %ige SDS-PAGEs analysiert, um das korrekte Molekulargewicht (MW) und die Reinheit des Proteins zu überprüfen. Auf den Coomassie-gefärbten SDS-Gelen konnte eine spezifische Bande bei ca. 57,5 kDa (GST-CHASE) in allen Fraktionen in verschiedener Stärke detektiert werden (Abb. 42). Neben dieser Bande für das GST-CHASE Protein wurden mehrere andere Banden von höher- und niedermolekularen Proteinen mitdetektiert. Insgesamt betrachtet wies das native GST-CHASE Protein somit einen niedrigen Reinheitsgrad auf. Die oberen unspezifischen mitgereinigten Banden waren wahrscheinlich Dimerisierungsprodukte des GST-Proteins und die unteren sind GST-CHASE Abbauprodukte.



**Abbildung 42: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des GST-CHASE Proteins an einem FPLC-Gerät.** Nach der Elution des Proteins mit 10 mM reduziertem L-Glutathion (Elutionspuffer) (siehe Abschnitt 2.2.2.7) wurden 15 µl von den Elutionsfraktionen und vom Durchfluss (X2) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. 5 µl des *PageRuler Prestained Protein Ladders* (Thermo Scientific, Lithuania) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Die oberen Pfeile zeigen die überexprimierte CHASE Domäne mit (GST-Tag) bei ca. 57,5 kDa und die unteren zeigen GST-Protein bei ca. 26 kDa.

Um den stabilen Teil des Proteins weiter aufzureinigen wurden die Elutionsfraktionen (A5-A10) (Abb. 42) gepoolt und durch Ultrafiltration in Zentrifugal-Röhrchen (Ultracel, MWCO 30 kDa,

Millipore, Irland) über Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9). 15 µl vom aufkonzentrierten GST-CHASE Protein wurden auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetragen und analysiert (Abb. 43). Auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel sind alle vorher detektierten Banden (Abb. 42) intensiv zu sehen, was auf eine Instabilität des GST-CHASE hindeuten kann.



**Abbildung 43: SDS-PAGE des aufkonzentrierten GST-CHASE Proteins.** Nach der Reinigung wurden die Proteinfractionen (A5-A10) (Abb.42) gepoolt und durch Ultrafiltration in Zentrifugal-Röhrchen (Ultracel, MWCO 30 kDa, Millipore, Irland) über Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.2.2.9). 15 µl wurden auf einem 10%igen SDS-PAGE aufgetragen und analysiert (Spur 1). 5 µl des *PageRuler Prestained Protein Ladders* (Thermo Scientific, Lithuania) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Der obere Pfeil zeigt die überexprimierte CHASE Domäne mit (GST-Tag) bei ca. 57,5 kDa und der untere zeigt GST Protein bei ca. 26 kDa.

Um die CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors in höherer Konzentration, Stabilität und Reinheit für die geplante Kristallografie zu exprimieren, wurde die CHASE Domäne anschließend in mehreren *E. coli*-Expressionsvektoren mit verschiedenen N- oder C-terminalen Tags kloniert. Die native Expression des Proteins wurde danach mit diesen Konstrukten unter verschiedenen Expressionsbedingungen und in verschiedenen *E. coli* Stämmen getestet. Die verwendeten *E. coli* Stämme waren BL21 (DE3)pLysS, BL21 (DE3)pLysS Star, BL21 (DE3)pLysS-RIL, Rosetta2, Origami B (DE3)pLysS und ArcticExpress (DE3)RP. Der Stamm BL21 (DE3)pLysS Star wurde so mutiert, dass er

die Stabilität der mRNA fördert und die Proteinausbeute optimiert. Die Stämme Rosetta2 und BL21 (DE3)pLysS-RIL enthalten zusätzliche tRNAs, die selten in *E. coli* vorhanden sind. Im Stamm Origami B (DE3)pLysS sind die beiden Gene, Thioredoxinreduktase (*trxB*) und Glutathion-Reduktase (*gor*), mutiert sind, was die Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma unterschützen kann. Der Stamm Arctic Express (DE3)RP unterstützt die Proteinexpression bei niedrigen Temperaturen aufgrund der Koexpression von Kälte-adaptierten Chaperonen. Die Proteinexpression wurde schließlich durch Substratinduktion durchgeführt (siehe 2.2.2.5) und die native Proteinaufreinigung erfolgte spezifisch an einem FPLC-Gerät (ÄKTA Purifier100<sup>TM</sup>, GE Healthcare, Freiburg) (siehe 2.2.2.7).

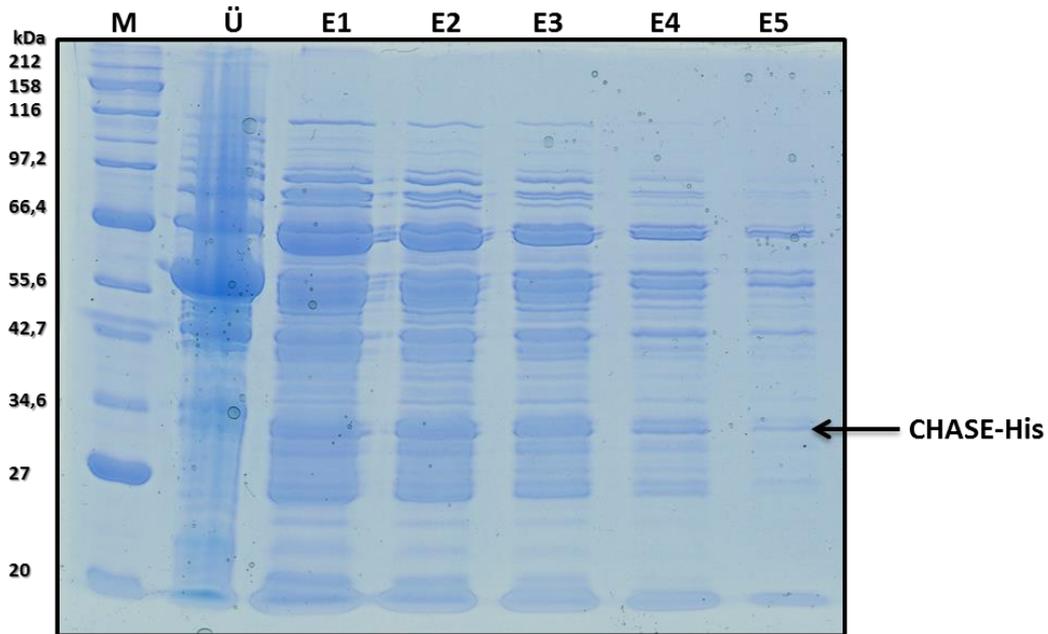
Die CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors wurde als C-terminales His-getaggtetes Protein (pET28b, Novagen/Merck, Darmstadt) im *E. coli* Stamm Origami B (DE3)pLysS in 1 l LB-Medium entsprechend der optimalen Bedingungen (siehe 3.2.1) exprimiert und durch ein FPLC-Gerät mit einer 1 ml Ni-Sepharose-Säule (ÄKTA Purifier100<sup>TM</sup>, GE Healthcare, Freiburg) nativ aufgereinigt (siehe 2.2.2.7). Nach der Elution mit einem Imidazolgradient mit Stufen von 0,1, 1; 2; 5; 10; 20; 50 und 100 % waren drei deutlich erkennbare Elutionspeaks bei einer Konzentration an Eluat (Imidazol) von 10 % (Peak 1), 20 % (Peak 2) und 50 % (Peak 3) sichtbar. Auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel konnte eine spezifische Bande bei ca. 31,46 kDa (CHASE-His) in allen Fraktionen der Elutionspeaks in verschiedener Stärke (sehr schwach bei Peak 1, intensiv bei Peak 2 und schwach bei Peak 3) detektiert werden. Neben dieser Bande für das CHASE-His Protein wurden viele andere unspezifischen Banden von höher- und niedermolekularen Proteinen mitdetektiert, was die Aufreinigung und die Trennung des CHASE Proteins von diesen anderen Proteinen unmöglich machte (Daten nicht gezeigt).

Die CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors wurde anschließend als N-terminales Sumo\_Strep II\_7x His-getaggtetes Protein (pMH-HSsumo; Hothorn *et al*, 2011) im *E. coli* Stamm Origami B (DE3)pLysS unter den besten untersuchenden Expressionsbedingungen für diese Konstrukt (1 l TB Medium; bei 20 °C; ab OD<sub>600</sub>=1.0; IPTG= 0.3 mM und 20 Stunden) exprimiert. Der Sumo-Tag erhöht die Löslichkeit des getaggteten Proteins. Die Expression der CHASE Domäne wurde danach durch Western-Blot (siehe 2.2.2.3) und MALDI-MS (siehe 2.2.2.15) bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die CHASE Domäne wurde dann mittels Affinitätschromatographie durch His-Tag an einem FPLC-Gerät mit 5 ml Ni-Sepharose-Säule (ÄKTA Purifier100<sup>TM</sup>, GE Healthcare, Freiburg) spezifisch aufgereinigt. Aufgrund der hohen Verluste des schwach exprimierten Proteins nach der His-Aufreinigung konnte anschließend keine Strep II-Aufreinigung durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb

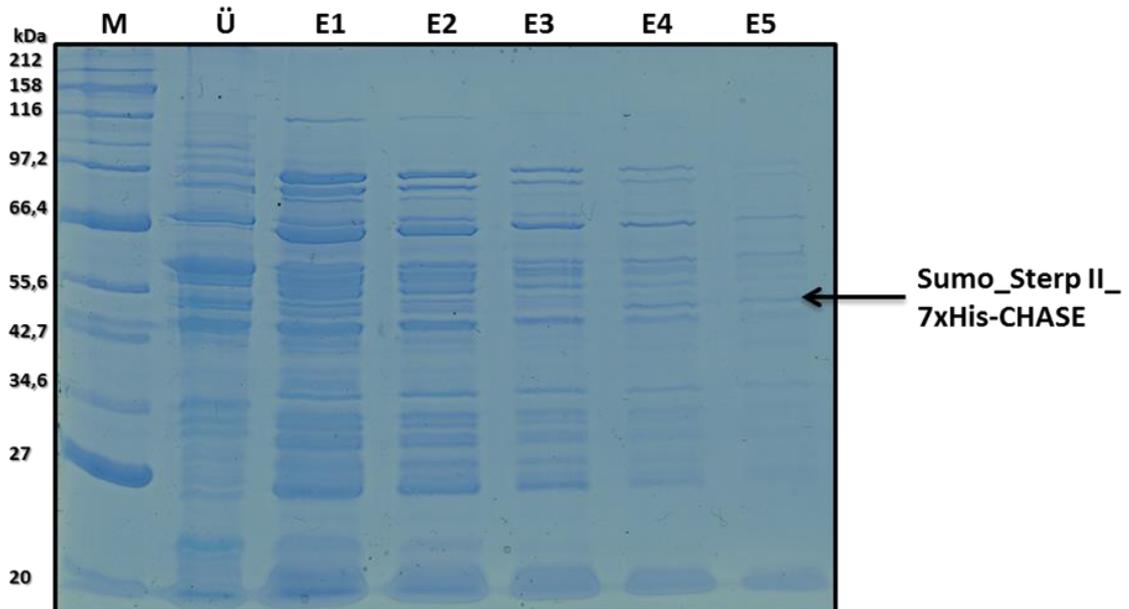
sollten mit den vorhandenen CHASE Domäne-Konstrukten neue Expression-Methoden (z.B. Auto-Induktion; Studier, 2005) untersucht werden, die die Expression des Proteins in höherer Proteinkonzentration, Stabilität und Reinheit für die Kristallographie ermöglichen.

### **3.2.2 Expression der präparativen nativen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Auto-Induktion in *E. coli***

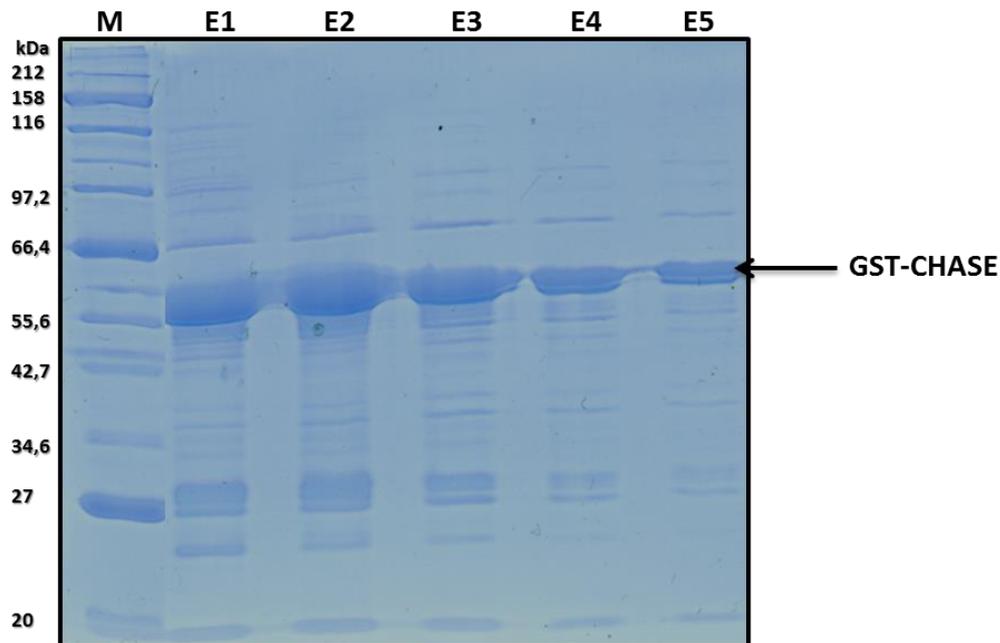
Die CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors aus *Physcomitrella patens* wurde als C-terminales His-getaggtetes Protein (pET28b, Novagen/Merck, Darmstadt); N-terminales Sumo\_Sterp II\_7x His-getaggtetes Protein (pMH-HSsumo; Hothorn *et al*, 2011) und N-terminales GST-getaggtetes Protein (pGEX-4T-3; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) im *E. coli* Stamm Arctic Express (DE3)RP durch Auto-Induktion exprimiert (siehe 2.2.2.5). Das CHASE Protein wurde anschließend als His-getaggtetes Protein (im Vektor pET28b) an einem FPLC-Gerät mit 1 ml Ni-Sepharose-Säule (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg); als Strep II-getaggtetes Protein (im Vektor pMH-HSsumo) mit Strep-Tactin™ Macroprep™ (IBA GmbH, Göttingen) und als GST-getaggtetes Protein (für den Konstrukt im Vektor pGEX-4T-3) mit Glutathion-Agarose-Kügelchen (30 mg/ml H<sub>2</sub>O; Sigma, München) durch Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.2.2.7). Nach der Proteinelution wurden fünf Elutionsfraktionen (E1-E5, je 1 ml) von jedem Konstrukt gesammelt und in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt (siehe Abb. 44, 45 und 46). Das erste SDS-Gel zeigte eine Proteinbande beim erwarteten Molekulargewicht von ca. 31,64 kDa des CHASE-His Proteins in allen Elutionsfraktionen (E1-E5) und mehrere unspezifische Banden (Abb. 44). Das zweite SDS-Gel zeigte eine schwache Proteinbande bei ca. 50 kDa des Sumo\_Sterp II\_7x His-CHASE Proteins in allen Elutionsfraktionen (E1-E5) und mehrere unspezifische Banden (Abb. 45). Das dritte SDS-Gel zeigt eine intensive Proteinbande bei ca. 57,5 kDa des GST-CHASE Proteins in allen Elutionsfraktionen (E1-E5), ein untere Bande (entspricht dem GST-Molekulargewicht bei ca. 26 kDa) und unspezifische andere Banden (Abb. 46).



**Abbildung 44: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des CHASE-His Proteins an einem FPLC-Gerät.** Nach der Elution des Proteins mit 0,5 M Imidazol (EP) (siehe Abschnitt 2.2.2.7) wurden 15  $\mu$ l der Elutionsfraktionen (E1-E5) und des Überstands (Ü) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. 10  $\mu$ l von P7702 (NEB) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Der Pfeil bei ca. 31,46 kDa zeigt das auf der Säule gereinigte CHASE-His Protein.

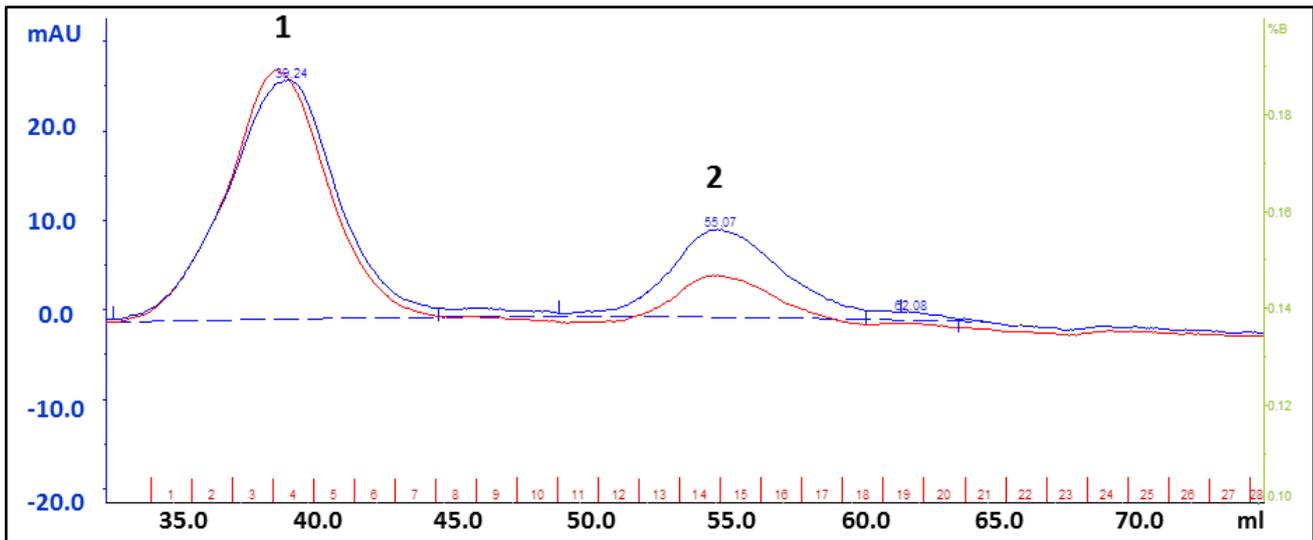


**Abbildung 45: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des Sumo\_Sterp II\_7x His-CHASE Proteins mittels Strep-Tactin™-Kügelchen.** Nach der Elution des Proteins mit 5 mM Biotin (EP) (siehe Abschnitt 2.2.2.7) wurden 15  $\mu$ l der Elutionsfraktionen (E1-E5) und des Überstands (Ü) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. 10  $\mu$ l von P7702 (NEB) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Der Pfeil bei ca. 50 kDa zeigt das gereinigte Sumo\_Sterp II\_7x His-CHASE Protein.



**Abbildung 46: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des GST-CHASE Proteins mittels Glutathion-Agarose-Kügelchen.** Nach der Elution des Proteins mit 10 mM reduziertem Glutathion (siehe 2.2.2.7) wurden 15 µl der Elutionsfraktionen (E1-E5) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. 10 µl von P7702 (NEB) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Der Pfeil bei ca. 57,5 kDa zeigt das gereinigte GST-CHASE Protein.

Weil die Expression des GST-CHASE Proteins unter diesen Bedingungen (siehe oben) mittels Auto-Induktion in *E. coli* Stamm Arctic Express (DE3)RP am stärksten war und eine höhere Reinheit zeigte, wurde das Protein anschließend entsprechend diesen Bedingungen im großen Maßstab (1 l Kultur) exprimiert und wie oben beschrieben aufgereinigt. Zur Trennung des nativ aufgereinigten GST-CHASE Proteins von den anderen unspezifischen Banden folgte nach der Proteinelution eine weitere Aufreinigung durch die Gelfiltrationschromatographie (HiLoad™16/60 Superdex 75, GE Healthcare, Freiburg) (siehe 2.2.2.8). Dazu wurden die Elutionsfraktionen E1-E5 (je 5ml) (Gel nicht gezeigt) nach der nativen Reinigung gepoolt (25 ml), aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9) und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Laufpuffer wurde hier (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 8,0) verwendet. Die Proteine wurden schließlich nach ihrer Größen von der Säule eluiert. Das Chromatogramm der Gelfiltration-Chromatographie zeigte einen breiten Proteinpeak (1) zwischen 35 ml und 45 ml und einen kleinen Peak (2) zwischen 52 ml und 60 ml (Abb. 47).

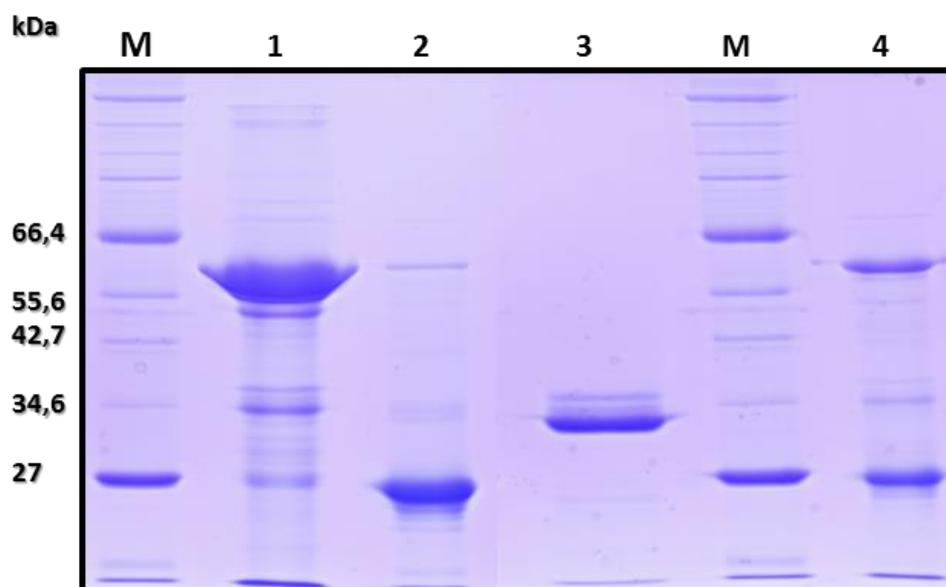


**Abbildung 47: Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie des nativen gereinigten GST-CHASE Proteins.** Zur Trennung des nativ aufgereinigten GST-CHASE Proteins von den anderen unspezifischen Banden wurden die Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung der CHASE Domäne mittels Affinitätschromatographie gepoolt, aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (siehe 2.2.2.8). Als Laufpuffer wurde hier (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 8,0) verwendet. Die Proteine wurden schließlich nach ihrer Größen von der Säule eluiert. x-Achse; Volumen (ml), y-Achse; UV-Absorption bei 280 nm (mAU). Die Flussrate war 2 ml/min und 2 ml Fraktionen wurden gesammelt.

Die Fraktionen von jedem Peak (1 und 2) wurden anschließend gepoolt, aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9) und auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetragen und analysiert (Abb. 48; Spur 1 bzw. Spur 2). Das Gel zeigte eine intensive Bande bei ca. 57,5 kDa des GST-CHASE Proteins und schwache unspezifische Banden (Abb. 48); eine intensive Bande bei ca. 26 kDa des GST-Proteins (Abb. 48). Das bedeutet, dass das GST-CHASE Protein vom abgebauten GST-Protein durch Gelfiltrationschromatographie getrennt wurde.

Der PGEX-4T-3 Vektor hat eine Schnittstelle für die Protease Thrombin, was die Spaltung des GST-Tags vom Zielprotein ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden die aufkonzentrierten Fraktionen vom Peak 1 nach der Gel-Chromatographie auf einem FPLC-Gerät mit 1 ml GSTrap FF-Säulen (ÄKTA Purifier<sup>100TM</sup>, GE Healthcare, Freiburg) gebunden (siehe 2.2.2.7). Nach dem Waschen der Säule wurde der Thrombin-Verdau durch die Zugabe von Thrombin-Lösung (GE Healthcare, Freiburg) auf der Säule gestartet. Es folgte eine 16 stündige Inkubation bei 23 °C. Am nächsten Tag wurden CHASE Domäne und Thrombin mit 5 ml (PBS, pH 7,3) eluiert, während das GST-Protein mit L-Glutathion reduziert eluiert wurde (Chromatogramm nicht gezeigt). Die Elutionsfraktionen von CHASE+Thrombin wurden aufkonzentriert und auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetragen und

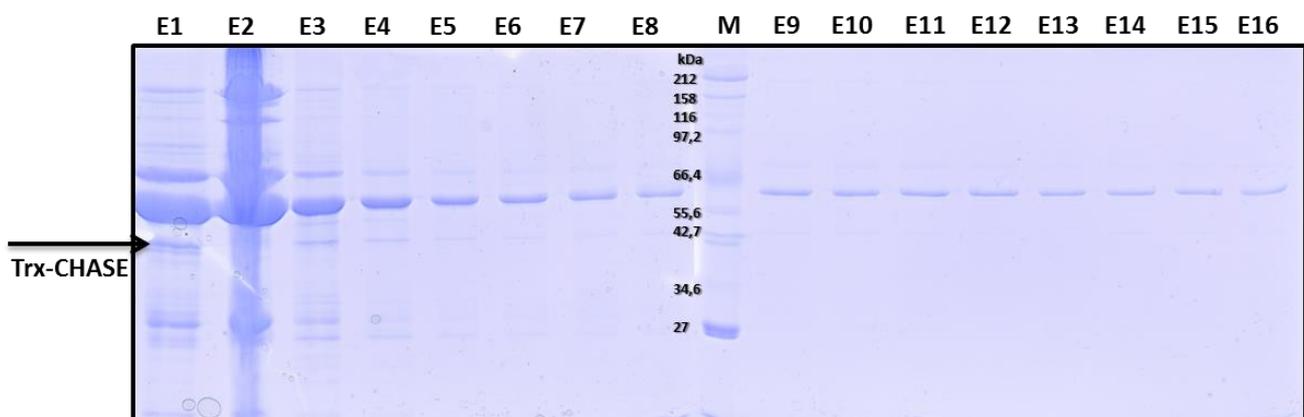
analysiert. Das Gel zeigte eine Bande bei ca. 57,5 kDa des GST-CHASE Proteins, eine Bande bei ca. 26 kDa des GST-Proteins und mehrere schwache Banden (Abb. 48). Dies deutet darauf hin, dass ein Teil vom GST-CHASE Proteins zu CHASE und GST mit Thrombin geschnitten wurde. Weil nach dem Verdau keine Bande auf dem SDS-Gel beim erwarteten Molekulargewicht von ca. 31,64 kDa des CHASE Proteins zu sehen war, wurde vermutet, dass das Protein abgebaut und die native exprimierte CHASE Domäne ohne GST-Tag nicht stabil war. Wegen der hohen Fähigkeit zur Dimerisierung des GST Proteins, war die Co-Kristallisierung von der CHASE Domäne mit dem GST-Tag unmöglich, weil die GST- Dimere die Kristallisation der CHASE-Dmäne verhindern können.



**Abbildung 48: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der aufkonzentrierten Fraktionen nach Gel-Chromatographie vom Peak 1 und Peak 2 und nach dem Thrombin-Verdau des GST-CHASE Proteins.** Die Fraktionen von jedem Peak wurden nach Gel-Chromatographie gepoolt, aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9) und 15 µl wurden auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetragen (Spur 1 bzw. Spur 2). Die aufkonzentrierten Fraktionen von Spur 1 wurden auf einem FPLC-Gerät mit 1 ml GSTrap FF-Säulen (ÄKTA Purifier<sup>100</sup>™, GE Healthcare, Freiburg) gebunden (siehe 2.2.2.7). Der Thrombin-Verdau wurde durch die Zugabe von Thrombin-Lösung (GE Healthcare, Freiburg) gestartet. Es folgte eine 16 stündige Inkubation bei 23 °C. Am nächsten Tag wurden CHASE Domäne und Thrombin mit 5 ml (PBS, pH 7,3) eluiert, während das GST-Protein mit L-Glutathion reduziert eluiert wurde (Im Gel nicht gezeigt). Die Fraktionen von CHASE+Thrombin wurden aufkonzentriert und 15 µl wurden auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetragen (Spur 4). Als Kontrolle wurden 5 µl von der Thrombin-Lösung mit aufgetragen (Spur 3). 10 µl von P7702 (NEB) wurden als Größenstandard zweimal mit aufgetragen (M).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass das CHASE Protein unter den vorher beschriebenen nativen Expressionsbedingungen nicht stabil war. Deshalb wurde anschließend nach einem Tag gesucht, das eine hohe Löslichkeit des Proteins unterstützt und keine Dimere bildet, damit es mit der die CHASE Domäne co-kristallisiert werden kann. Zwei Tags (Maltose Binding Protein (MBP-Tag) und Thioredoxin (Trx-Tag)) wurden schließlich als gute Kandidaten für die Co-Kristallisation mit der CHASE Domäne ausgewählt. Die entsprechenden kodierenden Bereiche des *PpCHK4* Gens wurden

anschließend in die Vektoren pETMBP\_1b mit 6His-MBP-Tag und pET-Trx\_1a mit 6His-Trx-Tag als N-terminale-Fusion kloniert. Zum Expressieren der CHASE Domäne in höherer Konzentration wurde die Auto-Induktion im großen Maßstab (1 l Autoinduktionsmedium (ZYP-5052)) im Stamm *ArcticExpress (DE3)* bei 16 °C und für 2 Tage für jedes Konstrukt durchgeführt (siehe 2.2.2.5). Das Konstrukt 6His-Trx-CHASE wurde danach durch Affinitätschromatographie an einem FPLC-Gerät mit 1 ml Ni-Sepharose-Säulen (ÄKTA Purifier100™, GE Healthcare, Freiburg) nativ aufgereinigt (siehe 2.2.2.7). Danach wurde die CHASE Domäne mit dem Elutionspuffer (25 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7,8) und mit 2 ml Fraktionen (E1-E16) eluiert (Chromatogramm nicht gezeigt). 15 µl der Elutionsfraktionen wurden schließlich mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 49).

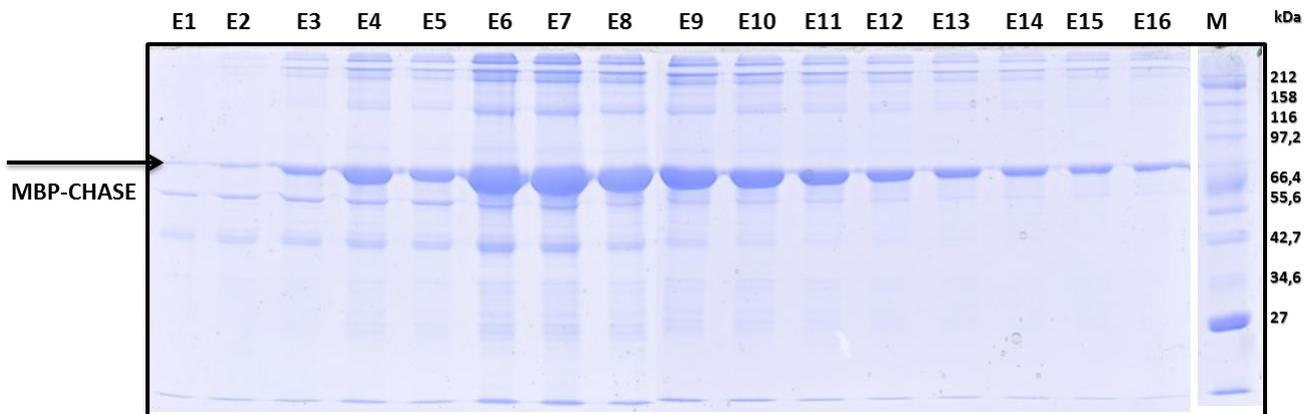


**Abbildung 49: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der nativen Reinigung des 6His-Trx-CHASE Proteins an einem FPLC-Gerät.** Nach der Elution des Proteins mit 0,5 M Imidazol (EP) (siehe Abschnitt 2.2.2.7) wurden 15 µl der Elutionsfraktionen (E1-E16) und des Überstands (Ü) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. 10 µl von P7702 (NEB) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Der Pfeil bei ca. 44 kDa zeigt das auf der Säule gereinigte 6His-Trx-CHASE Protein.

Das Konstrukt 6His-MBP-CHASE wurde durch eine Affinitätschromatographie an einer Dextrinsäule aufgereinigt (siehe 2.2.2.7). Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer. Dieser enthielt 20 mM D-Maltose, die das Dextrin aus der MBP-Bindungstasche verdrängt und so das Protein von der Säule löst. 10 ml der proteinhaltigen Fraktionen (E1-E16) wurden gesammelt und 15 µl davon wurden auf einem 10 %igen SDS-PAGE analysiert (Abb.50).

Auf dem ersten Coomassie-gefärbten SDS-Gel sind eine schwache Bande bei ca. 44 kDa (6His-Trx-CHASE) für die Fraktionen (E1-E8) und eine intensive nicht zuzuordnende Bande bei ca. 60 kDa für alle Fraktionen (E1-E16) in verschiedener Stärke zu sehen (Abb. 49). Auf dem zweiten Coomassie-

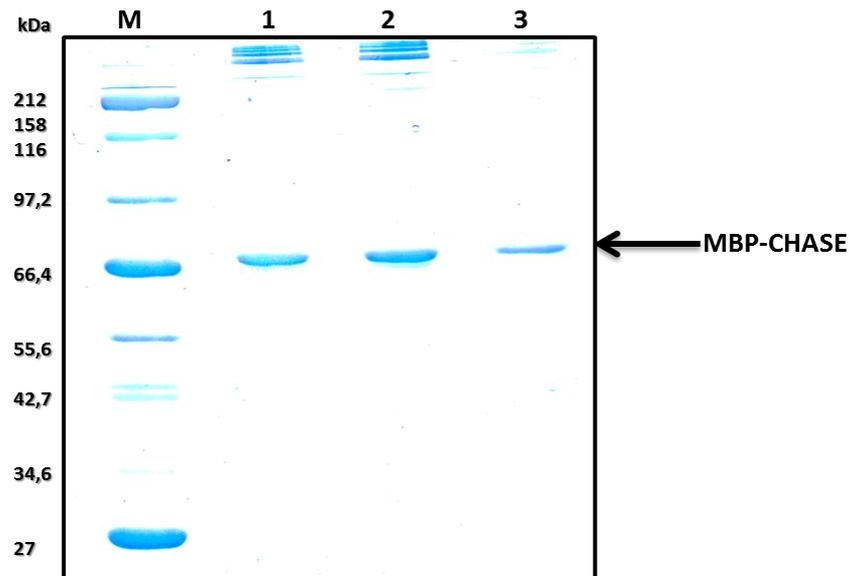
gefärbten SDS-Gel ist eine intensive Bande bei ca. 74 kDa (6His-MBP-CHASE) für alle Fraktionen (E1-E16) in verschiedener Stärke zu sehen (Abb. 50).



**Abbildung 50: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der Reinigung des CHASE-MBP Proteins an einer Dextrinsäule.** Nach der Elution des Proteins wurden 15  $\mu$ l der Fraktionen (E1-E16) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. 10  $\mu$ l von P7702 (NEB) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Der Pfeil bei ca. 74 kDa zeigt das auf der Säule gereinigte CHASE-MBP Protein.

Weil die CHASE Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 unter diesen Bedingungen (siehe oben) mittels Auto-Induktion im *E. coli* Stamm Arctic Express (DE3)RP eine hohe Expression mit MBP-Tag im Vektor pETMBP\_1b aufwies, wurde das resultierte Protein nach der Reinigung an einer Dextrinsäule weiter aufgereinigt.

Zur Trennung des MBP-CHASE Proteins von den anderen unspezifischen Banden (Abb. 50) folgte nach der Proteinelution eine weitere Aufreinigung durch die Gel-Chromatographie (HiLoad<sup>TM</sup>16/60 Superdex 75, GE Healthcare, Freiburg) (siehe 2.2.2.8). Die Elutionsfraktionen (E6+E7) nach der nativen Reinigung wurden gepoolt (20 ml), aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9) und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Laufpuffer wurde hier 25 mM Tris, pH 8,5; 500 mM NaCl verwendet. Die Proteine wurden schließlich nach ihrer Größen von der Säule eluiert. Das Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie zeigte einen großen breiten Proteinpeak für das MBP-CHASE Protein, der mit einem kleinen Peak für die Proteine mit niedrigen Molekulargewichten folgte (Chromatogramm nicht gezeigt). Die Fraktionen von dem Peak (MBP-CHASE) wurden anschließend gepoolt, aufkonzentriert und auf einem 10 %igen SDS-PAGE analysiert (Abb. 51). Das Gel zeigte eine intensive Bande bei ca. 74 kDa des MBP-CHASE Proteins. Was bedeutet, dass das MBP-Protein löslich und in hoher Konzentration und Reinheit erhalten wurde.

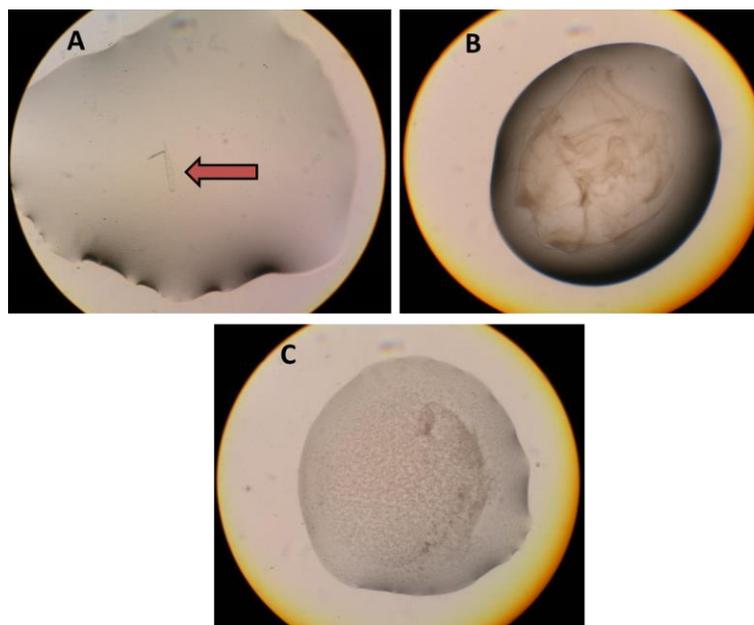


**Abbildung 51: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE der aufkonzentrierten Fraktionen nach Gel-Chromatographie des CHASE-MBP.** Die Elutionsfraktionen (E6+E7) (Abb.50) wurden nach der nativen Reinigung gepoolt (20 ml), aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9) und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Laufpuffer wurde hier 25 mM Tris, pH 8,5; 500 mM NaCl verwendet. Die Proteine wurden danach nach ihren Größen von der Säule eluiert. Die Fraktionen vom MBP-CHASE-Peak wurden anschließend gepoolt und aufkonzentriert. Schließlich wurden 10 µl vom aufkonzentrierten Protein (Spur 1, 2) oder 5 µl (Spur 3) auf einem 10 %igen SDS-PAGE aufgetragen. 10 µl von P7702 (NEB) wurden als Größenstandard mit aufgetragen (M). Der Pfeil bei ca. 74 kDa zeigt das aufgereinigte MBP-CHASE Protein.

Um die richtige Konzentration für die Kristallographie zu erhalten, wurde das resultierte Protein bis ca. 14 mg/ml nochmal aufkonzentriert und zwei Kristallisation-Screens Mb ClassI und Mb ClassII (Qiagen, Hilden) wurden danach pipettiert. Weil diese Kristallisation-Screens keine Kristalle des MBP-CHASE Proteins ergaben, sollte das Protein in höherer Konzentration exprimiert und mit anderen Kristallisationsbedingungen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Expression und die Aufreinigung noch zweimal wiederholt. Das Protein MBP-CHASE lag anschließend in höherer Konzentration (16,5 bzw. 29,09 mg/ml) vor. Die Stabilität und die Kristallisationsbedingungen des Proteins wurden schließlich in weiteren verschiedenen Kristallisation-Screens überprüft. Für die Konzentration 16,5 mg/ml wurden die Screens Mb JCSC Core 24; 25; 26 und 27 (Qiagen, Hilden; MDL MemGold, Molecular Dimensions, England) und für die Konzentration 29,09 mg/ml wurden die Screens Magic1 und Magic2 (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried) getestet. Alle verwendeten Kristallisation-Screens enthielten verschiedene Kristallisationsbedingungen (jede Platte hat 96 verschiedene Kristallisationsbedingungen), die sich jeweils in ihrer Pufferzusammensetzung (z. B. Tris,

Natriumacetat, Natriumzitat, HEPES), dem Präzipitant (z. B. 1-3 M Natrium- oder Kaliumphosphat, 10-30 % Polyethylenglycol (PEG) verschiedener Kettenlänge; z.B. PEG 6000, 1-4 M Ammoniumsulfat und 0,5–1,5 M Natriumzitat (pH 4–10)) und Salzzusätzen (z. B. Natriumchlorid, Magnesiumchlorid, Ammoniumsulfat) unterschieden. Folgende Merkmale waren bis jetzt in den Kristallisation-*Screens* der CHASE Domäne zu sehen:

- Klare Lösung: Das Protein war stabil in der Lösung und kann jeder Zeit zu Kristallen werden, wenn die Konzentration hoch genug ist.
- Salzkristall: Wegen hoher Präzipitatenkonzentration (Abb. 52A).
- Vollständige Präzipitation des Proteins: Das Protein war komplett denaturiert und in der Lösung ausgefallen (Abb. 52B).
- Mikrokristallines Präzipitat: Dieses mikrokristalline Präzipitat kann ein instabiler Zustand sein und zu Kristallen werden (Abb.52C).



**Abbildung 52: Verschiedene Ergebnisse der Kristallisation-*Screens* der CHASE Domäne.** A: Salzkristall. B: Vollständige Präzipitation. C: Mikrokristalliner Präzipitat. Der Pfeil markiert das Salzkristall.

Weil keine Proteinkristalle sondern nur Salzkristall in diesen *Screens* bis jetzt erhalten wurden, wurde vermutet, dass entweder das Protein noch in höherer Konzentration exprimiert werden musste (MBP liefert eine sehr hohe Löslichkeit des Proteins), oder das MBP-CHASE unter diesen Bedingungen anfängt Aggregationen zu bilden, was die Kristallisation verhindern könnte.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Evolution der Cytokininperzeption durch funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen in verschiedenen Systemen analysiert. Der PpCHK4 Rezeptor aus *Physcomitrella patens*, der divergierende Aminosäuren in der CHASE Domäne und konservierte ZKS Domänen enthält, zeigte eine Funktion mit Cytokinin in verschiedenen Assays (Gruhn *et al.*, 2014; 2015). Zum besseren Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen der diversen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors wurde die Lösung der räumlichen Struktur des Proteins angestrebt. Tatsächlich konnte die CHASE Domäne zu hoher Reinheit und Konzentration gebracht werden, eine Kristallisation der Domäne als eine notwendige Grundvoraussetzung für die Lösung der dreidimensionalen Struktur war jedoch bis jetzt nicht erfolgreich. Die Cytokininsignaltransduktion vom putativen Cytokininrezeptor CHARK (CHASE domain Receptor-like serine/threonine Kinase) aus *Oryza sativa*, der zur Klasse mit hohen konservierten Aminosäuren in der CHASE Domäne gehört und nur eine Serin/Threonin Domäne enthält (Gruhn *et al.*, 2014), wurde in dieser Arbeit unter Verwendung verschiedener Assays charakterisiert. Im Folgenden werden die erhaltenden Ergebnisse anhand der vorhandenen Literatur detailliert illustriert und ausführlich diskutiert.

### 4.1 Funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen

Eine phylogenetische Analyse zeigte neben den klassischen Cytokininrezeptoren (Klasse C) eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren, die nur in den früh divergierenden Landpflanzen wie *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* gefunden werden (Klasse B). Außerdem wurde eine dritte Klasse von Rezeptoren aus Cyanobakterien, *Chlorophyceae* Algen und Amöben nachgewiesen (Klasse A) (Gruhn *et al.*, 2014) (siehe Abschnitt 3.1) (Abb. 8). Die Evolution der Cytokininrezeption wurde im Rahmen dieser Arbeit durch funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Klassen (A, B und C) und Organismen in verschiedenen Systemen analysiert.

#### 4.1.1 Drei putative Cytokininrezeptoren aus der Klasse A wurden funktionell mit Cytokinin untersucht

Die Klasse A aus der phylogenetischen Analyse der CHASE Domäne enthält putative Cytokininrezeptoren aus Cyanobakterien, Amöben und *Chlorophyceae* Algen mit diversen CHASE Domäne Aminosäuren und unbekannt anderen (ZKS) Domänen (siehe Abschnitt 3.1.1) (Abb. 9). Die biologische Funktion für drei Rezeptoren aus dieser Klasse Slr1759 (Hik14) (*Hybrid histidine kinase 14*) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp. PCC 6803*; CTK1 (*CHASE domain containing Tyrosine kinase 1*) aus der *Chlorophyceae* Alge *Chlamydomonas reinhardtii* und acgA (*adenylyl cyclase germination protein A*) aus der Amöbe *Dictyostelium discoideum* wurden in verschiedenen Systemen mit Cytokinin untersucht.

##### 4.1.1.1 Funktionelle Charakterisierung des Histidine Kinase Rezeptors Slr1759 aus *Synechocystis sp. PCC 6803*

Das Cyanobakterium *Synechocystis sp. PCC 6803*-Genom enthält 47 kodierende Histidinkinase Gene, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Domänenstrukturen und Funktionen eine wichtige Rolle in der Antwort auf verschiedene Umweltsignale besitzen (Mizuno *et al.*, 1996; Murata und Suzuki 2006; Shin *et al.*, 2008). Der putative Cytokininrezeptor Slr1759 besitzt in seinem N-terminalen Bereich eine CHASE Domäne (*Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular*), die von zwei hydrophoben transmembranständigen Bereichen flankiert ist. Im cytoplasmatischen Teil des Proteins befinden sich zwei PAS<sub>4</sub> Domänen, eine GAF Domäne, eine Histidinkinase A Domäne, eine Histidinkinase ähnliche ATPase Domäne, zwei *Receiver* Domänen und eine Histidin *Phosphotransmitter*-Domäne (siehe Abschnitt 3.1.1.1) (Abb. 10 und 11). Anhand der Vorhersage der Sekundärstruktur wiesen die CHASE Domänen der Rezeptoren Slr1759 und AHK4 ähnliche prozentuale Anteile der Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *Coil*) auf und die beiden Domänen besitzen die gleiche lange  $\alpha$ -Helix im N-terminalen Bereich der Proteine (Abb. 12 und Tabelle 20). Die *Slr1759*-cDNA konnte aus genomischer DNA schrittweise kloniert und für die nächsten Funktionsanalysen zur Verfügung gestellt werden (Abb. 14). Der Histidinkinase putative Cytokininrezeptor Slr1759 konnte keine spezifische Bindungsaktivität mit *trans*-[2-<sup>3</sup>H]Zeatin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay (Abb. 15) und keine Aktivität in einem *E. coli* Komplementationsassay zeigen (Abb. 17). Er konnte aber das Zwei-Komponenten-System (ZKS) in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* in Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay

(PTA) unabhängig von Cytokinin (*tZ*) aktivieren (Abb. 18). Das bedeutet, dass dieser Rezeptor in *Arabidopsis* Protoplasten mindestens exprimiert wurde und wegen ähnlicher Domänenstruktur die Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* komplementieren konnte. Aber wie wurde dieses pflanzliche ZKS durch Slr1759 unabhängig von Cytokinin (*tZ*) aktiviert?

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass dieser Rezeptor wegen seiner ähnlichen Domänenstruktur zu den klassischen Cytokininrezeptoren die Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* komplementierte und eine ständige Aktivität in diesem System zeigte. Diese Aktivität war aber unabhängig von Cytokinin.

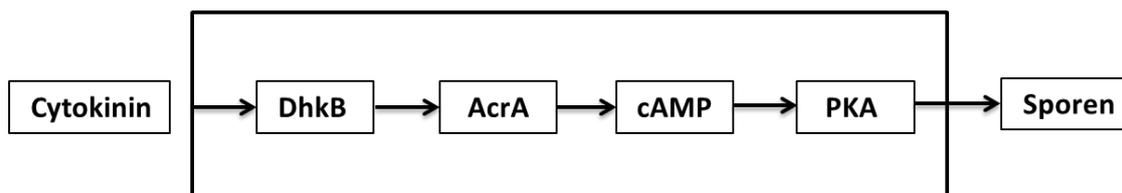
Nodop *et al.* (2006) zeigten, dass die Hybrid-Sensor-Histidinkinase Slr1759 ein mehrstufiges Phosphorelais-System besitzt und dass das *Slr1759*-Gen ein Teil von einem Operon zusammen mit *Slr1760* ist, das für den *Response*-Regulator *Slr1760* kodiert. Sie zeigten, dass Slr1759-Slr1760 ein Zwei-Komponenten-System repräsentieren und dieses System wahrscheinlich eine wichtige Funktion in der Koordination verschiedener Stoffwechsel-Aktivitäten (z.B. Kohlenstoffstoffwechsel) und in der Verbindung mit anderen Signalwegen in *Synechocystis sp. PCC 6803* hat, aber die direkten Liganden und die nachgeschalteten Signalketten dieses ZKSs bleiben bisher nicht bekannt. Die erste PAS Domäne des Slr1759 Rezeptors ist mit einer FAD Domäne (Flavin-Cofaktor) verbunden und dieser Rezeptor konnte in einem *in vivo* Phosphorylationsassay am konservierten Histidinrest der Histidinkinase Domäne phosphoryliert werden (Michel *et al.*, 2008). Die Doppel-Mutanten *slr1759 slr1760* zeigten ein schwächeres Wachstum von *Synechocystis sp. PCC 6803* in einigen Wachstumsbedingungen (z.B. bei Animpfung mit einer niedrigen Kulturzelldichte) (Nodop *et al.*, 2006).

Um die Aktivität des Slr1759 Rezeptors in *Arabidopsis* Protoplasten im PTA System zu beweisen und seine biologische Funktion sowie die nachgeschaltete Signaltransduktion zu charakterisieren, sollten weitere Analysen (z.B. *Yeast Two-Hybrid (Y2H)* und Split-YFP mit AHPs, Mutationsanalysen in *Synechocystis sp. PCC 6803* sowie die Induktion mit verschiedenen Cytokinen) durchgeführt werden. Die Anwesenheit von diesem Histidin-Kinase-Rezeptor mit einer divergierenden CHASE Domäne und konservierten (ZKS) Domänen sowie mehrere IPTs- und CKXs-Proteinen in Cyanobakterien unterstützt die Vermutung, dass der Cytokininstoffwechsel aus bakterieller Herkunft stammt und ins Pflanzengenom über die primäre Endosymbiose eingebracht wurde (Frebort *et al.*, 2011; Spichal, 2012).

#### 4.1.1.2 Funktionelle Charakterisierung des *acgA* Rezeptors aus *Dictyostelium discoideum*

Der *acgA* Rezeptor zeigte eine sehr schwache spezifische Bindungsaktivität mit Cytokinin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay (Abb. 15) und keine Aktivität in einem *E. coli* Komplementationsassay (Abb.17). Dieser Rezeptor konnte aber das ZKS in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* in Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) als Antwort für Cytokinin (*tZ*) aktivieren (Abb. 18), was auf einen Zusammenhang von *acgA* mit Cytokinin hindeutet.

Anjard und Loomis (2008) demonstrierten eine Fähigkeit von Cytokinin, durch ein positives Signal die Sporulation in *Dictyostelium discoideum* zu induzieren und dies passiert parallel und unabhängig vom SDF2-(*sporulation-inducing factor-2*)-Signaltransduktionsweg; SDF2 kann die Sporulation durch ein negatives Signal auch induzieren. Zwei Proteine, eine Histidinkinase DhkB und eine Adenylatzyklase AcrA, sind an der Cytokinin-signaltransduktion beteiligt, weil die in *Dictyostelium* einzelnen Mutationen *dhkB*<sup>-</sup> und *acrA*<sup>-</sup> keine Sporulationsinduktion durch Cytokinin zeigen konnten (Anjard und Loomis *et al.*, 2008). Aber in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay konnte keine Cytokininbindungsaktivität für DhkB oder AcrA detektiert werden (Anjard und Loomis *et al.*, 2008). Es wurde schon bestätigt, dass die CHASE Domäne die Cytokininbindung des Cytokininrezeptors vermittelt (Heyl *et al.*, 2007). Die Rezeptoren DhkB und AcrA besitzen in ihrem N-terminalen Bereich keine CHASE Domäne, sondern nur kleine extrazelluläre Schleifen (loops) und können dadurch das Cytokinin nicht binden (Zinda und Singleton, 1998). DhkB besitzt in seinem cytoplasmatischen Teil eine Histidinkinase A Domäne bzw. eine Histidinkinase ähnliche ATPase Domäne und eine *Receiver*-Domäne, während AcrA eine *Receiver* Domäne bzw. eine *pseudo* Histidinkinase A; eine *Receiver* Domäne und eine Adenylatzyklase Domäne besitzt. Loomis, (2014) vermutete, dass DhkB und AcrA zusammen einen Heterodimer bilden können, in welchem die Phosphatgruppe vom Histidinrest der Histidinkinase Domäne des DhkB Rezeptors direkt auf den Aspartatrest der *Response*-Regulator Domäne des AcrA Rezeptors übertragen wird, was cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) und PKA (*camp-dependent protein kinase*) aktiviert und dadurch die Sporulation induziert (Abb. 53).

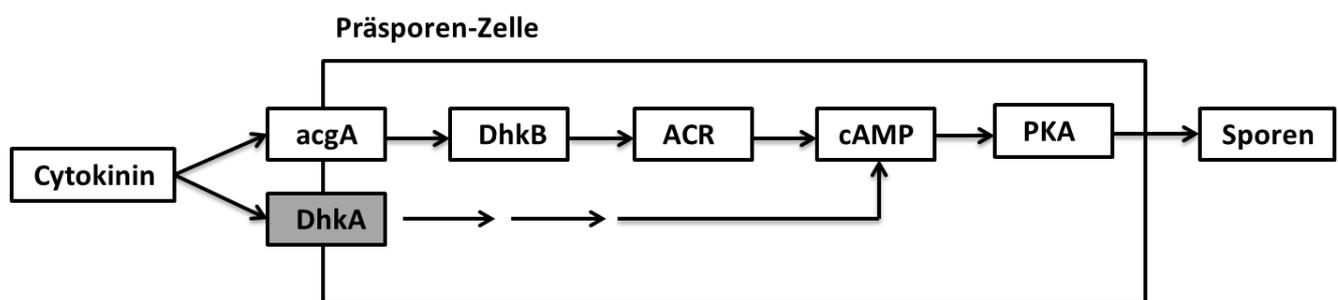


**Abbildung 53: Modell einer Cytokininsignaltransduktion in *Dictyostelium discoideum*.** Die Cytokininsignaltransduktion in *Dictyostelium* fängt mit einer Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest der Histidinkinase Domäne des DhkB Rezeptors an, die anschließend auf den Aspartatrest der *Response*-Regulator Domäne des AcrA Rezeptors direkt übertragen wird, was cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und PKA (*camp-dependent protein kinase*) aktiviert und dadurch die Sporulation induziert (Abbildung von Loomis, 2014).

Aber die Cytokininrezeptoren in *Dictyostelium* sowie andere Elemente der Cytokininsignaltransduktion sind bisher nicht identifiziert.

Die Klasse A einer phylogenetischen Analyse der CHASE Domäne enthält zwei putative Cytokininezeptoren aus *Dictyostelium discoideum* *acgA* und *Dhka* (Gruhn *et al.*, 2014). Der Histidinkinase putative Cytokininrezeptor *Dhka* besitzt eine diverse CHASE Domäne die konservierten (ZKS) Domänen (Abb. 9). Die spezifischen Liganden der Rezeptoren *acgA* und *Dhka* wurden als SDF-1 (*sporulation-inducing factor-1*) bzw. SDF-2 (*sporulation-inducing factor-2*) identifiziert (Wang *et al.*, 1999; Loomis, 2014). Die einzelnen Mutationen *dhka*<sup>-</sup> und *acgA*<sup>-</sup> in *Dictyostelium* zeigten keine Veränderung der Sporulationsinduktion durch Cytokinin (Anjard und Loomis *et al.*, 2008). Die *Arabidopsis* Mutationen der einzelnen Cytokininrezeptoren zeigten auch keinen signifikanten Phänotyp (Nishimura *et al.*, 2004). Wahrscheinlich haben die putativen Cytokininrezeptoren in *Dictyostelium* *Dhka* und *acgA* mit anderen nicht bekannten Rezeptoren eine positive, überlappende Funktion in der Cytokininsignaltransduktion wie die *Arabidopsis* Cytokininrezeptoren und können durch verschiedene Affinitäten und Regulationsprozesse die Cytokinin-Derivate sowie SDF1 und SDF2 binden. Der Cytokininsignalweg in *Dictyostelium* konnte auch mit der Signaltransduktion von SDF-1 und SDF-2 integriert werden und die beiden Rezeptoren *acgA* und *Dhka* haben wahrscheinlich die Fähigkeit Homo- und Heterodimerisierungen zu bilden. Entsprechend dieser Vermutungen und der vorhandenen Ergebnisse wurde ein neues Modell der Cytokininsignaltransduktion in *Dictyostelium discoideum* vorgeschlagen (Abb. 54). Anhand dieses Modells wird das Cytokinin durch die CHASE Domäne der Rezeptoren *acgA* und *Dhka* gebunden. Nach der Cytokininbindung an der CHASE Domäne des *acgA* Rezeptors wird die Guanylatcyklase Domäne autophosphoryliert, die Phosphatgruppe wird danach auf den konservierten Histidinrest

der Histidinkinase Domäne des DhkB Rezeptors und anschließend auf den Aspartatrest der Response-Regulator Domäne des AcrA Rezeptors übertragen, was cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und PKA (*camp-dependent protein kinase*) aktiviert und schließlich die Sporulation induziert. Wenn das Cytokinin an der CHASE Domäne des DhkA Rezeptors bindet, erfolgt eine Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest des Rezeptors, die anschließend auf den Aspartatrest des Rezeptors übertragen wird. Dies führt zur Aktivierung von cAMP und PKA und zur Sporulationsinduktion



**Abbildung 54: Neues Modell einer Cytokininsignaltransduktion in *Dictyostelium discoideum*.** Nach der Bindung von Cytokinin an der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors acgA wird die Guanylatcyklase Domäne autophosphoryliert, die Phosphatgruppe wird danach auf den konservierten Histidinrest der Histidinkinase Domäne des DhkB Rezeptors und anschließend auf den Aspartatrest der Response-Regulator Domäne des AcrA Rezeptors übertragen, was cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und PKA (*camp-dependent protein kinase*) aktiviert und die Sporulation induziert. Wenn das Cytokinin an der CHASE Domäne des DhkA Rezeptors bindet, erfolgt eine Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest des Rezeptors, die anschließend auf den Aspartatrest des Rezeptors übertragen wird. Dies führt zur Aktivierung von cAMP und PKA und zur Sporulationsinduktion (Abbildung modifiziert aus Loomis, 2014).

Ausführliche Analysen der Cytokininsignaltransduktion und der durch Cytokinin induzierten Sporulation in *Dictyostelium discoideum* sind hier nötig, um dieses Signal in *Dictyostelium* weiter aufzuklären. Untersuchung der Cytokinin-Aktivität von *Dictyostelium* Cytokininsignal-Mitgliedern in höheren Pflanzen kann wichtige Informationen über die Entstehung und Evolution des (ZKS) Systems ergeben.

In der Evolution trennten sich die Amoebozoa von der Tiere-Pilze Linie kurz nach der Spaltung von Pflanzen und Tieren (Eichingeretal, 2005; Schilde and Schaap, 2013). Da *Dictyostelium discoideum* die beste charakterisierte Amöbe ist (Loomis, 1975; 1982; Kessin, 2001), die Entwicklung von *Dictyostelium* viel einfacher als die von Pflanzen und Tiere ist und viele gleiche pflanzliche und tierische Signale in *Dictyostelium discoideum* gefunden wurden (Loomis, 2014), stellt die

Charakterisierung und die Evolution des Zwei-Komponenten-Systems (ZKS) in *Dictyostelium discoideum* ein zukünftiges Projekt dar.

Nächste Schritte in der Forschung dieses Phänomens könnten sein:

- Charakterisierung der Cytokininsignaltransduktion in *Dictyostelium discoideum* mit folgenden Genen (*acgA*, *dhkA*, *DhkB* und *AcrA*) durch verschiedene Analysen (z.B. Mutationsanalysen und Sporulationsinduktion mit Cytokinin; *in vivo* Cytokininbindungsassay; *E. coli* und *in Planta* Komplementationsassay; *in vivo* Kinase-Assay; Messung des Cytokiningehaltes und quantitative *Realtime*-PCR).
- Eine neue phylogenetische Analyse mit den CHASE Domänen aus *Dictyostelium* und anderen Organismen, die wichtige Rolle in der Evolution des Cytokininsignals spielen [z.B. aus Pflanzen, *Charophyceae* Grünalgen (*Klebsormidium flaccidum*; *Spirogyra pratensis*), *Chlorophyceae* Grünalgen (*Volvox carteri*; *Ostreococcus tauri*), *Phaeophyceae* Braunalgen (*Ectocarpus fasciculatus*; *Pylaiella littoralis*) und *Rhodophyceae* Rotalgen (*Cyanidioschyzon merolae*; *Chondracanthus teedei*)], sollte durchgeführt werden, um die Evolution der Cytokininperzeption besser zu verstehen.

#### 4.1.1.3 Funktionelle Charakterisierung des putativen Cytokininrezeptors CTK1 aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Der putative Cytokininrezeptor CTK1 (*CHASE domain containing tyrosine kinase 1*) gehört zur Klasse A mit divergierenden CHASE Domäne Aminosäuren und zwei Proteinkinase Domänen (Pkinase\_Tyr-Pkinase) (Abb. 8 und 10). Die CHASE Domäne des CTK1 Rezeptors ist eine kurze Domäne mit nur drei  $\alpha$ -Helices und weist eine unterschiedliche Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *Coil*) im Vergleich zur CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors auf (Abb. 12 und Tabelle 20). Dieser Rezeptor zeigte eine sehr schwache Bindungsaktivität mit Cytokinin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay (Abb. 15) und konnte das Signal in einem *E. coli*-Komplementationsassay zur zellulären Antwort nicht weiterleiten (Abb. 17). Interessanterweise konnte dieser Rezeptor das Zwei-Komponenten-System in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* in Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) mit einer hohen Aktivität und einer hohen Induktion mit Cytokinin (*tZ*) aktivieren (Abb. 18). Eine Hypothese für die Aktivität des CTK1 Rezeptors im PTA Assay wäre, dass durch die Bindung von Cytokinin (*tZ*) an die CHASE Domäne die (Pkinase\_Tyr) Domäne autophosphoryliert wurde und dadurch das Signal direkt auf die nächsten Cytokininsignalelemente

weiterleiten konnte. Eine andere Hypothese wäre, dass dieser putative Cytokininrezeptor mit einem Histidinkinase Protein interagieren könnte, das das Autophosphorylierungssignal weiter zur zellulären Antwort überträgt.

Nur zwei von vier Cytokininsignalmitgliedern (HPTs und RRBs) wurden im *Chlorophyceae* Grünalgen genom gefunden (Pils und Heyl, 2009), aber putative Cytokininrezeptoren mit einer diversen CHASE-Domäne und unbekannt anderen (ZKS) Domänen wurden auch in Grünalgen wie *Chlamydomonas* und *Volvox* identifiziert (Gruhn *et al.*, 2014). Ivanova und Kollegen zeigten, dass die iP-Form 90 % von den Cytokinin in *Chlamydomonas reinhardtii* repräsentiert. tZ- und DHZ-Formen waren ebenfalls anwesend, aber die cZ-Form wurde nicht untersucht (Ivanova *et al.*, 1992). Park und Kollegen zeigten, dass Kinetin das Wachstum von *Chlamydomonas reinhardtii* deutlich induzieren kann (Park *et al.*, 2013). Aber die biologische Funktion von Cytokinin sowie die Cytokininsignaltransduktion in *Chlamydomonas reinhardtii* sind bisher unbekannt.

Die Aktivität vom CTK1 in PTA System lässt sich vermuten, dass die Cytokininsignaltransduktion dieses ungewöhnlichen Rezeptors durch die Evolution in höheren Pflanzen entwickelt wurde und während der Entwicklung Veränderungen in den entsprechenden aktiven Domänen passierte. Aber die genaue nachgeschaltete Cytokininsignaltransduktion des CTK1 Rezeptors sowie die Entwicklung dieses Signals durch die Evolution von *Chlamydomonas reinhardtii* in höheren Pflanzen, sollten durch verschiedene Assays und phylogenetische Analysen charakterisiert werden.

#### **4.1.2 Verschiedene Assays lieferten von zwei Mitgliedern der neuen Klasse, MpCHK1 und PpCHK4 Hinweise für eine Funktion als Cytokininrezeptoren**

Die phylogenetische Analyse der CHASE Domäne (Abb. 8) zeigte überraschend eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren mit divergierenden Aminosäuren in der CHASE Domäne und konservierten Domänen (ZKS), die nur in den frühen divergierenden Landpflanzen, in *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens*, gefunden wurden (Klasse B). Zwei putative Cytokininrezeptoren aus dieser Klasse, MpCHK1 aus *Marchantia polymorpha* und PpCHK4 aus *Physcomitrella patens*, wurden in dieser Arbeit funktionell als Cytokininrezeptor charakterisiert (Abb. 19). Beide Rezeptoren zeigten eine Cytokininbindungsaktivität mit *trans*-Zeatin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay (mit starker Bindungsaktivität für PpCHK4 und schwächer für MpCHK1) (Abb. 24) und konnten das Zwei-Komponenten-System (ZKS) spezifisch als Reaktion auf

verschiedene Cytokinine mit verschiedenen Konzentrationen in einem bakteriellen Komplementationsassay *in vivo* aktivieren (im hohen Niveau für PpCHK4 und im niedrigen Niveau für MpCHK1) (Abb. 25). Ein anderer Hinweis für die Funktion beider Proteine als Cytokininrezeptoren ist auch ihre subzelluläre Lokalisation. Somit wies die Analyse der subzellulären Lokalisation mittels GFP-(*Green Fluorescent Protein*)-Fusionsproteine in Tabakepidermiszellen eine Lokalisation von MpCHK1 und PpCHK4 zum großen Teil im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran auf (Abb. 26). Interessantweise ist diese subzelluläre Lokalisation ähnlich der vorher beschriebenen Lokalisation für die klassischen Cytokininrezeptoren (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011; Lomin *et al.*, 2011). Jedoch ist die biologische Rolle dieser einmaligen putativen Cytokininrezeptoren der Klasse B bisher unklar. Die Anwesenheit von Mitgliedern nur aus *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* in dieser Klasse zeigt wahrscheinlich einen Hinweis auf eine frühe Trennung dieser Klasse von den klassischen Cytokininrezeptoren der modernen Landpflanzen (Klasse C) (Gruhn *et al.*, 2014). *Physcomitrella patens* besitzt auch drei aktive klassische Cytokininrezeptoren (CHK1, CHK2 und CHK3) (von Schwarzenberg *et al.*, eingereicht), während *Marchantia polymorpha* nur einen putativen Cytokininrezeptor (in unserer phylogenetischen Analyse) besitzt. Die Anwesenheit von solchen Cytokininrezeptoren von den beiden Klassen im Genom von *Physcomitrella patens* sowie wahrscheinlich ihre unterschiedlichen biologischen Funktionen sollten experimentell untersucht werden. Interessanterweise wurde in einer phylogenetischen Analyse eine neue Familie von sechs putativen Cytokininrezeptoren im Genom von *Klebsormidium flaccidum* (eine *Charophyta*-Alge) identifiziert (Hori *et al.*, 2014), von denen aber die meisten Rezeptoren mit den in *Physcomitrella patens* neuen putativen Cytokininrezeptoren eng verwandt sind. Eine phylogenetische Analyse zeigte zwei EST-Beweise im RR-Baum und einen EST-Beweis im HATPase Baum der *Charophyta* (Grünalgen) *Spirogyra pratensis*, die mit den Sequenzen der Cytokininrezeptoren gruppierten, was auf erste Hinweise für die Existenz von putativen Cytokininrezeptoren in *Spirogyra pratensis* hindeutet (Gruhn *et al.*, 2014).

Die Sequenzierung von weiteren Genomen aus *Chlorophyceae* und *Charophyceae* (Grünalgen) und eine erneute *large-scale* phylogenetische Analyse der CHASE Domäne können hier wichtige Informationen über die Evolution dieser neuen Rezeptorfamilie ergeben.

### 4.1.3 Die Aktivität des putativen Cytokininrezeptors CHARK aus *Oryza sativa* wurde funktionell mit Cytokinin charakterisiert

Der putative Cytokininrezeptor CHARK aus *Oryza sativa* gehört zur Klasse mit hohen konservierten CHASE Domäne Aminosäuren (Klasse C) und enthält eine Serin/Threonin Domäne (Abb.8 und 27). Dieser Rezeptor war in dieser Arbeit aus mehreren Gründen besonders interessant, weil

- (1) Ser/Thr Kinasen normalerweise in der Signalübertragung des Phytohormones Cytokinin keine Rolle spielen.
- (2) die CHASE Domäne von CHARK denen der anderen klassischen Cytokininrezeptoren sehr ähnlich ist.
- (3) es keine Homologe zu CHARK in nahverwandten Spezies, z.B. Mais oder Sorghum gibt.

Alle diese Besonderheiten deuten darauf hin, dass CHARK ein atypischer putativer Cytokininrezeptor ist. Zur Charakterisierung der Signaltransduktion dieses atypischen Cytokininrezeptors und seiner Integration in der konventionellen Cytokininsignaltransduktion wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Assays durchgeführt. In einem *in vivo* Cytokininbindungsassay konnte für CHARK eine schwache spezifische Bindungsaktivität für das Cytokinin *trans*-Zeatin nachgewiesen werden, die deutlich über der Bindungsaktivität der Vektorkontrolle lag (Abb. 31). Er zeigte aber keine Aktivität in einem *E. coli*-Komplementationsassay und konnte damit das Cytokininsignal auf die nächsten Mitglieder dieses Zwei-Komponenten-Systems im Vergleich mit der Positiv- und Negativkontrolle nicht übertragen (Abb. 32). Interessanterweise konnte dieser Rezeptor das Zwei-Komponenten-System (ZKS) in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* in Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) mit einer hohen Cytokinin-Induktion (ungefähr zweifach höher als die Cytokinin-Induktion der Positivkontrolle AHK2) aktivieren (Abb. 33B). Um die Ergebnisse von Protoplasten-*trans* Aktivierungsassays (PTA) zu bestätigen und die Aktivität des putativen Cytokininrezeptors CHARK in Pflanzen zu untersuchen, wurden Komplementationsanalysen für CHARK in der *Arabidopsis thaliana* Rezeptor-Mutanten-Linie *ahk2-2/ahk3-3* wie vorher im Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt (Stolz *et al.*, 2011). Interessanterweise konnte CHARK in fünf von den sechs homozygoten Linien eine vollständige Komplementierung (Linie II-VI) und in einer Linie keine Komplementierung (Linie I) der *ahk2/ahk3* Mutanten zeigen (Abb. 34). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CHARK die *ahk2/ahk3* Mutationen funktionell ersetzen konnte und somit als

Cytokininrezeptor in *Arabidopsis* aktiv ist. Um seine biologische Funktion zu erfüllen, muss ein Protein im entsprechenden subzellulären Kompartiment lokalisiert sein. Die Analyse der Subzellulären Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteine in Tabakepidermiszellen zeigte eine Lokalisation von CHARK zum großen Teil im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran (Abb. 35). Diese subzelluläre Lokalisation ist ähnlich der vorher beschriebenen Lokalisation für die klassischen Cytokininrezeptoren (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011; Lomin *et al.*, 2011). Nach diesen interessanten Ergebnissen entstanden die Fragen: Wie wird das Cytokininsignal durch CHARK weitergeleitet? Erfolgt die Signalweiterleitung wegen der Ser/Thr Kinase Domäne nicht über den klassischen Cytokininsignalweg, sondern über eine neue bisher unbekannte Signalkaskade?

Um diese Fragen beantworten zu können, sollten noch weitere unterschiedliche Assays für CHARK in der Reispflanze durchgeführt werden. Die Protein-Protein-Interaktionen des cytoplasmatischen Teils von CHARK mit AHP2, AHP4 und AHP5 aus *Arabidopsis thaliana* konnten im einem gezielten *Yeast Two-Hybrid (Y2H)* Screen nachgewiesen werden (Kristin Helbig, 2013). Anhand dieses Protein-Protein-Interaktionsexperiments lässt sich somit vorschlagen, dass CHARK ähnlich wie AHKs mit den AHPs interagieren kann und die Cytokininsignaltransduktion von CHARK der von den AHKs ähnelt. Diese *Yeast Two-Hybrid (Y2H)* Ergebnisse sollen *in planta* mit Hilfe des Split-YFP Systems bestätigt werden, und die gleichen Analysen sollen ebenfalls mit OsHPs durchgeführt werden.

Das *Tobacco HK-like* Protein NTHK2 konnte in der Anwesenheit von  $Mn^{+2}$  eine Serin/Threonin Kinase Aktivität und in der Anwesenheit von  $Ca^{+2}$  eine Histidinkinase Aktivität in einem *in vitro* Phosphorylationsassay zeigen (Zahng *et al.*, 2004). Entsprechend dieser Phosphorylationsmöglichkeiten eines Sensor-Histidine-Kinase-Rezeptors und der oben genannten Ergebnisse konnte ein Modell der Cytokininsignaltransduktion des CHARK Rezeptors vorschlagen werden: Nach der Bindung von Cytokinin an die CHASE Domäne des CHARK Rezeptors wird die Ser/Thr Kinase Domäne an Ser/Thr oder anderen Resten autophosphoryliert und die Phosphorylgruppe wird anschließend auf die Phosphotransfer-Proteine direkt übertragen. Die Autophosphorylationsfähigkeit der Ser/Thr Kinase Domäne des CHARK Rezeptor sowie die phosphorylierten Reste und der Transfer von der Phosphorylgruppe auf die Phosphotransfer-Proteine müssen durch Phosphorylations- und Kinase-Assays analysiert werden. Die Funktion und die Evolution von der Ser/Thr Kinase Domäne sollten eingehender untersucht werden, um den nachgeschalteten Signalübertragungsweg und die biologische Funktion von CHARK besser zu

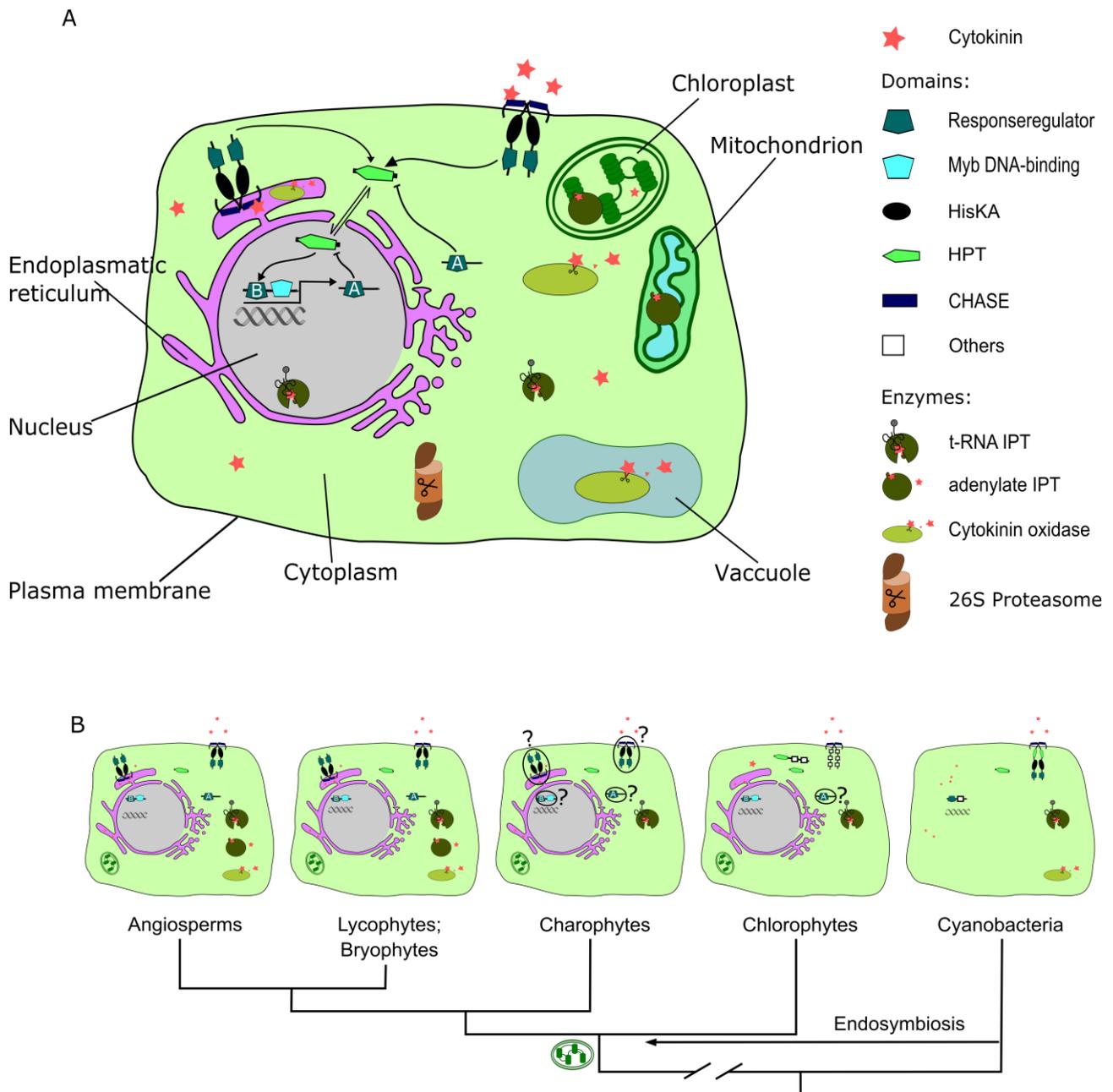
verstehen. Dazu sollte eine ausführliche detaillierte Analyse der Funktion von CHARK in der Reispflanze (z.B. *Promotor::GUS* Expression-Experimenten, quantitative *Realtime* PCR, CHARK-Überexpression (*35S::CHARK*), CHARK *Knock-Outs*; für die CHARK-Mutationen ein Wurzel *Elongation* Assay (weil *CHARK* in Wurzeln exprimiert wird) sowie die Reaktion auf biotische sowie abiotische Stresse, Untersuchung der Bindungsaffinität der CHASE Domäne mit verschiedenen Cytokinin, gezielte *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) Analyse für CHARK mit OsHPs und *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) Assay für CHARK mit cDNA-Bibliothek aus Reis) durchgeführt werden.

Die Anwesenheit dieser neuen Art von Cytokininrezeptor (CHARK) nur in *Oryza sativa* lässt uns vermuten, dass sich hier ein Cytokininsignaltransduktionsweg entwickelte, welcher Elemente für Eukaryoten typischen Signalweges (Ser/Thr Phosphorylierungssystem) aufweist (Schaller *et al.*, 2011). Neue Forschungen zeigten, dass nicht-Familiengene (*orphan genes*), die *de novo* aus nicht-kodierenden Regionen generiert werden, an primären biologischen Prozessen beteiligt sind und wichtige Rolle in der Evolution der Organismen haben (Tautz und Domazet-Lozo 2011; Ye *et al.*, 2013). Deshalb ist nicht auszuschließen, dass auch das nicht-Familiengen *CHARK* eine Rolle in Reis besitzt, obwohl CHARK eine andere Domänenstruktur und einen anderen evolutionären Ursprung als die anderen klassischen Cytokininrezeptoren besitzt.

## 4.2 Evolution der Cytokininsignaltransduktion

Mehrere Gründen der Evolution der Cytokininsignaltransduktion machen es eine sehr interessante Analyse: Erstens sind die Signalmoleküle in allen untersuchten Organismen vorhanden (Spichal, 2012); zweitens sind die Protein-Domänen, die für die Cytokininsignaltransduktion notwendig sind, in verschiedenen Königreichen gefunden wurden und schließlich scheinen die verschiedenen Cytokinin-SignalKomponenten nur in Landpflanzen zusammenzukommen, um den Cytokininsignalweg zu bilden (Pils und Heyl, 2009). Der Cytokininsignalierungsweg und – Metabolismus fehlen in der Tier-Abstammungslinie. Mitglieder der (ZKS) Protein-Familien des Cytokininsignalweges wurden in allen Landpflanzen gefunden (Schaller *et al.*, 2011). Weil *IPT* und *CKX* Gene aus Cyanobakterien in der letzten Zeit identifiziert wurden, wurde es vermutet, dass der Cytokinin Stoffwechsel aus bakterieller Herkunft stammt und ins Pflanzengenom über primäre Endosymbiose eingetragen wurde (Frebort *et al.*, 2011; Spichal, 2012) (Abb. 55). In ersten phylogenetischen Analysen mit den sequenzierten *Chlorophyceae*-Genomen wurden zwei von vier

der Cytokinin (ZKS) Gen-Familien (HPs und RRBs) detektiert, aber die Cytokininrezeptoren und RRAs wurden nur in Genomen von Landpflanzen gefunden (Pils und Heyl, 2009) (Abb. 55). Das Genom der *Klebsormidium flaccidum* Alge, die zur Klasse Charophyta (Klebsormidiales-Art) gehört, wurde sequenziert (Hori *et al.*, 2014). Die vier Cytokinin-Signalierungselemente (HKs, HPs und RRs) wurden in diesem Genom gefunden. Interessanterweise wurde eine neue Familie von sechs putativen Cytokininrezeptoren, ein putatives Phosphotransfer-Protein, ein putativer Typ-B RRs *Response-Regulator* und ein putativer Typ-A RRs *Response-Regulator* identifiziert (Hori *et al.*, 2014).



**Abbildung 55: Modell für die Evolution der Cytokininsignaltransduktion. (a)** Aktuelles Modell des Cytokinin-Signalwegs und die wichtigen Enzyme der Stoffwechsel in Angiospermen. **(b)** Modell für die Herkunft und Evolution des Cytokinin

Zwei-Komponenten-Systemen. Die wichtigen Gene für dieses System wurden ins Pflanzengenom über primäre Endosymbiose eingetragen, nachfolgende Sub- und Neo-Funktionalisierung von duplizierten Genen führten zum Cytokininsignalsystem in modernen Pflanzen. RR = *Receiver* Domäne, *Response*-Regulator; HK = Histidine-Kinase Domäne; HPT = Histidine Phosphotransfer-protein; CHASE = *Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular*; IPT = Isopentenyl Transferase (Abbildung von Gruhn und Heyl, 2013).

Gruhn und Kollegen zeigten in der phylogenetischen Analyse der Cytokininsignaltransduktion einen Algen-Ursprung der Cytokininrezeption. Die Histidin Phosphotransfer Proteine der *Charophyceae* Algen schienen näher zu Landpflanzen als zu den anderen Grünalgen-Gruppen zu sein. B-Typ RRs wurden in allen Pflanzen Klassen gefunden, aber vielen Mitgliedern fehlte entweder den kanonischen Asp-Rest oder die DNA-Bindungsdomäne. Im Gegensatz hierzu schienen A-Typ RRs begrenzt zu Landpflanzen zu sein. Schließlich ergab diese Analyse Hinweise für eine zusätzliche Gruppe von RRs (Typ-C RRs), die degenerierte Rezeptoren sein könnten und damit aus einem anderen evolutionären Ursprung als die klassischen RRs kommen (Schaller *et al.*, 2008; Gruhn *et al.*, 2014). Wang *et al.* (2015) zeigten in einer phylogenetischen Analyse, dass die *AHK* Orthologen in den Genomen von *Charophyta* (*N. mirabilis* und *K. flaccidum*) vorhanden sind. Sie identifizierten drei putative Cytokininrezeptoren aus *K. flaccidum* und einen Rezeptor aus *N. mirabilis* Alge, die diversen Aminosäuren in der CHASE Domäne im Vergleich mit der CHASE Domäne des *AHK4* Rezeptors und interessanterweise die (ZKS) konservierten Domänen besitzen. Weil alle Cytokinin-Signalierungselemente (HKs, HPs, RRs und CRFs) im Genom von *K. flaccidum* detektiert wurden, wurde vermutet, dass der Cytokinin-Signalisierungsweg in Landpflanzen ursprünglich aus den *Charophyta* kommt (Wang *et al.*, 2015).

Anhand unserer Ergebnisse zeigte der putative Cytokininrezeptor CTK1 aus der *Chlorophyceae* Alge *Chlamydomonas reinhardtii* eine hohe Aktivität als Antwort auf Cytokinin in einem Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) (siehe Abschnitt 3.1.1). Die Anwesenheit von diesem Rezeptor im *Chlamydomonas reinhardtii*-Genom und seine Aktivität mit Cytokinin ergaben einen neuen Hinweis über die Evolution der Cytokinin-Rezeption aus den *Chlorophyceae* Algen, dass dieses System von CTK1 wahrscheinlich dem System von CHARK ähnelt, obwohl die beiden Systeme von anderen evolutionären Ursprüngen kommen.

Die *Amoebozoa* trennten sich von der Tiere-Pilze Linie kurz nach der Spaltung von Pflanzen und Tieren (Eichinger *et al.*, 2005; Schilde and Schaap, 2013) und zwei Cytokinine (Isopentenyl Adenin und Discadenin) wurden aus *Dictyostelium discoideum* isoliert (Loomis, 2008). Die Aktivität des

putativen Cytokininrezeptors *acgA* aus *Dictyostelium discoideum* in einem Protoplasten-*trans*-Aktivierungsassay (PTA) zeigte einen wichtigen Hinweis über eine mögliche Evolution des Cytokinin-Signal aus den sozialen Amöben.

Die Charakterisierung der Cytokinin-signaltransduktion in *Dictyostelium discoideum*, die Sequenzierung von weiteren Genomen aus *Chlorophyceae* und *Charophyceae* Grünalgen, die phylogenetischen Analysen sowie die funktionelle Charakterisierung von neuen identifizierten putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Organismen werden wichtige Hinweise über die Evolution bringen.

### **4.3 Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der CHASE Domäne des Cytokininrezeptors PpCHK4 aus *Physcomitrella patens***

Die Cytokininmoleküle werden durch die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors (CHASE Domäne) gebunden (Heyl *et al.*, 2007 und Miwa *et al.*, 2007). Die CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors aus *Arabidopsis thaliana* wurde kristallisiert (Hothorn *et al.*, 2011) und die kritischen Aminosäuren in der Cytokininbindungstasche der CHASE Domäne wurden identifiziert (siehe Abschnitt 1.7) (Heyl *et al.*, 2007; Hothorn *et al.*, 2011). Die strukturellen Daten zeigten, dass die CHASE Domäne zu zwei PAS-*like* Domänen aufgeteilt ist, und die membrandistale PAS-*like* Domäne für die Cytokininbindung verantwortlich ist. Die CHASE Domäne besitzt auch eine lange  $\alpha$ -Helix, die für die Struktur-Stabilität der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors wichtig ist (Hothorn *et al.*, 2011).

Der putative Cytokininrezeptor PpCHK4 aus *Physcomitrella patens*, konnte eine Aktivität mit Cytokinin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay und in einem bakteriellen Komplementationsassay zeigen (siehe 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Die Analyse der subzellulären Lokalisation des PpCHK4 Rezeptors zeigte eine ähnliche Lokalisation der vorher beschriebenen Lokalisation für die klassischen Cytokininrezeptoren (siehe 3.1.2.4) (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011). Zwei kritische Reste für die Cytokininbindung der CHASE Domäne des AHK4 Rezeptors (D262, T294) sind in der diversen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors nicht konserviert (Gruhn *et al.*, 2015). Aus diesen Gründen und um besser zu verstehen, wie sich die Aminosäuren der Cytokininbindungstasche in der Evolution entwickelten, ist die Kristallisation und die Lösung der Tertiärstruktur dieses diversen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors sehr wichtig.

### **4.3.1 Bestimmung der optimalen Bedingungen der löslichen Überexpression der CHASE Domäne von PpCHK4 durch Substratinduktion in *E. coli***

Die CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors (Aminosäuren 98-282; ~31,46 kDa, siehe Abbildung 20) wurde zuerst als GST-getaggetes Protein im Vektor pGEX-4T-3 im *E. coli* exprimiert (siehe Abschnitt 2.2.2.5). Zum nativen Expressieren dieser Domäne in höherer Konzentration wurden die optimalen Bedingungen der Expression bestimmt. Danach wurde die Expression der CHASE Domäne entsprechend diesen optimalen Bedingungen im großen Maßstab (1 l LB-Medium) durchgeführt. Nach der Affinitätsreinigung (siehe 2.2.2.7) wurde anschließend die Identität der nativen aufgereinigten CHASE Domäne durch MALDI-MS bestätigt (siehe Abschnitt 2.2.2.15, Abb.39 und 40). Schließlich wurde die CHASE Domäne durch Ultrafiltration aufkonzentriert (siehe 2.2.2.9 und Abb. 43). Das native aufgereinigte GST-CHASE Protein wies aber unter diesen Bedingungen einen niedrigen Reinheitsgrad und eine Instabilität auf (Abb. 42 und 43). Zum Zweck der Expression der CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors in höherer Konzentration, Stabilität und Reinheit für die geplante Kristallografie, wurde die CHASE Domäne anschließend in mehreren *E. coli*-Expressionsvektoren mit verschiedenen N- oder C-terminalen Tags kloniert und seine native Expression mit diesen Konstrukten unter den oben genannten optimalen Bedingungen und in verschiedenen *E. coli* Stämmen getestet (siehe Abschnitt 3.2.1). Aber die CHASE Domäne wurde unter diesen Bedingungen entweder schwach oder mit niedrigem Reinheitsgrad exprimiert. Aus diesem Grund wurde nach neuen Expression- und Aufreinigung-Methoden gesucht, die höhere Proteinkonzentration, Stabilität und Reinheit der CHASE Domäne ermöglichen können.

### **4.3.2 Präparative native Überexpression und Reinigung der CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors durch Auto-Induktion in *E. coli***

Die CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors wurde mit verschiedenen Tags (His-Tag; Sumo\_Stepp II\_7x His-Tag und GST-Tag) im *E. coli* Stamm Arctic Express (DE3)RP bei 16 °C und für 48 Stunden durch Auto-Induktion exprimiert (siehe 2.2.2.5) und anschließend durch Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.2.2.7). Da die Expression des GST-CHASE Proteins unter diesen Bedingungen die größte Menge und die höchste Reinheit zeigte (siehe 3.2.2) (Abb. 44, 45 und 46), wurde das Protein anschließend entsprechend diesen Bedingungen im großen Maßstab exprimiert, durch Affinitätschromatographie und schließlich durch Gel-Chromatographie aufgereinigt (siehe 2.2.2.8) (Abb. 47 und 48). Nach der Spaltung des GST-Tags vom Zielprotein durch die Protease Thrombin wurde keine Bande auf dem SDS-Gel beim erwarteten Molekulargewicht von ca. 31,64 kDa des

CHASE Proteins gesehen, was auf die Instabilität der nativen exprimierten CHASE Domäne ohne GST-Tag unter diesen Expressionsbedingungen hindeutet. Wegen der hohen Fähigkeit zur Dimerisierung des GST Proteins, war die Co-Kristallisierung von CHASE Domäne mit GST-Tag unmöglich, weil die GST-Dimere die Kristallstruktur der CHASE-Domäne verhindern kann. Deshalb wurde anschließend nach einem Tag gesucht, das eine hohe Löslichkeit des Proteins unterstützt und keine Dimere bildet, damit es mit der die CHASE Domäne kokristallisiert werden kann. Die Expression der CHASE Domäne wurde danach mit dem MBP-Tag durchgeführt und das Protein durch Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.2.2.7) (Abb.49 und 50). Nach der Aufreinigung konnte das MBP-Protein nativ und in hohen Konzentrationen (14 mg/ml; 16,5 mg/ml und 29,09 mg/ml) und Reinheit erhalten. Für alle Proteinkonzentration wurden die Stabilität und die Kristallisationsbedingungen des Proteins schließlich in verschiedenen Kristallisation-*Screens* überprüft (siehe 3.2.2). Weil keine Proteinkristalle, sondern nur Salzkristall in diesen *Screens* bis jetzt erhalten wurde (Abb. 52), wurde vermutet, dass entweder das Protein noch in höherer Konzentration exprimiert werden muss (MBP liefert eine sehr hohe Löslichkeit des Proteins), oder das MBP-CHASE unter diesen Bedingungen anfängt Aggregationen zu bilden, was die Kristallisation verhindern konnte.

Aufgrund der erhaltenen hohen Proteinkonzentration konnte hier eine NMR-Spektroskopie Analyse durchgeführt werden, um die Tertiärstruktur des CHASE-Proteins versuchen zu lösen. Die Expression der CHASE Domäne mit anderen Tags (z.B. Optimierung der Expression mit Trx-Tag; oder mit Fh8-Tag, das die stärkste Löslichkeit als alle anderen Protein-Tags fördert (Costa *et al.*, 2014)), wird hier auch empfohlen.

## 5 Zusammenfassung

Cytokinine gehören zu einer Klasse von pflanzlichen Hormonen, die an vielen entwicklungsbiologischen und physiologischen Prozessen beteiligt sind. Das Cytokininsignaltransduktionssystem in *Arabidopsis thaliana* basiert auf dem Zwei-Komponenten-System (ZKS). Während die Cytokininsignaltransduktion in höheren Pflanzen gut erforscht ist, gibt es kaum Informationen über dieses System in früh divergierenden Landpflanzen und anderen Organismen (wie Bakterien und Algen). Um Einblicke in die Entstehung und Entwicklung des Cytokininregulierungssystems zu gewinnen, wurden wichtige Komponenten des Signalwegs dieses Phytohormons in den Genomen und EST-Daten von einer Vielzahl von verschiedenen Arten aus Bakterien und Algen bis zu modernen Landpflanzen identifiziert. Diese phylogenetische Analyse zeigte neben den klassischen Cytokininrezeptoren (Klasse C) eine neue Klasse von putativen Cytokininrezeptoren, die nur in den früh divergierenden Landpflanzen wie *Marchantia polymorpha* und *Physcomitrella patens* gefunden werden (Klasse B). Außerdem wurde eine dritte Klasse von Rezeptoren aus Cyanobakterien, *Chlorophyceae* Algen und Amöben nachgewiesen (Klasse A). Die Evolution der Cytokininrezeption wurde im Rahmen dieser Arbeit durch funktionelle Charakterisierung von putativen Cytokininrezeptoren aus verschiedenen Klassen (A, B und C) und Organismen in verschiedenen Systemen analysiert. Die biologische Funktion für drei Rezeptoren aus der Klasse A, Slr1759 aus *Synechocystis sp. PCC 6803*; CTK1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* und acgA aus *Dictyostelium discoideum*, wurde charakterisiert. Eine sehr schwache spezifische Bindungsaktivität für das Cytokinin *trans*-Zeatin konnte für acgA und CTK1 in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay beobachtet werden. Alle drei putativen Rezeptoren acgA, Slr1759 und CTK1 zeigten keine Aktivität in einem *E. coli* Komplementationsassay und konnten damit das Cytokininsignal auf die nächsten Mitglieder dieses *E. coli* Zwei-Komponenten-Systems nicht übertragen. Interessantweise konnten acgA und CTK1 das ZKS in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* im Protoplasten-*trans* Aktivierungsassay (PTA) als Antwort für Cytokinin aktivieren. Der putative Rezeptor Slr1759 zeigte in diesem Assay eine hohe Aktivität, aber diese Aktivität war nicht von Cytokinin-abhängig. Zwei putative Cytokininrezeptoren aus der neuen Klasse (Klasse B), MpCHK1 aus *Marchantia polymorpha* und PpCHK4 aus *Physcomitrella patens*, wurden in dieser Arbeit funktionell als Cytokininrezeptor charakterisiert. Beide Rezeptoren zeigten eine Cytokininbindungsaktivität mit *trans*-Zeatin in einem *in vivo* Cytokininbindungsassay und

konnten das ZKS spezifisch als Reaktion auf verschiedene Cytokinine mit verschiedenen Konzentrationen in einem bakteriellen Komplementationsassay *in vivo* aktivieren. Die Cytokininsignaltransduktion des atypischen Cytokininrezeptors CHARK aus *Oryza sativa*, der zur Klasse mit hohen konservierten CHASE Domäne Aminosäuren (Klasse C) gehört und außer der CHASE Domäne nur eine Serin/Threonin Domäne enthält, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch charakterisiert. In einem *in vivo* Cytokininbindungsassay konnte für CHARK eine schwache spezifische Bindungsaktivität für das Cytokinin *trans*-Zeatin nachgewiesen werden. Er zeigte aber keine Aktivität in einem *E. coli*-Komplementationsassay, konnte aber interessantweise das ZKS in der *Arabidopsis* Rezeptor-Mutantenlinie *ahk2-5/ahk3-7* im PTA mit einer hohen Cytokinin-Induktion aktivieren. Dieser putative Cytokininrezeptor zeigte auch in *Arabidopsis* Komplementationsanalysen in fünf von den sechs homozygoten Linien eine vollständige Komplementierung (Linie II-VI) der *ahk2/ahk3* Mutanten.

Zum besseren Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung der diversen CHASE Domäne des PpCHK4 Rezeptors wurde die Lösung der räumlichen Struktur des Proteins angestrebt. Zu diesem Zweck wurde die CHASE Domäne mit verschiedenen N- oder C-terminalen Tags durch verschiedene Expressionsbedingungen und -Methoden in *E. coli* exprimiert. Die stärkste Expression der CHASE Domäne wurde mit dem MBP-Tag erreicht. Nach der Proteinaufreinigung lag das MBP-Protein nativ und in hoher Konzentration vor. Die Stabilität und die Kristallisationsbedingungen des Proteins wurden schließlich in verschiedenen Kristallisation-Screens überprüft. Eine Kristallisation der Domäne als eine notwendige Grundvoraussetzung für die Lösung der Tertiärstruktur Struktur war jedoch bis jetzt nicht erfolgreich.

## 6 Summary

Cytokinins are a class of plant hormones involved in many developmental and physiological processes. The cytokinin signal transduction is based on the two-component system (TCS). While the TCS of cytokinin signal transduction is well researched in higher plants, information about this system in early divergent land plants and other organisms (such as bacteria and algae) are rare. To gain insights into the origin and evolution of the cytokinin regulatory system, key components of the signaling pathway of this phytohormone were identified in the genomes and EST data of a wide variety of different species ranging from bacteria and algae to modern land plants. In addition to the clade of well known, “classical” cytokinin receptors (clade C), this phylogenetic analysis revealed a new clade of putative cytokinin receptors, which contains only members from *Marchantia polymorpha* and *Physcomitrella patens* (clade B). Furthermore, a third clade was detected with receptors from cyanobacteria, *chlorophyceae* algae and amoeba (clade A). The evolution of cytokinin reception was analyzed in this work by functional characterization of putative cytokinin receptors from different clades (A, B and C) and organisms in different systems. The biological function of three receptors of the clade A, namely Slr1759 from *Synechocystis sp. PCC 6803*; CTK1 from the *Chlamydomonas reinhardtii* and acgA from *Dictyostelium discoideum*, was characterized. The *in vivo* cytokinin binding assay demonstrated a very weak cytokinin binding activity of acgA and CTK1 to *trans*-Zeatin. All three putative receptors, acgA, Slr1759 and CTK1, did not transduce the cytokinin signal into a cellular response in an *E. coli* complementation assay. Interestingly, acgA and CTK1 could activate the TCS in *ahk2-5/ahk3-7* knockout mutants of *A. thaliana* in protoplasts *trans*-activation assay (PTA). The third putative receptor, histidine kinase receptor Slr1759 showed high activity in protoplasts transactivation assay (PTA), but this activity was not dependent on cytokinin. Two putative cytokinin receptors of the new clade (clade B), MpCHK1 from *Marchantia polymorpha* and PpCHK4 from *Physcomitrella patens*, were functionally characterized as cytokinin receptors in this work. Both receptors showed cytokinin binding activity with *trans*-Zeatin in an *in vivo* hormone binding assay and could specifically activate the TCS in response to various cytokinins with different concentrations in an *E. coli* complementation assay. All cytokinin receptors of the classical clade have a typical architecture with an N-terminal CHASE (Cyclase/Histidine-kinase-Associated Sensory Extracellular) domain, followed by a histidine kinase domain and a receiver domain. Except of the putative cytokinin receptor CHARK (CHASE domain

Receptor-like serine/threonine Kinase) from *Oryza sativa* which has unusual domain architecture consisting of a CHASE domain and a serine/threonine kinase domain. To investigate, if CHARK uses an unusual pathway to transduce cytokinin in rice compared to the classical cytokinin receptors, the activity of this receptor was characterized using different assays. The *in vivo* hormone binding assay demonstrated a cytokinin binding activity for CHARK, but this putative receptor did not transduce the cytokinin signal into a cellular response in an *E. coli* complementation assay. Interestingly this receptor could activate the TCS in *ahk2-5/ahk3-7* knockout mutants of *A. thaliana* in protoplasts *trans*-activation assay (PTA) with a high cytokinin induction. In *Arabidopsis* complementation assays the putative cytokinin receptor CHARK rescued also functionally the *A. thaliana* receptor mutated line *ahk2/ahk3* plants, thus demonstrated this assay a full complementation of five from six homozygous lines (II-VI).

For a better understanding of the evolution of cytokinin binding by the divergent CHASE domain of the putative cytokinin receptor PpCHK4, the crystallization and the solution of its tertiary structure was crucial. For this purpose the CHASE domain was expressed in *E. coli* with different N- or C-terminal tags through different experimental conditions and methods. The strongest expression of the CHASE domain has been reached with the MBP-tag. After the purification the MBP-CHASE was obtained in high concentration and purity. The stability and the crystallization conditions of the protein were finally checked in different crystallization screens. However, the crystallization of the CHASE domain as a necessary prerequisite for the solution of the tertiary structure was so far not successful.

## 7 Bibliographie

- Akiyoshi, D.E., Klee, H., Amasino, R.M., Nester, E.W., und Gordon, M.P.** (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **81**, 5994-5998.
- 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.
- Anjard, C., und Loomis, W. F.** (2008) Cytokinins induce sporulation in *Dictyostelium*. *Development*, **135**, 819-827.
- Allaby, M ed.** (1992) Algae. *The Concise Dictionary of Botany*. Oxford: Oxford University Press.
- Argueso, C. T., Ferreira F. J., Epple, P., To, J. P., Hutchison, C. E., Schaller, G. E., Dangl, J. L. und Kieber, J. J.** (2012) Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genetics*, **8**, e1002448.
- 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.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., S. Lin, Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E. R., Qian Q., Kitano, H. und Matsuoka, M.** (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, **309**, 741-745.
- 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.
- 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.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids*, **7**, 1513-1523.
- Bishopp, A., Help, H., und Helariutta, Y.** (2009) Cytokinin signaling during root development. *International Review of Cell and Molecular Biology*, **276**, 1-48.
- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., Benková, E., Mähönen, A. P. und Helariutta, Y.** (2011a) A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*, **21**, 917-926.
- Bishopp, A., Lehesranta, S., Vatén, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mähönen, A. P., Sakakibara, H. und Helariutta, Y.** (2011b) Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Current Biology*, **21**, 927-932.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

- 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.
- Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. und Palme, K.** (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, **262**, 1051-1054.
- Buchan, D.W.A., Minneci, F., Nugent, T.C.O., Bryson, K und Jones, D.T.** (2013) Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, **41**, W340-W348.
- 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.
- Caesar, K., Thamm, A. M., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., ... und Harter, K.** (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, err238.
- Caillet, J., und Droogmans, L.** (1988) Molecular cloning of the *Escherichia coli* miaA gene involved in the formation of delta 2-isopentenyl adenosine in tRNA. *Journal of bacteriology*, **170**, 4147-4152.
- Calvin, N.M. und Hanawalt, P.C.** (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of Bacteriology*, **170**, 2796-2801.
- Cheng, X., Jiang H., Zhang J., Qian Y., Zhu, S. und Cheng, B.** (2010) Overexpression of type-A rice response regulators, OsRR3 and OsRR5, results in lower sensitivity to cytokinins. *Genetics and Molecular Research*, **9**,348-359.
- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C. M. und Hwang, I.** (2011) Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends in Plant Science*, **16**, 388-394.
- Choi, J., Lee, J., Kim, K., Cho, M., Ryu, H., An, G. und Hwang, I.** (2012) Functional identification of OsHK6 as a homotypic cytokinin receptor in rice with preferential affinity for iP. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 1334-1343.
- 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.
- Clark, L. G., Zhang, W. und Wendel, J. F.** (1995) A phylogeny of the grass family (*Poaceae*) based on ndhF sequence data. *Systematic Botany*, 436-460.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **16**, 735-743.
- Compton, S. J. und Jones, C. G.** (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, **151**, 369-374.

- Cortleven, A., Remans, T., Brenner, W. G. und Valcke, R.** (2009) Selection of plastid- and nuclearencoded reference genes to study the effect of altered endogenous cytokinin content on photosynthesis genes in *Nicotiana tabacum*. *Photosynthesis Research*, **102**, 21-29.
- Cortleven, A., Noben, J. P. und Valcke, R.** (2011) Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic *tobacco* plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study. *Proteome Science*, **9**, 33.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A. und Domingues, L.** (2014) Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*, **5**.
- Cove, D. J., und Knight, C. D.** (1993) The moss *Physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *The Plant Cell*, **5**, 1483.
- Cutcliffe, J. W., Hellmann, E., Heyl, A. und Rashotte, A. M.** (2011) CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 4995-5002.
- D'Agostino, I. B., Deruere, J. und Kieber, J. J.** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, **124**, 1706-1717.
- Dello Iorio, 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.
- Dello Iorio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Ao-yama, T., Costantino, P. und Sabatini, S.** (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, **322**, 1380-1384.
- 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.
- Drees, B. L.** (1999) Progress and variations in two-hybrid and three-hybrid technologies. *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 64-70.
- Du, L., Jiao, F., Chu, J., Jin, G., Chen, M. und Wu, P.** (2007) The two-component signal system in rice (*Oryza sativa* L.): a genome-wide study of cytokinin signal perception and transduction. *Genomics*, **89**, 697-707.
- Duplessis, M. R., Karol, K. G., Adman, E. T., Choi, L. Y., Jacobs, M. A. und Cattolico, R. A.** (2007) Chloroplast His-to-Asp signal transduction: a potential mechanism for plastid gene regulation in *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 70.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M. A., Sugang, R., Berriman, M., ... und Hauser, H.** (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435**, 43-57.

- Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C. S., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J., und Dröge-Laser, W. (2006) Two-hybrid protein–protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *The Plant Journal*, **46**, 890-900.
- El-Showk, S., van Zweden, J. S., d'Ettoire, P. und Sundstrom, L. (2010) Are you my mother? Kin recognition in the ant *Formica fusca*. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 397-406.
- Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E.L.L., Tate J., und Punta M. Nucleic Acids Research (2014) Database Issue **42**, D222-D230.
- Frahm, J. (2001) Biologie der Moose. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin*, S. 122. ISBN 3-8274-0164-X.
- Frahm J., Frey, W. und Döring, J. (2004) Moosflora. 4., neu bearbeitete und erweiterte Auflage (UTB für Wissenschaft, Band 1250). Ulmer, Stuttgart, ISBN 3-8001-2772-5.
- Frebort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frebortova, J. und Galuszka, P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2431-2452.
- Gajdosova, S., Spichal, L., Kaminek, M., Hoyerova, K., Novak, O., Dobrev, P. I., Galuszka, P., Klima, P., Gaudinova, A., Zizkova, E., Hanus, J., Dancak, M., Travnicek, B., Pesek, B., Krupicka, M., Vankova, R., Strnad, M. und Motyka, V. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2827-2840.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébertová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmülling, T. und Frébert, 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.
- Gaudet, P., Fey, P., und Chisholm, R. (2008) *Dictyostelium discoideum*: The social amoeba. *Cold Spring Harb. Protoc.*
- Gietz, R. D., und Woods, R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology*, **350**, 87-96.
- 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.
- Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., Droege, A., Lindenberg, K.S., Knoblich, M., Haenig, C., Herbst, M., Suopanki, J., Scherzinger, E., Abraham, C., Bauer, B., Hasenbank, R., Fritzsche, A., Ludewig, A.H., Buessow, K., Coleman, S.H., Gutekunst, C.A., Landwehrmeyer, B.G., Lehrach, H. und Wanker, E.E. (2004) A protein interaction network links GIT1, an enhancer of Huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Molecular Cell*, **15**, 853-865.

- Gray, J., Gelvin, S. B., Meilan, R., und Morris, R. O.** (1996) Transfer RNA is the source of extracellular isopentenyladenine in a Ti-plasmidless strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, **110**, 431-438.
- Gruhn, N. und Heyl, A.** (2013) Updates on the model and the evolution of cytokinin signaling. *Current opinion in plant biology*, **16**, 569-574.
- Gruhn, N., Halawa, M., Snel, B., Seidel, M. F. und Heyl, A.** (2014) A Subfamily of Putative Cytokinin Receptors Is Revealed by an Analysis of the Evolution of the Two-Component Signaling System of Plants. *Plant Physiology*, **165**, 227–237.
- Gruhn, N., Seidl, M. F., Halawa, M., und Heyl, A.** (2015) Members of a recently discovered subfamily of cytokinin receptors display differences and similarities to their classical counterparts. *Plant Signaling & Behavior*, **10**, e984512.
- 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.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hanano, S., Domagalska, M.A., Nagy, F., und Davis, S.J.** (2006) Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes Cells*, **11**, 1381-1392.
- Han, Q. M., H. W. Jiang, X. P. Qi, J. Yu und P. Wu** (2004) A CHASE domain containing protein kinase *OsCRL4*, represents a new *AtCRE1*-like gene family in rice. *Journal of Zhejiang University Science*, **5**, 629-633.
- Harris, E. H.** (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Biology*, **52**, 363-406.
- Helbig, K.** (2013) Untersuchungen zur Lokalisation, zur Protein-Protein-Interaktion und zur Evolution des putativen Cytokininrezeptors CHARK aus *Oryza sativa*. Freie Universität Berlin Institut für Biologie – Angewandte Genetik.
- Hellmann, E., Gruhn, N. und Heyl, A.** (2010) The more, the merrier: Cytokinin signaling beyond *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behaviour*, **5**, 1365-1371.
- 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**, 62.
- 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.

- Heyl, A., Riefler, M., Romanov, G. A. und Schmülling, T. (2012) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European journal of Cell Biology*, **91**, 246-256.
- 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.
- Hill, K., Mathews, D. E., Kim, H. J., Street, I., Wildes, S., Chiang, Y. H., Mason, M., Alonso, J., Ecker, J., Kieber, J. und Schaller, G. E. (2013) Functional characterization of type-B response regulators in the *Arabidopsis* cytokinin response. *Plant Physiology*, **162**, 212-224.
- 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., Makita, N., Kojima, M., Kamada-Nobusada, T. und Sakakibara, H. (2007) Overexpression of a type-A response regulator alters rice morphology and cytokinin metabolism. *Plant and Cell Physiology*, **48**, 523-539.
- 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.
- Hoffman, C. S. und Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., Ikeuchi, M., Watanabe, M., Wada, H., Kobayashi, K., Saito, M., Masuda, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Mashiguchi, K., Awai, K., Shimojima, M., Masuda, S., Iwai, M., Nobusawa, T., Narise, T., Kondo, S., Saito, H., Sato, R., Murakawa, M., Ihara, Y., Oshima-Yamada, Y., Ohtaka, K., Satoh, M., Sonobe, K., Ishii, M., Ohtani, R., Kanamori-Sato, M., Honoki, R., Miyazaki, D., Mochizuki, H., Umetsu, J., Higashi, K., Shibata, D., Kamiya, Y., Sato, N., Nakamura, Y., Tabata, S., Ida, S., Kurokawa, K. und Ohta, H. (2014) *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications*, **5**, 3978.
- Hothorn, M., Dabi, T. und Chory, J. (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nature Chemical Biology*, **7**, 766-768.
- Hradilová, J. und Brzobohatý, B. (2007) Expression pattern of the AHP gene family from *Arabidopsis thaliana* and organ specific alternative splicing in the AHP5 gene. *Biologia plantarum*, **51**, 257-267.
- 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.

- Hwang, I., Chen, H. C. und Sheen, J.** (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **129**, 500-515.
- Hwang, I. und H. Sakakibara** (2006) Cytokinin biosynthesis and perception. *Planta*, **126**, 528-538.
- Hwang, I., Sheen, J. und Muller, B.** (2012) Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 353-380.
- Imamura, A., Hanaki, N., Umeda, H., Nakamura, A., Suzuki, T., Ueguchi, C. und Mizuno, T.** (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**, 2691-2696.
- Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T. und Mizuno, T.** (1999). Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology* **40**, 733-742.
- 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.
- Ishida, K., Yamashino, T., Nakanishi, H. und Mizuno, T.** (2010) Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **74**, 2542-2545.
- Ito, Y. und Kurata, N.** (2006) Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene*, **382**, 57-65.
- 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.
- Ivanova, M., Todoruv, I., Pashankov, P., Kostova, L. und Kaminek, M.** (1992) Estimation of cytokinins in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 483-485.
- Jain, M., Tyagi, A. und Khurana, J.** (2006) Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biology*, **6**, 1.
- Jungbauer, A. und Kaar, W.** (2007) Current status of technical protein refolding. *Journal of Biotechnology*, **128**, 587-596.
- 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.
- Kamada-Nobusada, T. und Sakakibara, H.** (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, **70**, 444-449.
- 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.
- Karimi, M., De Meyer, B. und Hilson, P.** (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science*, **10**, 103-105.
- Katoh, K., Asimenos, G. und Toh, H.** (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods in Molecular Biology*, **537**, 39-64.
- Keeling, P. J.** (2013) The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 583-607.
- Keller, L. C., Romijn, E. P., Zamora, I., Yates, J. R. und Marshall, W. F.** (2005) Proteomic analysis of isolated *Chlamydomonas* centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Current Biology*, **15**, 1090-1098.
- Kessin, R. H.** (2001) *Dictyostelium*: evolution, cell biology, and the development of multicellularity (No. **38**). Cambridge University Press.
- Kiba, T., Taniguchi M., Imamura A., Ueguchi C., Mizuno, T. und Sugiyama, T.** (1999) Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 767-771.
- Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H. und Mizuno, T.** (2004) *Arabidopsis* response regulator, *ARR22*, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1063-1077.
- 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.
- Kieber, J. J. und Schaller, G. E.** (2014) Cytokinins. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, **12**, e0168.
- 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.

- Kirby, J. und Kavanagh, T.A.** (2002) NAN fusions: a synthetic sialidase reporter gene as a sensitive and versatile partner for GUS. *Plant Journal*, **32**, 391-400.
- Knippers, R.** (2001). Molekulare Genetik. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag).
- Köllmer, I.** (2009) Funktionelle Charakterisierung von CKX7 und cytokininregulierten Transkriptionsfaktorgenen in *Arabidopsis thaliana*. PhD, Freie Universität.
- 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.
- Korbie, D. J., und Mattick, J. S.** (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, **3**, 1452-1456.
- Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P. V., Rosenberg, M. und Brown, J. R.** (2000) Evolution of two component signal transduction. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 1956-1970.
- Kudo, T., Kiba, T. und Sakakibara, H.** (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52**, 53-60.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. und Kyozuka, 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.
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K. und Sakakibara, H.** (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **21**, 3152-3169.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landy, A.** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of  $\lambda$  site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, **58**, 913-949.
- Lang, D., Zimmer, A. D., Rensing, S. A. and Reski, R.** (2008) Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science*, **13**, 542-549.
- Lee, R. E.** (2008). *Phycology*. Cambridge University Press.
- 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.
- Lerbs, S., Lerbs, W., Klyachko, N. L., Romanko, E. G., Kulaeva, O. N., Wollgiehn, R., und Parthier, B.** (1984). Gene expression in cytokinin-and light-mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta*, **162**, 289-298.

- Letham, D.S. und Zhang, R.** (1989) Cytokinin translocation and metabolism in lupin species. II. New nucleotide metabolites of cytokinins. *Plant Science*, **64**, 161-165.
- 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.
- Lohar, D.P., Schaff, J.E., Laskey, J.G., Kieber, J.J., Bilyeu, K.D. und Bird, D.M.** (2004) Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *The Plant Journal*, **38**, 203-214.
- 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.
- Lomin, S. N., Yonekura-Sakakibara, K., Romanov, G. A. und Sakakibara, H.** (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5149-5159.
- Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Osolodkin, D. I. und Romanov, G. A.** (2012) Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*, **4**, 31-45.
- Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Arkhipov, D. V., Osolodkin, D. I., Schmülling, T., und Romanov, G. A.** (2015) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany*, eru522.
- Loomis, W. F.** (1975) *Dictyostelium discoideum*. A Developmental System. New York: Academic Press.
- Loomis W.F.** (1982) The Development of *Dictyostelium discoideum*. New York: Academic Press, pp. 233-324
- Loomis, W. F.** (2014) Cell signaling during development of *Dictyostelium*. *Developmental biology*, **391**, 1-16.
- 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.
- 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.

- 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.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Vaclavikowa, K., Miyawaki, K. und Kakimoto, T.** (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 20027-20031.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., ... und Mittag, M.** (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, **318**, 245-250.
- Michel, K. P., Schröder, A. K., Zimmermann, M., Brandt, S., Pistorius, E. K., Frankenberg-Dinkel, N. und Staiger, D.** (2009) The hybrid histidine kinase Slr1759 of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 contains FAD at its PAS domain. *Archives of Microbiology*, **191**, 553-559.
- Miller, C. O.** (1958) The Relationship of the Kinetin and Red-Light Promotions of Lettuce Seed Germination. *Plant Physiology*, **33**, 115-117.
- 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.
- 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.
- Mizuno T., Kaneko T. und Tabata S.** (1996) Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Research*, **3**, 407-414
- Mizuno, T.** (2004) Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 499-505.
- Mizuno, T. und Yamashino, T.** (2010) Biochemical characterization of plant hormone cytokininreceptor histidine kinases using microorganisms. *Methods in Enzymology*, **471**, 335-356.
- 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.** (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.
- 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.
- Muller, B. und J. Sheen** (2007) Cytokinin signaling pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, **2007**, cm4.
- 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.
- Murata, N. und Suzuki, I. (2006)** Exploitation of genomic sequences in a systematic analysis to access how cyanobacteria sense environmental stress. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 235-247.
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N. H. und Sakakibara, H.** (2010) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell*, **22**, 594-605.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. und Shinshi, H.** (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, **140**, 411-432.
- 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.
- 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.
- Nodop, A., Suzuki, I., Barsch, A., Schroeder, A. K., Niehaus, K., Staiger, D., ... und Michel, K. P.** (2006) Physiological and molecular characterization of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant lacking histidine kinase Slr1759 and response regulator Slr1760. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **61**, 865-878.
- Pareek, A., Singh, A., Kumar, M., Kushwaha, H. R., Lynn, A. M. und Singla-Pareek, S.L.** (2006) Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **142**, 380-397.
- Park, W. K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C. W., Choi, Y. E., und Yang, J. W.** (2013) Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **171**, 1128-1142.
- Pils, B. und Heyl, A.** (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology*, **151**, 782-791.
- Punwani, J. A., Hutchison, C. E., Schaller, G. E. und Kieber, J. J.** (2010). The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *Plant J* **62**, 473-482.
- Punwani, J. A. und Kieber, J. J.** (2010) Localization of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin. *Plant Signaling & Behavior*, **5**, 896-898.

- Puthiyaveetil, S. und Allen, J. F.** (2009) Chloroplast two-component systems: evolution of the link between photosynthesis and gene expression. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, 2133-2145.
- 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., Carson, S. D., To, J. P. und Kieber, J. J.** (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **132**, 1998-2011.
- 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.
- Rashotte, A. M. und Goertzen, L. R.** (2010) The CRF domain defines cytokinin response factor proteins in plants. *BMC plant biology*, **10**, 74.
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., ... und Rushton, P. J.** (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, **319**, 64-69.
- Reski, R.** (1998) Development, genetics and molecular biology of mosses. *Botanica Acta*, **111**, 1-15.
- 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.
- 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.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und Oka, A.** (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, **294**, 1519-1521.
- Sakakibara, H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi, M. und Sugiyama, T.** (1998) A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant Journal*, **14**, 337-344.
- Sakakibara, H.** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 43-449.

- 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.
- Salome, 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. *Plant Cell*, **18**, 55-69.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Schaap, P.** (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Development*, **138**, 387-396.
- Schaefer, D. G., Bisztray, G. und Zrýd, J. P.** (1994) Genetic transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Biotechnology and Agriculture*, **29**, *Plant protoplasts and genetic engineering V*, Editor Y.P.S. Bajaj, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New-York.
- Schaller, G. E., Doi, K., Hwang, I., Kieber, J. J., Khurana, J. P., Kurata, N., Mizuno, T., Pareek, A., Shiu, S. H., Wu, P. und Yip, W. K.** (2007) Nomenclature for two-component signaling elements of rice. *Plant Physiology*, **143**, 555-557.
- Shaller, G. E., Kieber, J. J. und Shiu, S. H.** (2008) Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, **6**, e0112.
- Schaller, G. E., Shiu, S. H. und Armitage, J. P.** (2011) Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Current Biology*, **21**, R320-R330.
- 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.
- Shi, X. und Rashotte, A. M.** (2012) Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphotransfer proteins. *Plant Cell Reports*, **31**, 789-799.
- Schilde, C. und Schaap, P.** (2013) The amoebzoa. In *Dictyostelium discoideum Protocols* (pp. 1-15). Humana Press.
- Shin, B. J., Oh, J., Kang, S., Chung, Y. H., Park, Y. M., Kim, Y. H., ... und Choi, J. S.** (2008) Cyanobacterial hybrid kinase SII0043 regulates phototaxis by suppressing pilin and twitching motility protein. *The Journal of Microbiology*, **46**, 300-308.
- Schmitz, R.Y. und Skoog, F.** (1972) Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiol*, **50**, 702-705.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E. und y Manns, I. B.** (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.

- 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.
- Spichal, 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 Physiol*, **45**, 1299-1305.
- Spichal, L.** (2012) Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, **39**, 267-284.
- Spiess, L.D.** (1975). Comparative Activity of Isomers of Zeatin and Ribosyl-Zeatin on *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiol*, **55**, 583-585.
- Sprenger-Haussels, M., und Weisshaar, B.** (2000) Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant Journal*, **22**, 1-8.
- Steklov, M. Y., Lomin, S. N., Osolodkin, D. I. und Romanov, G. A.** (2013) Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. *Plant Cell Reports*, **32**, 781-793.
- Stepanova, A. N. und Alonso, J. M.** (2011) Bypassing transcription: a shortcut in cytokinin-auxin interactions. *Developmental Cell*, **21**, 608-610.
- Stephens, D.J. und Banting, G.** (2000) The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking. *Traffic*, **1**, 763-768.
- Strnad, M., Peters, W., Beck, E. und Kaminek, M.** (1992) Immunodetection and Identification of N-(o-Hydroxybenzylamino)Purine as a Naturally Occurring Cytokinin in *Populus x canadensis* Moench cv Robusta Leaves. *Plant Physiol*, **99**, 74-80.
- Strnad, M.** (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, **101**, 674-688.
- Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S. N., Achazi, K., Romanov, G. A. und Schmölling, T.** (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*, **67**, 157-168.
- Studier, F. W.** (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, **41**, 207-234.
- 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.
- Sun, L., Zhang, Q., Wu, J., Zhang, L., Jiao, X., Zhang, S., ... und Sun, Y.** (2014) Two rice authentic histidine phosphotransfer proteins, OsAHP1 and OsAHP2, mediate cytokinin signaling and stress responses in rice. *Plant physiology*, **165**, 335-345.
- Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C., und Mizuno, T.** (1998). Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, **39**, 1258-1268.

- 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.** (2001a) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 107-113.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C. und Mizuno, T.** (2001b) Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (HPT) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 37-45.
- 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.
- 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., 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, Y., Suzuki, T., Yamashino, T., und Mizuno, T.** (2004). Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 462-465.
- Taniguchi, M., Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T. und Oka, A.** (2007). ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant and Cell Physiology* **48**, 263-277.
- Tautz, D. und Domazet-Lošo, T.** (2011) The evolutionary origin of orphan genes. *Nature Reviews Genetics*, **12**, 692-702.
- Taya, Y., Tanaka, Y., und Nishimura, S.** (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **271**, 545-547.
- 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.
- 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.
- Tsai, Y. C., Weir, N. R., Hill, K., Zhang, W., Kim, H. J., Shiu, S. H., Schaller, G. E. und Kieber, J. J.** (2012) Characterization of genes involved in cytokinin signaling and metabolism from rice. *Plant Physiology*, **158**, 1666-1684.
- 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.
- Urao, T., Yakubov, B., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K.** (1998) Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **427**, 175-178.
- 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.
- von Schwartzenberg, K., Lindner, A., Gruhn, N., Gelhaar, F., Šimura, J., Novák, O., Strnad, M., Gonneau, M., Nogué, F. und Heyl, A.** (2015) Cytokinin Receptors Play Crucial and Distinct Roles in Triggering Developmental Transition of *Physcomitrella patens*, *in Press*.
- Wang, C., Liu, Y., Li, S. S. und Han, G. Z.** (2015) Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery. *Plant physiology*, **167**, 872-886.
- Wang, J., Ma, X. M., Kojima, M., Sakakibara, H. und Hou, B. K.** (2011) N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 2200-2213.
- 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.
- 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.

**Wulfetange, K.** (2010) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Cytokininrezeptors AHK4/CRE1 aus *Arabidopsis thaliana*. Freie Universität Berlin Institut für Biologie – Angewandte Genetik.

**Wulfetange, K., Lomin, S. N., Romanov, G. A., Stolz, A., Heyl, A. und Schmülling, T.** (2011) The Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana* are Locating Mainly to the Endoplasmic Reticulum. *Plant Physiology*, **156**, 1808-1818.

**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.

**Yang, P., Diener, D. R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G. J., Dienes, J. M., ... und Witman, G. B.** (2006) Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella. *Journal of Cell Science*, **119**, 1165-1174.

**Ye, C. Y., Li, T., Yin, H., Weston, D. J., Tuskan, G. A., Tschaplinski, T. J. und Yang, X.** (2013) Evolutionary analyses of non-family genes in plants. *The Plant Journal*, **5**, 788-797.

**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 and Cell Physiology*, **48**, 84-96.

**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.

**Zhang, Z. und Hendrickson, W. A.** (2010) Structural characterization of the predominant family of histidine kinase sensor domains. *Journal of Molecular Biology*, **400**, 335-353.

**Zhang, Z. G., Zhou, H. L., Chen, T., Gong, Y., Cao, W. H., Wang, Y. J., ... und Chen, S. Y.** (2004) Evidence for serine/threonine and histidine kinase activity in the *tobacco* ethylene receptor protein NTHK2. *Plant physiology*, **136**, 2971-2981.

**Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J. und Lohmann, J.U.** (2010) Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, **465**, 1089-1092.

**Zinda, M. J. und Singleton, C. K.** (1998) The Hybrid Histidine Kinase dhkB Regulates Spore Germination in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, **196**, 171-183.

## 8 Publikationen

**Gruhn, N., Seidel, M. F., Halawa, M. and Heyl, A.** (2015) Members of a recently discovered subfamily of cytokinin receptors display differences and similarities to their classical counterparts. *Plant signaling & behavior*, **10**, e984512.

**Gruhn, N., Halawa, M., Snel, B., Seidel, M. F. and Heyl, A.** (2014) A Subfamily of Putative Cytokinin Receptors Is Revealed by an Analysis of the Evolution of the Two-Component Signaling System of Plants. *Plant physiology*, **165**, 227–237.

## **9 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn PD. Dr. Alexander Heyl dafür danken, dass er mich in seiner wissenschaftlichen Gruppe aufgenommen, mir das interessante Thema zur Bearbeitung für meine Promotion überlassen und meine Arbeit durch seine neuen motivierenden Ideen unterstützt hat. Ich danke ihm für die sehr gute und kreative Ausbildung, die ich in seinem Labor erhalten habe.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thomas Schmülling, der mich als Chemiker in seinem Institut aufgenommen und sich als Gutachter für meine Promotion zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Säger danke ich herzlich, dass er mir die erste Zulassung nach Syrien geschickt hat, um meine Promotion an der Freien Universität Berlin anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schuster möchte ich mich für seinen Rat und seine Hilfe im Isotopenlabor und rundum alle Computerangelegenheiten bedanken.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Markus Wahl, Claudia Alings und Clemens Langner für die freundschaftliche und zuverlässige Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. Jan Erik Leuendorf danke ich für seine zahlreichen Ratschläge auf dem Gebiet der Proteinaufreinigung.

Ich danke Sylvia Bolt für die sehr hilfreichen Kommentare zu meinem Manuskript.

Allen Mitgliedern des Labors 106 und allen Kollegen am Institut für Angewandte Genetik danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meinem Vater, meiner Familie und meinen Freunden in Homs, die mich während meiner Promotion, trotz Krieg und Gefahr in Syrien nicht vergessen und unterstützt haben.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau, die sich um unsere Kinder gekümmert und mir immer den Rücken frei gehalten hat.

## 10 Anhang

### 10.1 Plasmide

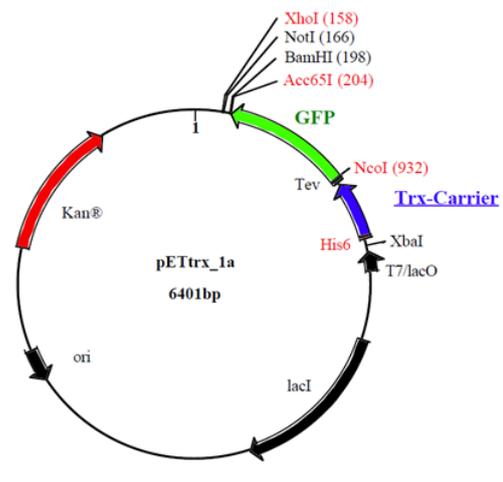
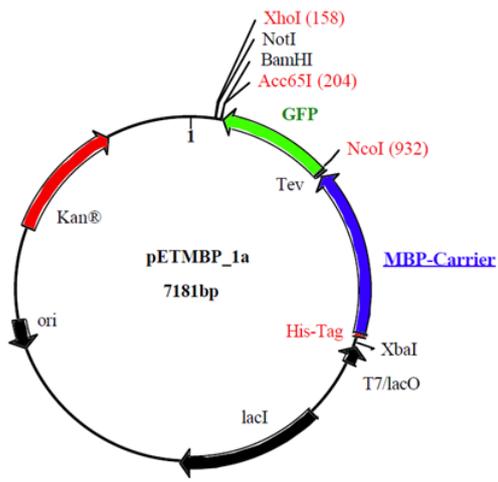
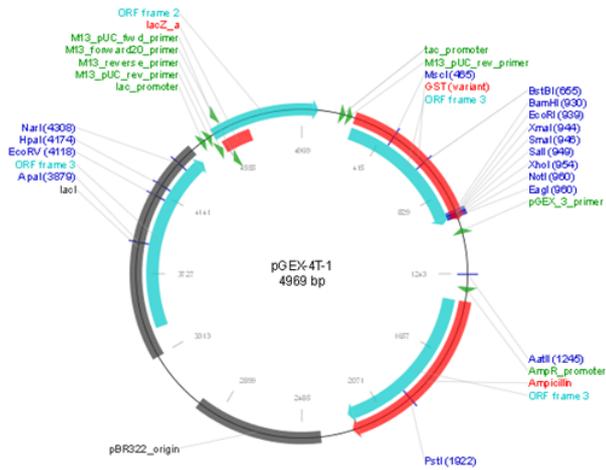
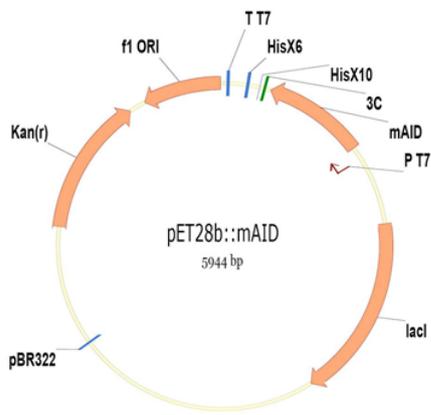
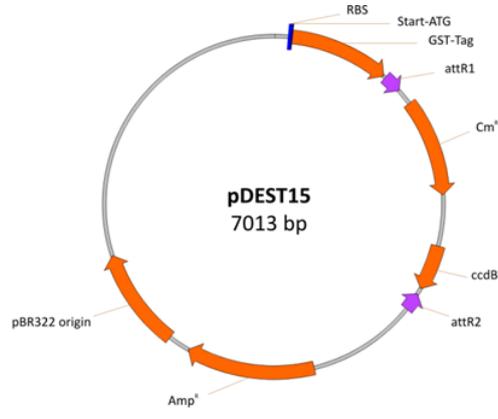
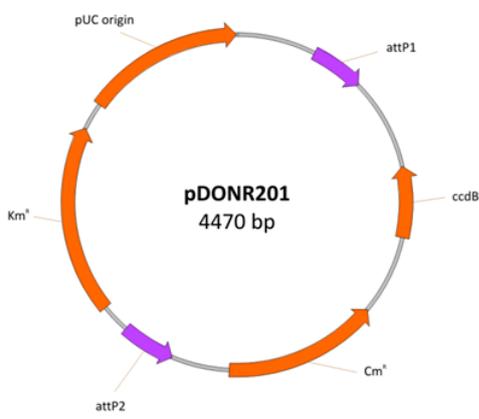
Die Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der Tabelle 19 aufgeführt.

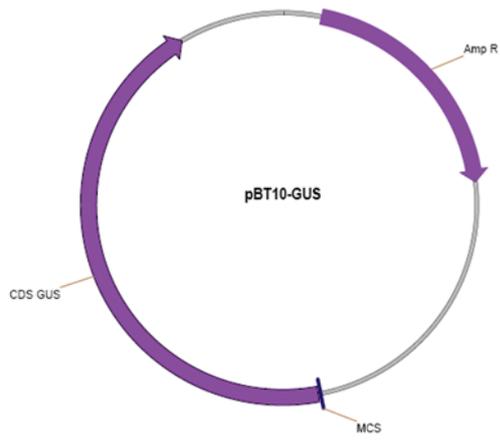
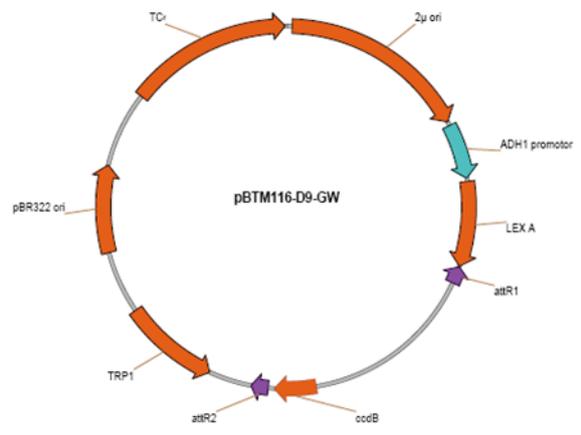
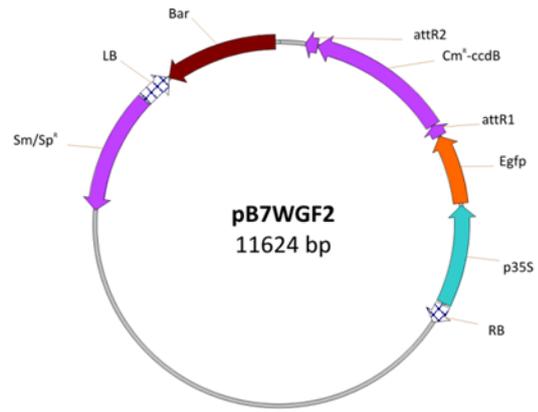
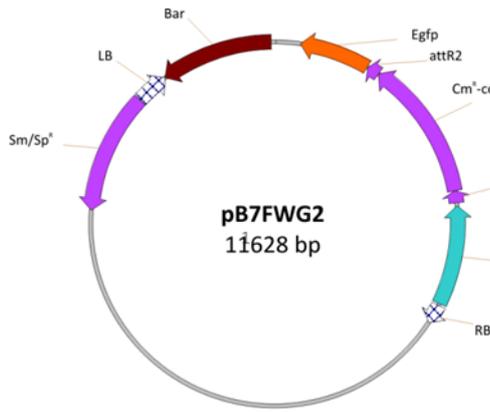
**Tabelle 19: Plasmid**

Bezeichnung	Funktion	Marker	Referenz	Klone Nr.
<b>Gateway Entry-Plasmide</b>				
pDONR 221	Gateway Entry-Vektor für BP Reaktion	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe	0322
pDONR 201	Gateway Entry-Vektor für BP Reaktion	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe	0553
pDONR 222	Gateway Entry-Vektor für BP Reaktion	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe	0318
pDONR 207	Gateway Entry-Vektor für BP Reaktion	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe	0183
<b>Plasmide für Protein-Expression in <i>E. coli</i></b>				
pDEST17	Expressionsvektor für N-terminale 6xHis-Fusion in <i>E. coli</i>	Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe	0370
pDEST15	Expressionsvektor für N-terminale GST-Fusion in <i>E. coli</i>	Carbenicillin	Invitrogen, Karlsruhe	0316
pET28b	Expressionsvektor für N- und C-terminale 6xHis-Fusion in <i>E. coli</i>	Kanamycin	Geschenk von Jacobo Martinez, AG Säger, FU Berlin	1802
pMH-HSsumo	Expressionsvektor für N-terminale sumo_Strep_7xHis-Fusion in <i>E. coli</i>	Kanamycin	Hothorn <i>et al.</i> , 2011	2102
pETtrx-1a	Expressionsvektor für N-terminale 6xHis_trx-Carrier-Fusion in <i>E. coli</i>	Kanamycin	Zur Verfügung gestellt von Dr. Holton, FU Berlin	2151
pETMBP-1b	Expressionsvektor für N-terminale 6xHis_MBP-Fusion in <i>E. coli</i>	Kanamycin	Zur Verfügung gestellt von Dr. Holton, FU Berlin	2150
pGEX-4T-3	Expressionsvektor für N-terminale GST-Fusion in <i>E. coli</i>	Carbenicillin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	1885
<b>Plasmide für Hefe</b>				

pACT2-GW	<i>Yeast two-hybrid</i>	Carbenicillin (Bakterien), Leucin (Hefe)	Dortay <i>et al.</i> , 2006, 2008	0126
pBTM116-D9 GW	<i>Yeast two-hybrid</i>	Tetracyclin (Bakterien), Tryptophan (Hefe)	Goehler <i>et al.</i> , 2004	0208
<b>Plasmide für PTA</b>				
pB2GW7	Binärer Gateway Überexpressionsvektor mit 35S Promotor für Pflanzen	Spectinomycin (Bakterien), BASTA(Pflanze)	Karimi <i>et al.</i> , 2002	0205
pBT10-GUS	PTA Reportervektor	Carbenicillin	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000	0856
pROK219_NA N	PTA Referenzvektor	Kanamycin	Kirby und Kavanagh, 2002	0962
<b>Plasmide für Pflanzen</b>				
pB7FWG2	Binärer Gateway Ziel-Vektor für C- terminale GFP-Fusion	Spektinomycin (Bakterien), BASTA (Pflanze)	Karimi <i>et al.</i> , 2002	0405
pB7WGF2	Binärer Gateway Ziel-Vektor für N- terminale GFP-Fusion	Spektinomycin (Bakterien), BASTA (Pflanze)	Karimi <i>et al.</i> , 2002	0404
pBIN- mCherry- HDEL	Rot-fluoreszierender ER-Marker für in Pflanzen transiente Expression	Kanamycin	Nelson <i>et al.</i> , 2007	2311
pB7m34GW	Binärer Gateway Ziel-Vektor für Multifusionen von Promotor, Gen und Tag zusammen in einen Vektor	Spektinomycin (Bakterien), BASTA (Pflanze)	Karimi <i>et al.</i> , 2005	1453

Vektorkarten





## 10.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma (Invitrogen, Karlsruhe) bezogen. Die Konzentration der in einem TRIS-Puffer (10 mM, pH 8) gelösten Oligonukleotide betrug 100 µM. Die verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 20 aufgeführt.

**Tabelle 20 : Oligonukleotide (Primer)**

Primername	Sequenz 5'→3'	Verwendung	Primer Nr.
attB1 Adapter forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Gateway Adapter PCR	4
attB2 Adapter reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Gateway Adapter PCR	5
CHARK forward	<u>AAAAAGCAGGCTTG</u> ATGGCGCTACTGCTCT GGGTG	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1018
CHARK reverse	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CACAGAACATCCATAG CTTGCACG	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1019
CHARK-middle1	GTCGAAGATGGTTACAAGGCGACT	CHARK-DNA-Sequenzierung	1026
CHARK-middle2	TTGGCCATGGCTGGCAGTAGCAT	CHARK-DNA-Sequenzierung	1027
CHARK- ohne Stopp reverse	<u>AGAAAGCTGGGTCC</u> CAGAACATCCATAGCTT GCACGATA	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1121
CHARK-cyto forward	<u>AAAAAGCAGGCTTG</u> ATGCGCCGGTGCAAC GACCATAGG	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1124
CHARK-cyto-BamHI forward	GGCC <u>GGATCC</u> ATGCGCCGGTGCAACGACCA TAGG	Klonierung in pGEX-4T-3	1155
CHARK-XhoI reverse	GGCC <u>CTCGAGT</u> CACAGAACATCCATAGCTTG CACG	Klonierung in pGEX-4T-3	1156
Short CHASE-NcoI forward	GCC <u>CCATGGG</u> GCTCTGCAATTGATCAGGAGA CATTTGC	Klonierung von AHK4-CHASE Domäne in pET28b	920
CHASE+2sheets-XhoI reverse	GCC <u>CTCGAG</u> GCCCTGAAAATACAGGTTTTCG TGGTACCTGCATATCATCTT	Klonierung von AHK4-CHASE Domäne in pET28b	921
Core CHASE-XhoI reverse	GCC <u>CTCGAG</u> GCCCTGAAAATACAGGTTTTCA TTACCATACATGACAAGTGG	Klonierung von AHK4-CHASE Domäne in pET28b	922

PpCHK4-CHASE- BamHI forward	GGCC <b><u>GGATCC</u></b> ATGGCGTTGAAGTTCAGGGA A	Klonierung von PpCHK4-CHASE Domäne in pGEX-4T-3	1007
PpCHK4-CHASE- XhoI reverse	GGCC <b><u>CTCGAG</u></b> TTATTAACAGAAGGATTCGCT TTGAAT	Klonierung von PpCHK4-CHASE Domäne in pGEX-4T-3	1008
PpCHK4-CHASE- NheI forward	GG <b><u>GCTAGC</u></b> GCGTTGAAGTTCAGGGAA	Klonierung von der PpCHK4- CHASE Domäne in pET28b	1069
PpCHK4-CHASE- HindIII reverse	GG <b><u>TTCGAA</u></b> TTATTATAAGTTTCGCTTAGGAA GACA	Klonierung von der PpCHK4- CHASE Domäne in pET28b	1070
PpCHK4-CHASE- NcoI forward	<b><u>GCCCATGGG</u></b> GCGTTGAAGTTCAGGGAA	Klonierung von der PpCHK4- CHASE Domäne in pET28b, pEMBP_1b, pETtrx_1a und pMH-HSsumo	1071
PpCHK4-CHASE- XhoI reverse	<b><u>GCCTCGAG</u></b> TAAGTTTCGCTTAGGAAGACA	Klonierung von der PpCHK4- CHASE Domäne in pET28b, pEMBP_1b, pETtrx_1a und p- MH-HSsumo	1072
Chlre4 286243- CTK1 forward	<b><u>AAAAAGCAGGCTTG</u></b> ATGCCACAGTCAGAAC CGGAG	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1106
Chlre4 286243- CTK1 reverse	<b><u>AGAAAGCTGGGTCT</u></b> CATACGGAGTCAGCCC CATG	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1107
acgA-Primer 1 forward	ATGAAAAAACATTTGTAAAGATACTATCT	Amplifizierung von <i>acgA</i> Gen	1109
acgA-Primer 6 reverse	TTATTTATTTTTTTTGGATTCTACATTTT	Amplifizierung von <i>acgA</i> Gen	1110
acgA-GW-Primer 1 forward	<b><u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u></b> <b><u>TG</u></b> ATGAAAAAACATTTGTAAAGATACT	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1094
acgA-GW-Primer 6 reverse	<b><u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u></b> <b><u>CT</u></b> TATTTATTTTTTTTGGATTCTACATTTT	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1095
Dhka-Primer 1 reverse	<b><u>AAAAAGCAGGCTTG</u></b> ATGGAATTA AAAACAT TTAAGGAC	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1024
Dhka-Primer 3 reverse	<b><u>AGAAAGCTGGGTCT</u></b> TAATTATTATAACCACC CCATTTTGC	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1025
Dhka-Primer 2 forward	ACATTTAAGGACTTAAACGATGATATTATAG GA	Amplifizierung von <i>Dhka</i> Gen mittels einer überlappenden PCR	1023

Synechocystis sp. PCC 6803-Slr1759 forward	<b><u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u></b> <b><u>TG</u></b> ATGGTTATTAGTGCCACTGTG	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1005
Synechocystis sp. PCC 6803-Slr1759 reverse	<b><u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u></b> <b><u>C</u></b> TTATCATGGCGAGGGAATGGTGAAGGG	Klonierung in pDONR mittels BP Reaktion	1006

Die unterstrichenen und fettgedruckten Nukleotide zeigen die Restriktionsschnittstellen oder die att Rekombinationsstellen.

## 10.3 Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ADP	Adenosindiphosphat
AHK	<i>Arabidopsis</i> Histidin Kinase
AHP	<i>Arabidopsis</i> Histidin Phosphotransferprotein
AMP	Ammoniumpersulfat
APS	Adenosinmonophosphat
ARR	<i>Arabidopsis</i> Response Regulator
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaar
<i>BsrGI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CHK	<i>CHASE domain containing histidine kinase receptor</i>
CKX	Cytokininoxidasen/dehydrogenasen
Cpm	<i>counts per minute</i>
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
Fh8	<i>Fasciolahepatica</i> 8-kDa antigen
G	Gramm
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin
IPTG	Isopropyl-β-D-galaktopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Broth
LiAc	Lithiumacetat
μl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> (Boten) RNA
NAN	Neuraminidase
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OHK	<i>Oryza</i> Histidin Kinase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTA	Protoplasten <i>trans</i> -Aktivierungsassay
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Natriumdodezylphosphat-Polyacrylamidgelelektrophorese
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TM	Transmembran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -Zeatin
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
WOL	<i>Wooden leg</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranosid
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
Y2H	<i>Yeast two-hybrid</i>
YPD	Hefevollmedium
z. B.	zum Beispiel

***Eidesstattliche Erklärung***

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

Berlin, den 20.08.2015

.....

Mhyeddeen Halawa