

1 Einleitung

Pro- und eukaryotische Zellen reagieren ständig auf äußere Signale, um die Funktionen der Zelle zu gewährleisten. Voraussetzungen dafür sind Erkennung, Verarbeitung und Weiterleitung der Signale über intrazelluläre Signalwege. Diese Signalwege regulieren in jeder Zelle biologische Prozesse wie beispielsweise den Stoffwechsel, das Wachstum und die Zellteilung. Doch wie kommt das Signal von der Außenseite der Zelle in den Zellkern, und auf welche Weise wird dort unter Steuerung externer Stimuli das Genexpressionsprogramm spezifisch verändert?

1.1 Das Zweikomponenten-Signalsystem

Das ursprünglich in Prokaryoten entdeckte Zweikomponenten-Signalsystem (ZKS) vermittelt in Bakterien die Antwort auf ein breites Spektrum an Reizen aus der Umwelt. Hierzu gehören beispielsweise das EnvZ/OmpR-ZKS für die Osmoregulation oder das ArcB/ArcA-ZKS für die Sauerstoffmangelregulation (Stock *et al.*, 2000). Erst 1993, mit der Entdeckung des Osmosensors SLN1 in *Saccharomyces cerevisiae* (Ota und Varshavsky, 1993) und des Ethylenrezeptors ETR1 in *Arabidopsis* (Chang *et al.*, 1993), wurde bekannt, dass das ZKS auch in niederen und höheren Eukaryoten (nur in Pflanzen) vorkommt (Koretke *et al.*, 2000).

Das einfache ZKS besteht aus zwei Elementen, einer Histidinkinase und einem Responseregulator (Abbildung 1A). Beide Elemente bestehen in den meisten Fällen aus je zwei Domänen, die Histidinkinase aus der *Sensor*- und *Transmitter*-Domäne und der Responseregulator aus der *Receiver*- und *Output*-Domäne (Abbildung 1A). Durch Wahrnehmung eines extrazellulären Signals über die *Sensor*-Domäne einer Histidinkinase erfolgt eine Autophosphorylierung des Rezeptors, bei der die Phosphorylgruppe von ATP auf die Histidinphosphorylierungsstelle der *Transmitter*-Domäne übertragen wird. Anschließend wird der Phosphorylrest auf die Aspartatphosphorylierungsstelle in der *Receiver*-Domäne des Responseregulators transferiert (Abbildung 1A).

Im komplexen ZKS ist an die *Transmitter*-Domäne des Rezeptors eine *Receiver*-Domäne fusioniert (Abbildung 1B). In einer solchen Hybridhistidinkinase wird das Phosphorylsignal intramolekular von der *Transmitter*-Domäne auf die Aspartatphosphorylierungsstelle der *Receiver*-Domäne übertragen (Abbildung 1B). Anschließend wird das Phosphorylsignal auf die Histidinphosphorylierungsstelle der HPt-Domäne des Histidinphosphotransmitters und von dort auf die Aspartatphosphorylierungsstelle der *Receiver*-Domäne des Responseregulators

transferiert. (Mizuno, 2005; Grefen und Harter, 2004; Kakimoto, 2003; Hwang *et al.*, 2002; Saito, 2001; West und Stock, 2001; Stock *et al.*, 2000; Chang und Stewart, 1998). Die HPT-Domäne kommt in Eukaryoten in separaten Histidinphosphotransmittern und in Prokaryoten ausschließlich an Hybridhistidinkinasen fusioniert vor (Stock *et al.*, 2000).

Sowohl im einfachen als auch im komplexen ZKS hat die Phosphorylierung des Responseregulators die Aktivierung ihrer *Output*-Domäne zur Folge (Abbildung 1A und B), was zur Expression bestimmter Zielgene führen kann. Anschließend löst sich das Phosphorylsignal vom Responseregulator, indem es auf ein Wassermolekül übertragen wird.

Autophosphorylierung, Phosphotransfer und Dephosphorylierung sind somit die für ein ZKS charakteristischen Reaktionen (Mizuno, 2005; Grefen und Harter, 2004; Kakimoto, 2003; Hwang *et al.*, 2002; Saito, 2001; West und Stock, 2001; Stock *et al.*, 2000; Chang und Stewart, 1998).

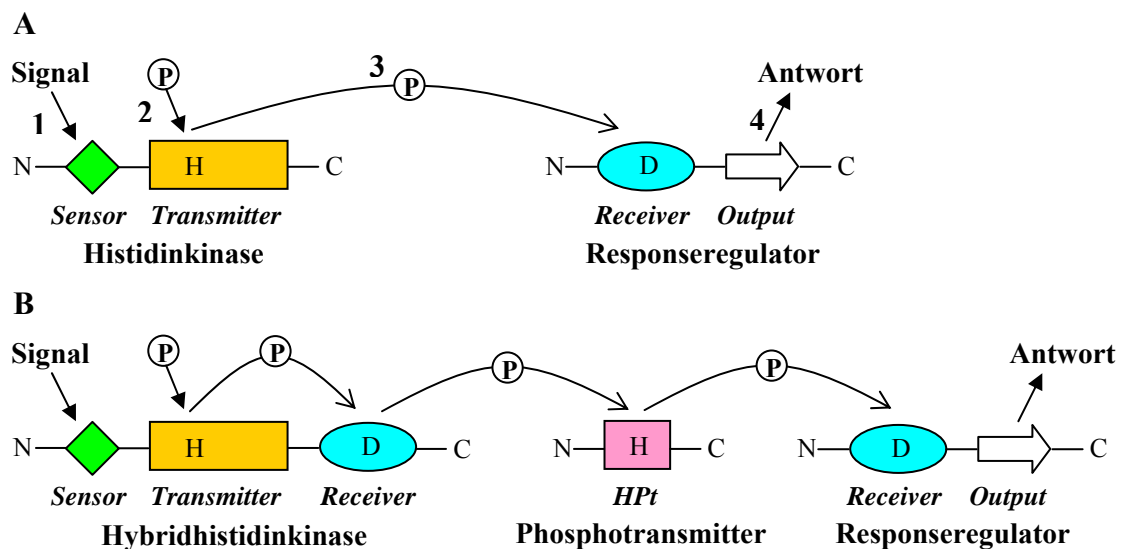


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Signalflusses im einfachen und komplexen ZKS. (A) Signalfluss im einfachen ZKS. 1, Signalwahrnehmung durch die *Sensor*-Domäne der Histidinkinase; 2, Autophosphorylierung der *Transmitter*-Domäne an der Histidinphosphorylierungsstelle; 3, Transfer der Phosphorylgruppe auf die Aspartatphosphorylierungsstelle in der *Receiver*-Domäne des Responseregulators; 4, Auslösen der Signalantwort. (B) Signalfluss im komplexen ZKS. An die *Transmitter*-Domäne des Rezeptors ist eine *Receiver*-Domäne fusioniert, daher die Bezeichnung Hybridhistidinkinase. Das Phosphorylsignal wird durch einen Phosphotransmitter, das über eine Histidinphosphorylierungsstelle in der HPT-Domäne verfügt, vom Rezeptor auf den Responseregulator übertragen. Abkürzungen: H, Histidin; D, Aspartat; P, Phosphorylgruppe.

Signaltransduktionsprozesse werden in Prokaryoten größtenteils durch das einfache ZKS realisiert. In *E. coli* konnten 30 Sensorkinasen, darunter nur fünf Hybridhistidinkinasen, und 32 Responseregulatoren identifiziert werden (Mizuno, 1997). In *Bacillus subtilis* wurden 36 Sensorkinasen und 34 Responseregulatoren identifiziert (Fabret *et al.*, 1999) und in *Synechocystis* 42 Sensorkinasen und 38 Responseregulatoren (Mizuno *et al.*, 1996). Die

Anzahl an ZKS variiert anscheinend in verschiedenen Bakterien in Abhängigkeit von ihrer Fähigkeit, in verschiedenen Umgebungen leben zu können. So enthält das ausschließlich im Genitalbereich vorkommende Pathogen *Mycoplasma genitalium* kein ZKS (Fraser *et al.*, 1995), das humanpathogene Bakterium *Haemophilus influenzae*, das auf Warmblüter spezialisiert ist, enthält nur vier Sensorkinasen und fünf Responseregulatoren (Fleischmann *et al.*, 1995) und *Pseudomonas aeruginosa*, ein Pathogen für Menschen, Tier und Pflanzen, enthält 63 Sensorkinasen und 64 Responseregulatoren (Stover *et al.*, 2000).

In Eukaryoten hingegen dominiert das komplexe ZKS, da sie fast ausschließlich Hybridhistidinkinase besitzen. Nur ERS1 und ERS2 in *Arabidopsis* bilden die einzigen bekannten Ausnahmen, da ihnen die *Receiver*-Domäne fehlt (Mizuno, 2005). Die Anzahl der bislang in Eukaryoten gefundenen ZKS ist jedoch gering, da die meisten Signaltransduktionen in Eukaryoten durch Serin/Threonin- oder Tyrosinkinase realisiert werden (Stock *et al.*, 2000). So verfügt die Hefe *S. cerevisiae* nur über das SLN1/YPD1/SSK1-ZKS für die Osmoregulation (Maeda *et al.*, 1994). Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* enthält 11 Sensorkinasen, darunter DokA und DHKC, die für die Osmoregulation (Schuster *et al.*, 1996) und für die Regulation der Fruchtkörperbildung (Singleton *et al.*, 1998) benötigt werden.

Für die Cytokininsignaltransduktion wurden auch in *A. thaliana* verschiedene Elemente des ZKS identifiziert (Lohrmann und Harter, 2002; Schmülling, 2002). Diese Elemente umfassen drei Hybridhistidinkinase (AHK2, AHK3, AHK4; Mizuno, 2005; Mähönen *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2001a, Ueguchi *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001), fünf Histidinphosphotransmitterproteine (AHP1-AHP5) und 21 Responseregulatoren (10 Typ-A und 11 Typ-B ARR; D'Agostino und Kieber, 1999; Imamura *et al.*, 1999) (Tabelle 1). Unter den *AHKs* ist *AHK4* hauptsächlich in Wurzeln, *AHK2* und *AHK3* in allen getesteten Geweben exprimiert (Tabelle 1). Die *AHPs* *AHP2*, *AHP3* und *AHP5* sind in allen getesteten Geweben exprimiert, *AHP1* hingegen in Wurzeln und Keimlingen und *AHP4* in Blättern, Stengel und Blüten (Tabelle 1). Die Typ-B ARRs, ausgenommen *ARR13*, *ARR18*, *ARR19*, *ARR20* und *ARR21*, sind in fast allen Geweben exprimiert und Typ-A ARRs hauptsächlich in Wurzeln (Tabelle 1). Für *ARR17* liegen keine Expressionsdaten vor.

Ein Pseudo-AHP (AHP6/APHP1; Mähönen *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2000) und neun Pseudo-ARRs (APRR1-APRR9; Makino *et al.*, 2000), denen die charakteristischen Phosphorylierungsstellen fehlen, sowie drei Responseregulatoren (ARR22 (At3g04280), ARR23 (At5g62120), ARR24 (At5g26594); Kiba *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 2002) sind in Tabelle 1 nicht aufgeführt. ARR22 und ARR24 verfügen, wie die Typ-A ARRs auch, über eine komplette *Receiver*-Domäne, sie werden aber nicht durch Cytokinin induziert (Kiba *et al.*,

2004). ARR23 verfügt über eine Aspartatphosphorylierungsstelle, wobei das 5'-Ende ihrer Receiver-Domäne fehlt (Schaller *et al.*, 2002).

Tabelle 1. Komponenten der Cytokininsignaltransduktion und deren Expressionsmuster.

Cytokininrezeptoren		
Gen	Lokus	Gewebespezifische Genexpression (RT-PCR oder Reporteranalysen (GUS))
<i>AHK2</i>	At5g35750	Blätter, Blüten, Schoten, Wurzeln (Higuchi <i>et al.</i> , 2004)
<i>AHK3</i>	At1g27320	Blätter, Blüten, Wurzeln (Higuchi <i>et al.</i> , 2004)
<i>AHK4</i>	At2g01830	Blätter, Wurzeln (Higuchi <i>et al.</i> , 2004)

Histidinphosphotransmitter		
Gen	Lokus	Gewebespezifische Genexpression (RT-PCR oder Reporteranalysen (GUS))
<i>AHP1</i>	At3g21510	Keimlinge, Wurzeln (Tanaka <i>et al.</i> , 2004; Suzuki <i>et al.</i> , 1998)
<i>AHP2</i>	At3g29350	Keimlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel, Blüten, Schoten (Tanaka <i>et al.</i> , 2004; Suzuki <i>et al.</i> , 1998)
<i>AHP3</i>	At5g39340	Keimlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel, Blüten (Tanaka <i>et al.</i> , 2004; Suzuki <i>et al.</i> , 1998)
<i>AHP4</i>	At3g16360	Blätter, Stengel, Blüten (Tanaka <i>et al.</i> , 2004)
<i>AHP5</i>	At1g03430	Keimlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel, Blüten, Schoten (Tanaka <i>et al.</i> , 2004)

Typ-B Responseregulatoren		
Gen	Lokus	Gewebespezifische Genexpression (RT-PCR oder Reporteranalysen (GUS))
<i>ARR1</i>	At3g16857	Keimlinge, Wurzeln, Spross, Blätter, Stengel, Schoten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR2</i>	At4g16110	Keimlinge, Wurzeln, Spross, Blätter, Stengel, Schoten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR10</i>	At4g31920	Keimlinge, Wurzeln, Spross, Blätter, Stengel, Schoten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR11</i>	At1g67710	Keimlinge, Wurzeln, Spross, Blätter, Stengel, Schoten, Blüten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR12</i>	At2g25180	Keimlinge, Wurzeln, Spross, Blätter, Stengel, Schoten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR13</i>	At2g27070	Blätter (Mason <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR14</i>	At2g01760	Keimlinge, Spross, Blätter, Stengel, Blüten, Schoten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR18</i>	At5g58080	Blätter, Blüten, Schoten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR19</i>	At1g49190	Blüten, Blätter (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR20</i>	At3g62670	Blüten, Schoten (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR21</i>	At5g07210	Blüten, Samen (Mason <i>et al.</i> , 2004; Tajima <i>et al.</i> , 2004)

Typ-A Responseregulatoren		
Gen	Lokus	Gewebespezifische Genexpression (RT-PCR oder Reporteranalysen (GUS))
<i>ARR3</i>	At1g59940	Spross, Wurzeln (To <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR4</i>	At1g10470	Spross, Wurzeln (To <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR5</i>	At3g48100	Spross, Wurzeln (To <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR6</i>	At5g62920	Spross, Wurzeln (To <i>et al.</i> , 2004; Imamura <i>et al.</i> , 1998)
<i>ARR7</i>	At1g19050	Wurzeln (Kiba <i>et al.</i> , 2002)
<i>ARR8</i>	At2g41310	Wurzeln, Keimlinge (To <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR9</i>	At3g57040	Wurzeln, Keimlinge (To <i>et al.</i> , 2004)
<i>ARR15</i>	At1g74890	Wurzeln (Kiba <i>et al.</i> , 2002)
<i>ARR16</i>	At2g40670	Wurzeln (Kiba <i>et al.</i> , 2002)
<i>ARR17</i>	At3g56380	UN

UN, Unbekannt

1.2 Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* durch das ZKS

Nach dem derzeitigen Modell der Cytokininsignaltransduktion wird das Cytokininsignal in *A. thaliana* mittels des komplexen ZKS wahrgenommen und transduziert. Membranständige AHKs nehmen das extrazelluläre Cytokininsignal wahr (Abbildung 2), worauf ein AHK-Monomer vermutlich mit einem weiteren dimerisiert und die cytoplasmatisch lokalisierte *Transmitter*-Domäne autophosphoryliert. Das Phosphorylsignal wird anschließend auf die

Receiver-Domäne des Rezeptors und von dort auf AHPs transferiert. Daraufhin translozieren die AHPs in den Kern, wo sie das Phosphorylsignal auf die *Receiver*-Domäne von Typ-B ARR transferieren. Die als Transkriptionsfaktoren fungierenden Typ-B ARRs aktivieren die Transkription von verschiedenen Cytokininantwortgenen, u.a. der Typ-A ARRs, die durch negatives *Feedback* die Cytokinintransduktion und durch Protein-Protein-Interaktionen auch andere Signalwege beeinflussen (Heyl und Schmölling, 2003; Kiba *et al.*, 2002; Hwang und Sheen, 2001; Sweere *et al.*, 2001; D'Agostino *et al.*, 2000; Brandstatter und Kieber, 1998).

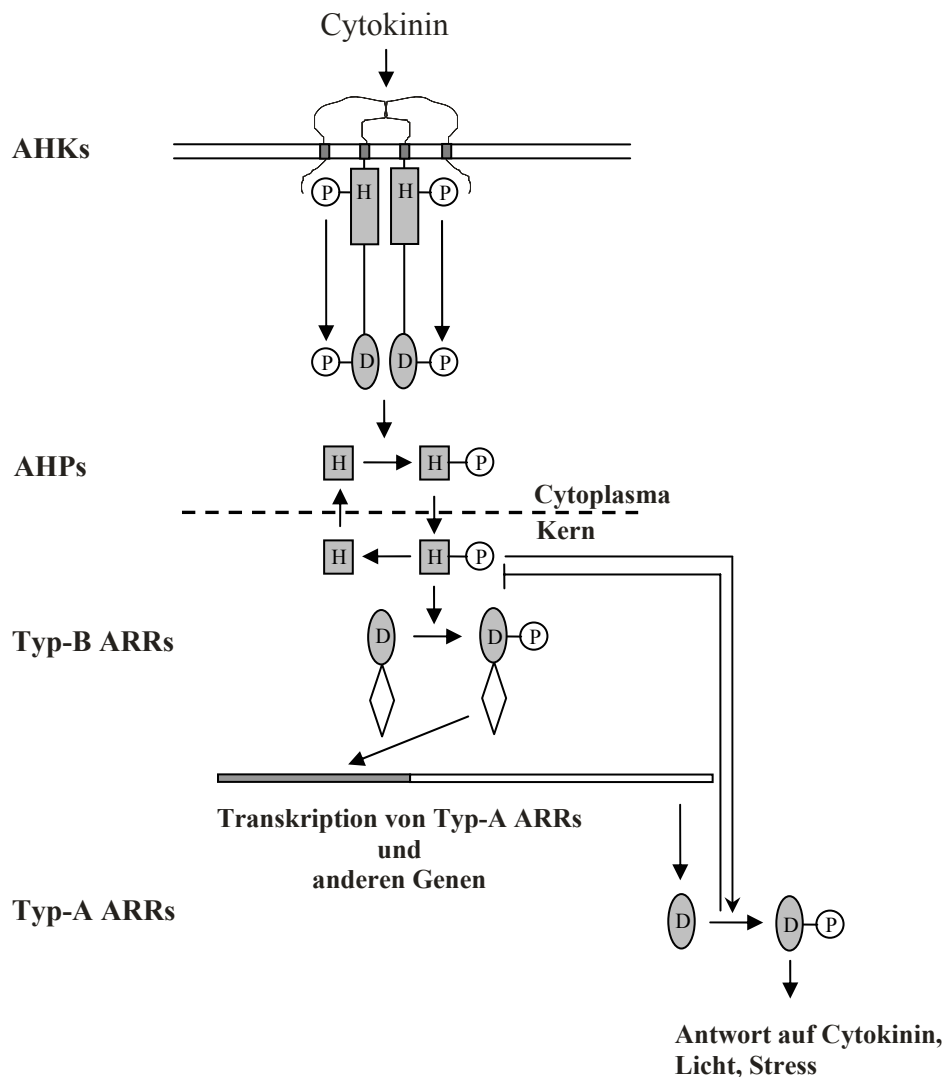


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Cytokininsignaltransduktion (aus Heyl *et al.*, 2006). Membrangebundene Hybridhistidinkinase (AHKs) nehmen das Cytokininsignal wahr, was vermutlich zur Dimerisierung und anschließend zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. Das Phosphat wird auf Histidinphosphotransmitter (AHPs) übertragen, die daraufhin in den Kern translozieren und dieses auf Typ-B Responseregulatoren (Typ-B ARRs) transferieren. Diese aktivieren die Transkription von Zielgenen, darunter die Typ-A Responseregulatoren (Typ-A ARRs). Durch negatives *Feedback* können die Typ-A ARRs die Cytokininsignaltransduktion sowie durch Protein-Protein-Interaktionen auch andere Signalwege beeinflussen. Abkürzungen: D, Aspartat; H, Histidin; P, Phosphorylgruppe.

Wahrnehmung des Cytokininsignals durch Hybridhistidinkinasen

Die Cytokininrezeptoren AHK2, AHK3 und AHK4 setzen sich, wie andere Hybridhistidinkinasen auch, aus den drei Domänen *Sensor*, *Transmitter* und *Receiver* zusammen (Abbildung 3). Ihre kodierenden Gene zeigen ein überlappendes Expressionsmuster. *AHK4* wird hauptsächlich in Wurzeln, *AHK2* und *AHK3* in allen getesteten Geweben exprimiert (Tabelle 1; Higuchi *et al.*, 2004). Die AHKs sind untereinander in ihrer gesamten Aminosäuresequenz zu > 50 % und in ihrer extrazellulären Domäne zu > 60 % homolog (Inoue *et al.*, 2001). Vermutlich sind alle AHKs an der Cytoplasmamembran lokalisiert, obwohl dies bislang nur für AHK3 durch Fusion an GFP gezeigt wurde (Kim *et al.*, 2006). Die Membranverankerung erfolgt für AHK2 und AHK3 durch drei und für AHK4 durch zwei vorhergesagte Transmembran-Domänen (Abbildung 3) (Mizuno, 2005; Heyl und Schmülling, 2003; Hwang *et al.*, 2002). Das extrazelluläre Cytokininsignal wird wahrscheinlich durch die CHASE-Domäne (cyclase/histidine-kinase-associated sensory extracellular) gebunden (Abbildung 3), da diese Domäne dafür bekannt ist, niedermolekulare Liganden zu binden (Anantharaman und Aravind, 2001; Mougél und Zhulin, 2001). In *Arabidopsis* ist sie für die drei AHKs, in *Dictyostelium discoideum* sowie in Bakterien für rezeptorähnliche Proteine mit Histidinkinase- und Nukleotidcyclase-Domänen charakteristisch (Napier, 2004). In *Dictyostelium* führte die Deletion der CHASE-Domäne des Rezeptors DhkA zum Ausfall der Einkapselung von Präsporen, da das sekretierte Signalpeptid SDF-2 vom DhkA-Rezeptor nicht mehr wahrgenommen wurde (Wang *et al.*, 1999). In *Arabidopsis* führte ein Aminosäureaustausch in der CHASE-Domäne des Rezeptors AHK4 (T278I) zum Verlust der Wahrnehmung des Cytokininsignals (Mähönen *et al.*, 2000).

Die AHKs binden unterschiedliche Cytokinine mit unterschiedlicher Präferenz. In einem bakteriellen *LacZ*-Reportersystem wurde gezeigt, dass *trans*-Zeatin und Isopentenyladenin durch AHK3 und AHK4 und *cis*-Zeatin nur durch AHK3 gebunden wird. AHK3 zeigt ein breiteres Spektrum an Cytokininbindungen im Vergleich zu AHK4, jedoch mit einer geringeren Bindungsaffinität (Spichal *et al.*, 2004). Auch in Mais zeigten die drei homologen Cytokininrezeptoren ZmHK1 (AHK4 homolog), ZmHK2 (AHK3 homolog) und ZmHK3 (AHK2 homolog) ähnliche Cytokininbindungspräferenzen, da für ZmHK2 und ZmHK3 ein breites und für ZmHK1 ein enges Spektrum an Cytokininbindungen identifiziert werden konnten (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004). Unterschiedliche Bindungspräferenzen unter den Cytokininrezeptoren könnten mit dazu beitragen, cytokininspezifische Antworten zu regulieren.

- Einleitung -

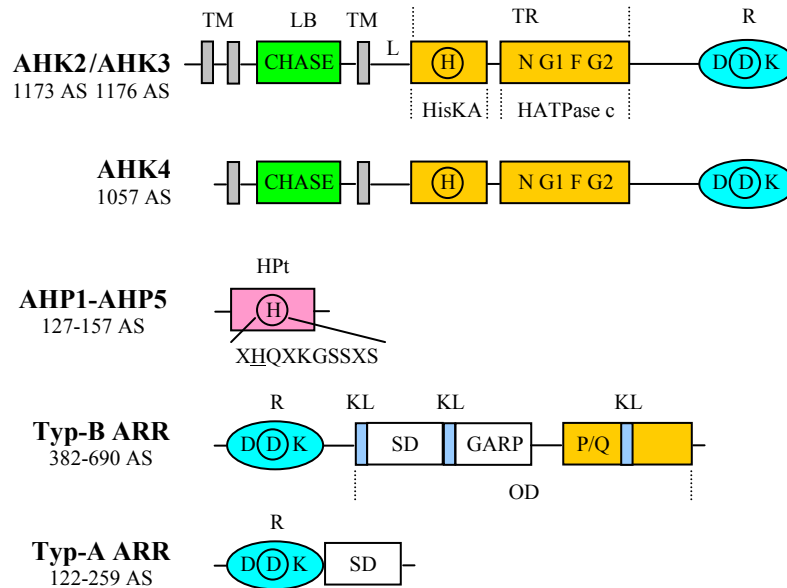


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Komponenten der Cytokinin-signaltransduktion. Aminosäuren, die als Phosphorylierungsstellen fungieren, sind durch einen Kreis markiert. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; CHASE, *cyclase/histidine-kinases-associated sensory extracellular*; SD, Saure-Domäne; GARP, DNA-Bindemotiv; P/Q, Prolin- und Glutaminreiche-Sequenz; TM, Transmembran-Domäne; LB, *Sensor- bzw. Ligandenbinde-Domäne*; L, *Linker*; TR, *Transmitter- bzw. Histidinkinase-Domäne*; R, *Receiver-Domäne*; HPt, *Histidinphosphotransmitter-Domäne*; KL, *Kernlokalisierungssequenz*; OD, *Output-Domäne*.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal für Histidinkinasen und somit auch für AHKs ist die cytoplasmatisch lokalisierte *Transmitter*-Domäne mit dem konservierten „H N G1 F G2“-Motiv, die auch als Histidinkinase-Domäne bezeichnet wird (Abbildung 3). Diese Domäne setzt sich aus zwei separaten Subdomänen zusammen, der HisKA-Domäne, die auch als Dimerisierungs-Domäne bekannt ist und das konservierte „H“-Motiv mit der Histidinphosphorylierungsstelle trägt, und der HATPase c-Domäne, die in Anwesenheit eines Kofaktors, wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} , mittels des konservierten „N G1 F G2“-Motivs, ATP bindet (Marina *et al.*, 2005; Letunic *et al.*, 2004; Heyl und Schmülling, 2003; Wolanin *et al.*, 2002; Saito, 2001; Stock *et al.*, 2000). Das Segment, das der letzten Transmembran-Domäne und der Histidinkinase-Domäne zwischengeschaltet ist, wird als *Linker* oder auch als HAMP-Domäne (*histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis proteins and phosphatase*) bezeichnet (Abbildung 3). Für diese Domäne ist beispielsweise in *E. coli* bekannt, dass sie die Kinase- und Phosphataseaktivität des Osmosensors EnvZ reguliert (Marina *et al.*, 2005). Sie spielt vermutlich auch bei der „Benachrichtigung“ der cytoplasmatisch lokalisierten Histidinkinase-Domäne über die Wahrnehmung des extrazellulären Signals eine Rolle. Durch Bindung des extrazellulären Liganden erfolgt nämlich im dimerisierten Rezeptor entweder eine Auf- oder Abwärtsbewegung oder eine Torsion des einen Monomers gegen das andere, so dass die HATPase c-Domäne mit dem gebundenen ATP-Molekül sich der HisKA-Domäne des

Partnermonomers räumlich nähert. Auf diese Weise lässt sich möglicherweise der Mechanismus der *trans*-Phosphorylierung im Rezeptordimer erklären (Marina *et al.*, 2005; Inouye, 2003; Hwang *et al.*, 2002; Wolanin *et al.*, 2002; Saito, 2001; Stock *et al.*, 2000). Gemäß dem Modell der Cytokininsignaltransduktion (Abbildung 2) wird das Phosphorylsignal nach Autophosphorylierung der Histidinkinase-Domäne auf die Aspartatphosphorylierungsstelle im konservierten „D D K“-Motiv der *Receiver*-Domäne des Rezeptors (Abbildung 3) und von dort auf AHPs transferiert. Dieses Modell stützt sich dabei auf Experimente, die in *S. cerevisiae* und *Arabidopsis* durchgeführt wurden. So konnte durch Expression von AHK4 in Anwesenheit von Cytokinin die Letalität der *S. cerevisiae* Osmosensor-Mutante *sln1* komplementiert werden. Die Mutation des konservierten His459 oder Asp973 in der Histidinkinase-Domäne oder der *Receiver*-Domäne führte zum Komplementationsverlust, da der Phosphatsignalfluss vom Rezeptor AHK4 auf den *Saccharomyces*-Phosphotransmitter YPD1 unterbrochen wird (Inoue *et al.*, 2001). Dies konnte auch in *Arabidopsis* mittels eines *ARR6::Luc* Reportergens bestätigt werden. AHK4 aktiviert in Anwesenheit von Cytokinin die Transkription des Reportergens, durch die Mutationen His459 oder Asp973 fällt die Aktivierung jedoch aus (Hwang und Sheen, 2001).

Zu den weiteren wichtigen Ergebnissen, die das Modell der Cytokininsignaltransduktion unterstützen, gehören auch die Interaktionen von AHK4 mit AHP1, AHP2, AHP3 und AHP5 (Tabelle 2; Suzuki *et al.*, 2001a). Durch Expression von *AHK4* in der *E. coli* Polysaccharidsensor-Mutante *RcsC* konnte in Anwesenheit von Cytokinin das Phosphatsignal auf YojN (Phosphotransmitter) und von dort auf RcsB (Responseregulator) übertragen werden, was die Aktivierung des *CPS::LacZ* Reportergens zur Folge hat. Die Koexpression von AHK4 mit den jeweiligen AHPs führte jedoch zum Verlust der Aktivierung, da die AHPs mit YojN um das Phosphatsignal konkurrieren und das Signal „titrieren“ (Suzuki *et al.*, 2001a).

Transduktion des Cytokininsignals durch Histidinphosphotransmitter

Fünf Gene kodieren in *Arabidopsis* für die Histidinphosphotransmitter AHP1, AHP2, AHP3, AHP4 und AHP5. Ihr charakteristisches Merkmal ist die HPt-Domäne mit der Histidinphosphorylierungsstelle im konservierten „XHQXKGSSXS“-Motiv (Abbildung 3), das für den Phosphotransfer benötigt wird (Mizuno, 2005; Heyl und Schmülling, 2003; Hwang *et al.*, 2002). *AHP2*, *AHP3* und *AHP5* sind miteinander am nächsten verwandt und zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster. *AHP1* dagegen ist in Wurzeln und Keimlingen und *AHP4* in abnehmender Intensität in Blättern, Stengel und Blüten exprimiert (Tabelle 1; Tanaka *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 1998). Interessanterweise wurden für *AHP4* in verschiedenen Geweben

drei unterschiedlich große Transkripte identifiziert. Diese Splicevarianten könnten AHP4 gewebespezifische Funktionen verleihen (Tanaka *et al.*, 2004).

Tabelle 2. Bekannte Interaktionen im Cytokininsignaltransduktionssystem von *A. thaliana*.
Die Tabelle fasst alle bislang publizierten Interaktionen und die dafür verwendeten Methoden zusammen.

Interaktionspaar	Methode	Referenz
AHK4 – AHP1, AHP2, AHP3, AHP5	<i>E. coli</i> - <i>LacZ</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001a
AHP1 – ETR1, AHK4, ARR1, ARR2, ARR3, ARR4, ARR8, ARR9, ARR10	<i>Yeast Two-Hybrid</i> , <i>Phosphorelay</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001a; Suzuki <i>et al.</i> , 2001b; Urao <i>et al.</i> , 2000; Tanaka <i>et al.</i> , 2004; Suzuki <i>et al.</i> , 1998; Imamura <i>et al.</i> , 1999; Lohrmann <i>et al.</i> , 2001
AHP2 – ETR1, AHK1, AHK4, ARR1, ARR2, ARR3, ARR4, ARR8, ARR9, ARR10, ARR11	<i>Yeast Two-Hybrid</i> , <i>Phosphorelay</i> , <i>Quenching</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001a; Suzuki <i>et al.</i> , 2001b; Lohrmann <i>et al.</i> , 2001; Imamura <i>et al.</i> , 1999; Imamura <i>et al.</i> , 2003; Urao <i>et al.</i> , 2000; Tanaka <i>et al.</i> , 2004
AHP3 – ETR1, AHK4, ARR1, ARR2, ARR8, ARR9, ARR10	<i>Yeast Two-Hybrid</i> , <i>Quenching</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001a; Suzuki <i>et al.</i> , 2001b; Imamura <i>et al.</i> , 1999; Urao <i>et al.</i> , 2000; Tanaka <i>et al.</i> , 2004
AHP4 – ARR1, ARR2	<i>Yeast Two-Hybrid</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2004
AHP5 – AHK4, ARR1, ARR2, ARR22	<i>Yeast Two-Hybrid</i> , <i>Phosphorelay</i> , <i>Quenching</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001b; Tanaka <i>et al.</i> , 2004; Kiba <i>et al.</i> , 2004
ARR3 – AHP1, AHP2	<i>Phosphorelay</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1998; Imamura <i>et al.</i> , 1999
ARR4 – AHP1, AHP2	<i>Yeast Two-Hybrid</i> , <i>Phosphorelay</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1998; Urao <i>et al.</i> , 2000; Imamura <i>et al.</i> , 1999
ARR8 – AHP1, AHP2, AHP3	<i>Yeast Two-Hybrid</i>	Urao <i>et al.</i> , 2000
ARR9 – AHP1, AHP2, AHP3	<i>Yeast Two-Hybrid</i>	Urao <i>et al.</i> , 2000
ARR1 – AHP1, AHP2, AHP3, AHP4, AHP5	<i>Yeast Two-Hybrid</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001b; Tanaka <i>et al.</i> , 2004
ARR2 – AHP1, AHP2, AHP3, AHP4, AHP5	<i>Yeast Two-Hybrid</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001b; Lohrmann <i>et al.</i> , 2001
ARR10 – AHP1, AHP2, AHP3	<i>Yeast Two-Hybrid</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2001b; Imamura <i>et al.</i> , 1999
ARR11 – AHP2	<i>Phosphorelay</i>	Imamura <i>et al.</i> , 2003

Das Modell der Cytokininsignaltransduktion geht davon aus, dass cytoplasmatisch lokalisierte AHPs den Phosphorylrest von den AHKs erhalten und dieser, nach Translokation in den Kern, durch Typ-B ARRs übernommen wird (Abbildung 2). Diese Vermutung basiert auf Analysen der subzellulären Lokalisation von AHP-GFP Fusionsproteinen, da alle AHP-GFP Fusionsproteine hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert waren (Tanaka *et al.*, 2004) und für AHP1 und AHP2 eine cytokininabhängige Translokation in den Kern gezeigt wurde (Hwang und Sheen, 2001). Die Translokation von AHP1 und AHP2 in den Kern war von ihrem Phosphorylierungszustand abhängig, da eine Mutation ihrer konservierten Histidinphosphorylierungsstelle zum Verlust dieses Transfers führte (Hwang und Sheen, 2001). Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der AHPs wird durch die Kinase- und Phosphataseaktivität der Cytokininrezeptoren und durch die Phosphataseaktivität der Responseregulatoren ausgeführt, da AHPs keine katalytische Funktionen besitzen (Hwang und Sheen, 2001; Stock *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 1998). Eine Phosphataseaktivität konnte u.a. für ARR3 und ARR4 *in vitro* gezeigt werden, da sie phosphoryliertes AHP1 und AHP2 dephosphorylieren (Imamura *et al.*, 1999). Durch Expression von AHP1, AHP2 und AHP3 in der Hefe-Mutante *ypd1* konnte die Funktion der AHPs im Phosphatsignalfluss AHK > AHP >

ARR ebenfalls gezeigt werden, da sie die Rolle des Histidinphosphotransmitters YPD1 übernehmen und durch den Transfer des Phosphorylsignals vom Rezeptor SLN1 auf den Responseregulator SSK1 die Letalität der Mutation komplementierten (Miyata *et al.*, 1998). Entscheidend für die Rolle der AHPs als Histidinphosphotransmitter in der Cytokininsignaltransduktion ist, dass sie mit den AHKs und den ARRs interagieren. Dies konnte durch zahlreiche Experimente belegt werden (Tabelle 2).

AHP-Homologe wurden in Weizen (TaHP1-TaHP3) und Mais (ZmHP1-ZmHP3) identifiziert (Asakura *et al.*, 2003; Ma und Tian, 2005). Einige Histidinphosphotransmitter aus Mais interagierten im *Yeast Two-Hybrid* System mit Responseregulatoren (ZmRRs). Darüber hinaus wurde im *Phosphorelay*-Experiment gezeigt, dass ZmHPs als Phospho-Donoren für ZmRRs fungieren (Asakura *et al.*, 2003).

Transduktion des Cytokininsignals durch Responseregulatoren

Responseregulatoren stellen hinsichtlich der Signalweiterleitung das letzte Element der Signaltransduktion im ZKS dar. Durch die Phosphorylierung werden sie aktiviert oder inaktiviert und können eine Antwort auslösen. Bei der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis* wird zwischen zwei Responseregulator-Typen unterschieden, den Typ-B und Typ-A ARRs (D'Agostino *et al.*, 2000; Kiba *et al.*, 1999; Brandstatter und Kieber, 1998). Die 11 Typ-B ARRs unterscheiden sich von den 10 Typ-A ARRs dadurch, dass sie neben der N-terminalen *Receiver*-Domäne über eine C-terminale *Output*-Domäne verfügen (Abbildung 3) (Mizuno, 2005; Heyl und Schmölling, 2003; Hwang *et al.*, 2002) und mit dieser Domäne als Transkriptionsfaktoren fungieren (Sakai *et al.*, 2000). Die Typ-B ARRs werden im Gegensatz zu den Typ-A ARRs nicht durch Cytokinin induziert (D'Agostino *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 1999; Kiba *et al.*, 1999). Sie übernehmen im Zuge der Signalweiterleitung das Phosphorylsignal von den AHPs und aktivieren die Transkription der Typ-A ARRs, die zu den primären Cytokininantwortgenen gehören (Hwang und Sheen, 2001; Sakai *et al.*, 2001) und ein negatives *Feedback* auf die Cytokininsignaltransduktion ausüben können (Abbildung 2) (To *et al.*, 2004; Hwang und Sheen, 2001).

i) Typ-B Responseregulatoren

Insgesamt 11 ARRs werden der Typ-B Familie zugeordnet (Tabelle 1) (Hwang *et al.*, 2002; Imamura *et al.*, 1999). Eine phylogenetische Analyse zeigte, dass Typ-B ARRs in drei Untergruppen, Typ-B I (ARR1/ARR2, ARR10/ARR12, ARR11, ARR14 und ARR18), Typ-B II (ARR13/ARR21) und Typ-B III (ARR19/ARR20), unterteilt werden können (Mason *et al.*, 2004). Bis auf ARR11, ARR14 und ARR18 zeigen alle anderen Typ-B Responseregulatoren

paarweise Gruppierungen (Imamura *et al.*, 2003). Typ-B I *ARRs* haben ein sehr ähnliches Expressionsmuster und sind in allen untersuchten Geweben exprimiert, ausgenommen *ARR14* (nicht in Wurzeln exprimiert) und *ARR18* (stark in Blüten exprimiert) (Tabelle 1). Typ-B II und Typ-B III *ARRs* zeigen ebenfalls ein spezifisches Expressionsmuster (Tabelle 1). Bis auf *ARR13*, für das aber mit einem Reportergen (*ARR13::GUS*) Expression in Blättern gezeigt wurde (Mason *et al.*, 2004), konnten für alle Typ-B *ARRs* cDNAs isoliert werden (Imamura *et al.*, 2003) (Tabelle 1).

Charakteristisch für Typ-B *ARRs*, verglichen mit Typ-A *ARRs*, ist ihre lange C-terminale *Output*-Domäne mit dem GARP-Motiv (Golden2, kontrolliert die Differenzierung eines Zelltyps in Maisblättern; Typ-B ARR, Responseregulatoren der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis*; Psr1, reguliert den Phosphatmetabolismus in *Chlamydomonas*), den Kernlokalisierungssequenzen sowie saure und P/Q-haltige Domänen (Abbildung 3). Das GARP-Motiv ähnelt der Myb-Domäne aus anderen eukaryotischen Transkriptionsfaktoren, die eine Helix-Turn-Helix Struktur (HTH) haben, mit der sie an die DNA binden können (Riechmann *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 1999). Eine NMR Strukturanalyse für das ARR10 GARP-Motiv zeigte ebenfalls drei α -Helices, die vermutlich eine HTH Struktur ausbilden (Hosoda *et al.*, 2002). ARR10 bindet möglicherweise als Monomer an die DNA, da es nicht, wie das Psr1-Protein aus *Chlamydomonas*, über eine *coiled-coiled* Struktur besitzt (Hosoda *et al.*, 2002). Das GARP-Motiv aus ARR1, ARR2, ARR10 und ARR11 bindet *in vitro* bevorzugt an die DNA-Sequenz 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' (Imamura *et al.*, 2003; Hosoda *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2000). Für ARR1 und ARR2 konnte dies *in planta* mittels eines *Promotor::Luc* Reportergens (mit der GGATT-Sequenz im Promotor) gestützt werden (Sakai *et al.*, 2000). Voraussetzung für die DNA-Bindung ist die Kernlokalisierung der Typ-B *ARRs*. Typ-B *ARRs* verfügen über potentielle Kernlokalisierungssignale (Abbildung 3) (Lohrmann *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2000) und tatsächlich konnte auch eine Kernlokalisierung für die Typ-B *ARRs* ARR1, ARR2, ARR10, ARR11, ARR12 und ARR19 experimentell gezeigt werden (Mason *et al.*, 2004; Hosoda *et al.*, 2002; Hwang und Sheen, 2001; Lohrmann *et al.*, 2001; Sakai, 2000; Lohrmann *et al.*, 1999). In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass die isolierte *Output*-Domäne der Typ-B *ARRs* ARR1, ARR2, ARR10 und ARR11 Transkriptionsaktivierende Eigenschaften haben (Lohrmann *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2000; Lohrmann *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft wird vermutlich durch die saure und P/Q-haltige Domäne (Abbildung 3) realisiert, die über charakteristische Aminosäuren wie Glutamin, Prolin und Phenylalanin verfügen (Lohrmann *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 1998). Die N-terminale *Receiver*-Domäne der Typ-B *ARRs* hat eine negativ-regulatorische Funktion, da

beispielsweise die isolierte *Output*-Domäne von ARR1 und ARR2 im *Yeast One-Hybrid* System das *GAL4::LacZ* bzw. *GAL4::Luc* Reporter gen stärker aktivierten als das komplette Protein (Lohrmann *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2000). Dies konnte auch *in planta* bestätigt werden, da transgene Pflanzen, die die isolierte *Output*-Domäne von ARR1 überexprimierten, einen buschigen Phänotyp und eine erhöhte Cytokininsensitivität (Kallusbildung bei geringer Cytokininkonzentration) zeigten (Imamura *et al.*, 2003). Pflanzen, die das vollständige ARR1-Protein überexprimierten, zeigten diesen Phänotyp hingegen nicht. Die Aktivität der *Output*-Domäne wird durch die *Receiver*-Domäne in Abwesenheit von Cytokinin unterdrückt und erst in Anwesenheit aktiviert. ARR1 überexprimierende Pflanzen zeigten nämlich erst in Anwesenheit von Cytokinin denselben Phänotyp (zusätzliche Sprossbildung) wie Pflanzen, in denen die isolierte ARR1 *Output*-Domäne in Abwesenheit von Cytokinin überexprimiert wurde (Sakai *et al.*, 2001).

Welche Zielgene werden durch Typ-B ARRs aktiviert? Bekannt ist, dass zu den primären Cytokininantwortgenen u.a. die Typ-A *ARR* Gene gehören und deren Expression von Typ-B ARRs kontrolliert wird (Hwang und Sheen, 2001; Sakai *et al.*, 2001; D'Agostino *et al.*, 2000; Kiba *et al.*, 2000). Darüber hinaus gibt es auch andere potentielle Zielgene für die Typ-B ARRs, da beispielsweise bei DNA-*Microarray* Experimenten Transkripte zahlreicher Gene gefunden wurden, die innerhalb weniger Minuten cytokinininduziert hochreguliert werden (Brenner *et al.*, 2005; Kiba *et al.*, 2005).

Im Modell der Cytokininsignaltransduktion wird die Interaktion der Typ-B ARRs mit AHPs und die Phosphorylierung ihrer N-terminalen *Receiver*-Domäne vorausgesetzt (Abbildung 2). Interaktionen mit AHPs konnten durch zahlreiche Experimente belegt werden (Tabelle 2) und auch die Phosphorylierung der Typ-B ARRs wurde mit einem sogenannten *Phosphorelay*-Experiment bewiesen. Bei diesem Experiment wurden AHPs an der Histidinphosphorylierungsstelle durch einen *E. coli*-Membranextrakt radioaktiv phosphoryliert und die Phosphorylgruppe wird anschließend auf die *Receiver*-Domäne der Typ-B ARRs übertragen (Imamura *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001b).

Arabidopsis Typ-B ARR Homologe konnten auch in Mais (*ZmRR8-ZmRR10*) identifiziert werden. Diese werden wie die *Arabidopsis*-Gene ebenfalls nicht durch Cytokinin induziert. *ZmRR8* ist, wie die *Arabidopsis* Typ-B ARRs auch, im Kern lokalisiert. Darüber hinaus wurde im *Phosphorelay*-Experiment gezeigt, dass *ZmHPs* als Phospho-Donor für *ZmRR8* und *ZmRR9* dienen, was gleichzeitig auf eine Interaktion zwischen *ZmRRs* und *ZmHPs* deutet (Asakura *et al.*, 2003).

ii) *Typ-A Responseregulatoren*

Insgesamt 10 ARR_s werden der Typ-A Familie zugeordnet (Tabelle 1; Hwang *et al.*, 2002; Imamura *et al.*, 1999). Diese sind miteinander zu 63 % - 93 % homolog (D'Agostino *et al.*, 2000) und können paarweise gruppiert werden (ARR₃/ARR₄, ARR₅/ARR₆, ARR₇/ARR₁₅, ARR₈/ARR₉ und ARR₁₆/ARR₁₇; Kiba *et al.*, 2004; D'Agostino *et al.*, 2000). Bis auf ARR₁₇ liegen für alle Typ-A ARR_s Expressionsdaten vor (Tabelle 1). Die Vermutung, dass homologe Gene ein ähnliches Expressionsmuster zeigen, konnte für die Paare ARR₃/ARR₄, ARR₅/ARR₆ und ARR₈/ARR₉ bestätigt werden (Tabelle 1). Darüber hinaus zeigen fast alle Typ-A ARR_s ein partiell überlappendes Expressionsmuster, da sie in Wurzeln exprimiert sind (Tabelle 1). Charakteristisch für die Typ-A ARR_s ist ihre cytokinininduzierte Expression. ARR₄, ARR₅, ARR₆, ARR₇, ARR₈, ARR₉, ARR₁₅ und ARR₁₆ Transkripte werden innerhalb von 15 min durch Cytokinin induziert, erreichen nach ca. 30-60 min ein Maximum, um anschließend wieder abzuklingen (D'Agostino *et al.*, 2000; Taniguchi *et al.*, 1998; Brandstatter und Kiba, 1998).

Ein charakteristisches Merkmal der Typ-A ARR_s ist, dass sie nur über eine *Receiver*-Domäne mit der Aspartatphosphorylierungsstelle im konservierten „DDK“-Motiv sowie eine kurze C-terminale Verlängerung (< 100 Aminosäuren) mit sauren Aminosäuren, wie Serin, Threonin und Prolin, verfügen (Abbildung 3) (D'Agostino *et al.*, 2000). Für die C-terminale Verlängerung von ARR₃, ARR₄, ARR₆ und ARR₇ wurden potentielle Kernlokalisierungssignale vorhergesagt (Imamura *et al.*, 2001), die in Abbildung 3 nicht dargestellt sind. Die Analyse der subzellulären Lokalisation zeigte, dass GFP-ARR₇ und GFP-ARR₁₅ im Kern lokalisiert sind. GFP-ARR₇-ΔC und GFP-ARR₁₆ dagegen, die keine C-terminale Verlängerung haben, waren im Cytoplasma lokalisiert (Kiba *et al.*, 2002). Auch ARR₆, das ebenfalls über eine C-terminale Verlängerung verfügt, zeigte eine Kernlokalisierung (Hwang und Sheen, 2001).

Gemäß dem Modell der Cytokininsignaltransduktion wird für die Typ-A ARR_s vorhergesagt, dass sie durch negatives *Feedback* die Transduktion des Signals inhibieren können (Abbildung 2). Hierzu wurde in *Arabidopsis*-Protoplasten ein ARR₆::*Luc* Reporter gen verwendet, das in Anwesenheit von Cytokinin aktiviert wird. Durch Überexpression der Typ-A ARR_s ARR₄, ARR₅, ARR₆ und ARR₇ wurde das Reporter gen jedoch reprimiert (Hwang und Sheen, 2001). Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Überexpression von ARR₁₅ erzielt, da dies die Transkriptakkumulation von ARR₄ und ARR₇ reduzierte (Kiba *et al.*, 2003). Neben der negativ-regulatorischen Funktion der Typ-A ARR_s konnte auch eine positive Funktion gezeigt werden, da die Überexpression von ARR₄ die Aktivierung der Transkription von anderen Typ-

A *ARRs* und gleichzeitig eine erhöhte Cytokininsensitivität der transgenen Pflanzen (Kallusbildung bei geringen Cytokininkonzentrationen) zur Folge hatte (Osakabe *et al.*, 2002). Für den Mechanismus des negativen *Feedbacks* wird vermutet, dass Typ-A *ARRs* mit *AHPs* interagieren und diese durch ihre Phosphataseaktivität dephosphorylieren, so dass der Signalfluss der Cytokininsignaltransduktion unterbrochen wird (Kiba *et al.*, 2003). Experimente belegen die Interaktionen der Typ-A *ARRs* mit *AHPs* (Tabelle 2) und auch die Phosphataseaktivität der Typ-A *ARRs* mit *AHPs* als Substrat wurde bestätigt. Beispielsweise werden die radioaktiv phosphorylierten *AHPs* *AHP1* oder *AHP2* innerhalb von 60 Sekunden in Anwesenheit von *ARR3* oder *ARR4* desphosphoryliert (Imamura *et al.*, 1999).

Arabidopsis Typ-A *ARR* Homologe wurden auch in Mais (*ZmRR1-ZmRR7*) identifiziert und dort ebenfalls durch Cytokinin induziert (Asakura *et al.*, 2003). Einige von ihnen sind im Cytoplasma (*ZmRR1*, *ZmRR2* und *ZmRR3*) und andere im Kern (*ZmRR4*, *ZmRR5* und *ZmRR6*) lokalisiert. Im *Yeast Two-Hybrid* Test wurden Interaktionen mit Histidinphosphotransmittern gezeigt (*ZmRR1-ZmHP1/ZmHP3*) und *Phosphorelay*-Experimente belegten den Phosphotranfer von *ZmHPs* auf Typ-A *ZmRRs* (Asakura *et al.*, 2003).

Crosstalk durch Interaktion der ZKS-Proteine mit anderen Arabidopsis-Proteinen

Die Verknüpfung von Signalwegen, die u.a. durch Protein-Protein-Interaktionen erfolgen kann, wird als *Crosstalk* bezeichnet. Nachfolgend werden einige Beispiele für den *Crosstalk* der Cytokininsignaltransduktion mit anderen Signalwegen aufgeführt, die durch Protein-Protein-Interaktionen identifiziert wurden.

Ein *Crosstalk* der Cytokininsignaltransduktion mit der durch Ethylen und Osmose hervorgerufenen Signalantworten wird vermutet, da *AHP1*, *AHP2* und *AHP3* mit dem Ethylenrezeptor *ETR1* (Urao *et al.*, 2000) und *AHP2* mit dem potentiellen Osmosensor *AHK1* (Urao *et al.*, 2000) interagieren. Darüber hinaus interagieren *AHP1*, *AHP2* und *AHP3* mit dem potentiellen Transkriptionsfaktor *TCP10* (Suzuki *et al.*, 2001b). Für ein *TCP10*-homologes Protein, nämlich *TBP1* aus Mais, ist bekannt, dass es die Ausbildung von lateralen Verzweigungen im Spross reprimiert (Luo *et al.*, 1999). Für den Typ-A *ARR* *ARR4* wurde eine Interaktion mit dem Rotlichtrezeptor *PhyB*, einem Protein der Phytochromfamilie (*PhyA-PhyE*), identifiziert (Sweere *et al.*, 2001). *ARR4* interagiert auch mit *AtDBP1* und *AtDBP2* (Yamada *et al.*, 1998), DNA-bindende Proteine, die ursprünglich als Auxinantwortgene identifiziert wurden (Alliotte *et al.*, 1989).

1.3 Ziel der Arbeit

Die Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis* wird durch Elemente des ZKS realisiert, die den Proteinfamilien AHK, AHP und ARR zugeordnet werden. Die AHK-Familie umfasst drei, die AHP-Familie fünf und die ARR-Familie insgesamt 21 Proteine. Ihre hochkonservierten Domänen, ihre Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisationen und genetische Analysen zeigen, dass die Elemente innerhalb der Familien möglicherweise überlappende Funktionen übernehmen und somit redundant sind. Aufgrund dieser Redundanz, die durch zahlreiche *in planta* Experimente belegt wurde (Higuchi *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; To *et al.*, 2004), konnte bislang nur das grundlegende Prinzip der Cytokininsignaltransduktion modellhaft aufgeklärt werden (Mizuno, 2005; Heyl und Schmülling, 2003). Demnach wird das Cytokininsignal durch membranständige AHKs wahrgenommen und anschließend in Form eines Phosphorylsignals über cytoplasmatisch lokalisierte AHPs und kernlokalisierte ARRs in den Kern transduziert. Der genaue Mechanismus zur Steuerung des cytokininspezifischen Genexpressionsprogrammes und die Beteiligung der jeweiligen ZKS-Proteine bleiben aber unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf molekularer Ebene durch Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ein Beitrag zum Verständnis des ZKS von *A. thaliana* geleistet werden, da die spezifische biologische Funktion eines Proteins u.a. durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen bestimmt wird. Die Identifizierung eines Proteininteraktionsnetzwerkes könnte daher helfen, den komplexen Mechanismus des ZKS besser zu verstehen. Hinweise auf die Funktion eines unbekanntes Proteins in einem solchen Netzwerk liefert nämlich seine Interaktion mit einem charakterisierten Protein. Zur Generierung eines Proteininteraktionsnetzwerkes können verschiedene Ansätze gewählt werden. Eine Möglichkeit ist die Untersuchung der ZKS-Proteine auf Interaktionen untereinander und eine weitere ist die Untersuchung auf Interaktionen mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen. Für Interaktionsanalysen untereinander wurde der Matrix-Ansatz ausgewählt, bei dem die ZKS-Proteine mittels des *Yeast Two-Hybrid* Systems im Rastermuster auf Interaktionen untersucht werden. Für Interaktionsanalysen mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen wurde der *Library-Screen*, der ebenfalls auf dem *Yeast Two-Hybrid* System basiert, sowie eine Kopplung von Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie ausgewählt. Die Kombination von verschiedenen Methoden sollte die Darstellung eines Proteininteraktionsnetzwerkes mit verlässlichen Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen, so dass sich auf molekularer Ebene zusätzliche Hinweise für ein zunehmend detaillierteres Bild zum Mechanismus des ZKS ergeben sollten.