

## 5 Zusammenfassung

Die Cytokininsignaltransduktion konnte bislang aufgrund der Redundanz der beteiligten ZKS-Proteine nur modellhaft aufgeklärt werden. Hinweise zur Regulation dieses Signaltransduktionsweges und zu den Funktionen der ZKS-Proteine sollte die Generierung eines Proteininteraktionsnetzwerkes liefern.

In einem Matrix-Ansatz, bei dem mittels des *Yeast Two-Hybrid* Systems 20 *ZKS-Baits* gegen 25 *ZKS-Preys* im Rastermuster auf Protein-Protein-Interaktionen untersucht wurden, wurden unter den 500 Kombinationen insgesamt 68 Interaktionen, 43 neue und 25 bekannte, identifiziert. 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. Interaktionen zwischen den cytoplasmatischen Domänen der Cytokininrezeptoren (AHK2-AHK2, AHK3-AHK2 und AHK3-AHK4) weisen auf mögliche Homo- und Heterodimerisierungen hin. Weitere ungewöhnliche Interaktionen unter den Typ-B ARR (ARR14-ARR14, ARR14-ARR2) sowie eine direkte Interaktion zwischen einem Rezeptor und einem Responseregulator (AHK2-ARR14) weisen auf mögliche neue Mechanismen der Cytokininsignaltransduktion hin. Die Qualität des verwendeten *Yeast Two-Hybrid* Systems wurde durch einen *in vitro* Interaktionstest belegt, da 38 der insgesamt 42 getesteten neuen Interaktionen verifiziert wurden. Mutations- und Kartierungsanalysen der Interaktionsdomänen ausgewählter ZKS-Proteine lieferten wichtige Hinweise auf die den Interaktionen zugrunde liegenden Mechanismen. AHP5-Mutationsanalysen zeigten stellvertretend für alle AHPs, dass die identifizierten AHP-Interaktionen von ihrem Phosphorylierungszustand unabhängig sind. Mittels einer Domänenkartierung von AHK2 konnte zum einen die komplette *Transmitter*-Domäne als Interaktionsdomäne für die Homodimerisierung von AHK2, sowie die C-terminale *Receiver*-Domäne als Interaktionsdomäne für die Interaktion mit AHP5 und ARR14 identifiziert werden. Die Kartierungsanalyse für AHP5 zeigte, dass ihre HPt-Domäne nicht weiter unterteilt werden kann, da dies zum Interaktionsverlust führte. Entgegen bisherigen Behauptungen, dass für die Interaktion mit AHPs die *Receiver*-Domäne der Typ-B Responseregulatoren benötigt wird, konnte für ARR14 gezeigt werden, dass für die Interaktion mit AHP5 sowie mit AHK2 das komplette ARR14-Protein benötigt wird. Darüber hinaus konnte für die isolierte *Output*-Domäne von ARR14, wie für andere Typ-B Responseregulatoren auch, eine transkriptionsaktivierende Eigenschaft nachgewiesen werden. Diese Domäne wird ausserdem für die Selbstinteraktion und für die Interaktion mit ARR2

benötigt. ARR4, ein Typ-A ARR, benötigt für ihre Interaktionen das komplette Protein und ist somit auch auf die C-terminale Verlängerung angewiesen.

Aufgrund der funktionellen Redundanz innerhalb des ZKS, lag die Vermutung nahe, dass die Signalspezifität möglicherweise hauptsächlich durch Interaktionen der ZKS-Proteine mit anderen Proteinen gesteuert werden könnte. 17 ZKS-Proteine wurden daher mittels der *Library-Screens*, die gleichzeitig durch Koloniehybridisierung, Erhöhung der Transformationsraten und Änderung des *Prey*-Vektors optimiert wurden, auf Interaktionen mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen untersucht. Aus 80 *Screens* wurde ein Interaktionsnetzwerk aus 140 verschiedenen Interaktionen generiert. Alle untersuchten ZKS-Proteine zeigten bekannte und/oder neue Interaktionspartner, die in verschiedenen Prozessen beteiligt sind. Für die Cytokininrezeptoren wurden verhältnismäßig wenige Interaktionen mit AHPs, jedoch zahlreiche mit anderen Proteinen identifiziert. Für die Typ-B sowie Typ-A Responseregulatoren hingegen wurden viele Interaktionen mit AHPs und nur wenige mit anderen Proteinen identifiziert. Aus den *Screens* wurde die Interaktion AHK2-PI4K $\beta$ 1 ausgewählt, da diese auf einen potentiellen *Crosstalk* zwischen der Cytokinin- und Phosphatidylinositol-signaltransduktion hinweist. In einem Spezifitätstest, in dem alle verfügbaren ZKS-Proteine auf Interaktionen mit PI4K $\beta$ 1 untersucht wurden, erwies sich die Interaktion mit AHK2 als spezifisch. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass innerhalb des ZKS cytokininspezifische Antworten durch spezifische Interaktionen der Cytokininrezeptoren mit anderen Proteinen reguliert werden können. Darüber hinaus zeigte die Interaktionskartierung, dass die *Receiver*-Domäne von AHK2 für die Interaktion mit PI4K $\beta$ 1 benötigt wird. Diese Domäne wird gleichzeitig für die Interaktionen mit AHP5 und ARR14 benötigt, so dass verschiedene Proteine entweder um dieselbe Bindestelle in der *Receiver*-Domäne von AHK2 konkurrieren oder einen Multiproteinkomplex bilden.

Für eine weitere Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und als ein Beginn für die Analyse von Multiproteinkomplexen wurde die Kopplung von Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie verwendet. Die cytoplasmatische Domäne von AHK3 wurde modellhaft bearbeitet. Bei diesen Analysen wurden Hinweise auf eine AHK3-Homodimerisierung und die Interaktion von AHK3 mit einem Protein der Dehydrinfamilie erhalten.

Die in dieser Arbeit identifizierten Interaktionen geben neue Einblicke in potentielle Funktionen der ZKS-Proteine und weisen darauf hin, dass Interaktionen mit anderen Proteinen wichtig sind, um die Komplexität der Cytokininsignaltransduktion zu verstehen.