

4 Diskussion

In Pflanzen stellt der Ubiquitin-Proteasom-Weg einen bedeutenden regulatorischen Mechanismus dar, der eine Vielzahl von physiologischen und entwicklungspezifischen Prozessen beeinflusst. Als wichtige Vermittler bei diesem Prozess sind E3-Ubiquitin-Ligasen aktiv, die oft Culline als zentrale Untereinheiten besitzen.

Die genauesten Erkenntnisse liegen für AtCUL1 vor, das Bestandteil des SCF^{TIR1}-Komplexes ist und eine entscheidende Rolle bei der Auxinsignaltransduktion spielt. Deutlich weniger ist über AtCUL3a und AtCUL3b bekannt. Weber *et al.* und Figueroa *et al.* konnten zeigen, dass diese Culline mit BPM-Proteinen und dem für eine funktionale E3-Ligase wichtigen RBX1 *in vitro* und *in vivo* interagieren. Es liegen bisher noch keine Daten zu den entsprechenden Interaktionen *in planta* vor. Ein weiteres BTB-Protein das mit AtCUL3 interagiert ist ETO1. Es reguliert ACS5, ein Enzym der Ethylenbiosynthese (Wang *et al.*, 2004). Dies ist gleichzeitig der einzige bisher beschriebene Hinweis auf eine biologische Funktion von AtCUL3.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die weitere Charakterisierung von AtCUL3a und AtCUL3b. Darüber hinaus sollte ihnen eine mögliche biologische Aufgabe zugewiesen und neue Kandidaten für Substratadaptoren identifiziert werden. Hierzu wurden T-DNA Insertionslinien verwendet, bei denen die Expression der Culline komplett ausgeschaltet war.

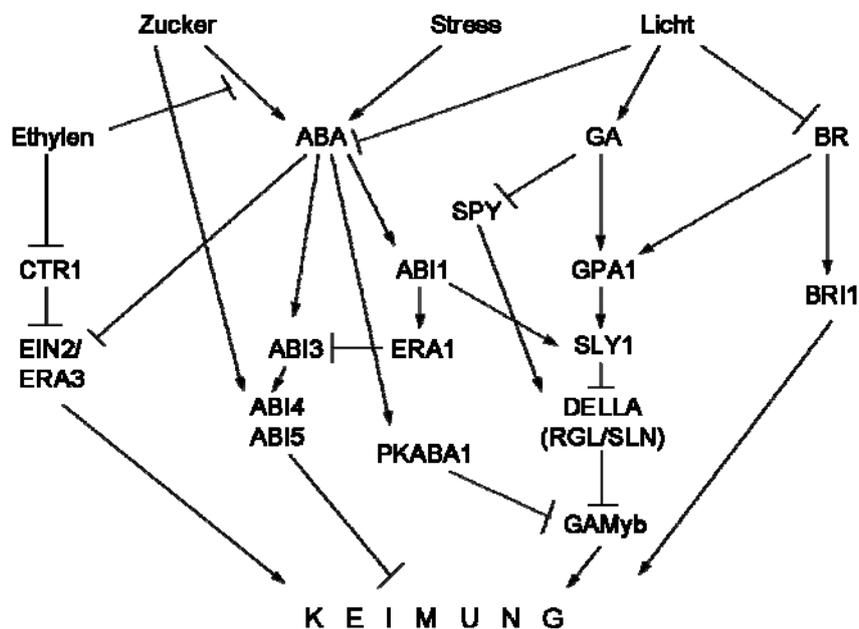
4.1 Die Rolle von AtCUL3 bei der Stressantwort

Zur generellen Charakterisierung von AtCUL3a und AtCUL3b wurde das Keimungsverhalten der Nullmutanten unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Es wurden der Einfluss von verschiedenen Salzen, Glukose und Osmotika getestet und die Keimungsrate bei erhöhten Temperaturen analysiert. Daran anschließend wurde die Sensitivität von Keimlingen der Nullmutanten gegenüber Hitzeschock untersucht.

4.1.1 *cul3ko* ist bei der Keimung toleranter gegenüber hohen Sulfatkonzentrationen und Temperaturen

Bei der Keimung werden drei Phasen durchlaufen. In der ersten Phase kommt es zu einer schnellen Wasseraufnahme. In der zweiten Phase nimmt der Samen die metabolische Aktivität wieder auf und bereitet sich so auf das anschließende Wachstum vor. In der dritten und letzten Phase tritt dann die Radicula aus der Samenschale (Bewley, 1997).

Die Keimung ist einer der kritischsten Momente der Pflanzenentwicklung und wird durch diverse Signale wie Licht, Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen, Salzgehalt und Temperatur reguliert. All diese Informationen müssen bei der Keimung verarbeitet werden. Dieser Prozess wird über die Phytohormonsignaltransduktion gesteuert. Dabei unterscheidet man die keimungsfördernden Hormone GA, Ethylen, BR oder Cytokinin, von den hemmenden Hormone ABA und JA und von den spezifischen Regulatoren die als Knotenpunkte im Netz der Signale agieren (vgl. Abb. 4-1; Finkelstein *et al.*, 2002, 2004; Gazzarrini und McCourt, 2001)).



Finkelstein, 2004

Abb. 4-1: Netzwerk der Phytohormonsignaltransduktion bei der Keimung. Gezeigt ist die Wirkung von abiotischen Faktoren und Zucker. Die antagonistischen Effekte zwischen ABA und GA sind die Hauptregulatoren der Keimung, die jedoch mit Signaltransduktionswegen anderer Hormone interagieren. Pfeile bedeuten hierbei eine Förderung, Striche stehen für eine Hemmung des entsprechenden Wegs.

Die Keimung von *cul3ko* auf Zucker, Mannitol und Sorbitol wies im Vergleich zu den Wildtypen keine Veränderung auf. Auch die Zugabe von NaCl, KCl, NH₄Cl und NH₄NO₃ führte zu keinem unterschiedlichen Keimungsverhalten.

Im Gegensatz dazu zeigten *cul3bko* eine Toleranz gegenüber hohen Sulfatkonzentrationen. In etwas geringerem Ausmaß war dieser Effekt auch bei *cul3ako* zu beobachten. Die Untersuchung der Expression von Genen der Sulfatassimilation erbrachte unveränderte Transkriptmengen, so dass der Einfluss eines BRC-Komplexes bei der Aufnahme und Reduzierung von Sulfat unwahrscheinlich ist.

Nach der Assimilation von Sulfat gibt es verschiedene Varianten, den aufgenommenen Schwefel zu nutzen. Eine Möglichkeit ist der direkte Einbau von Cystein in Proteine oder Peptide, wie dies bei der Bildung des Antioxidans Glutathion geschieht. In einem anderen Weg wird Cystein weiter metabolisiert und dient als Donor für reduzierten Schwefel. Das Vorkommen und die Funktion von Schwefel in Pflanzen sind sehr vielseitig. So findet man ihn in reduzierter Form in Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, in Eisen-Schwefel-Clustern oder in Coenzymen wie α -Liponsäure. In oxidierter Form modifiziert er als Sulfonat Proteine, Polysaccharide, Lipide und andere Naturstoffe. Es ist durchaus möglich, dass AtCUL3 an einer oder mehreren dieser Stellen eine Funktion übernimmt. Da hierfür jedoch keine genaueren Hinweise vorlagen, wurde auf eine detailliertere Untersuchung dieser komplexen Sachverhalte verzichtet.

Ebenso wie bei der exogenen Zugabe von Sulfat zeigte *cul3ko* während der Keimung eine größere Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen. Hitze ist ein Stresssignal für den Samen und es kommt zu einem Anstieg des Abscisinsäurelevels, der wiederum die Keimung inhibiert (Finkelstein, 2004). Verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren den ABA-Signalweg und es gibt bereits mehrere Hinweise auf eine Beteiligung des UBIQUITIN-PROTEASOM-WEGS (vgl. 1.1.3). Zu den entscheidenden gehören die Akkumulation der ubiquitinierten Formen von ABI5 und ABI3 in Anwesenheit des Proteasomhemmers MG132 und auch der proteolytische Abbau dieser Transkriptionsfaktoren (Lopez-Molina *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Ein weiterer Anhaltspunkt ist die Interaktion des BTB-Proteins ARIA mit dem positiven Regulator ABF2. ARIA ist aufgrund der BTB-Domäne eine potentielle Komponente einer AtCUL3-abhängigen E3-Ligase und *aria* Mutanten zeigen eine reduzierte Sensitivität gegenüber ABA (Kim *et al.*, 2004b).

Tamura *et al.* (2006) zeigten, dass *abi1* und *abi3* in der Lage sind, bei einer Temperatur von 34°C zu keimen. *abi2* zeigte eine Toleranz bis zu einer Temperatur von 32°C. In dieser Studie wurde auch eine neue Mutante identifiziert, die sowohl ABA insensitiv ist, als auch bei hohen Temperaturen noch keimen kann. Hierbei handelte es sich um eine neue allelische Variante von *abi3* (*abi3-14*).

Es ist möglich, dass die Abscisinsäureantwort über eine AtCUL3-abhängige E3-Ligase reguliert wird, da auch *cul3ako* und *cul3bko* eine Toleranz gegenüber ABA bei der Keimung aufweisen (Henriette Weber, persönliche Mitteilung). Ebenso wie *abi1* und *abi3-14* keimen die Nullmutanten bei hohen Temperaturen.

Im Gegensatz dazu sind *abi4* und *abi5* nicht in der Lage, bei hohen Temperaturen zu keimen. Beide sind aber resistent gegen Glukose, NaCl und osmotischen Stress (Finkelstein und Gibson, 2002; Tamura *et al.*, 2006). Auch bei der *abf2* Nullmutante ist diese Resistenz gegenüber Glukose festzustellen (Kim *et al.*, 2004a). *cul3ko* reagieren dagegen in üblicher Weise auf Glucose, NaCl und Osmotika, so dass ABI4, ABI5 und auch ABF2 als Substrate nicht wahrscheinlich sind.

abi1, *abi2* und *abi3* Mutanten zeigen dagegen wie *cul3ko* eine normale Antwort auf Glucose und stellen somit geeignete Kandidaten für eine Regulation durch einen BRC-Komplex dar.

Zhang *et al.* (2005) belegten, dass ABI3 durch die RING-E3-Ligase AIP2 (ABI3-Interacting Protein) ubiquitiniert und anschließend durch das 26S Proteasom abgebaut wird. Die Autoren schließen allerdings eine Ubiquitinierung durch eine andere E3-Ligase ausdrücklich nicht aus, da verschiedene Ergebnisse die Regulation durch eine zweite E3-Ligase wahrscheinlich machen. AIP2 ist z.B. ubiquitär über sämtliche Gewebe verteilt, während ABI3 nur in samenspezifischen Geweben zu finden ist. Auch geschieht der Abbau von AIP2 sehr viel schneller als der von ABI3.

4.1.2 Das HSP-Schutzsystem ist in *cul3ko* Pflanzen gestört

Bei älteren Pflanzen wurde festgestellt, dass ein Hitzeschock für die Nullmutanten eher letal wirkt als für die Wildtypen. Eine Analyse der Expression von HSP-Genen und des HSP17.6-Proteins ergab eine verzögerte und auch schwächere Antwort des HSP-Schutzsystems nach einem HS. Dabei war bei *cul3bko* sowohl der Phänotyp ausgeprägter als auch die HSP-Expression deutlicher gestört als bei *cul3ako*. Dies kann als ein Hinweis auf eine bedeutendere Funktion von AtCUL3b bei der HS-Antwort gewertet werden. Da AtCUL3b in *cul3ako*-Nullmutanten normal und nicht stärker exprimiert wird, könnte ein Teil des Proteins aufgrund einer möglichen Redundanz zur Kompensierung des Verlusts von AtCUL3a zur Verfügung gestellt werden. Damit verbleibt nicht mehr genügend AtCUL3b für die Antwort auf den Hitzeschock in der Zelle und somit ist auch in *cul3ako* die Expression der HSP leicht abgeschwächt.

HSPs werden in der Regel auf Transkriptionsebene durch HSFs reguliert. Bei einem Stresssignal bilden sie Trimere aus, lagern sich an die HSE in den Promotoren der *HSP*-Gene an, und initiieren auf diese Weise deren Expression (zur Übersicht Craig, 1985; Lindquist, 1986). Um zu untersuchen, ob die Regulation der HSP durch eine gestörte Expression der HSF erschwert ist, wurde deren Expression ebenfalls analysiert. Es konnte allerdings kein Unterschied in der Transkriptmenge der hitzeregulierten HSFs, die hauptsächlich für die HSP-Induktion verantwortlich sind, festgestellt werden. Der Abbau eines direkten Regulators durch eine AtCUL3-abhängige E3-Ligase kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Es existieren noch weitere Mechanismen zur Regulation der HS-Antwort. Deshalb ist eine andere Art der Beteiligung einer AtCUL3-abhängigen E3-Ligase möglich. Zu diesen Prozessen gehören die Induktion der HSF-Oligomerisierung, die Regulation der Kernlokalisation oder die Modulation der DNA-Bindungsaffinität. Eine weitere Möglichkeit zur Regulation ist die Markierung von Proteinen mit UBQ, die keinen proteolytischen Abbau zur Folge hat. Zum Beispiel hat die Monoubiquitinierung von Transkriptionsfaktoren einen positiven Effekt auf die RNA-Polymeraseaktivität und die Transkription von Zielgenen (Carter *et al.*, 2005; Pavri *et al.*, 2006).

Neben den HSE existieren in HS-Promotoren weitere *cis*-regulatorische Elemente, welche die Stärke der Transkription beeinflussen. Dabei werden Elemente, die eine HSE-Funktion verstärken von denen unterschieden, die HSE-unabhängig regulieren. Aus Pflanzen liegen hierfür noch keine Daten vor. In Hefe konnte jedoch gezeigt werden, dass die STREs (Stress Responsive Elements) zur HSF-unabhängigen allgemeinen Stressantwort beitragen (zur Übersicht: Morano und Thiele, 1999). In HS-Promotoren sind solche und andere „autonome“ Elemente vorhanden und es bieten sich zahlreiche Wege zur HSF-unabhängigen Regulation der Genexpression. Es ist durchaus möglich, dass ein BRC-Komplex eine Rolle bei der HSF-unabhängigen Regulierung dieser Stressantwort spielt.

Ein weiterer Beleg für eine generellere Störung der Stressantwort ist die verminderte Keimungsrate von *cu3bko* und *cul3ako* auf verschiedenen Chemikalien, die eine toxische Wirkung auf Pflanzen haben. Diese geringere Keimung ging mit einer in den Nullmutanten und Wildtypen vergleichbaren Expression der *HSP*-Gene einher. Demnach scheint die unterschiedliche Stresswirkung dieser Gifte auf die Mutanten und die Wildtypen unabhängig vom HSP-Schutzsystem zu sein. Erneut fällt auf, dass die Reaktion von *cul3ako* auf die Substanzen schwächer ist als bei *cul3bko*. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass es sich bei der Stresssignaltransduktion um einen für AtCUL3b spezifischen Vorgang handelt.

Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu untersuchen, erfolgt über Erzeugung von Doppelmutanten. Da der Verlust beider AtCUL3-Proteine jedoch embryonal wirkt (Figueroa *et al.*, 2005; Gingerich *et al.*, 2005), wurde alternativ die *axr1-12*-Mutante in *cul3bko* eingekreuzt. Damit erhielt man eine Mutante, in der die RUB-Modifikation sowohl von AtCUL3a als auch von AtCUL3b behindert ist. Allerdings sind AtCUL1 und AtCUL4 ebenfalls von dieser Mutation betroffen.

Phänotypisch unterscheidet sich die Doppelmutante nicht von *axr1-12*, die sich durch geringes Längenwachstum, kleine eingerollte Rosettenblätter und geringe Samenproduktion auszeichnet.

Die molekularbiologische Untersuchung der Hitzeschockantwort ergab, dass bereits die parentale *axr1-12*-Linie in der Expression der HSP gestört war. Für *cul3bko/axr1-12* wurde keine Verstärkung des Effekts festgestellt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass für eine korrekte HS-Antwort die Expression von AtCUL3b allein nicht ausreicht, sondern die Modifikation mit RUB von erheblicher Bedeutung ist. Da sich die Reduktion der Transkriptmenge in *cul3bko*, *axr1-12* und in *cul3bko/axr1-12* nicht voneinander unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest die RUB-modifizierten Formen von AtCUL3a, AtCUL1 und AtCUL4 keine Funktion bei der HS-Antwort haben. Andernfalls wäre in *cul3bko/axr1-12* eine noch geringere Expression zu erwarten gewesen. Dies unterstützt die Annahme, dass es sich um einen für AtCUL3b spezifischen Vorgang handelt. Die Abhängigkeit von der RUB-Modifikation ist außerdem ein Hinweis darauf, dass AtCUL3b als Bestandteil einer E3-Ligase wirkt.

Es konnte gezeigt werden, dass AtCUL3 sowohl eine Rolle bei der stressabhängigen Keimung spielt, als auch eine Funktion bei der Regulation der Hitzeschockantwort übernimmt. Es ist wahrscheinlich, dass bei diesen beiden Prozessen unterschiedliche BRC-Komplexe wirken. In *Arabidopsis* wurden bisher 76 BTB/POZ-Proteine identifiziert, von denen jedes einzelne als Substratadaptor in Frage kommt.

ARIA wäre ein guter Kandidat für die Regulierung einer stress- bzw. ABA-abhängigen Keimung. Bis jetzt ist es aber noch nicht gelungen, eine Interaktion mit AtCUL3 nachzuweisen. Zusätzlich hat die *abf2* Mutante einen unterschiedlichen Phänotyp im Vergleich zu *cul3ko* Pflanzen. Allerdings kommen *abi1*, *abi2* und *abi3* als mögliche Substrate für einen AtCUL3-abhängigen Abbau über den UBR1-Proteasom-Weg in Frage.

Eine direkte Regulierung der Transkription der HSFs durch einen BRC-Komplex kann ausgeschlossen werden. Der komplexe Mechanismus der HSP-Antwort wird aber an vielen Stellen durch andere Einflüsse geregelt, in die eine AtCUL3-abhängige E3-Ligase involviert sein kann.

4.2 Die Rolle von AtCUL3 bei der Phytohormonsignaltransduktion

Die Phytohormonsignaltransduktion spielt eine wichtige Rolle bei der Stressantwort. Bei diesem Prozess ist wiederum der UBC-Proteasom-Weg von entscheidender Bedeutung (vgl. Einleitung). In dieser Arbeit wurde die Wirkung der einzelnen Phytohormone auf das Wachstumsverhalten der Einzel- und Doppelmutanten getestet. Die Salicylsäureantwort wurde molekularbiologisch anhand des Markergens *PR1* untersucht. In einem *in vitro* Pulldown konnte die Interaktion von AtCUL3b mit NPR1 gezeigt werden.

4.2.1 *cul3bko* und *cul3bko/axr1-12* sind sensitiv gegenüber epi-Brassinolid

Es wurde der Einfluss von epi-Brassinolid (BL) auf das Wurzellängenwachstum von *cul3bko* und *cul3bko/axr1-12* untersucht. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das Wurzellängenwachstum in diesen Mutanten war stärker durch BL inhibiert als in Col.0 bzw. *axr1-12*.

Brassinosteroide (BR) sind wichtige Regulatoren der Entwicklungsprozesse in Pflanzen. Unter anderem beeinflussen sie die Zellteilung, Keimung, Seneszenz und Reifung. Außerdem haben BR eine positive Wirkung auf die Resistenz gegen abiotischen und biotischen Stress (Müssig, 2005; Sasse, 2003; Yokota, 1999). Dieses Phytohormon kann allerdings nicht getrennt von den anderen Phytohormonen betrachtet werden, so regt es z.B. die Biosynthese von Ethylen an (Arteca *et al.*, 1988; Schlaghaufer *et al.*, 1984), wirkt mit Auxin beim Längenwachstum des Stängels zusammen (Yopp *et al.*, 1981) und verstärkt die Auswirkung von Gibberellinen (Mandava *et al.*, 1981). BR inhibiert das Wurzellängenwachstum (Roddick, 1994), was die Folge einer erhöhten Ethylenbiosynthese sein kann (Arteca und Bachman, 1987).

Die BR-Antwort wird durch BZR1 (Brassinazole Resistant), einem Repressor von BR-Biosynthesegenen, in einer Feedbackschleife reguliert. Bei niedrigem BR-Level wird BZR1 durch BIN2 (Brassinosteroid Insensitiv) phosphoryliert und durch das Proteasom abgebaut (He *et al.*, 2002). Nun findet die Biosynthese statt. Ist der Hormonlevel dagegen hoch, werden die Rezeptorkinasen BRI1 (Brassinosteroid Insensitiv) und BAK1 (BR11 Associated Rezeptor Kinase) aktiviert und BZR1 dephosphoryliert. Dies geschieht entweder durch Inhibierung von BIN2, durch Aktivierung der Phosphatase BSU1 (BR11 Suppressor) oder durch beide Mechanismen (Li *et al.*, 2002; Mora-Garcia *et al.*, 2004; Wang und He, 2004). Durch die Dephosphorylierung wird der Abbau von BZR1 durch

das Proteasom gestoppt. Der Repressor kann an die Promotoren der Biosynthesegene binden und die Menge an BR sinkt wieder ab (He *et al.*, 2005).

Ein BRC-Komplex könnte den Abbau von BZR1 und damit die Biosynthese von BR regulieren. Wenn der Abbau des Repressors durch den Verlust von AtCUL3b gestoppt würde, käme es zu einem Anstieg des Brassinosteroidgehalts und so möglicherweise zu einer permanenten Aktivierung der Ethylenbiosynthese. Die RUB-Modifikation von AtCUL3b und anderer Culline scheint für diesen Signaltransduktionsweg nicht nötig zu sein. *axr1-12* ist genauso empfindlich gegenüber BR wie der Wildtyp. Auch in der Doppelmutante *cul3bko/axr1-12* konnte keine Verstärkung der Sensitivität festgestellt werden.

4.2.2 *cul3bko* ist hypersensitiv gegenüber Salicylsäure

Salicylsäure beeinflusste das Wurzellängenwachstum von *cul3bko* im Vergleich zum Wildtyp signifikant. SA bewirkte ein völliges Stoppen des Wachstums von *cul3bko*. Das Wurzellängenwachstum in *cul3bko/axr1-12* war nicht stärker beeinträchtigt als in Col.0. Auch *axr1-12* und *cul3ako* hatten ein den Wildtypen vergleichbares Wurzelwachstum. Die Transkriptionsanalyse des Markergens *PR1* zeigte, dass, mit Ausnahme von *cul3bko* bei der Northern-Blot-Analyse, dieses Gen erst nach der Induktion mit SA exprimiert war. Dabei war die Expression in *cul3bko* deutlich höher als in Col.0. *axr1-12* und *cul3bko/axr1-12* produzierten zwar mehr *PR1*-Transkript als Col.0 aber weniger als *cul3bko*. *cul3ako* hatte im Gegensatz dazu keine veränderte *PR1*-Expression.

Eine mögliche Erklärung für den starken Phänotyp von *cul3bko* und die erhöhte Expression von *PR1* nach SA-Induktion könnte in einer stärker erhöhten Salicylsäuremenge liegen. Dies wird durch die deutlichere Reduktion von *LOX2* in *cul3bko* unterstützt. Im Falle einer erhöhten SA-Menge sollte es zu einer stärkeren Reprimierung des Gens des JA-Biosynthesewegs kommen. Eine Interpretation der Daten bezüglich einer konstitutiven Expression von *PR1* fällt schwer, da sich die Ergebnisse von RT-PCR und Northern-Blot-Analyse widersprachen. Mittels RT-PCR konnte kein *PR1* nachgewiesen werden. Der Northern-Blot zeigte aber eine eindeutige Bande für nicht-induzierte *cul3bko*-Pflanzen.

Eine Komponente in der Regulation der Salicylsäuremengen, neben den Biosynthesewegen selber, sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die zusammen mit Salicylsäure in einer Rückkopplungs-Schleife reguliert werden.

Auf der einen Seite bindet Salicylsäure an H_2O_2 -detoxifizierende Enzyme wie Katalasen und Ascorbat-Peroxidasen und hemmt damit die Aktivität der Enzyme. Dadurch steigen die H_2O_2 Mengen an und induzieren eine Signaltransduktionskette, die zur *PR*-Gen-Expression und zur Abwehrreaktion der Pflanze führt (Chen *et al.*, 1993; Durner und Klessig, 1995). Auf der anderen Seite steht H_2O_2 in der Signalkette oberhalb von Salicylsäure. In Tabakpflanzen, die mit H_2O_2 behandelt wurden, konnte eine dosisabhängige Salicylsäureakkumulation und *PR1*-Expression nachgewiesen werden (Neuenschwander *et al.*, 1995). Erhöhte Salicylsäuremengen gehen also mit erhöhten H_2O_2 -Mengen einher. Da H_2O_2 aber auch toxische Wirkung hat, könnte dies den starken Phänotyp von *cul3bko* erklären.

Wegen der widersprüchlichen Ergebnisse der Expressionsanalyse von *PR1*, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Level von SA bereits in uninduzierten *cul3bko* Mutanten erhöht ist. Allerdings wird die Hypothese einer spezifischen Funktion von AtCUL3b in der SA-Signaltransduktion durch die Beobachtung unterstützt, dass nur in *cul3bko* die Transkriptionsmenge von *PR1* verändert ist und nicht in *cul3ako*. Auch zeigte die Nullmutante von AtCUL3a keine phänotypischen Veränderungen bei einem Wachstum auf Salicylsäure.

4.2.3 NPR1 interagiert mit *cul3bko* *in vitro*

Nach dem in Abb. 1-9 vorgestellten Modell wird die *PR1*-Expression über das BTB/POZ-Protein NPR1 reguliert. Dieses wandert als Monomer in den Kern, interagiert dort mit TGA-Transkriptionsfaktoren und die Expression von *PR1* wird induziert. Mittels eines Pulldowns konnte eine Interaktion von NPR1 mit AtCUL3b *in vitro* eindeutig nachgewiesen werden.

TGA-Faktoren binden als Dimere an das *as-1*-Element (Activating Sequence) in den Promotoren vieler Salicylsäure- und/oder stressaktivierter Gene (Lam *et al.*, 1989; Jupin und Chua, 1996; Zhang *et al.*, 1999). TGA2, TGA5 und TGA6 interagieren wiederum mit der Ankyrindomäne von NPR1 (vgl. 1.4; Zhou *et al.*, 2000) und haben, wie NPR1, eine essentielle Bedeutung für die Ausbildung der SAR (Zhang *et al.*, 2003).

TGA-Faktoren und NPR1 werden in der Pflanze konstitutiv exprimiert. Eine Interaktion findet aber nur nach Induktion mit Salicylsäure statt. NPR1 ist unabhängig von SA im Kern und im Cytosol zu finden (Deprés *et al.*, 2000). Das cytosolische NPR1 liegt als Oligomer vor, das durch intermolekulare Disulfid-Brücken zwischen den einzelnen Monomeren gebildet wird. Mou *et al.* (2003) zeigten, dass nach der Behandlung mit SA die

Synthese von NPR1 induziert wird und die Aminosäuren Cys82 und Cys216 reduziert werden, was zu einem Transport der entstehenden Monomere in den Kern führt. In *cul3bko* oder den anderen Mutanten liegt kein Defekt bei der Induktion von NPR1 vor. Alle Mutanten hatten eine zu Col.0 vergleichbare Expression.

Zhang *et al.* (2003) beschrieben, dass der Tripelknockout von TGA2, TGA5 und TGA6 zu einer großen Sensibilität gegenüber hohen SA-Konzentrationen führte. Sie vermuten, dass diese Transkriptionsfaktoren mit NPR1 zusammen die Toleranz gegenüber hohen Salicylsäuremengen regulieren. Gleichzeitig zeigten die TGA-Mutanten eine basale Expression von *PR1*, was eine Funktion dieser Transkriptionsfaktoren als Repressor ohne SA-Stimulus nahe legt.

Rochon *et al.*, (2006) konnten diese Vermutung in einem *in-vivo*-Pflanzentranskriptionsassay bestätigen. Sie zeigten außerdem, dass NPR1 SA- und TGA-unabhängig mit dem *PR1*-Promotor interagieren kann. In NPR1 wurde jedoch keine DNA-Bindedomäne gefunden. Deshalb geht man davon aus, dass die Interaktion über ein bisher unbekanntes Adapterprotein ermöglicht wird. Nach einem SA-Stimulus kommt es dann bei Anwesenheit der TGAs zur *PR1*-Expression. Die Autoren postulieren eine Koaktivatorfunktion eines TGA2/NPR1-Komplexes, was durch eine im C-Terminus gefundene Transaktivierungsdomäne unterstützt wird. Weiterhin machten sie deutlich, dass das Herzstück der BTB/POZ Domäne von NPR1 (Reste 80 bis 91) und die Oxidation von Cys521 und Cys529 essentiell für die Bildung eines Aktivierungskomplexes mit TGA2 ist. Die beiden Aminosäuren liegen aber sowohl im uninduzierten als auch im SA-induzierten Zustand in oxidiertem Form vor.

4.2.4 Entwicklung eines Modells zur Rolle von AtCUL3b bei der Salicylsäuresignaltransduktion

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen und unter Berücksichtigung der aus der Literatur bereits bekannten Daten lässt sich ein Modell entwickeln, das AtCUL3b in einen funktionalen Zusammenhang mit der SA-Signaltransduktion bringt.

Demnach könnte AtCUL3b im Kern ohne SA-Stimulus mit NPR1 interagieren. Auf diese Weise wäre die für eine Interaktion mit TGA2 nötige BTB-Domäne durch AtCUL3b besetzt und der an den Promotor von *PR1* gebundene TGA-Transkriptionsfaktor wirkt in seiner Funktion als Repressor. Als Folge würde kein *PR1* exprimiert.

Nachdem die Zelle ein Salicylsäuresignal empfangen hat, würde die kovalente Bindung zwischen NPR1 und AtCul3b getrennt. NPR1 könnte nun mit TGA interagieren, einen Aktivierungskomplex bilden und die Expression von *PR1* auf diese Weise induzieren. Abb. 4-2 zeigt schematisch den Ablauf der Reaktion im Wildtyp.

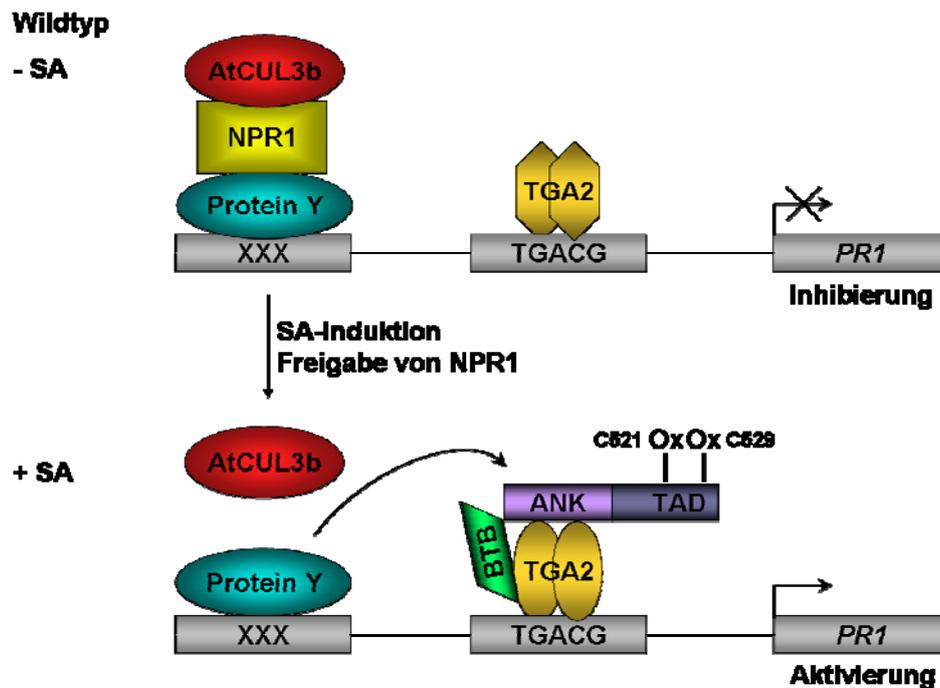


Abb. 4-2: Modell für die Regulierung der *PR1*-Expression durch eine Interaktion von NPR1 mit AtCUL3b. Ohne SA-Stimulus blockiert AtCUL3b die BTB-Domäne von NPR1 und eine Bindung mit TGA2 kann nicht stattfinden. Durch die SA-Induktion wird NPR1 freigesetzt und kann an TGA2 binden. Dies aktiviert die *PR1*-Expression. ANK, Akyrindomäne; TAD, Transaktivierungsdomäne.

Wenn die Expression von AtCUL3b unterbunden ist, läge ein kleiner Teil von NPR1 frei im Kern vor. Das kernlokalisierte NPR1 könnte ungehindert an TGA2 binden und für eine leichte *PR1*-Expression sorgen (vgl. Abb. 3-16 B, Northern-Blot). Folgt man jedoch Rochon *et al.* (2006), die ein zusätzliches DNA-Bindeprotein für die Interaktion mit dem Promotor von *PR1* vermuten, läge zwar die BTB-Domäne frei vor, aber NPR1 wäre an das Bindeprotein gebunden und könnte nicht mit TGA2 interagieren (vgl. Abb. 3-16 A, RT-PCR).

Nach einem Salicylsäuresignal wird NPR1 induziert und löst sich von dem DNA-Bindeprotein. Da die Spaltung einer kovalenten Bindung zwischen AtCUL3b und NPR1 nicht mehr nötig ist, stehen größere Mengen an NPR1 direkt für die Bildung von funktionalen NPR1/TGA2-Aktivierungskomplexen zur Verfügung. In Folge dessen käme es zu

einer verstärkten *PR1*-Expression. Abb. 4-3 zeigt ein Modell für den Fall, dass es zu keiner basalen Expression von *PR1* kommt.

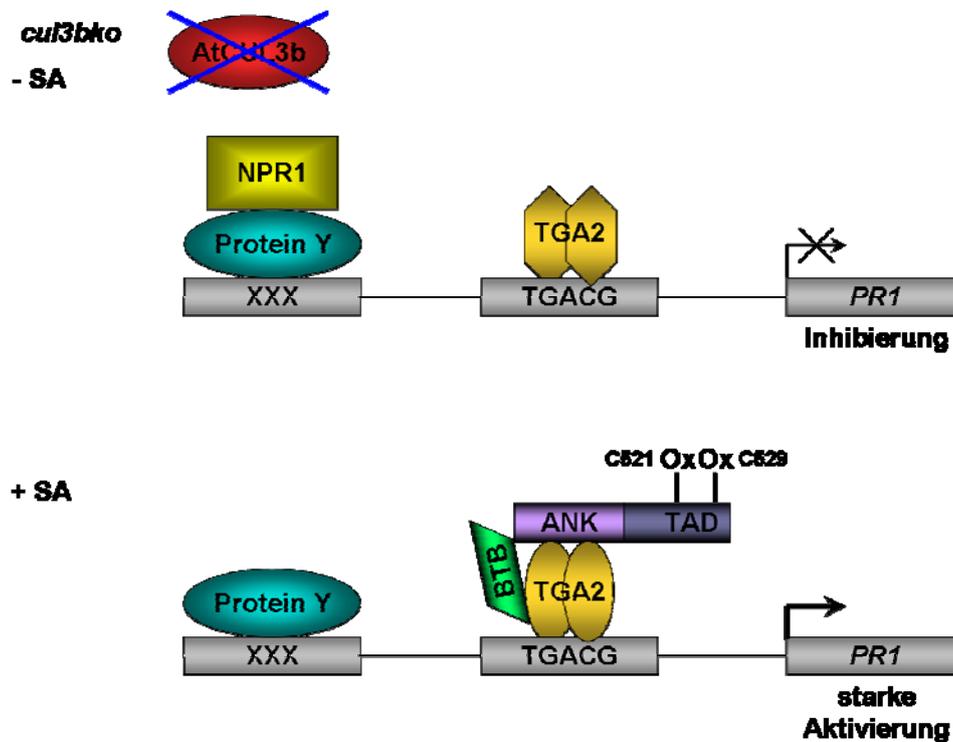


Abb. 4-3: Modell des Salicylsäuresignalwegs im Fall eines Knockouts von *AtCUL3b*. NPR1 liegt ohne *AtCUL3b* gebunden an Protein Y vor. Ohne SA-Stimulus findet eine Expression von *PR1* nicht statt. Nach dem Stimulus interagiert sämtliches NPR1 mit den TGA2-Transkriptionsfaktoren und es kommt zu vermehrter Expression von *PR1*.

Die Beteiligung eines anderen cullinabhängigen Prozesses an diesem Signaltransduktionsweg ist sehr wahrscheinlich. *cul3bko* zeigte zwar eine hypersensitive Reaktion auf Salicylsäure, aber sowohl die Doppelmutante als auch *axr1-12* reagierten vergleichbar zu den Wildtypen auf SA. Es hat den Anschein, dass die RUB-modifizierte Variante eines weiteren Cullins ein zusätzlicher Regulator in diesem Prozess ist und die beschriebene Funktion von *AtCUL3b* erst ermöglicht. Ein möglicher Regulationsort wäre der Kernimport von NPR1. Sollte dieser mit Hilfe eines RUB-modifizierten Cullins stattfinden, ständen für die Aktivierung von TGA2 geringere Mengen an NPR1 zur Verfügung. Es würde sowohl in *axr1-12* als auch in *cul3bko/axr1-12* keine hypersensitive Reaktion geben.