

4 Diskussion

Gemäß dem derzeitigen Modell der Cytokininsignaltransduktion (Heyl und Schmölling, 2003; Hwang und Sheen, 2001) wird das Signal des Pflanzenhormons Cytokinin durch membranständige Cytokininrezeptoren (AHKs) wahrgenommen, die daraufhin durch Autophosphorylierung die Signaltransduktion initiieren. Das Phosphatsignal wird auf Histidinphosphotransmitterproteine (AHPs) übertragen, die in den Kern translozieren und dort das Phosphatsignal auf Typ-B Responseregulatoren (Typ-B ARR) übertragen. Diese fungieren als Transkriptionsfaktoren und aktivieren die Transkription der Typ-A Responseregulatoren, die durch negatives *Feedback* die Cytokininsignaltransduktion inhibieren können. Aufgrund der Redundanz innerhalb des ZKS, 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 Schmölling, 2003). Der genaue Mechanismus zur Steuerung cytokininspezifischer Antworten und die Beteiligung der jeweiligen ZKS-Proteine bleiben somit unbekannt.

Die meisten Proteine bilden in einer Zelle mit ihren Interaktionspartnern stabile oder transiente Proteinkomplexe, um ihre spezifische biologische Funktion auszuüben (Alberts, 1998). Die spezifische Funktion eines Proteins wird somit auch durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen bestimmt (Bader *et al.*, 2003). Die Identifizierung eines Proteininteraktionsnetzwerkes könnte aus diesem Grund helfen, den komplexen Mechanismus eines zellulären Prozesses, wie beispielsweise des ZKS, besser zu verstehen. Für mehrere Modellorganismen, wie *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *C. elegans*, wurden bereits mittels des *Yeast Two-Hybrid* Systems Proteininteraktionsnetzwerke generiert (Li *et al.*, 2004; Giot *et al.*, 2003; Uetz und Hughes, 2000). Hinweise auf die Funktion eines unbekanntes Proteins in einem solchen Netzwerk liefert seine Interaktion mit einem charakterisierten Protein. Auf diese Weise lassen sich Proteine mit unbekannter Funktion einem zellulären Kontext zuordnen (Uetz *et al.*, 2005; Bader und Hogue, 2002; Xenarios und Eisenberg, 2001; Schwikowski *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf molekularer Ebene ein Beitrag zum Verständnis des ZKS von *A. thaliana* geleistet werden. Hierzu wurde ein bislang für das ZKS noch nicht beschriebener Ansatz durchgeführt, bei dem die ZKS-Proteine zunächst mittels des *Yeast Two-Hybrid* Systems im Matrix-Ansatz auf Interaktionen untereinander untersucht wurden. Im *Library-Screen* und mittels der Kopplung der Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie wurden die ZKS-Proteine auf Interaktionen mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen

untersucht. Die Kombination von verschiedenen Methoden sollte die Darstellung eines Proteininteraktionsnetzwerkes mit verlässlichen Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Uetz *et al.*, 2005; Bader und Christopher, 2002; von Mering *et al.*, 2002; Xenarios *et al.*, 2001; Walhout und Vidal, 2001; Schwikowski *et al.*, 2000), so dass sich auf molekularer Ebene zusätzliche Hinweise für ein zunehmend detaillierteres Bild zum Mechanismus des ZKS ergeben sollte.

4.1 Protein-Protein-Interaktionen im ZKS von *A. thaliana* mittels des Matrix-Ansatzes

Mittels des Matrix-Ansatzes, bei dem 20 ZKS-Baits gegen 25 ZKS-Preys im Rastermuster auf Protein-Protein-Interaktionen untersucht wurden, wurden unter den 500 untersuchten Kombinationen insgesamt 68 Interaktionen, 43 neue und 25 bekannte, identifiziert (Kapitel 3.2).

Die Untersuchung der ZKS-Proteine auf Interaktionen in beiden Orientierungen, d.h. als *Bait*- und als *Prey*-Fusionsproteine, sollte dazu beitragen, Interaktionen, die in der einen Orientierung nicht gefunden werden können, durch Expression in der anderen Orientierung zu identifizieren (Estojak *et al.*, 1995) und somit die Anzahl an gefundenen potentiellen Interaktionen erhöhen. Von den 68 Interaktionen konnten sechs nur in einer Orientierung identifiziert werden. Dies bedeutet, dass durch Interaktionsanalyse der ZKS-Proteine in beiden Orientierungen die Anzahl an gefundenen potentiellen Interaktionen in diesem System um 9 % erhöht werden konnte.

Verglichen mit der Tatsache, dass die mittels verschiedener *Yeast Two-Hybrid* Systeme identifizierten Protein-Protein-Interaktionen nur wenig Überlappung zeigen (von Mering *et al.*, 2002), belegt das hier erzielte Ergebnis die gute Qualität des verwendeten *Yeast Two-Hybrid* Systems. Für die Qualität spricht, dass 25 (Kapitel 3.2) der 32 publizierten (Kapitel 1.2) Interaktionen detektiert wurden. Nur 7 bekannte Interaktionen konnten nicht detektiert werden, darunter die Interaktionen ARR1/ARR2-AHP4 (Tanaka *et al.*, 2004), ARR11-AHP2 (Imamura *et al.*, 2003) und ARR22-AHP5 (Kiba *et al.*, 2004), die nicht untersucht werden konnten, da die entsprechenden Klone (AHP4 und ARR22) fehlten oder die Proteine in der *Bait*-Orientierung (AHP2 und ARR11) stark autoaktivierend waren. Die restlichen drei publizierten Interaktionen AHK1-AHP2 (Urao *et al.*, 2000) und die Interaktionen AHP1/AHP2-ARR10 (Imamura *et al.*, 1999) konnten in diesem System nicht detektiert werden.

Die Qualität der *in vivo* Ergebnisse wurde durch eine weitere Methode, dem *in vitro* Interaktionstest, untersucht. Dabei konnten 38 der insgesamt 42 getesteten neuen Interaktionen, also 90 %, verifiziert werden. Die durch andere Forschungsgruppen erzielten Werte liegen bei 35-82 % (Goehler *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Der Vergleich dieser Werte belegt ebenfalls die gute Qualität des in dieser Arbeit verwendeten *Yeast Two-Hybrid* Systems. Für die drei nicht verifizierten Interaktionen waren die Testbedingungen möglicherweise zu stringent und müssen unter modifizierten Bedingungen, beispielsweise nach Änderung der Detergenzkonzentration, der Anzahl der Waschschriffe oder des Waschpuffervolumens, wiederholt werden. Falls dennoch eine *in vitro*-Verifizierung nicht möglich sein sollte, könnte dies z.B. darauf zurückzuführen sein, dass die Bedingungen nicht optimal sind oder die Interaktion durch andere kontaminierende Proteine „maskiert“ wird. Darüber hinaus ist darauf hinzuweisen, dass für den *in vitro* Interaktionstest die GST-Fusionsproteine aus einem bakteriellen Expressionssystem aufgereinigt wurden. Mittels dieses Systems können Proteine nicht posttranslational modifiziert werden, so dass möglicherweise unter diesen Bedingungen für einige Proteine eine *in vitro* Verifizierung nicht möglich ist und ein eukaryotisches Expressionssystem somit eine Alternative wäre. Beispielsweise konnte für alle Ethylenrezeptoren, nämlich ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4, eine Autophosphorylierung *in vitro* gezeigt werden, wenn diese aus einem eukaryotischen Expressionssystem aufgereinigt wurden. Dieses konnte jedoch nicht gezeigt werden, wenn ein bakterielles Expressionssystem verwendet wurde (Moussatche und Klee, 2004).

Ein etabliertes *Yeast Two-Hybrid* System eignet sich zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen. Für die biologische Relevanz der gefundenen Interaktionen hingegen müssen die Proteine u.a. zur selben Zeit im selben Gewebe und im selben Zellkompartiment der Pflanze exprimiert sein. Für einige ZKS-Gene konnte bereits ein überlappendes Expressionsmuster per RT-PCR, Northern-Blot, Reportergene und DNA-*Microarray*-Experimente gezeigt werden (zusammengefasst in Heyl *et al.*, 2006), so dass die im Matrix-Ansatz gefundenen Interaktionen durchaus *in planta* stattfinden könnten. Ein solches Expressionsmuster unterstützt zwar die gefundenen potentiellen Protein-Protein-Interaktionen (Hughes *et al.*, 2000), liefert aber keinen direkten Hinweis auf die Funktionen der kodierten Proteine, so dass hierzu weitere Untersuchungen, im Idealfall *in planta*, unerlässlich sind.

Auch *in planta* gibt es, wenn auch nicht wie das *Yeast Two-Hybrid* System im Hochdurchsatzverfahren einsetzbar, bereits Methoden, die die Identifizierung der subzellulären Lokalisation eines Proteins und gleichzeitig auch die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen. Beispielsweise konnte mittels eines Fragmentkomplementierungs-

ansatzes, basierend auf der Rekonstitution des Enzyms Dihydrofolatreduktase, die subzelluläre Lokalisation und gleichzeitige Interaktion von Transkriptionsfaktoren direkt durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden (Subramaniam *et al.*, 2001). Eine weitere ähnliche *in planta*-Methode ist die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementierung (BiFC), bei der das gelbfluoreszierende Protein YFP in zwei Fragmente unterteilt ist und erst durch Interaktion der an die beiden Fragmente fusionierten Proteine fluoresziert (Walter *et al.*, 2004; Bracha-Drori *et al.*, 2004).

Die nachfolgend diskutierten mittels des Matrix-Ansatzes identifizierten physikalischen Protein-Protein-Interaktionen könnten somit mittels der oben genannten Methoden auf ihre biologische Relevanz direkt *in planta* untersucht werden.

4.1.1 Homo- und Heterodimerisierung der Cytokininrezeptoren

Zu den in dieser Arbeit gefundenen interessanten neuen Interaktionen zählen vor allem die zwischen den Cytokininrezeptoren. Ähnlich den bakteriellen Rezeptorhistidinkinasen (Marina *et al.*, 2005; Wolanin *et al.*, 2002; Saito, 2001; Stock *et al.*, 2000) liegt die aus Sequenzähnlichkeiten abgeleitete Interaktionsdomäne der Cytokininrezeptoren im cytoplasmatischen Bereich, nämlich in der Histidinkinasedomäne. Für den Ethylenrezeptor ETR1 konnte wiederum gezeigt werden, dass für eine Homodimerisierung Disulfidbrückenbindungen an Cysteinresten in der Transmembran-Domäne benötigt werden (Urao *et al.*, 2000). Das *Yeast Two-Hybrid* System lässt allerdings Interaktionsanalysen nur für Proteine zu, die keine Transmembran-Domänen enthalten, so dass in dieser Arbeit nur der cytoplasmatische Bereich der Rezeptoren verwendet wurde. Daher ist es durchaus möglich, dass einige potentielle Interaktionen für die Cytokininrezeptoren aufgrund dieser Eigenschaft des *Yeast Two-Hybrid* Systems unidentifiziert bleiben. Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen für membranständige Proteine könnten Systeme, wie z.B. das Split-Ubiquitin-System, das SOS-Recruitment-System oder das β -Galaktosidase-Komplementierungssystem verwendet werden (Golemis, 2002). Diese Systeme sind allerdings noch nicht so weit ausgereift, dass man sie, wie das *Yeast Two-Hybrid* System, im Hochdurchsatzverfahren verwenden könnte.

Rezeptorkinasen in Säugern sind dafür bekannt, Homo- und Heterodimere bilden zu können (Schlessinger, 2002) und auch in Pflanzen konnte dies für einige Rezeptorkinasen gezeigt werden. So konnte eine Heterodimerisierung der Brassinosteroidrezeptoren BRI1 und BAK1 (Wang *et al.*, 2005; Russinova *et al.*, 2004), eine Heterodimerisierung der CLV3-Rezeptoren CLV1 und CLV2 (Matsubayashi, 2003) und eine Homodimerisierung des

Ethylenrezeptors ETR1 (Schaller *et al.*, 1995) gezeigt werden. Untersuchungen zu Rezeptor *loss-of-function* Mutanten weisen möglicherweise auch auf eine Heterodimerisierung unter Histidinkinasen hin. So zeigten Cytokininrezeptor-Mutantenkombinationen, in denen *ahk3* enthalten waren, einen stärkeren Phänotyp als die *ahk2 ahk4* Doppelmutante (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Eine Heterodimerisierung mit AHK3 ist jedoch nicht Voraussetzung für die Funktionen von AHK2 und AHK4, da *ahk3* Mutanten keinen Phänotyp zeigten (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Die Analyse der einzelnen Rezeptor *loss-of-function* Mutanten zeigte eine funktionelle Redundanz unter den Cytokininrezeptoren. Die Erwartung, dass redundante Proteine ein ähnliches Interaktionsmuster zeigen (de Folter *et al.*, 2005), wird im Matrix-Ansatz durch die drei Cytokininrezeptoren erfüllt, da für diese Interaktionen mit allen AHPs gezeigt werden konnten.

Mittels des Matrix-Ansatzes konnten somit in dieser Arbeit zum ersten Mal physikalische Interaktionen unter den Cytokininrezeptoren gezeigt werden, die als Hinweis auf eine Homodimerisierung für AHK2 und eine Heterodimerisierung für AHK3 mit AHK2 und AHK4 gewertet werden. Für die Cytokininrezeptoren wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese erst nach Bindung des Liganden dimerisieren würden (Heyl und Schmölling, 2003; Sheen, 2002). Aus dem Matrix-Ansatz geht jedoch hervor, dass die Rezeptoren in Abwesenheit des Liganden dimerisieren können. Die Cytokininrezeptoren sind möglicherweise erst durch Dimerisierung dazu befähigt, den Liganden zu binden, um anschließend die Cytokininsignaltransduktion einzuleiten. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass eine Dimerisierung hervorgerufen wird, weil der verwendete cytoplasmatische Teil der Rezeptoren den ligandengebundenen Zustand eines vollständigen Rezeptors imitiert.

Für die Cytokininrezeptoren AHK3 und AHK4 konnte gezeigt werden, dass diese unterschiedliche Cytokinine mit unterschiedlicher Präferenz binden (Spichal *et al.* 2004). Die Bedeutung der in dieser Arbeit gezeigten Homo- und Heterodimerisierung für die Funktion der Cytokininrezeptoren könnte möglicherweise darin bestehen, dass die Erkennung des Liganden zusätzlich moduliert wird. Die Homo- und Heterodimerisierung könnte eine zusätzliche Flexibilität des Signalsystems nicht nur bezüglich des Liganden sondern auch bezüglich der *Downstream*-Komponenten bedeuten. So könnte ein Rezeptor-Homodimer andere Interaktionspartner haben als ein Rezeptor-Heterodimer.

4.1.2 AHP-Proteine als Dreh- und Angelpunkt des ZKS

Aus dem derzeitigen Modell für die Cytokininsignaltransduktion in *A. thaliana* geht hervor, dass die AHPs Dreh- und Angelpunkt innerhalb des ZKS sind und somit eine zentrale Rolle

übernehmen. Sie übertragen das Signal von der Plasmamembran in den Zellkern und bilden somit das Signaltransportmittel zwischen den Rezeptoren und Responseregulatoren (Ferreira und Kieber, 2005; Heyl *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2002; Imamura *et al.*, 1999; Kakimoto, 2003; Lohrmann *et al.*, 2001a; Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001a, b; Tanaka *et al.*, 2004). Die Ergebnisse des Matrix-Ansatzes bestätigen die zentrale Rolle der AHPs im ZKS, da sie mit fast allen ZKS-Proteinen interagieren (Abbildung 36). Auf diese Weise sind die AHPs möglicherweise in der Lage, Signale, die durch einen der Rezeptoren oder durch die verschiedenen Rezeptoren wahrgenommen werden, zu einem gemeinsamen Signalweg zu bündeln.

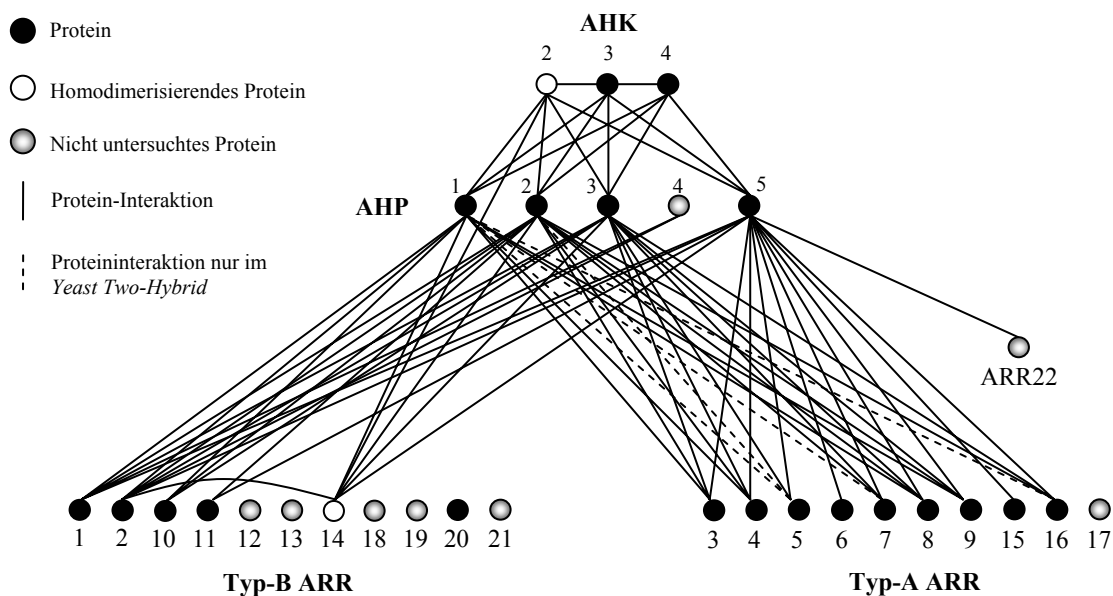


Abbildung 36. Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk im ZKS von *A. thaliana*. In dieser Abbildung sind alle bekannten und in dieser Arbeit identifizierten Interaktionen der ZKS-Proteine zusammengefasst. Jeder schwarze Punkt entspricht einem Protein und die verifizierten Interaktionen sind durch eine schwarze Verbindungslinie dargestellt. Die gestrichelten Linien entsprechen den Proteininteraktionen, die nur im *Yeast Two-Hybrid* identifiziert wurden. Jeder weiße Punkt entspricht einem homodimerisierenden Protein und jeder schattierte Punkt einem Protein, das in dieser Arbeit nicht untersucht werden konnte.

Während alle AHPs mit allen Rezeptoren interagieren, scheint es für einige Interaktionen zwischen AHPs und den Responseregulatoren eine Spezifität zu geben. Beispielsweise interagiert ARR10, ein Typ-B ARR, mit AHP1, AHP2 und AHP3. Eine Interaktion mit AHP5 konnte aber nicht nachgewiesen werden. Somit ergibt sich die Möglichkeit, dass spezifische Interaktionen zwischen AHPs und ARRs zur Signalspezifität beitragen (Abbildung 36).

Für einige AHPs konnte gezeigt werden, dass ihre subzelluläre Lokalisation vom Phosphorylierungszustand des konservierten Histidins reguliert wird (Hwang und Sheen, 2001). Nicht bekannt war jedoch, ob die Interaktionen der AHPs ebenfalls vom Phosphorylierungszustand beeinflusst werden. Der Mutationsanalyse lässt sich entnehmen,

dass durch Austausch des konservierten Histidins das AHP5-Interaktionsmuster nicht beeinflusst wird (Kapitel 3.2.6). Die Phosphorylierung von AHP5 und möglicherweise auch der anderen AHPs ist nicht Voraussetzung für die Interaktionen mit ihren Partnerproteinen. Für einige Rezeptoren und Typ-B Responseregulatoren wurde allerdings gezeigt, dass die phosphorylierbaren konservierten Aminosäuren für ihre Funktionen wichtig sind (Hass *et al.*, 2004; Hwang und Sheen, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1998; Urao *et al.*, 1999). Somit lässt sich vermuten, dass die Richtung des Signalflusses möglicherweise von der subzellulären Lokalisation der AHPs, die cytokinin- und phosphorylierungsabhängig ist (Hwang und Sheen 2001), bestimmt wird.

Darüber hinaus ist bekannt, dass AHPs keine katalytische Funktion besitzen (Suzuki *et al.*, 1998) und ihr Phosphorylierungszustand durch die Rezeptoren und Responseregulatoren bestimmt wird (Stock *et al.*, 2000). Histidinkinasen hingegen besitzen neben ihrer Kinaseaktivität auch eine Phosphataseaktivität (Stock *et al.*, 2000). Beide Aktivitäten werden durch extrazelluläre Signale und durch die HAMP-Domäne, die der letzten Transmembran-Domäne und der cytoplasmatisch lokalisierten Histidinkinase-Domäne zwischengeschaltet ist, beeinflusst (Inouye, 2003). Über die Kinase- und Phosphataseaktivität der Cytokininrezeptoren könnte auch im ZKS von *A. thaliana* das Verhältnis phosphorylierte zu nicht-phosphorylierte AHPs und somit der Signalfluss reguliert werden.

4.1.3 Protein-Interaktionen der Responseregulatoren

Homo- und Heterodimerisierung ist für Transkriptionsfaktoren ein bekannter Mechanismus zur Regulation ihrer Aktivität und Bestimmung ihrer Spezifität (Immink und Angenent, 2002; Riechmann *et al.*, 2000). Unter den hier untersuchten sechs Typ-B ARRs konnte für ARR14 eine Homodimerisierung, eine Heterodimerisierung mit ARR2 und eine Interaktion mit dem Cytokininrezeptor AHK2 identifiziert werden. *ARR14* zeigt sowohl mit *ARR2* (Mason *et al.*, 2004; Tajima *et al.*, 2004) als auch mit *AHK2* (Mason *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2004) ein überlappendes Expressionsmuster, so dass es durchaus möglich ist, dass ihre Aktivitäten *in planta* durch Dimerisierung reguliert werden.

Eine weitere Voraussetzung für eine biologische Relevanz dieser Interaktionen ist, dass die interagierenden Proteine auch im selben Zellkompartiment lokalisiert sind. Unter den drei hier besprochenen Proteinen AHK2, ARR2 und ARR14 konnte bislang nur für ARR2 durch Fusion an das grünfluoreszierende Protein GFP in *Arabidopsis*-Protoplasten eine Kernlokalisierung gezeigt werden (Lohrmann *et al.*, 2001). Auch für ARR1 und ARR11, zwei weitere Typ-B Responseregulatoren, konnte eine Kernlokalisierung gezeigt werden (Sakai *et al.*, 2000;

Lohrmann *et al.*, 1999). Daher liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise alle Typ-B ARR, einschließlich ARR14, im Kern lokalisiert sein könnten und somit neben der Homodimerisierung von ARR14 auch eine Heterodimerisierung mit ARR2 *in planta* stattfinden könnte. Für den Cytokininrezeptor AHK2 liegen keine Lokalisationsdaten vor, so dass dieser Rezeptor aufgrund der Transmembran-Domänen an der Cytoplasmamembran lokalisiert sein könnte. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass für AHK3 fusioniert mit GFP eine Lokalisierung in der Cytoplasmamembran gezeigt werden konnte (Kim *et al.*, 2006). Falls AHK2 tatsächlich an der Cytoplasmamembran und ARR14 im Kern lokalisiert sein sollte, so wäre aufgrund unterschiedlicher subzellulärer Lokalisationen eine Interaktion zwischen ARR14 und AHK2 *in planta* nicht möglich. Erst durch Untersuchung der subzellulären Lokalisation von ARR14 wird sich herausstellen, ob ARR14 über eine Cytoplasma-Kern-Mobilität verfügt. Eine solche Mobilität, die bereits für einige AHPs in Abhängigkeit von ihrem Phosphorylierungszustand gezeigt wurde (Hwang und Sheen, 2001), könnte die Interaktion von ARR14 mit ARR2 und AHK2 *in planta* ermöglichen.

Interaktionen zwischen Typ-A ARR und AHPs sind aufgrund des negativen *Feedbacks* interessant, dabei unterdrücken die Typ-A ARR die Cytokininsignaltransduktion (To *et al.*, 2004; Hwang und Sheen, 2001). Diese Regulation könnte via Interaktion der Typ-A ARR mit AHPs und/oder mit Typ-B ARR erfolgen. Der Interaktionsmatrix ist zu entnehmen, dass ein negatives *Feedback* via AHPs durchaus möglich ist, da diese Proteine zahlreiche Interaktionen mit Typ-A ARR zeigen. Ein möglicher Mechanismus hierfür wäre, dass die phosphorylierten AHPs durch Typ-A ARR dephosphoryliert werden und somit ihre Aktivität verlieren. Die Typ-A ARR würden somit als Phosphatasen fungieren, bei der jeweils ein Typ-A ARR Protein mehrere phosphorylierte AHP-Proteine dephosphorylieren kann. So konnte beispielsweise eine Phosphohistidinphosphataseaktivität für ARR4 *in vitro* gezeigt werden (Imamura *et al.*, 1999). Ein alternativer Mechanismus hierzu wäre, dass Typ-A und Typ-B ARR um die phosphorylierten AHPs konkurrieren. Bei diesem Modell wäre die *Feedback*-Inhibierung der Cytokininsignaltransduktion von der Menge der Typ-A ARR Proteine in der Zelle abhängig. Für einige Typ-A ARR konnte in einem bakteriellen Testsystem dieser Mechanismus gezeigt werden (Imamura *et al.*, 1998). Welcher dieser beiden Mechanismen *in planta* tatsächlich vorliegt, ist unbekannt. Die Vermutung jedoch, dass durch Interaktionen der Typ-A ARR mit den AHPs die AHK-abhängige Aktivierung der Typ-B ARR und somit die Cytokininsignaltransduktion reduziert wird, liegt nahe und wird auch durch die im Matrix-Ansatz identifizierten Interaktionen unterstützt. Ein *Feedback*-Mechanismus durch Interaktion

zwischen Typ-A und Typ-B ARR's ist weniger wahrscheinlich, da deren Interaktion im Matrix-Ansatz nicht gezeigt werden konnte.

4.1.4 Redundanz und Spezifität im ZKS von *A. thaliana*

Die wichtigste Erkenntnis, die mittels des Matrix-Ansatzes gemacht werden konnte, ist, dass ZKS-Proteine derselben Proteinfamilie ein fast identisches Interaktionsmuster zeigen, was auf molekularer Ebene die funktionelle Redundanz innerhalb des ZKS erklärt. Die Redundanz konnte auch auf phänotypischer Ebene durch Untersuchung von Rezeptor bzw. Responseregulator *loss-of-function* Mutanten gezeigt werden (Higuchi *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2004; To *et al.*, 2004) und scheint somit ein wichtiges Merkmal des ZKS zu sein. Das bakterielle ZKS bildet diesbezüglich eine Ausnahme, da beispielsweise in *E. coli* die Anzahl an Rezeptorkinasen und Responseregulatoren fast identisch ist, d.h. jede Rezeptorkinase hat vermutlich einen Responseregulator (Koretke *et al.*, 2000). Die Redundanz könnte als Puffer innerhalb einer Proteinfamilie fungieren. So konnte beispielsweise in Hefen gezeigt werden, dass eine Mutation in einem Protein das Transkriptionsmuster des entsprechend homologen Proteins beeinflusst und somit diesen Verlust kompensiert (Kafri *et al.*, 2005). Ein Verlust kann funktionell nur dann kompensiert werden, wenn das homologe Protein mit denselben Proteinen wie das mutierte Protein interagiert und gleichzeitig dieselben Funktionen übernimmt. Deshalb ist zu erwarten, dass in einem Organismus für essentielle Signalwege eine gewisse Redundanz innerhalb des entsprechenden Proteininteraktionsnetzwerkes vorhanden ist. Für das ZKS in *A. thaliana* jedenfalls konnte diese Erwartung hinsichtlich der Interaktionen bestätigt werden (Abbildung 36).

Eine solche Redundanz wirft wiederum die Frage auf, auf welche Art und Weise das ZKS die spezifischen Cytokininantworten steuert. Gewebespezifische Expression oder Änderung der subzellulären Lokalisation könnten möglicherweise dazu beitragen. Die gewebespezifische Expression scheint aber nur einen Teilbeitrag zu leisten, da die *AHK*-, *AHP*- und *ARR*-Gene größtenteils ein überlappendes Expressionsmuster zeigen (Higuchi *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Tajima *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004; To *et al.*, 2004). Die subzelluläre Lokalisation ist nur für wenige ZKS-Proteine bekannt, somit kann keine Aussage über ihre Relevanz hinsichtlich der Redundanz gemacht werden.

Die Signalspezifität könnte möglicherweise hauptsächlich durch Interaktionen der ZKS-Proteine mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen gesteuert werden. In Hefe konnten beispielsweise Unterschiede in der MAPK-Signalantwort durch Interaktionen mit verschiedenen Interaktionspartnern (z.B. *Scaffold*-Proteinen oder Phosphatasen) gezeigt werden (Elion *et al.*,

2005; Claire *et al.*, 2002). Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der *Library-Screens* unterstützt, da für jedes ZKS-Protein zahlreiche potentielle Interaktionspartner identifiziert und aus diesen ein Proteininteraktionsnetzwerk generiert werden konnte (Kapitel 4.3).

4.2 Kartierung der Interaktionsdomänen für ZKS-Proteine aus *A. thaliana*

Bei nahezu allen biologischen Prozessen spielen Protein-Protein-Interaktionen, die durch Proteindomänen vermittelt werden, eine zentrale Rolle. Einzelne Proteindomänen können sich unabhängig von anderen Teilen des Proteins falten und somit strukturelle und funktionelle Einheiten von Proteininteraktionen bilden (Uetz und Pohl, 2004). Proteininteraktionsdomänen lassen sich im *Yeast Two-Hybrid* System durch Kartierung identifizieren, so dass anschließend die Funktion eines Proteins in Abhängigkeit von seinen Interaktionsdomänen untersucht werden kann. So konnte beispielsweise für die Interaktionen ARR1-AHP2, ARR2-AHP1/AHP2 und ARR10-AHP2 gezeigt werden, dass die N-terminale *Receiver*-Domäne der Typ-B Responseregulatoren und nicht die *Output*-Domäne für die Interaktionen mit den Histidinphosphotransmittern benötigt wird (Lohrmann *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001b; Imamura *et al.*, 1999). In weiteren Experimenten erwies sich die *Output*-Domäne des Typ-B Responseregulators ARR2 als DNA-Bindedomäne und Transkriptionsaktivierungsdomäne zugleich. Dabei bindet die *Output*-Domäne alleine stärker an die Promotorsequenz ihres Zielgens und aktiviert auch die Transkription stärker als das vollständige ARR2-Protein (Lohrmann *et al.*, 2001). Dadurch wurde die Vermutung nahe gelegt, dass die Aktivität der *Output*-Domäne durch die *Receiver*-Domäne negativ inhibiert wird. Dieses konnte auch *in planta* durch Überexpression der isolierten *Output*-Domäne (ohne *Receiver*-Domäne) des Typ-B Responseregulators ARR11 (ARR11-C) gezeigt werden (Imamura *et al.*, 2003). ARR11-C überexprimierende Pflanzen zeigten nämlich im Gegensatz zu Pflanzen, die das komplette ARR11-Protein überexprimierten, im erwachsenen Stadium einen buschigen Phänotyp. Bei der Untersuchung von Hypokotylsegmenten auf Kallusbildung zeigten ARR11-C Überexprimierer ausserdem eine höhere Cytokininsensitivität, d.h. sie bildeten schon bei geringen Cytokininkonzentrationen einen grünen Kallus. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivität der einen Proteindomäne durch die andere reguliert werden kann.

Die in dieser Arbeit mittels des Matrix-Ansatzes identifizierten Interaktionen bilden die Grundlage für zukünftige Experimente, wie sie soeben beschrieben worden sind. Darüber hinaus ist es aber auch interessant zu wissen, welche Proteindomäne eines ZKS-Proteins für welche Interaktion benötigt wird und ob ein und dieselbe Proteindomäne für die Interaktion mit

verschiedenen Proteinen gleichzeitig zuständig ist. Die Interaktionskartierung, die nachfolgend diskutiert wird, sollte Aufschluss darüber geben.

4.2.1 Interaktionskartierung des Cytokininrezeptors AHK2

Für die Interaktionskartierung wurde unter den Cytokininrezeptoren AHK2 als Vertreter ausgewählt, da dieser mit beinahe allen Proteinfamilien des ZKS Interaktionen zeigte (Abbildung 36).

Entgegen bisherigen Ergebnissen, die die Homodimerisierung in Histidinkinasen durch die HisKA-Domäne beschreiben (Marina *et al.*, 2005; Wolanin *et al.*, 2002; Saito, 2001; Stock *et al.*, 2000), konnte für AHK2 gezeigt werden, dass für eine Selbstinteraktion die komplette Histidinkinase-Domäne (HisKA+HATPase c) benötigt wird (Kapitel 3.3.1).

Gemäß dem derzeitigen Modell der Cytokininsignaltransduktion (Heyl und Schmülling, 2003; Hwang und Sheen, 2001) erfolgt die Übertragung des Phosphatsignals in der Reihenfolge Cytokininrezeptor > Histidinphosphotransmitter, über die *Receiver*-Domäne des Cytokininrezeptors (Heyl und Schmülling, 2003; Hwang *et al.*, 2002; Hwang und Sheen, 2001; Stock *et al.*, 2000). Eine direkte Interaktion der *Receiver*-Domäne mit dem Histidinphosphotransmitter wäre daher sinnvoll und konnte auch in dieser Arbeit für die Interaktion AHK2-AHP5 gezeigt werden (Kapitel 3.3.1). Darüber hinaus wird die *Receiver*-Domäne von AHK2 auch für die Interaktion mit ARR14 benötigt (Kapitel 3.3.1).

Aus den Ergebnissen der Interaktionskartierung für die Interaktionen AHK2-AHP5/ARR14 lässt sich folgende potentielle Bedeutungen herleiten: ARR14 und AHP5 konkurrieren um dieselbe Bindestelle innerhalb der AHK2-*Receiver*-Domäne. Für den Fall, dass unter gegebener Voraussetzung ARR14 bevorzugt bindet und somit die Bindestelle für AHPs besetzt, könnte der Phosphatsignalfluss AHK > AHP > ARR blockiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ARR14 durch die AHK2-*Receiver*-Domäne phosphoryliert werden könnte, ist gering. Dies würde nämlich einen Phosphatsignalfluss in der Reihenfolge Aspartat > Aspartat bedeuten, was dem Modell der Phosphatübertragung Histidin > Aspartat > Histidin widerspricht und bisher noch nicht gezeigt wurde. Eine Interaktion von ARR14 mit der AHK2-*Receiver*-Domäne könnte aber auch zur Folge haben, dass ARR14 durch zusätzliche Interaktion mit anderen Proteinen phosphoryliert wird oder in räumliche Nähe der HisKA-Domäne kommt und durch diese phosphoryliert wird. Aufgrund der phosphorylierungsabhängig veränderten subzellulären Lokalisation einiger AHPs (Hwang und Shenn, 2001) ist es möglich, dass auch ARR14 nach einer Phosphorylierung in den Kern transloziert, wo es dann anschließend die Transkription von Zielgenen aktiviert.

4.2.2 Interaktionskartierung des Histidinphosphotransmitters AHP5

AHP5 wurde stellvertretend für die Interaktionskartierung für alle AHPs verwendet, da es die meisten Interaktionen im Matrix-Ansatz zeigte. Dabei stellte sich heraus, dass nur das vollständige AHP5-Protein und somit die gesamte HPt-Domäne für die untersuchten Interaktionen, AHP5-AHK2/AHK3, AHP5-ARR2/ARR4, benötigt wird. Eine Unterteilung der HPt-Domäne trotz Beibehaltung des „XHQXKGSSXS“-Motivs führt zum Interaktionsverlust (Kapitel 3.3.2).

Es könnte sein, dass sowohl die derzeit bekannten als auch unbekanntes *Arabidopsis*-Proteine um dieselbe Bindestelle im AHP5-Protein konkurrieren und somit den Phosphatsignalfluss, vielleicht sogar auch die cytokininspezifischen Antworten, regulieren. Dabei bestimmt neben den Faktoren Expressionsmuster, Kollokalisierung, Stabilität und posttranslationale Modifikationen der Proteine auch die Interaktionsstärke, welches Protein sich unter den konkurrierenden durchsetzt. Beispielsweise kann ein Enzym vorübergehend an ein Substrat binden und nach kurzer Zeit wieder dissoziieren. Eine solche Interaktion ist kurzlebig und wird gemeinsam mit schwachen Interaktionen als „transient“ bezeichnet (Uetz und Pohl, 2004). Proteinkomplexe wie die des Kollagens dagegen können über Jahre „stabil“ vorliegen ohne zu dissoziieren (Uetz und Pohl, 2004).

Neben der hier aufgestellten Hypothese gibt es auch alternative Hypothesen, in denen der Phosphatsignalfluss möglicherweise durch die subzelluläre Lokalisation der Histidinphosphotransmitter reguliert werden könnte oder durch Cytokininrezeptoren und Responseregulatoren, die eine Kinase- und Phosphataseaktivität auf die AHPs ausüben (Hwang und Sheen, 2001; Stock *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 1998).

4.2.3 Interaktionskartierung des Typ-B Responseregulators ARR14 und des Typ-A Responseregulators ARR4

Interaktionskartierungen für die Typ-B Responseregulatoren ARR1, ARR2 und ARR10 haben gezeigt, dass die *Receiver*-Domäne für die Interaktion mit AHPs benötigt wird (Lohrmann *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001b; Imamura *et al.*, 1999). Für ARR14 trifft dieses jedoch nicht zu, da für die Interaktion mit AHP5 und AHK2 das komplette ARR14-Protein benötigt wird (Kapitel 3.3.3).

Für die *Output*-Domäne der Typ-B Responseregulatoren ARR1, ARR2 und ARR11 konnte nach Fusion an die GAL4-DBD eine Transkriptionsaktivierung der Reportergene, d.h. Autoaktivierung, im *Yeast Two-Hybrid* System gezeigt werden (Sakai *et al.*, 1998; Lohrmann

et al., 1999). Die *Output*-Domäne von ARR14 zeigte ebenfalls eine Autoaktivierung und hat somit eine Transkriptionsaktivierende Eigenschaft. Diese Domäne wird gleichzeitig auch für die Selbstinteraktion und für die Interaktion mit ARR2 benötigt (Kapitel 3.3.3).

Wie die anderen Typ-A Responseregulatoren auch, besitzt ARR4 nur eine Proteindomäne, die *Receiver*-Domäne (Mason *et al.*, 2004; Heyl und Schmülling, 2003; Kakimoto, 2003; Hosoda *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002). Auffällig bei ARR4 jedoch ist, dass es unter den Typ-A Responseregulatoren über den längsten C-terminalen Bereich verfügt. Daher wurde ARR4 für die Interaktionskartierung in die *Receiver*-Domäne und in den C-terminalen Bereich unterteilt und diese auf Interaktion mit AHP5 untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur das vollständige ARR4-Protein mit AHP5 interagiert und eine Unterteilung zum Interaktionsverlust führt. Für ARR4 ist bekannt, dass es *in vitro* eine Phosphohistidinphosphataseaktivität mit den phosphorylierten AHPs AHP1 und AHP2 zeigt, d.h. diese innerhalb von 60 Sekunden dephosphoryliert (Imamura *et al.*, 1999). Diese Aktivität wird möglicherweise durch das komplette ARR4-Protein realisiert.

4.3 Identifizierung von Protein-Interaktionen des ZKS von *A. thaliana* mittels der *Library-Screens*

Mittels der *Library-Screens*, bei denen 17 ZKS-Baits gegen bis zu sechs verschiedene *Prey*-cDNA-Banken aus *A. thaliana* auf Protein-Protein-Interaktionen durchmustert wurden, konnten aus 80 *Screens* insgesamt 178 verschiedene Interaktionen identifiziert werden (Kapitel 3.4). Eine Hauptkritik an einem solchen Hochdurchsatzverfahren ist, dass ca. 50 % aller Interaktionen Falschpositive sind (von Mering *et al.*, 2003; Bader *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2003). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Protein-Protein-Interaktionen nicht durch zusätzliche Experimente bestätigt und als „Rohdaten“ veröffentlicht wurden. Das Auftreten von Falschpositiven ist systembedingt, da das *Yeast Two-Hybrid* System ohne Rücksicht auf die biologische Relevanz alle physikalisch stattfindenden Interaktionen detektiert. Falschpositive Interaktionen treten beispielsweise zwischen Proteinen auf, die *in vivo* aufgrund unterschiedlicher subzellulärer Lokalisationen, räumlich voneinander getrennt sind, jedoch im *Yeast Two-Hybrid* System systembedingt in Kontakt treten können. Ein weiteres Kriterium für Falschpositive ist die Autoaktivierung der Reportergene durch die *Bait*- oder *Prey*-Fusionsproteine in Abwesenheit eines Partnerproteins. So konnten auch in dieser Arbeit mittels des Autoaktivierungstests die als *Prey*-Fusionsproteine exprimierten Histone als Autoaktivierer identifiziert werden. Aufgrunddessen wurden 38 der gefundenen Interaktionen als Falschpositive eingestuft und die Zahl der gefundenen 178

Interaktionen auf 140 reduziert. Neben den Falschpositiven gibt es auch die Falschnegativen, also reale Interaktionen, die *in vivo* tatsächlich auftreten aber im *Yeast Two-Hybrid* System beispielsweise aufgrund von Fehlfaltungen oder fehlender posttranslationaler Modifikationen nicht identifiziert werden können (Auerbach, 2002; Walhout und Vidal, 2001). Trotz dieser limitierenden Faktoren werden *Library-Screens* durchgeführt, da es keine andere Methode zur Untersuchung einer großen Anzahl von Proteinen auf Protein-Protein-Interaktionen gibt. Erst durch die Kombination mehrerer Methoden können diese Probleme partiell umgangen werden (Uetz *et al.*, 2005; von Mering *et al.*, 2002; Golemis, 2002).

Durch Erhöhung der Transformationsraten und mittels der Koloniehybridisierung konnten die *Library-Screen* in dieser Arbeit optimiert und die Arbeitsschritte des Prozessverlaufs reduziert werden. Darüber hinaus konnte durch den Austausch des *Prey*-Vektors die Anzahl an gefundenen potentiellen Interaktionspartnern erhöht werden. So zeigt der *Screen* mit ARR7 gegen die *Hormon*-cDNA-Bank mit dem *Prey*-Vektor pGAD10-GW 4.552.000 Transformanden, jedoch keine Primärpositiven (Kapitel 3.4.1), mit dem *Prey*-Vektor pACT2-GW dagegen 1.230.000 Transformanden mit > 200 Primärpositiven, aus denen nach Prozessende 13 Klone als Retrafopositive eingestuft werden konnten (Kapitel 3.4.2). Im pGAD10-GW Vektor sind der GAL4-AD und dem ihr fusionierten unbekanntem Protein vier Aminosäuren, im pACT2-GW Vektor hingegen 25 Aminosäuren zwischengeschaltet (Kapitel 11.1). Im pACT2-GW Vektor haben die ZKS-Proteine möglicherweise aufgrund dieses größeren Abstandes einen besseren Zugang zu den Interaktionsdomänen der unbekanntem Proteine.

Aus bereits publizierten *Screens* geht hervor, dass einige Proteine nur wenige und andere wiederum sehr viele Interaktionspartner besitzen (Li *et al.*, 2004; Giot *et al.*, 2003). Schätzungsweise interagiert jedes Protein durchschnittlich mit mindestens 3 anderen Proteinen (Uetz und Pohl, 2004). Nach Ausschluss der falschpositiven Histonproteine konnte für die *Screens* gegen die cDNA-Bank *Koncz* folgende wichtige Beobachtungen gemacht werden (Kapitel 3.4.2):

i) Unter den Cytokininrezeptoren zeigt AHK2 mit 25 verschiedenen Proteinen insgesamt 41 Interaktionen pro $12,5 \times 10^6$ Transformanden, darunter sechs AHPs (5x AHP2, 1x AHP3) und AHK4 mit 12 verschiedenen Proteinen insgesamt 40 Interaktionen pro 8×10^6 Transformanden, darunter fünf AHPs (5x AHP2). Die AHP-Interaktionshäufigkeit beträgt für AHK2 15 % und AHK4 13 %.

ii) Unter den Typ-B Responseregulatoren zeigt ARR1 mit 7 verschiedenen Proteinen insgesamt 24 Interaktionen pro $0,7 \times 10^6$ Transformanden, darunter 17 AHPs (14x AHP3, 2x

AHP2, 1x AHP1) und ARR2 mit 6 verschiedenen Proteinen insgesamt 37 Interaktionen pro $0,8 \times 10^6$ Transformanden, darunter 32 AHPs (20x AHP3, 7x AHP2, 5x AHP1). Die AHP-Interaktionshäufigkeit beträgt für ARR1 71 % und ARR2 86 %.

iii) Unter den Typ-A Responseregulatoren zeigt ARR3 mit 6 verschiedenen Proteinen insgesamt 32 Interaktionen pro $0,9 \times 10^6$ Transformanden, darunter 28 AHPs (16x AHP3, 7x AHP2, 5x AHP1), ARR5 mit 19 verschiedenen Proteinen insgesamt 40 Interaktionen pro $0,4 \times 10^6$ Transformanden, darunter 20 AHPs (13x AHP3, 7x AHP2), ARR7 mit 6 verschiedenen Proteinen insgesamt 34 Interaktionen pro $0,8 \times 10^6$ Transformanden, darunter 30 AHPs (18x AHP3, 12x AHP2), ARR8 mit 2 verschiedenen Proteinen insgesamt 14 Interaktionen pro $0,9 \times 10^6$ Transformanden, darunter 14 AHPs (13x AHP3, 1x AHP1), ARR9 mit 3 verschiedenen Proteinen insgesamt 13 Interaktionen pro $0,2 \times 10^6$ Transformanden, darunter 12 AHPs (9x AHP3, 3x AHP2). Die AHP-Interaktionshäufigkeit beträgt für ARR3 88%, ARR5 50 %, ARR7 88 %, ARR8 100 %, ARR9 92 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass fast alle ZKS-Proteine Interaktionen mit mehr als drei verschiedenen Proteinen zeigen. Die Cytokininrezeptoren zeigen die meisten Interaktionen, da diese auch intensiv *gescreent* wurden. Für die Cytokininrezeptoren wurden wenige Interaktionen mit AHPs jedoch zahlreiche Interaktionen mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen identifiziert. Für die Typ-B sowie Typ-A Responseregulatoren dagegen wurden zahlreiche Interaktionen mit AHPs und nur wenige Interaktionen mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen identifiziert. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Interaktionen der Cytokininrezeptoren mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen auch wichtig für die Cytokininsignaltransduktion sind.

Für die Typ-A Responseregulatoren ARR4, ARR6, ARR15 und ARR16 konnte die Interaktionshäufigkeit mit AHPs nicht ermittelt werden, da für diese fast ausschließlich falschpositive Histonproteine als Interaktoren identifiziert wurden. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese ZKS-Proteine in Hefe nicht exprimiert werden, ist gering. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass im Matrix-Ansatz für ARR4 und ARR16 Interaktionen mit allen untersuchten AHPs (AHP1, AHP2, AHP3 und AHP5), darunter die publizierten Interaktionen ARR4-AHP1/AHP2 und ARR9-AHP1/AHP2/AHP3, und mit ARR6 und ARR15 eine Interaktion mit AHP5 identifiziert wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der Autoaktivierung der falschpositiven Histonproteine ein starkes Wachstum dieser Klone potentielle andere Interaktionen überlagert, die daher unidentifiziert blieben.

Für die Qualität der *Library-Screens* spricht, dass 14 von 32 publizierten Interaktionen (AHK4-AHP2, AHP5-ARR1, ARR1-AHP1/AHP2/AHP3, ARR2-AHP1/AHP2/AHP3, ARR3-AHP1/AHP2, ARR8-AHP1/AHP3, ARR9-AHP2/AHP3; Kapitel 1.2), d.h. 44 %, in diesem Experiment ebenfalls detektiert wurden. Darüber hinaus konnten neun der neuen Interaktionen (AHK2-AHP2/AHP3, AHP5-ARR4, ARR3-AHP3, ARR5-AHP2/AHP3 und ARR7-AHP1/AHP2/AHP3), die im Matrix-Ansatz identifiziert wurden (Kapitel 3.2.4), bestätigt werden. Die restlichen 18 publizierten Interaktionen konnten möglicherweise in dieser Arbeit nicht gefunden werden, weil die in der Literatur beschriebenen Interaktionen durch andere Methoden wie die Phosphatübertragung, Quenching oder im *E. coli-LacZ* System identifiziert wurden (Kapitel 1.2) oder weil die Proteine in den untersuchten cDNA-Banken durch die entsprechenden *Prey*-Plasmide nicht oder nur partiell kodiert sind.

Die Qualität der *Library-Screens* wurde ausserdem mittels des *in vitro* Interaktionstests abgeschätzt. Hierzu wurden mit AHK4-AMP-D, AHK2-ADL1, AHK2-UN8 und AHK2-UN13 vier Interaktionen zufällig und weitere zwei Interaktionen, nämlich AHK2-PI4K β 1, AHK2-PI3-/4-K nach Literaturrecherchen ausgewählt. Von den sechs untersuchten Interaktionen konnten mit AHK2-PI4K β 1, AHK4-AMP-D und AHK2-ADL1 drei Interaktionen, also 50 %, verifiziert werden (Kapitel 3.4.3). Die durch andere Forschungsgruppen erzielten Verifizierungswerte liegen bei 35-82 % (Goehler *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Bader *et al.*, 2003; von Mering *et al.*, 2002). Für eine endgültige Beurteilung der Qualität der *Library-Screens* müssen weitere Interaktionen verifiziert werden.

Die Interaktion AHK2-ADL1 wurde gegen Ende dieser Arbeit identifiziert und verifiziert, so dass ein Spezifitätstest nur mit den Proteinen PI4K β 1 und AMP-D durchgeführt wurde. Hierzu wurden beide Proteine als *Prey*-Fusionsproteine auf Interaktion mit den in *Bait*-Orientierung exprimierten ZKS-Proteinen (Fünf Histidinkinase-Rezeptoren, ein Histidinphosphotransmitter und 14 Responseregulatoren) untersucht. Unter den jeweils 20 möglichen Interaktionskombinationen konnten nur die Interaktionen AHK2-PI4K β 1 und AHK4-AMP-D identifiziert werden (Kapitel 3.4.4). Beide Interaktionen sind somit spezifisch. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass innerhalb des ZKS die cytokininspezifischen Antworten durch spezifische Interaktionen der Cytokininrezeptoren mit anderen Proteinen reguliert werden können. Für die Interaktion AHK2-PI4K β 1 wurde eine Interaktionskartierung vorgenommen, dabei zeigte die *Receiver*-Domäne von AHK2 Interaktion mit PI4K β 1 (Kapitel 3.4.5). Diese Domäne wird gleichzeitig für die Interaktionen mit AHP5 und ARR14 benötigt (Kapitel 3.3.1).

Neben der Möglichkeit, dass verschiedene Proteine um dieselbe Bindestelle in der *Receiver*-Domäne von AHK2 konkurrieren, ist es auch möglich, dass diese Domäne Teil eines Multiproteinkomplexes ist. Durch Homo- und Heterodimerisierung des Rezeptors könnte ein solcher Multiproteinkomplex eine zusätzliche Flexibilität bezüglich der an der Ausbildung des Komplexes beteiligten Proteine erhalten. Für die Untersuchung von Multiproteinkomplexen bietet sich die Methode der Kopplung der Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie. Diese Methode wurde auch in dieser Arbeit verwendet, dessen Ergebnisse in Kapitel 4.4 diskutiert werden.

4.3.1 Ein Protein-Interaktionsnetzwerk des ZKS aus *A. thaliana*

Die meisten Proteine bilden mit ihren Interaktionspartnern stabile oder transiente Proteinkomplexe, um ihre spezifische biologische Funktion auszuüben (Alberts, 1998). Die spezifische Funktion eines Proteins wird somit auch durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen bestimmt (Bader *et al.*, 2003). Ein Proteininteraktionsnetzwerk könnte daher helfen, den komplexen Mechanismus eines zellulären Prozesses, wie des ZKS-Signalfusses und die Regulation spezifischer Antworten, besser zu verstehen. Für mehrere Modellorganismen, wie *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *C. elegans*, wurden bereits mittels des *Yeast Two-Hybrid* Systems Proteininteraktionsnetzwerke generiert (Li *et al.*, 2004; Giot *et al.*, 2003; Uetz und Hughes, 2000). Die Proteininteraktionen lassen sich als Beziehungen zwischen funktionellen Klassen darstellen, so dass Proteine mit ähnlicher Funktion oder derselben subzellulären Lokalisation Gruppen bilden. Diese Gruppen sind durch vereinzelte Proteininteraktionen miteinander verbunden, so dass für ein unbekanntes Protein aufgrund seiner Interaktion mit einem charakterisierten Protein, Hinweise auf seine Funktion erhalten werden können (Uetz *et al.*, 2005; Bader und Hogue, 2002; Xenarios und Eisenberg, 2001; Schwikowski *et al.*, 2000).

Nach Ausschluss der falschpositiven Histonproteine und durch Integration von Literaturdaten konnten die für die ZKS-Proteine gefundenen Interaktionspartner funktionellen Kategorien zugeordnet und ein Proteininteraktionsnetzwerk für das ZKS aufgestellt werden (Abbildung 37). Für ein solches Proteininteraktionsnetzwerk stellt sich die Frage, ob eine Aufteilung in funktionelle Kategorien auf die biologische Relevanz der gefundenen Interaktionen schliessen lässt. Aus publizierten Proteininteraktionsnetzwerken geht hervor, dass Proteine, die Interaktionen mit vielen anderen Proteinen zeigen, als Knoten oder Interaktionszentren eines Proteinnetzwerkes betrachtet werden können.

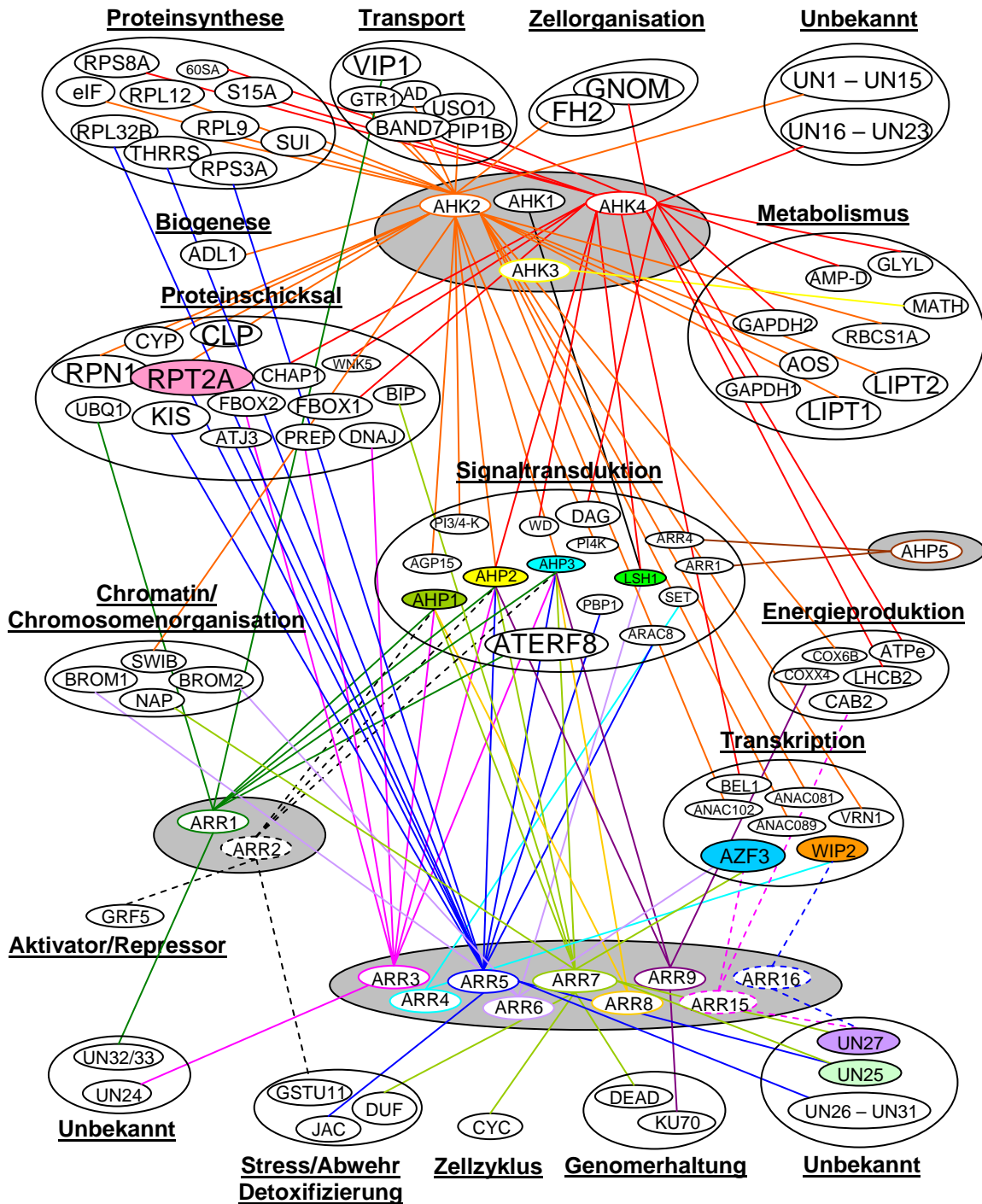


Abbildung 37. Protein-Interaktionsnetzwerk im Proteom von *A. thaliana* für das ZKS. In dieser Abbildung sind die aus den *Library-Screens* identifizierten 140 Interaktionen, einschließlich der unbekannt Proteine UN1-UN33, dargestellt. Jedes Protein ist oval umrandet, wobei die Größe der Umrandung und die Schriftgröße nur einen räumlichen Eindruck vermitteln sollen und keine weitere Bedeutung haben. Die gefundenen Interaktionen wurden den 14 funktionellen Kategorien Proteinsynthese, Transport, Zellorganisation, Biogenese, Proteinschicksal, Metabolismus, Signaltransduktion, Energieproduktion, Chromatin/ Chromosomen-organisation, Transkription, Aktivator/Repressor, Stress/Abwehr/ Detoxifizierung, Zellzyklus und Genomerhaltung zugeordnet, die durch weiße ovale Felder gekennzeichnet sind. Die grauen Felder kennzeichnen die vier ZKS-Proteinfamilien Rezeptorhistidinkinasen, Histidinphosphotransmitter, Typ-A und Typ-B Responseregulatoren. Die für die *Screens* verwendeten ZKS-Proteine sind farbig umrandet und ihre Interaktionen sind mit derselben Farbe durch gestrichelte oder durchgehende Linien mit ihren Interaktionspartnern verbunden. Die ovalen Felder der gefundenen Proteine, die Interaktionen mit mehreren ZKS-Proteinen zeigen, sind farbig gefüllt.

Solche Interaktionszentren sind eher an essentiellen zellulären Prozessen beteiligt als Proteine, die nur wenige Interaktionen zeigen (Jeong *et al.*, 2001, Schwikowski *et al.*, 2000). Im ZKS-Netzwerk bilden die ZKS-Proteine solche Interaktionszentren (Abbildung 37) und könnten somit nach dieser Aussage auch an anderen zellulären Prozessen als nur an der Cytokininsignaltransduktion beteiligt sein.

So bilden AHK2 und AHK4 ein Interaktionszentrum mit Interaktionspartnern aus den Kategorien Proteinsynthese, Metabolismus, Signaltransduktion und Transport. Die Typ-B und Typ-A Responseregulatoren fungieren ebenfalls als Interaktionszentren. Dabei zeigen ARR1 und ARR2 vor allem Interaktionen mit Proteinen aus der Kategorie Signaltransduktion, ARR3 mit Proteinen der Kategorien Proteinschicksal und Signaltransduktion, ARR4 mit Proteinen der Kategorien Proteinschicksal, Signaltransduktion und Proteinsynthese und ARR7 mit Proteinen der Kategorie Signaltransduktion. Interaktionen mit nur einem Protein aus einer Kategorie wurden hier nicht erwähnt, spielen aber für die ZKS-Proteine bei der Definition als Interaktionszentrum ebenfalls eine Rolle.

Netzwerkproteine, die miteinander über höchstens zwei weitere Proteine verbunden sind werden als funktionelle Einheiten definiert (Schwikowski *et al.*, 2000, Walhout *et al.*, 2000). Eine weitere Gruppe definiert Interaktionen in einem Netzwerk als biologisch relevant, wenn zwei Proteine identische Interaktionspartner besitzen (Milo *et al.*, 2002). So konnte beispielsweise in dieser Arbeit im Matrix-Ansatz gezeigt werden, dass die Cytokininrezeptoren und die Responseregulatoren über die Histidinphosphotransmitterproteine miteinander verbunden sind und somit, laut dieser Definition, funktionelle Einheiten bilden (Abbildung 36). Dieses bestätigt auch das aus den *Library-Screens* generierte ZKS-Netzwerk (Abbildung 37).

Darüber hinaus ist dem ZKS-Netzwerk zu entnehmen, dass der Cytokininrezeptor AHK2 und der Responseregulator ARR5 über das Protein RPT2A (AT4G29040), der AAA-ATPase Untereinheit des 26S-Proteasoms, miteinander verbunden sind und somit ebenfalls eine funktionelle Einheit bilden können. Für die beiden Rezeptoren AHK1 und AHK4 sowie den Responseregulator ARR6 konnte mit LSH1 (*Light dependent short hypocotyls 1*) (AT5G28490), das wahrscheinlich an der durch Licht regulierten Entwicklung von Keimlingen involviert ist (Zhao *et al.*, 2004), ebenfalls ein identischer Interaktionspartner identifiziert werden. Für die Responseregulatoren ARR6, ARR7 und ARR15 konnte eine Verbindung durch das Protein AZF3 (AT5G43170) und für ARR4 und ARR16 durch WIP2 (AT3G57670) gezeigt werden. AZF3 und WIP3 sind Zinkfingerproteine vom Typ C2H2. Besonders interessant ist auch, dass mehrere ZKS-Proteine mit den gleichen bisher nicht charakterisierten Proteinen interagieren und auch mit diesen eine funktionelle Einheit bilden. Beispiele sind die

Interaktionen der ZKS-Proteine ARR7, ARR15 und ARR16 mit UN27, sowie ARR5 und ARR7 mit UN25. Gemäß den oben genannten Definitionen bilden diese Interaktionen funktionelle Einheiten und könnten eine biologische Relevanz haben. Daher sollten diese Interaktionen Vorrang in zukünftigen Experimenten haben.

4.3.2 AHK2-PI4K β 1 Interaktion

Für den cytoplasmatischen Teil des Cytokininrezeptors AHK2 erwies sich nach Literaturrecherchen die Interaktion mit der PI4K β 1 als besonders interessant. Falls diese Interaktion *in planta* bestätigt wird, könnte dies ein Hinweis auf einen *Crosstalk* zwischen der Cytokinin- und der Phosphatidylinositolsignaltransduktion sein. Ähnliche Hinweise wurden auch durch andere Forschungsgruppen publiziert. So konnte beispielsweise die Inhibierung der *ARR5* mRNA-Akkumulierung und der *ARR5::GUS*-Aktivität in Anwesenheit von Cytokinin durch 1-Butanol gezeigt werden. 1-Butanol hemmt die Phospholipase D, einer an der Phosphatidylinositolsignaltransduktion (PIST) beteiligten Komponente (Romanov *et al.*, 2002). In einem DNA-*Microarray* Experiment konnte ausserdem gezeigt werden, dass die Expression von PI4K β 1 durch Auxin hoch- und durch Cytokinin herunterreguliert wird (Lin *et al.*, 2004). Darüber hinaus zeigte die *Physcomitrella patens* Phospholipase C-Mutante *plc1* eine Cytokinin-Insensitivität, da sie auf cytokininhaltigem Medium, im Gegensatz zum Wildtyp, keinen Kallus bildete (Repp *et al.*, 2004). Es ist auch bekannt, dass die PIST an der Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Ca²⁺-Ionen sowie am Einlass von Ca²⁺-Ionen aus dem extrazellulären Milieu in das Zellinnere beteiligt ist (Maciver, 2003; Prescott, 1999; Drobak, 1993; MacNicol *et al.*, 1990) und Cytokinin diesen Einlass stimuliert (Conrad und Hepler, 1988). Der Mechanismus für einen potentiellen *Crosstalk* zwischen der Cytokinin- und der Phosphatidylinositolsignaltransduktion war bislang nicht bekannt und könnte möglicherweise durch die Interaktion zwischen AHK2 und PI4K β 1 erklärt werden.

Die PIST dient in den meisten eukaryotischen Zellen der Vermittlung von extrazellulären Signalen, die beispielsweise durch Hormone oder andere Umweltreize ausgelöst werden (Lin *et al.*, 2004; Heilmeyer *et al.*, 2003; Müller-Röber und Pical, 2002; Barylko *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2000; Prescott, 1999; Drobak, 1993). In tierischen Zellen ist die PIST gut untersucht (Heilmeyer *et al.*, 2003; Drobak, 1993), in pflanzlichen Zellen dagegen kaum (Müller-Röber und Pical, 2002).

Das Phosphatidylinositol (PtIns) (Abbildung 38), das in Pflanzen mit ca. 20 % den größten Anteil der Phospholipide in einer Pflanzenzelle ausmacht (Müller-Röber und Pical, 2002; Drobak, 1993), bildet innerhalb der PIST den Startpunkt. Es dient als Substrat für Phosphorylierungsreaktionen an verschiedenen Stellen des Inositolringes, die durch Phosphatidylinositolkinasen (PIK) realisiert werden (Heilmeyer *et al.*, 2003; Müller-Röber und Pical, 2002; Prescott, 1999). Die daraus resultierenden Polyphosphoinositide PtIns(3)P, PtIns(4)P und PtIns(5)P werden wiederum durch andere PIK phosphoryliert (Müller-Röber und Pical, 2002). So entsteht beispielsweise aus PtIns das PtIns(4,5)P₂, indem die PI4K und die PI(4)P-5K den Inositolring spezifisch an der D-4 und D-5 Position sequentiell phosphorylieren (Müller-Röber und Pical, 2002; Jung *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 1999; Westergren *et al.*, 1999). PtIns(4,5)P₂ dient als Substrat für die Phospholipase C und somit als *Precursor* für die als *Second Messenger* bekannten Moleküle Inositoltrisphosphat (Ins(1,4,5)P₃) und Diacylglycerol (DAG) (Zhao *et al.*, 2000). Ins(1,4,5)P₃ signalisiert letztendlich die Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Ca²⁺-Ionen sowie den Einlass von Ca²⁺-Ionen aus dem extrazellulären Milieu in die Zelle und DAG aktiviert Mitglieder der Proteinkinase C-Familie, die in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen aktiv sind (Maciver, 2003; Prescott, 1999; Drobak, 1993; MacNicol *et al.*, 1990).

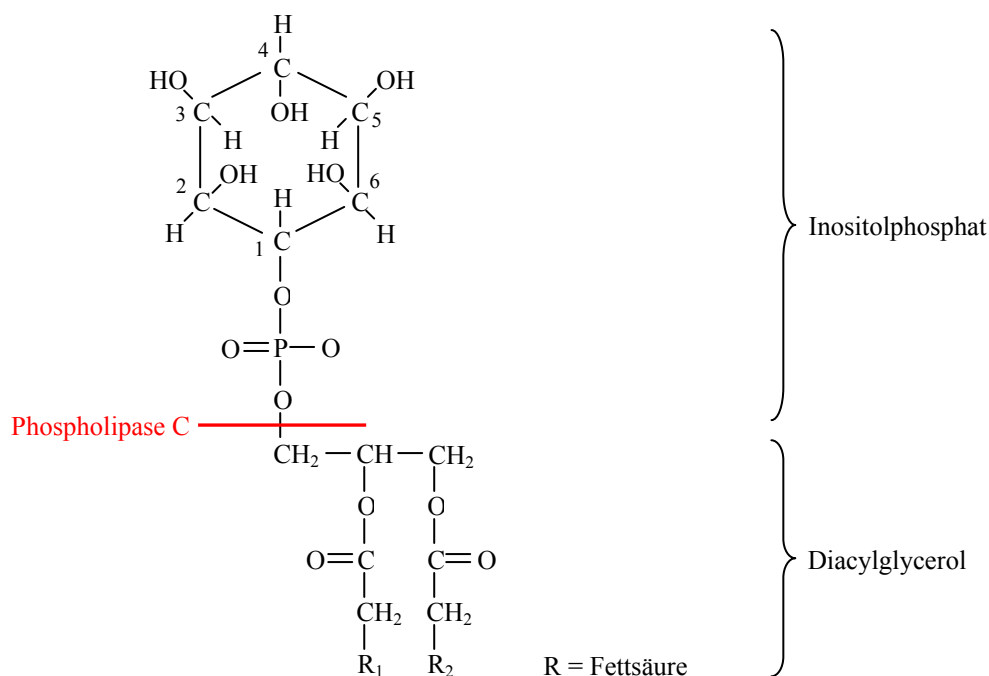


Abbildung 38. Struktur des Phospholipids Phosphatidylinositol. Phosphatidylinositol, das über die Fettsäuren R₁ und R₂ in der Membran verankert ist, kann durch spezifische Kinasen, wie PI4K und PI(4)P-5K im Inositolring sequenziell phosphoryliert und anschließend durch Phospholipase C gespalten werden. Die Spaltprodukte, Phosphatidylinositol-1,4,5-Trisphosphat und Diacylglycerol, dienen als *Second messenger*.

Als wichtigste Regulationsstelle innerhalb der PIST wird die PI4K katalysierte Phosphorylierung von PtIns betrachtet, da in vielen Fällen die Synthese von PtIns(4)P, d.h. die Aktivität von PI4K, der limitierende Faktor für die PIST ist und diese möglicherweise durch Proteinkinasen oder Phosphatasen reguliert wird (Heilmeyer *et al.*, 2003, Müller-Röber und Pical, 2002). So konnte beispielsweise in tierischen Zellen für PI4K neben der Lipidkinaseaktivität eine Autophosphorylierung sowie eine Heterophosphorylierung durch unbekannte Proteine *in vivo* gezeigt werden (Zhao *et al.*, 2000). Durch Autophosphorylierung wurde die für die Lipidkinaseaktivität benötigte katalytische Domäne und somit die Phosphorylierung von PtIns inhibiert. Die Inhibierung konnte durch Dephosphorylierung mit Phosphatasen wieder aufgehoben werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Interaktion AHK2-PI4K β 1 ergibt sich somit die Möglichkeit, dass die Aktivität von PI4K β 1 durch AHK2 (und umgekehrt) über einen ähnlichen Mechanismus reguliert wird, da Histidinkinaserzeptoren ebenfalls Kinase- und Phosphataseaktivitäten besitzen (Stock *et al.*, 2000). Für PI4K β 1 konnte eine Transmembran-Domäne nicht vorhergesagt werden und eine Publikation zu ihrer subzellulären Lokalisation liegt nicht vor. Es wird aber vermutet, dass durch Interaktion mit anderen Proteinen oder Lipiden die PI4K β 1 unterschiedliche Lokalisationen aufweist (Müller-Röber und Pical, 2002; Xue *et al.*, 1999), so dass eine Interaktion mit AHK2 durchaus möglich ist. AHK2 könnte an der Cytoplasmamembran lokalisiert sein, da dieses bereits für AHK3 durch Fusion an GFP gezeigt wurde (Kim *et al.*, 2006). Eine weitere Voraussetzung für Protein-Protein-Interaktionen, die Expression im selben Gewebe, ist ebenfalls erfüllt. Das PI4K β 1-Expressionsmuster (Xue *et al.*, 1999) stimmt nämlich mit dem des Rezeptors AHK2 (Higuchi *et al.*, 2004; Ueguchi *et al.*, 2001) überein, beide Transkripte wurden in Blättern, Wurzeln, Blüten und Stengel identifiziert.

In tierischen Zellen konnte gezeigt werden, dass die PIST beispielsweise durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Rezeptortyrosinkinasen initiiert werden kann. Diese aktivieren, nach Bindung des Liganden, die PI3K sowie die Phospholipase C (Jones *et al.*, 2005; Maciver, 2003). Eine solche Initiierung könnte möglicherweise für PI4K β 1 in *Arabidopsis* durch Interaktion mit dem Cytokininrezeptor AHK2 nach Bindung des Cytokininsignals erfolgen.

4.4 Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen in *A. thaliana* durch Kopplung der Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie

Bei zahlreichen Signalprozessen in der Zelle, wie beispielsweise der MAPK-Signalantwort (Elion *et al.*, 2005), spielen Interaktionen von mehreren Proteinen, die sich zu einem Proteinkomplex vereinen, eine wichtige Rolle. Es ist durchaus möglich, dass auch das ZKS-Signal durch die Ausbildung von Proteinkomplexen gesteuert wird. Mittels der *Library-Screens* konnten zahlreiche potentielle Interaktionen für die ZKS-Proteine mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen identifiziert werden, die möglicherweise an der Regulation von spezifischen Antworten beteiligt sind (Kapitel 4.3). Diese Methode diente aber nur der Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen zwei Proteinen und ist für die Untersuchung von Proteinkomplexen ungeeignet. Mittels der Kopplung der Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie, einer Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und Proteinkomplexen zugleich (Rohila *et al.*, 2006; Bauer und Kuster, 2003; Yates, 2000), konnten für AHK3 zusätzliche interessante Interaktionen identifiziert werden, die nachfolgend diskutiert werden. Das Prinzip dieser Methode, die als *GST-Pulldown* bezeichnet wird, beruht darauf, dass mittels der Affinitätschromatographie die interagierenden Proteine angereichert, diese mittels der Gelelektrophorese eindimensional oder zweidimensional aufgetrennt und anschließend mittels der Massenspektrometrie identifiziert werden (Bauer und Kuster, 2003; Yates, 2000). Dabei wird das zu untersuchende Protein an einen *GST-tag* fusioniert, in *E. coli* exprimiert und anschließend an eine Glutathion-Matrix immobilisiert. Die interagierenden Proteine werden aus einem Zellysate an der Matrix angereichert. Vorteil dieser Methode ist, dass durch die große Menge an immobilisiertem GST-Fusionsprotein sowohl schwache Interaktionen als auch unterrepräsentierte Proteine identifiziert werden können (Bauer und Kuster, 2003).

Voraussetzung für eine erfolgreiche affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen ist u.a. die Überexpression des zu untersuchenden Proteins. Hierzu wurde das GST-AHK3 Fusionsprotein in unterschiedlichen *E. coli*-Expressionsstämmen exprimiert, die Proteinausbeute durch Änderung der Parameter Temperatur, IPTG-Konzentration, Induktionszeit und Zelldichte zum Zeitpunkt der Induktion erhöht und der Prozess durch *Upscaling* des Expressionsvolumens optimiert (Kapitel 3.5.1). Nach Inkubation des immobilisierten GST-AHK3 Fusionsproteins mit dem Proteinextrakt aus *A. thaliana* erfolgte die Auftrennung der aufgereinigten Proteine in einem eindimensionalen SDS-Gradientengel. Ein eindimensionales Gel wurde aufgrund der einfacheren Handhabung und vor allem wegen der höheren Sensitivität bevorzugt (Bauer und Kuster, 2003; Yates, 2000). Eine wichtige

Beobachtung, die zwischen den beiden Ansätzen „Ohne Proteinextrakt“ und „Mit Proteinextrakt“ immunologisch gemacht wurde, war, dass in Anwesenheit des Proteinextraktes das immobilisierte GST-AHK3 Fusionsprotein sich zum Teil von der Glutathion-Matrix löste (Kapitel 3.5.2). Dies ist vermutlich auf reduzierende Komponenten im Extrakt zurückzuführen, die eine partielle Reduktion der Glutathion-Matrix hervorrufen. Nach der Auftrennung der Proteine wird entweder die gesamte Gelspur verwendet (Bauer und Kuster, 2003) oder die Gelspur in ca. 1 mm Banden ausgeschnitten (Gavin *et al.*, 2002). Aus zeitlichen Gründen wurden in dieser Arbeit nur optisch erkennbare Proteinbanden untersucht.

Unter den vier untersuchten Proteinbanden erwiesen sich zwei als der Cytokininrezeptor AHK3, so dass zum ersten Mal eine potentielle Homodimerisierung für den Cytokininrezeptor AHK3 gezeigt werden konnte, und eine als ein wasserstressinduzierbares Protein (At1G54410), das der Dehydrin-Proteinfamilie angehört. In Wildtyp *Arabidopsis*-Pflanzen ist bekannt, dass Dehydrine bei Kälte akkumulieren und beispielsweise das Dehydrin LTI29 vom Cytosol an die Membran transloziert, wo es möglicherweise eine Schutzfunktion für die Membran gegen Frost hervorruft (Puhakainen *et al.*, 2004). Dehydrin überexprimierende *Arabidopsis*-Pflanzen zeigen nämlich bei Frost eine höhere Überlebensfähigkeit als Wildtyppflanzen (Puhakainen *et al.*, 2004). Durch Interaktion mit AHK3 könnte möglicherweise auch das in dieser Arbeit gefundene Dehydrin vom Cytosol an die Membran translozieren, wo es dann eine Schutzfunktion gegen Frost hervorruft. Diese Interaktion weist auf einen potentiellen *Crosstalk* zwischen der Cytokininsignaltransduktion und der durch Kältestress induzierten Signaltransduktion hin.