
Die Wahrnehmung von Niedrigst-Fluenzen
durch Phytochrom A in
Arabidopsis thaliana



Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Julia Kneißl
aus Augsburg

München, den 22. September 2008

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

PD Dr. Cordelia Bolle

Prof. Dr. Hugo Scheer

26. November 2008

ABSTRACT	5
1. EINLEITUNG	7
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. Chemikalien	15
2.2. Medien	15
2.3. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.3.1. Anzucht von <i>Arabidopsis</i> in Sterilkultur	17
2.3.2. Verwendete <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp- und Mutantenlinien	17
2.4. Molekularbiologische Arbeiten	19
2.4.1. Extraktion genomischer DNA aus Blattmaterial	19
2.4.2. RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial	19
2.4.3. Reverse Transkription von RNA in cDNA	19
2.4.4. Herstellung gefrierkompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	20
2.4.5. Transformation von gefrierkompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen	21
2.4.6. Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> -Zellen	21
2.4.7. DNA-Behandlung mit Restriktionsendonukleasen	21
2.4.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.4.9. PEG-Fällung von PCR-Produkten	23
2.4.10. Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese	24
2.4.11. Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pENTR™/SD/D-TOPO®	24
2.4.12. Umklonierung von Fragmenten aus pENTR™/SD/D-TOPO® in andere Gatewayvektoren	25
2.4.13. Erzeugung eines Vektors für N-terminale 6xHis-Fusion unter Verwendung von pGEX-4T-1	27
2.4.14. Sequenzierung von DNA-Sequenzen	28
2.4.15. Transiente Transformation von Zwiebelzellen mittels Partikelkanone	29
2.4.16. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.4.17. Hefe-Zwei-Hybrid-Screen	31

2.4.18.	Plasmidpräparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.4.19.	Bestimmung der Stärke der Interaktion	32
2.5.	Proteinbiochemische Arbeiten	33
2.5.1.	Proteinüberexpression in <i>E. coli</i>	33
2.5.2.	Denaturierender Bakterienaufschluss	33
2.5.3.	Dialyse zur Rückfaltung denaturierter Proteine	34
2.5.4.	„Pull-Down-Assay“	34
2.5.5.	Kernisolation aus Pflanzenmaterial	35
2.5.6.	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	36
2.5.7.	Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	37
2.5.8.	Proteinauftrennung über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.5.9.	„Western“-Transfer	38
2.5.10.	Immunologischer Proteinnachweis	38
2.5.11.	Coomassie-Färbung	41
2.6.	Physiologische Untersuchungen	41
2.6.1.	Bestimmung der Keimungsrate nach Bestrahlung verschiedenen Lichtbedingungen	42
2.6.2.	Bestimmung der Hypokotyllänge nach Bestrahlung mit verschiedenen Lichtbedingungen	42
2.6.3.	Bestimmung der negativ-gravitropischen Ausrichtung von Keimlingen unter Dunkelrotlicht	43
2.6.4.	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Keimlingen nach Bestrahlung mit Dunkelrotlichtpulsen	43
2.6.5.	Statistische Untersuchungen	44
2.7.	Computerprogramme	44
3.	ERGEBNISSE	45
3.1.	Der Effekt von Reis phyA in <i>A.thaliana</i> unter besonderer Berücksichtigung der N- terminalen Serinreste	45
3.1.1.	Sequenzvergleich verschiedener phyA	45

3.1.2.	Akkumulation von Reis phyA in <i>A. thaliana</i> Komplementationsmutanten	47
3.1.3.	Bestimmung der Keimungsrate nach Bestrahlung mit R- oder DR-Licht	48
3.1.4.	Bestimmung der Hypokotyllänge unter verschiedenen Lichtbedingungen	49
3.1.5.	Determinierung des agravitropischen Wachstums	51
3.1.6.	Akkumulation von Chlorophyll nach Bestrahlung mit Dunkelrotlicht	54
3.1.7.	Bestimmung des Blühzeitpunktes	55
3.2.	Die Mutante <i>owl1-1</i>	58
3.2.1.	Molekulare Charakterisierung der Mutanten <i>owl1-1</i> und <i>owl1-2</i>	58
3.2.2.	Phänotypische Charakterisierung der Linien <i>owl1-1</i> , <i>owl1-2</i> , <i>OWL1-OE1</i> und <i>OWL1-OE2</i>	62
3.2.2.1.	Inhibierung der Hypokotylelongation	62
3.2.2.2.	Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen.	64
3.2.2.3.	Agravitropisches Wachstum unter Dunkelrotlicht	65
3.2.2.5.	Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte	68
3.2.3.	Proteinbiochemische Charakterisierung von OWL1	69
3.2.3.1.	Akkumulation von OWL1 während unterschiedlicher Entwicklungsstadien	69
3.2.3.2.	Intrazelluläre Lokalisation von OWL1	70
3.2.3.4.	Untersuchung von OWL1 auf Phosphorylierungen	71
3.2.3.6.	Untersuchung des OWL1-Gehaltes in phyA-Signalwegs-Mutanten	74
3.2.3.7.	Identifizierung von OWL1-Interaktionsproteinen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System	75
3.2.3.8.	Die Interaktion zwischen HFR1 und OWL1	78
A.	Bestätigung der Interaktion über das Hefe-Zwei-Hybrid-System	80
B.	Bestätigung der Interaktion mittels "Pull-Down-Assay"	81
C.	Die Akkumulation von OWL1 in <i>hfr1</i> sowie <i>HFR1</i> -Überexpressionslinien	82
D.	Die Doppelmutantenlinien <i>owl1-1/hfr1</i> und <i>OWL1-OE2/hfr1</i>	83
4.	DISKUSSION	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	100

6. LITERATUR	102
7. ABKÜRZUNGEN	110
7.1. Allgemeine Abkürzungen und Chemikalien	110
7.2. Basen und Nukleotide	112
7.3. Maßeinheiten (sofern abweichend von IS-Norm)	114
7.4. Nomenklatur	112
8. EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG	113
9. ERKLÄRUNG ÜBER BISHERIGE PROMOTIONSVERSUCHE	113
10. LEBENSLAUF	114
11. PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSTEILNAHMEN	115
11.1. Publikationen	117
11.2. Tagungsteilnahmen	117
12. DANKSAGUNG	116

ABSTRACT

For phototrophic organisms like plants, sensing of light is crucial to optimize their growth and development. Hence, plants have developed different light receptors to determine light quality, quantity and direction. The phytochromes (phy) represent in plants the red/far-red light photoreceptors. While phyB-E function as red-light-receptors mediating the low-fluence response (LFR), phyA can initiate three different signalling pathways depending on the perceived light conditions: the far-red-light high irradiance response (HIR), the very low fluence response (VLFR) and the recently described red-light high irradiance response (R-HIR). Many experiments have been performed to elucidate the mechanism of the HIR, but hardly anything is known about the VLFR and the R-HIR signal transduction. Additionally, the question how one protein can distinguish between three different pathways remains open. To address this question, the role of the serine-rich N-terminus of phyA in the selective activation of the VLFR and the HIR pathway was examined. A phenotypical characterization of *phyAB*-double mutants overexpressing rice-*phyA* (*phyA*/WT) and rice-*phyA* with serine-to-alanine substitutions in the N-terminus (*phyA*/SA) showed an involvement of these putative phosphorylation sites in the selective initiation of the VLFR and the HIR pathway. Substitutions of the serines by alanines affected all VLFRs but only few HIRs. *phyA*/WT was able to complement the inhibition of hypocotyl elongation and the far-red killing effect in response to very low fluences whereas the loss of agravitropic response and the germination under far-red light were rescued more efficiently by the overexpression of *phyA*/SA. Under HIR conditions, *phyA*/SA was able to complement the inhibition of hypocotyl elongation in continuous far-red light but the far-red killing effect was rescued by both *phyA*/WT and *phyA*/SA. The results indicate that a sensitive balance of the phosphorylation state of the serine residues in the N-terminus of *phyA* influences the activity of the protein in the dark as well as under VLFR and the HIR conditions.

In the second part of this work a VLFR-specific mutant, *owl1*, was phenotypically and biochemically characterized. This is the first molecular characterized mutant that displays only defects in its VLFR without involvement of other signalling pathways, even the HIR. *owl1* failed to germinate after exposition to far-red light and showed a diminished far-red killing effect, loss of agravitropic response and inhibition of hypocotyl elongation under pulses of far-red light. *owl1* carries a T-DNA- insertion in a gene encoding for a J domain protein. J proteins, named

after the amino acid motif J domain as described for Hsp40, are well known as interacting partners of Hsp70. OWL1 is a constitutively expressed protein that localizes in the cytoplasm and the nucleus. To characterize the function of OWL1 in the signal transduction pathway, a yeast-two-hybrid screen was performed. In the yeast system as well as by using *in vitro* pull-down assays the interaction of OWL1 with the bHLH protein HFR1 was confirmed. HFR1, a putative transcription factor, has been previously identified as an HIR-dependent phyA signalling intermediate. The interaction between HFR1 and OWL1 was genetically elucidated with the help of *owl1/hfr1* double mutants. Their phenotypical characterization suggests that both proteins act in the same pathway with OWL1 functioning upstream of HFR1. Overexpression of OWL1 in *hfr1* led to a partial complementation of the *hfr1*-phenotype under VLFR-conditions. The physiological and biochemical characterization of OWL1 and the identification of the interacting factor HFR1 are important for a better understanding of the VLFR and its importance for plant development.

1. EINLEITUNG

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um sich an ihre sessile Lebensweise anzupassen. Speziell die Lichtverhältnisse sind dabei für diese photoautotrophen Organismen von besonderer Bedeutung, was zur Entwicklung einer Reihe von hochsensiblen Photorezeptoren führte. Über diese Photorezeptoren ist es ihnen möglich, Lichtqualität und -quantität, sowie die Lichtrichtung zu bestimmen. Diese Kenntnisse der Lichtbedingungen sind für Pflanzen sowohl zur Optimierung der überlebenswichtigen Photosynthese essentiell, als auch zum Schutz vor den schädlichen Einflüssen einer zu starken Bestrahlung. Darüber hinaus geben Lichtverhältnisse Auskunft über die Tageslänge und damit über die Jahreszeit, ein wichtiger Indikator für den Eintritt in die reproduktive Phase.

Bisher wurden in *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) drei Proteine aus der Gruppe der Cryptochrome charakterisiert, die in die Wahrnehmung von Blaulicht und UV-A-Licht involviert sind. Diese auch aus dem Tierreich bekannten Proteine sind an Deetiolierungsprozessen, dem Eintritt in die Blühphase, sowie an der zirkadianen Rhythmik beteiligt (Lin & Shalitin, 2003; Li & Yang 2007).

Durch Blaulicht ausgelöste Phototropismusreaktionen wie Stomataöffnung, Chloroplastenbewegung und lichtgerichtetes Wachstum werden nicht über Cryptochrome, sondern über Phototropine vermittelt. Diese Proteingruppe wird in *A.thaliana* durch zwei Vertreter, PHOT1 und PHOT2, repräsentiert (Christie 2007).

Immer noch unbekannt ist dagegen der postulierte pflanzliche UV-B-Rezeptor, obwohl eine Vielzahl von Proteinen über UV-B-Licht in ihrer Expressionsrate und Enzymaktivität moduliert werden. Als Beispiel sind einige Mitglieder des Phenylpropanoid Metabolismus zu nennen, so die Chalconsynthase und die Chalconisomerase, die essentielle Enzyme für die Anthocyan synthese darstellen (Li *et al.*, 1993; Landry *et al.*, 1995). Um der DNA-schädigenden Wirkung der UV-B-Strahlung entgegen zu wirken werden zudem Polymerasen, Photolyasen und Helikasen über UV-B-Licht beeinflusst (Ahmad *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003).

Die am besten analysierte Gruppe der Photorezeptoren stellen die Phytochrome (phy) dar, die hauptsächlich für Rot- und Dunkelrotlichtperzeption verantwortlich sind (Quail 1997; Smith, 1999). Hierbei handelt es sich um dimerische Chromoproteine: An jedes Polypeptidmonomer ist im N-terminalen Bereich ein Phytochromobilin-Chromophor kovalent gebunden. Über dieses Chromophor erfolgt die Lichtperzeption. Bestrahlung mit Rot- oder Dunkelrotlicht führt

dabei zu einer Konformationsänderung des Chromophors (Abb. 1). Diese Konformationsänderung zieht strukturelle Veränderungen des gesamten phy-Proteins nach sich und wirkt sich so auf seine biochemische Aktivität aus. Dabei resultiert Rotlichtbestrahlung in einer *trans*-Konfiguration des Chromophors und damit in der Bildung der physiologisch aktiven P_{FR} -Form des Phytochrommoleküls. Die P_{FR} -Form des Phytochroms zeigt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 730 nm, also im dunkelroten Bereich. Durch Bestrahlung mit Licht dieser Wellenlänge wird die Strukturänderung wieder rückgängig gemacht, die *cis*-Konfiguration der Chromophors gebildet und das Phytochrom-Molekül in seine inaktive P_R -Form zurückversetzt. Die P_R -Form wiederum zeigt ein Absorptionsmaximum von 666 nm und kann somit wieder Rotlicht detektieren. Dieser Prozess des Lichtwellenlängen-abhängigen Wechsels zwischen P_R - und P_{FR} -Form wird als Photoreversibilität bezeichnet (Rockwell *et al.* 2006; 1,2).

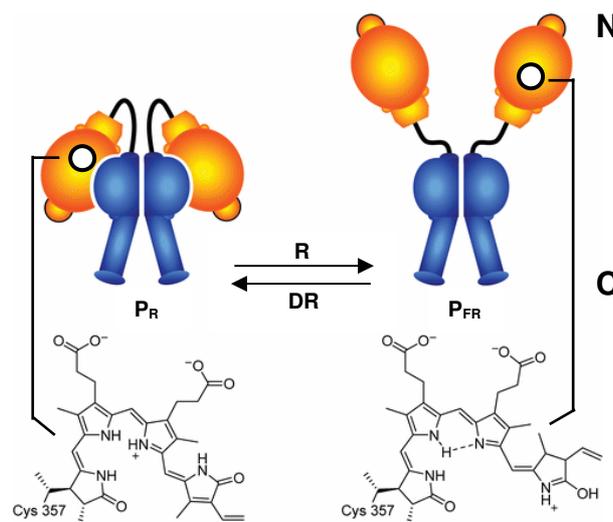


Abbildung 1: Die lichtabhängige Konformationsänderung des Phytochromobilinchromophors und die daraus resultierende Strukturänderung des Phytochrommoleküls. P_R =*trans*-Konfiguration des Phytochrommoleküls. Weißer Kreis=Chromophorbindungsstandort. N=N-Terminus. C=C-Terminus. P_{FR} =*cis*-Konfiguration des Phytochrommoleküls. R=Rotlicht. DR= Dunkelrotlicht. Nach: Bae & Choi 2008

Die Aktivität des Phytochrom-Moleküls wird über die intrazelluläre Lokalisation der P_R und der P_{FR} -Form gesteuert. Es konnte anhand von Experimenten mit phy-GFP-Fusionsproteinen gezeigt werden, dass alle Phytochrome lichtabhängig in ihrer P_{FR} -Form in den Kern transportiert werden. Dort schließen sie sich anschließend zu lokalen Proteinanhäufungen („Speckles“)

zusammen. Diese Aggregatsbildung ist essentiell für die Funktion der Phytochrome, da physiologisch nicht funktionale phy-GFP-Konstrukte zwar weiterhin in den Kern transportiert werden, eine Aggregatsbildung aber unterbleibt (Nagy *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002).

In allen bisher beschriebenen Pflanzenarten kommen Phytochrome als Genfamilien vor. So verfügen Reis und Weizen über drei unterscheidliche Phytochrome, in *A. thaliana* finden sich fünf unterschiedliche Phytochrome, die als Phytochrom A-E (phyA-E) bezeichnet werden (Clack *et al.*, 1994; Briggs & Olney, 2001; Fankhauser, 2001). Anhand ihrer Lichtstabilität lassen sie sich in zwei Gruppen unterteilen: Bei phyB-E sind die P_{FR}-Formen lichtstabil und werden nicht abgebaut. Sie sind bereits in trockenen Samen zu detektieren und während der gesamten Entwicklungsphase der Pflanze in vorhanden.

Die Gruppe der lichtinstabilen Phytochrome beinhaltet in *A. thaliana* mit phyA nur einen einzigen Vertreter. PhyA wird in völliger Dunkelheit sowohl in adulten Pflanzen als auch in Keimlingen gebildet und akkumuliert in seiner P_R-Form in großen Mengen. Wird bei Belichtung die P_{FR}-Form gebildet, so erweist sich diese als äußerst instabil und wird in kürzester Zeit abgebaut. Nach gängiger Auffassung unterbleibt damit für phyA die Photoreversibilitätsreaktion (Fankhauser, 2000; Kevei & Nagy, 2003; Wang & Deng, 2004)

Nicht nur im Bezug auf die Photoreversibilität und die Lichtstabilität nimmt phyA eine Sonderstellung ein. Während phyB-E nur durch Bestrahlung mit Rotlicht effektiv die physiologisch aktive P_{FR}-Form bilden können, kann die P_{FR}-Form von phyA durch Belichtung mit jeder Wellenlänge gebildet werden und damit auch unter Dunkelrotlicht. Folglich repräsentiert phyA den einzigen Dunkelrotlichtrezeptor in *Arabidopsis*. Nur für phyC wurden nach langfristiger Bestrahlung mit hohen Dosen an Dunkelrotlicht eine physiologische Aktivität verzeichnet, die aber unter natürlichen Bedingungen irrelevant sein dürfte (Wang & Deng, 2004).

In der Gruppe der lichtstabilen Phytochrome fällt phyB die Rolle des Hauptrotlichtrezeptors zu. Der durch Rotlicht ausgelöste Signalweg mit den daraus resultierenden genetischen, biochemischen und physiologischen Veränderungen wird als Niedrig-Fluenz-Antwort („low-fluence-response; LFR) bezeichnet und durch Rotlicht ab einer Lichtquantität von 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ausgelöst (Casal *et al.*, 1998). Über diesen Signalweg werden unter anderem Keimung, Deetiolerungsprozesse und die Induktion der Blütenbildung gesteuert (vgl. Tab.1). Darüber hinaus wird über das Verhältnis von P_R zu P_{FR} ständig der Anteil an rotem zu dunkelrotem Licht ermittelt. Da Beschattung durch andere Pflanzen zu einer Anreicherung von Dunkelrotlicht führt, kann so die Nähe zu um Licht konkurrierenden Pflanzen bestimmt

werden. Bei einer zu starken Beschattung wird eine Deetiolerungsreaktion, die sog. „Schattenvermeidungsreaktion“ ausgelöst. Diese Reaktion wird über phyB, D und E gesteuert (Wang & Deng, 2004).

phyA dagegen vermittelt drei unterschiedliche Antworten, deren Signalwege zumindest zum Teil voneinander getrennt zu sein scheinen: Durch Dunkelrotlicht hoher Quantitäten wird die sog. Hochintensitätsreaktion („High-Irradiance Response“; HIR) ausgelöst, die eine starke Deetiolerungsreaktion zu Folge hat. Licht jeglicher Qualität unterhalb eines Schwellenwertes von $0,01 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ führt zur Initiierung der Niedrigst-Fluenz-Antwort („Very-low-fluence-response; VLFR). Über sie werden der Keimungsvorgang sowie die Deetiolerung gesteuert (Bae & Choi, 2008).

Tabelle 1: Überblick über verschiedene phyA- und phyB-vermittelte Prozesse unter Berücksichtigung des induzierenden Signalweges sowie der Lichtbedingungen zur Simulation im Labor: DR_K=kontinuierliches Dunkelrotlicht, DR_P= Dunkelrotlichtpulse, R = Rotlicht, WL = Weißlicht

Phytochrom	Signalweg	Reaktion	Simulation im Labor
phyA	VLFR	Keimung	DR _P nach 48 h
		Verlust des agravitropischen Wachstums	DR _K
		Inhibierung der Hypokotylelongation	DR _P
		Kotyledonenöffnung	DR _P
		Herabregulierung der PORA-Expression	DR _P
	HIR	Inhibierung der Hypokotylelongation	DR _K
		Kotyledonenöffnung	DR _K
		Herabregulierung der PORA-Expression	DR _K
		Anthocyan synthese	DR _K
	Nicht zugeordnet	Induktion der Blüte	WL
phyB	LFR	Keimung	R-Puls nach 3 h
		Verlust des agravitropischen Wachstums	R
		Inhibierung der Hypokotylelongation	R
		Kotyledonenöffnung	R
	P _R /P _{FR}	Schattenvermeidungsreaktion	R/DR
		„End-of-day far-red light“	R/DR
	Nicht zugeordnet	Induktion der Blüte	WL

Erst kürzlich wurde mit der Rotlicht-vermittelten HIR (R-HIR) ein dritter *phyA*-gesteuerter Signalweg beschrieben. Dabei wurde beobachtet, dass Bestrahlung von Keimlingen mit sehr hohen Dosen von Rotlicht zu einem verkürztem Hypokotyl und einer Ergrünungsblockade führte. Diese Effekte konnten bei *phyA*-Mutanten nicht beobachtet werden (Franklin *et al.*, 2007).

Über die Phytochrome werden lichtabhängig Signalketten mit zahlreichen Intermediaten initiiert, die zu verschiedenen physiologischen Reaktionen führen. Diese Signalwege sind verzweigt und beeinflussen sich gegenseitig. Zudem wurden Interaktionen mit unterschiedlichen Hormonen beschrieben, wobei besonders Auxin und Gibberellin zu nennen sind (Bae & Choi, 2008). Viele unmittelbaren Interaktoren von *phyA*- und *phyB*-Molekülen wurden über Hefe-Zwei-Hybrid-Screens unter Verwendung von *phyA*- und *phyB*-Domänen identifiziert. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, die Domänenstruktur des *phy*-Moleküls zu beschreiben (Abb. 2):

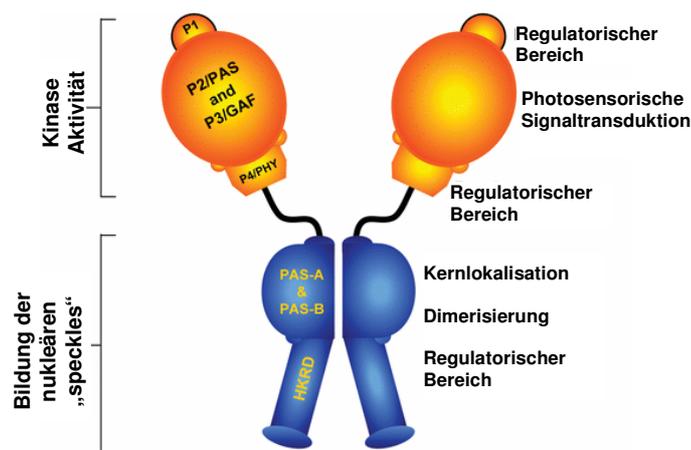


Abbildung 2.: Die Domänen des Phytochroms mit zugehörigen Funktionen. Nach: Bae & Choi 2008

Der N-terminale Bereich aller pflanzlichen Phytochrome fungiert als photosensorischer Bereich, während der C-terminale Bereich in der Dimerisierung und Regulation funktional ist.

Als feinere Abstufung kann der photosensorische Bereich in vier weitere Domänen unterteilt werden: P1, P2/PAS, P3/GAF und P4/PHY. P1 ist nicht essentiell für die Funktion von *phyB*, spielt aber eine wichtige Rolle in *phyA*, wie verschiedene Deletionsversuche gezeigt haben

(Cherry *et al.*, 1992). P2/PAS und P3/GAF verfügen über eine Bilin-Lyase-Aktivität und vermitteln die Bindung des Chromophors an einen Cystein-Rest. P4/PHY fungiert als Feinregulator der phy-Aktivität. Der C-terminale Bereich wird in zwei Subdomänen unterteilt: die PAS-A und PAS-B, sowie eine Histidin-Kinase-verwandte Domäne (HKRD). PAS-A/B sind essentiell für die Dimerisierungsreaktion. Darüber hinaus ist in diesem Bereich in phyB ein Kernlokalisierungssignal zu finden. In phyA fehlt diese Lokalisierungssequenz und wird für den Kernimport ersetzt durch Bindung an die Proteine FHY1 und FHL1 (Hiltbrunner *et al.*, 2005, 2006). Für die Bildung der nukleären „speckles“ ist auch die HKRD von Nöten. Dagegen konnte bis heute nicht gezeigt werden, dass die HKRD als Kinase aktiv ist, was im Gegensatz zu prokaryotischen Phytochromen steht. Dies ist möglicherweise auf den Verlust eines wichtigen Histidin-Restes zurückzuführen. Nichtsdestotrotz wurde für Hafer phyA (phyA/A.s.) sowohl eine Autophosphorylierung, als auch eine allgemeine Kinaseaktivität *in vitro* festgestellt. Diese scheint allerdings im N-terminale Bereich lokalisiert zu sein (Rockwell *et al.*, 2006, 1,2; Bae & Choi, 2008).

Ein solches *in vitro* Substrat ist PKS1, für das eine Bindung sowohl an phyA als auch an phyB gezeigt werden konnte (Fankhauser *et al.*, 1999). Auch die Cryptochrome cry1 und cry2 konnten in *in vitro* Assays durch phyA/A.s. phosphoryliert werden (Yeh & Lagarias, 1998; Fankhauser, 2000). Möglicherweise wird auch ein weiterer phyA-Interaktor, NDPK2, durch phyA phosphoryliert, auf alle Fälle konnte eine enzymatische Aktivitätssteigerung in Anwesenheit von phyA_{FR} gezeigt werden (Choi *et al.*, 1999). Der Transkriptionsfaktor PIF3, ein Basic-Helix-Loop-Helix-Protein (bHLH), ist in der Lage, direkt mit dem C-Terminus sowohl von phyA als auch von phyB zu interagieren. Es fungiert als Suppressor der Photomorphogenese und wird unter Licht schnell abgebaut. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das ungebundene PIF3 an die Promotoren verschiedener lichtgesteuerter Gene binden kann. Somit wird postuliert, dass über eine Bindung an phyA/B die Aktivität des Transkriptionsfaktors PIF3 unterbunden wird (Monte *et al.*, 2007). PIF3 ist nur ein Beispiel für einen Transkriptionsfaktor mit einer Involvierung in der phy-Signalkette. Viele weitere Faktoren wurden isoliert, bei denen zumindest der Verdacht besteht, dass sie in der Transkriptionskontrolle involviert sind. Dabei sind im phyA-Signalweg besonders mit PIF4, PIL1 und HFR1 weitere Mitglieder der bHLH-Proteinfamilie zu nennen, außerdem der MYB-Faktor LAF1 und das bZIP-Protein HY5. Für eine Reihe von Proteinen, darunter die Transkriptionsfaktoren LAF1, HFR1 und HY5 konnte im Dunkeln ein proteolytischer Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System gezeigt werden (vgl. Abb 3). Dadurch wird im Dunkeln die über diese Transkriptionsfaktoren im

Dunkelrotlicht induzierte Photomorphogenese unterdrückt. Eine Schlüsselrolle kommt in diesem Abbauprozess dem Protein COP1 zu, das über eine E3 Ubiquitin Ligase-Aktivität verfügt. Bis jetzt konnte eine *in vitro* Ubiquitinierung mit anschließendem proteolytischem Abbau für HY5, LAF1 und HFR1 und phyA gezeigt werden. COP1 ist nur im Dunkeln im Kern lokalisiert und kann so mit den Transkriptionsfaktoren interagieren. Unter Lichteinfluß wird COP1 aus dem Kern transportiert und ein weiterer Abbau der Transkriptionsfaktoren unterbleibt. Dieser lichtinduzierte, extranukleäre Transport ist aber zeitlich verzögert, so dass es COP1 noch möglich ist, die Degradation von phyA_{FR} zu vermitteln, das lichtabhängig in den Kern transportiert und abgebaut wird.

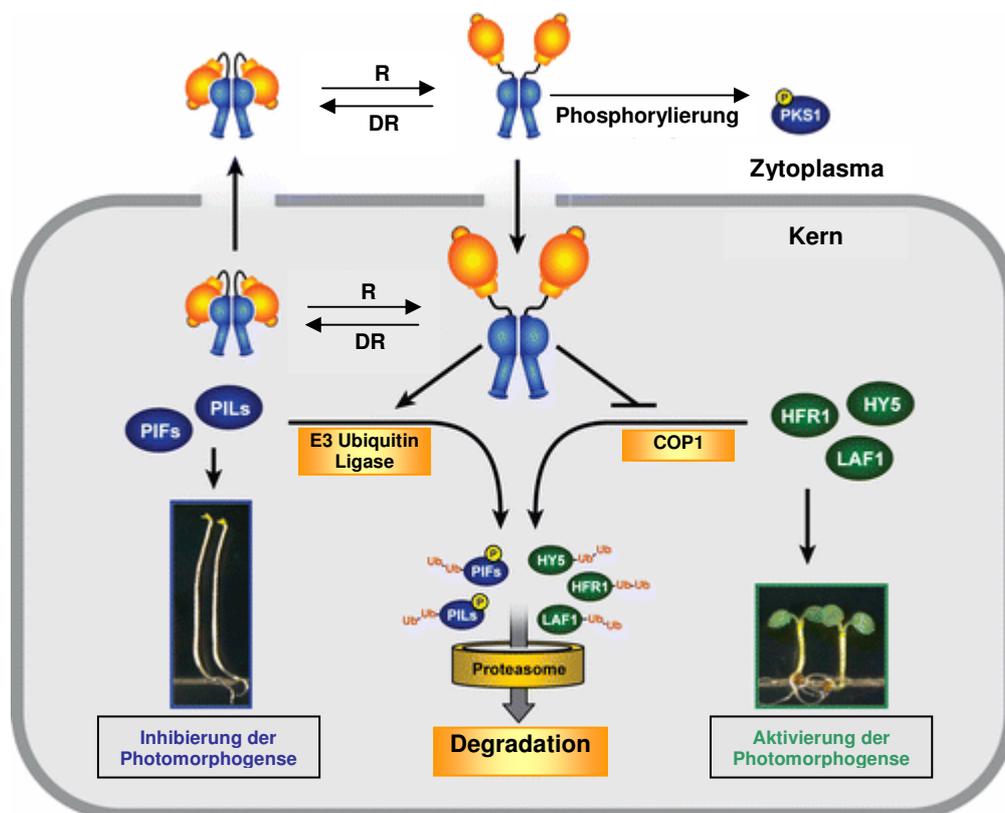


Abbildung 3: Aktivierung und Inhibition der Photomorphogenese ausgehend von Phytochromen und ihren Interaktionspartnern. In Anwesenheit der P_R -Form inhibieren PIF und PIL-Proteine die Photomorphogenese, positive Regulatoren (HFR1, HY5, LAF1) werden über das COP1-System degradiert. P_{FR} initiiert den Abbau von PIF/PIL und die Hemmung von COP1, so dass u.a. über HFR1, LAF1, HY5 die Photomorphogenese induziert werden kann. R=Rotlicht. DR=Dunkelrotlicht. Nach Bae & Choi, 2008.

Dabei bestehen Hinweise, dass der lichtabhängige Kernimport von phyA_{FR} und der Kernexport von COP1 miteinander in Verbindung stehen (Bae & Choi, 2008). Die Aktivität von COP1 wird über weitere Proteine gesteuert, wobei besonders SPA1 zu nennen ist. SPA1 ist ein weiterer Suppressor der phyA-vermittelten Deetiologie und beeinflusst die Ubiquitinierungseffizienz von COP1 (Hoecker *et al.*, 1998; Hoecker & Quail, 2001). FIN 219 scheint in den phyA-abhängigen Kernexport von COP1 involviert zu sein (Hsieh *et al.*, 2000).

Die Mehrzahl der beschriebenen Enzyme ist an der phyA-vermittelten HIR beteiligt und wurde in der Regel über Mutanten „Screens“ unter stärkerem Dunkelrotlicht isoliert. Nur wenige Mutanten mit Defekten in der VLFR konnten dagegen bisher beschrieben werden, wie z.B. PKS1, PKS2, SPA1 und FHY1, die aber auch in der HIR involviert sind (Hoecker *et al.*, 1998; Cerdán *et al.*, 1999; Baumgardt *et al.*, 2002; Lariguet *et al.*, 2003). 2001 isolierten J. Casal und Coautoren über einen Screen auf hyposensitive VLFR-Mutanten mit *eve1/dwarf1/dim1* eine Mutante, die aus dem Brassinosteroidsignalweg bekannt war (Luccioni *et al.*, 2002). Auch für die zwergwüchsige Mutante *cp3* konnte eine Involvierung in die VLFR nachgewiesen werden (Quinn *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden sieben Loci identifiziert (VLFR1-7), die in die VLFR involviert sind. Diese wurden allerdings molekular nicht näher charakterisiert (Yanovsky *et al.*, 1997; Botto *et al.*, 2003).

Bisher ist nur wenig über den phyA-abhängigen VLFR-Signalweg bekannt und bis heute wurde keine einzige spezifische VLFR-Mutante molekular charakterisiert. Darüber hinaus ist der molekulare Mechanismus hinter der Unterscheidung zwischen VLFR und HIR weiterhin unbekannt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei Fragenstellungen: Zum einen wie phyA die unterschiedlichen Signalwege HIR und VLFR initiieren kann. Zum anderen wie der Signalweg VLFR molekular von der HIR unterscheidbar ist. Dazu wurde mit *owl1* die erste spezifische VLFR-Mutante physiologisch, zellbiologisch und biochemisch charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass OWL1 und HFR1 Interaktionspartner sind.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Verbrauchskemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Merck und Roth bezogen.

2.2. Medien

LB

1% Pepton (w/v)
 1% NaCl (w/v)
 0,5% Hefeextrakt (w/v)
 (0,8% Agar)

in H₂O

Autoklavieren 20 min bei 120°C; danach fakultative Zugabe von Antibiotika (Tab. 2)

Tabelle 2: Übersicht über die zu LB-Medium zugegeben Mengen verschiedener Antibiotika

Antibiotika/ Abkürzung	Stammlösung	Menge Stammlösung /1 ml LB-Medium
Ampicillin/Amp	100 mg/ml in 50% Ethanol	1,5 µl
Kanamycin/Kana	50 mg/ml in H ₂ O	1 µl
Gentamycin/Genta	10 mg/ml in H ₂ O	1 µl
Streptomycin/Strep	50 mg/ml in H ₂ O	1 µl
Spectinomycin/Spec	50 mg/ml in H ₂ O	1 µl

LB/MgSO₄

Nach Sterilisation Zugabe von

10 mM MgSO₄ (Sterilfiltration)

SOC

2% Pepton (w/v)

0,5% Hefeextrakt (w/v)

0,05% NaCl (w/v)

in H₂O

Autoklavieren 20 min bei 120°C

10 mM MgCl₂

20 mM Glukose

sterilfiltriert hinzugeben

SC

1 x SD-Minimalmedium (Sigma, Menge gemäß Protokoll des Herstellers)

1 x Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement without histidine, leucine, tryptophan and uracil (Sigma, Menge gemäß Protokoll des Herstellers)

20% Agar

in H₂O

pH 5,6 (NaOH)

Autoklavieren 15 min bei 120°C

Nach dem Autoklavieren Zugabe nach Bedarf von

0,16 mM Uracil

0,16 mM Histidine

10/15/20 mM 3AT

YPAD

2% Pepton

2% Glukose

1% Hefeextrakt

0,01% Adenin-Hemisulfat

(0,8% Agar)

in H₂O

Autoklavieren 20 min bei 120°C

1 x MS-Medium

1 x MS-Salze der Firma Duchefa, Menge gemäß Protokoll des Herstellers

0,8% Agar (w/v)

pH 5,8 (KOH)

Sterilisation des Mediums bei 120°C für 15 min.

2.3. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

2.3.1. Anzucht von *Arabidopsis* in Sterilkultur

Sterilisationslösung

50% ddH₂O (v/v)

50% DanKlorix[®]-Hygienereiniger (Colgate-Palmolive GmbH) (v/v)

1‰ TritonX-100 (v/v)

Agaroselösung (0,1%)

0,1% Agarose (w/v) in ddH₂O

Sterilisation bei 120°C für 20 min.

Die benötigte Menge an *Arabidopsis*-Samen wurde für 5 min in Sterilisationslösung geschüttelt, wobei für ca. 100 Samen 300 µl Lösung verwendet wurden. Anschließend wurden die Samen bei 4000 UpM für eine Minute abzentrifugiert, die Sterilisationslösung abgegossen, die Samen unter Schütteln mit sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Für das Ausbringen auf Festmedium wurden die Samen mit 0,1%iger Agaroselösung versetzt und auf Petrischalen mit 1 x MS-Medium geträufelt.

2.3.2. Verwendete *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- und Mutantenlinien

Wildtyp-Referenzen

Ökotyp Columbia: Col-0

Ökotyp Landsberg erecta: Ler

 Mutantenlinien des Ökotyps Landsberg erecta und ihre Bezugsquelle

<i>phyA-211</i>	NASC
<i>phyAB</i> (<i>phyA-201</i> x <i>phyB-1</i>)	Nam-Hai Chua
<i>phyAB/SA</i>	Wei-Ming Leu/Cordelia Bolle
<i>phyAB/WT</i>	Wei-Ming Leu/Cordelia Bolle
<i>phyB/SA</i>	Wei-Ming Leu/Cordelia Bolle
<i>phyB/WT</i>	Wei-Ming Leu/Cordelia Bolle
<i>phyB-1</i>	NASC

Mutantenlinien des Ökotyps Columbia und ihre Bezugsquelle

<i>fhy1-2</i>	Mathias Zeidler
<i>hfr1-201</i>	Nam-Hai Chua
<i>HFR1-OE1</i>	Nam-Hai Chua
<i>HFR1-OE2</i>	Nam-Hai Chua
<i>owl1-1</i>	Mutantenkollektion von Dr. Csaba Koncz (MPI Köln)
<i>owl1-1/hfr1</i>	Julia Kneißl; diese Arbeit
<i>owl1-2</i>	GABI_091G03
<i>OWL1-OE1</i>	Volker Wachtler
<i>OWL1-OE2</i>	Volker Wachtler
<i>OWL1-OE2/hfr1</i>	Julia Kneißl; diese Arbeit
<i>phyB-9</i>	NASC
<i>pie1</i>	GABI_205F02.01
<i>pks1-1</i>	NASC
<i>rd19</i>	SALK_031088
<i>wav2</i>	SALK_087022

Mutantenlinien anderer Ökotypen und ihre Bezugsquelle

<i>spa1-3</i> (Ökotyp RLD)	Ute Hoecker
----------------------------	-------------

2.4. Molekularbiologische Arbeiten

2.4.1. Extraktion genomischer DNA aus Blattmaterial

Extraktionspuffer

200 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA
0,5%	SDS (v/v)

50 mg Blattmaterial wurden mittels Retsch-Schüttlers und Stahlkugel in 400 µl Homogenisationspuffer zerkleinert (2 min, 30 UpM). Anschließend wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 14.000 g gröbere Pflanzenpartikel sedimentiert und 300 µl Überstand abgenommen. Dieser wurde mit 300 µl Isopropanol versetzt, kräftig durchmischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 15.000 g). Der Überstand wurde entfernt und das Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Ethanol abgenommen, das DNA-Sediment für 20 min getrocknet und anschließend in 100 µl H₂O resuspendiert. Die auf diese Weise extrahierte DNA wurde für die PCR verwendet, wobei 1 µl in einen 50 µl Ansatz eingesetzt wurde.

2.4.2. RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

RNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des RNAeasy-Kits von Qiagen gemäß Protokoll des Herstellers aus Pflanzenmaterial von drei Wochen alten, im Weißlicht gezogenen Pflanzen.

2.4.3. Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des Omniscript RT-Kit von Qiagen vorgenommen, dabei wurden die Herstellerangaben befolgt.

Tabelle 3: Überblick über die Bedingungen zur Bestimmung der Genexpressionsrate anhand von RT-PCR

Mutante	Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2	Anlagerungs- temperatur	Verlängerungs- dauer
Fragment A	5'CACCATGTGGAAGG ATTGAATTCAGGATTAG3'	5'TCACTGGCCTTCT TGTGGTATACT3'	55°C	90 s
Fragment B	5'CACCATGATGGGCCA AGAAGCAGC3'	5'AGTGGGTTGAAAA TGAGCCATCTTC3'	55°C	90 s
Aktin	5'GCAACTGGGATGAT ATGGAAAAGA3'	5'CAAACGAGGGCTG GAACAAGACT3'	55°C	90 s

2.4.4. Herstellung gefrierkompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Tfb1-Puffer:

100 mM KCl
 50 mM MnCl₂
 30 mM KAc
 10 mM CaCl₂
 15% Glycerin (v/v)
 in H₂O
 steril filtriert

Tfb2-Puffer:

75mM CaCl₂
 10mM Na-MOPS
 10mM KCl
 15% Glycerin (v/v)
 in H₂O
 pH 7,0
 20 min bei 120°C autoklaviert

Bakterien wurden auf einer LB/MgSO₄-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie in 200 ml LB/MgSO-Medium überimpft und bis zu

einer $OD_{546nm} = 0,5$ bei $37^{\circ}C$ unter konstantem Schütteln (120 UpM) angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 6000 UpM, $4^{\circ}C$) sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Bakterien in 160 ml eisgekühltem Tfb1-Puffer resuspendiert. Nach fünf minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Sediment wurde in 16 ml Tfb2-Puffer aufgenommen und zu 200 μ l Aliquots in flüssigem N_2 schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei $-80^{\circ}C$.

2.4.5. Transformation von gefrierkompetenten *Escherichia coli*-Zellen

200 μ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der jeweiligen Menge an Plasmid-DNA versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 20 s im Wasserbad auf $42^{\circ}C$ erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 200 μ l SOC-Medium zugegeben und für 1 h bei $37^{\circ}C$ unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf LB-Platten mit dem erforderlichen Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei $37^{\circ}C$ inkubiert.

2.4.6. Plasmidpräparation aus *E.coli*-Zellen

Die Plasmidpräparation erfolgte unter Verwendung des „Miniprep-Kits“ von Qiagen gemäß dem Herstellerprotokoll.

2.4.7. DNA-Behandlung mit Restriktionsendonukleasen

10 x Superdo-Puffer

625 mM KAc
330 mM Tris/HCl (pH 7,8)
100 mM $MgCl_2$
40 mM Spermidin
5 mM DTT

steril filtriert

Restriktionsansatz:

4 µl Plasmidpräparation
1 µl 10 x Superdo-Puffer
0,1 µl Restriktionsendonuklease
ad 10 µl H₂O

Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37°C. Anschließend wurde durch 10 minütige Inkubation bei 65°C die Restriktionsendonuklease inaktiviert.

2.4.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Polymerasekettenreaktion wurden die Reagenziensets der Firmen Takara („Ex Taq“; für Klonierungsfragmente) und Genaxxon verwendet. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. Für die Oligonukleotidsequenzen, Anlagerungstemperaturen und die Verlängerungszeiten siehe Tab. 3, 4, 5,7.

Reaktionsansatz:

5 µl 10 x PCR-Puffer
4 µl dNTP-Mix (2 mM jedes Nukleotids)
2 µl MgCl₂
1 µl Oligonukleotid 1 (10 pM)
1 µl Oligonukleotid 2 (10 pM)
ad 50 µl ddH₂O

Programm:

1x 3 min 95°C
33x 20 s 95°C
20 s jeweilige Anlagerungstemperatur
72°C für die jeweilige Verlängerungsdauer
1x 5 min 72°C

Tabelle 4: Überblick über die PCR-Bedingungen zur Überprüfung von Mutantenlinien auf Homozygotie

Mutante	Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2	Anlagerungs- temperatur	Verlängerungszeit
<i>owl1-1</i>	5'GCGTCAACAAG CGAGCTAAAGCC3'	5'GTTGTCTGCACTCC AATAAGCG3'	52°C	90 s
<i>owl1-1</i> Insertion	5'GCGTCAACAAG CGAGCTAAAGCC3'	5'GATTTGGGTGATGG TTCACGTAGTGGGCC3'	52°C	90 s
<i>owl1-2</i>	5'GTAGAGCTACA CCGTGGTAG3'	5'CTGGCCTTCTTGT GGTATACTC3'	52°C	90 s
<i>owl1-2</i> Insertion	5'GTAGAGCTACA CCGTGGTAG3'	5'ATATTGACCATCAT ACTCATTGC3'	52°C	90 s
<i>OWL1- OE2</i>	5'CGTAAGGGATG ACGCACAATCC3'	5'CTGGCCTTCTTGT GGTATACTC3'	55°C	60 s
<i>hfr1</i>	5'GCTCGGTGTA TGGTTGATGATGAC3'	5' TCACATCATCTGA AGTTGAAGTTG3'	51°C	60 s
<i>wav2</i>	5'GCCGTTCTTG AAGTGGTTTATTGGAGG3'	5'CCACCAGACAGCC ATGTATCCATATGC3'	60°C	120 s
<i>rd19</i>	5'CACCATGGA TCGTCTTAAGCTTTATTC3'	5'CTTCCCTAGGCA CTGACGAGAAAC3'	55°C	120 s
<i>pie1</i>	5'CAGTTGGTAC GCAATGAGAAGAAG3'	5'CAATAGTGTCTG CCATCTCTGAG3'	55°C	120 s

2.4.9. PEG-Fällung von PCR-Produkten

PEG-Lösung

- 30% PEG 8000 (v/v)
- 30 mM MgCl₂

TE-Puffer

- 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
- 1 mM EDTA

1 Volumen PCR-Produkt wurde mit 3 Volumina TE-Puffer versetzt. Anschließend wurden 25% PEG-Lösung (v/v) zugegeben, durch Vortexen gemischt und für 15 min bei 10.000 UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 10 µl TE-Puffer rückgelöst.

2.4.10. Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

10 x TBE

0,89 M	Tris
0,89 M	Borsäure
20 mM	EDTA (pH 8,0)

Agaroselösung (1%)

1%	Agarose (w/v)
0,01%	Ethidiumbromid (v/v)

aufgeschmolzen in 1 x TBE

10 x Auftragspuffer

50 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
50 mM	EDTA
0,025%	Bromphenol Blau (w/v)
60%	Glycerin

Für den Gellauf wurden handelsübliche Gelelektrophorese Apparaturen verwendet, als Laufpuffer wurde 1 x TBE eingesetzt. Die mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzte DNA-Probe wurde auf das Agarose-Gel aufgetragen und die DNA bei ca. 90 V für 45 min aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA und die Geldokumentation erfolgte über ein „BioDocAnalyse“-Gerät (Biometra).

2.4.11. Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pENTRTM/SD/D-TOPO®

PCR-Produkte wurden in den Vektor pENTRTM/SD/D-TOPO® (Invitrogen) kloniert, um so Eingangsklone für das Gatewaysystem zu erzeugen. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die zu klonierenden PCR-Fragmente (vgl. Tab. 5) unter Verwendung von mutagenisierten Oligonukleotiden am 5'-Ende mit den Nukleotiden CACC versehen, so dass eine gerichtete Klonierung möglich war. Die PCR-Produkte wurden durch PEG-Fällung (siehe 2.4.9) aufkonzentriert und von Oligonukleotiden gereinigt.

Reaktionsansatz

20 ng PCR-Produkt
 1 µl pENTR™/SD/D-TOPO®-Vektor
 1 µl Salzlösung
 ad 6 µl ddH₂O

Tabelle 5: Überblick über die PCR-Bedingungen zur Erzeugung von Produkten zur Klonierung in pENTR-SD/D-TOPO.

Fragment	Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2	Anlagerungs- temperatur	Verlängerungs- dauer
OWL1 +TGA	CACCATGATGGGCCA AGAAGCAGC	5'TCACTGGCCTTCT TGTGGTATACT3'	52°C	90s
OWL1 -TGA	CACCATGATGGGCCA AGAAGCAGC	5'CTGGCCTTCTTGT GGTATACTC3'	52°C	90s
HFR1+TGA	5'CACCATGTCTGAATAA TCAAGCTTTCATGG3'	5'TCATAGTCTTCTCA TCGCATGGG3'	51°C	60s
CLP+TGA	5'CACCATGGCGTCGTA CACAGTCTC3'	5'TCATTGACCTTGTT TCTTGAAGCTC3'	55°C	120s
WAV2+TGA	5'CACCATGGTGACGTA CGTGAGCGCGTT3'	5'TCACCTTCCTGTAT CTTCTTCC3'	55°C	120s
RD19+TGA	5'CACCATGGATCGTCT TAAGCTTATTT3'	5'TCAATGGGCGGTG GTTAGGAC3'	55°C	120s

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz in chemikompetente *E. coli*-Zellen transformiert, auf LB/Kana ausgestrichen und gemäß 2.4.6. weiterverarbeitet. Positive Klone wurden mittels Sequenzierung (2.4.13.) auf die Richtigkeit von Sequenz und Leserahmen überprüft.

2.4.12. Umklonierung von Fragmenten aus pENTR™/SD/D-TOPO® in andere Gatewayvektoren

Unter Verwendung der LR-Clonase-Reaktion war es möglich, DNA-Fragmente aus pENTR/SD/D-TOPO in sog. Destinationsvektoren umzuklonieren (vgl. Tab. 6). Die Umklonierungsreaktion erfolgte gemäß Protokoll des Hersteller mit Hilfe des „Gateway® LR Clonase® II enzyme mix“ (Invitrogen). Zu näheren Angaben bezüglich der verwendeten Destinationsvektoren siehe Tabelle 4. Auch hier wurde anschließend der Reaktionsansatz in *E. coli*-Zellen transformiert (2.4.5.) und die Plasmide auf ihre korrekte Klonierung überprüft.

Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Gateway-Destinationsvektoren, deren Funktion sowie die in *E.coli* vermittelte Antibiotikaresistenz.

Vektor	Funktion	Antibiotikaresistenz
pK7WGF2	N-terminale GFP-Fusion	Strep/Spec
pK7FWG2	C-terminale GFP-Fusion	Strep/Spec
pGEX-4T-1 mit Gateway-Kassette	N-terminale GST-Fusion	Amp
pGEX-4T-1 mit Gatewaykassette - GST/+6xHis (vgl. 2.4.13)	N-terminale 6xHis-Fusion	Amp
pDEST TM 32	GAL4 DBD-Fusion	Genta
pDEST TM 22	GAL4 AD-Fusion	Amp

2.4.13. Erzeugung eines Vektors für N-terminale 6xHis-Fusion unter Verwendung von pGEX-4T-1

Um einen effizienten HFR1-6 x His-Fusionsvektor zu erzeugen, wurde an HFR1-pGEX-4T-1 (vgl. 2.4.11) eine PCR-Reaktion mit mutagenisierten, phosphorylierten Oligonukleotiden vorgenommen. Im Rahmen dieser PCR-Reaktion wurde der gesamte HFR1-pGEX-4T-1-Vektor amplifiziert, allerdings wurde durch die Wahl der Oligonukleotide das GST-Gen entfernt und die Information für einen N-terminalen 6 x His-Tag eingefügt. Als DNA-Polymerase wurde Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet, die auch für die Amplifikation großer Produkte geeignet ist und eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Anschließend wurde das PCR-Produkt ligiert, 1 µl der Ligrationsreaktion in *E.coli* transformiert, Plasmide präpariert und die Plasmide sequenziert.

Phosphorylierung von Oligonukleotiden

3 µl Oligonukleotid (100 pM)
 5 µl 10 x T4-Polynukleotid-kinase-Puffer
 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase
 5 µl 10 mM ATP
 ddH₂O ad 50 µl
 Inkubation: 30 min 37°C
 20 min 65°C

Oligonukleotide (His-Codons unterstrichen)

5' CAC CAC CAC AAG GAG CCC TTC ACC ATG TCG 3'

5' GTG GTG GTG CAT GAA TAC TGT TTC CTG TGT G 3'

PCR-Ansatz (Phusion High Fidelity DNA Polymerase-System; NEB)

0,1 µl HFR1-pGEX-4T-1
 10 µl 5 x HF-Puffer
 4 µl dNTP-Mix
 je 1 µl Oligonukleotide (phosphoryliert)
 0,05 µl Phusion High Fidelity DNA Polymerase
 ddH₂O ad 50 µl

PCR-Programm

1x 98°C 30s
31 x 98°C 10 s
70°C 15 s
72°C 120 s
1x 72°C 5 min

Ligation des PCR-Produktes

5 µl PCR-Produkt
1 µl 10 x T4-Ligase-Puffer
1 µl T4-Ligase
ddH₂O ad 10 µl
Inkubation: ÜN 16°C

2.4.14. Sequenzierung von DNA-Sequenzen

Für die Sequenzierung von DNA-Sequenzen wurde der Sequenzierservice des Departments Biologie I der LMU, München genutzt.

2.4.15. Transiente Transformation von Zwiebelzellen mittels Partikelkanone

Goldsuspension

30 mg Goldkügelchen mit einem Durchmesser von 0.6 Micron (Bio-Rad)
in 1 ml 50%igem Glycerin

Beladung der Goldsuspension mit Plasmid-DNA

15 µl Goldsuspension wurden mit
5 µg Plasmid-DNA,
15 µl 2,5 M CaCl₂ sowie
6 µl 0,1 M Spermidin

unter kontinuierlichem Vortexen versetzt. Anschließend wurde für weitere 3 min auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Durch 10 sekundige Zentrifugation wurde das Gold sedimentiert, der Überstand verworfen, das Gold mit 200 µl 70%igem Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 200 µl 100%igem Ethanol wiederholt. Das Sediment wurde in 25 µl 100%igem Ethanol resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 6 µl eingesetzt. Für die Transformation wurde eine Partikelkanone von Bio-Rad (Model PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System) verwendet. Die „Rupture-Discs“ waren auf 900 PSI ausgelegt. Die genaue Durchführung der Transformation erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Transformiert wurden die Epidermiszellen von Gemüsezwiebeln. Zu diesem Zweck wurden große Gemüsezwiebeln geviertelt und einzelne Blattstücke mit der Hautseite nach oben in der Partikelkanone beschossen. Die auf diese Weise behandelten Zwiebelzellen wurden über Nacht dunkel in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Fluoreszenz der transformierten Zellen am Fluoreszenzmikroskop untersucht und dokumentiert. Die Lage des Kerns wurde durch Hellfelduntersuchungen überprüft.

2.4.16. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

PEG-Lösung:

50% PEG 3500 (w/v) in H₂O
5 min bei 120°C sterilisiert

Lithiumacetat-Lösung:

1 M Lithiumacetat
in H₂O
steril filtriert

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

Träger-DNA-Lösung:

2 mg/ml hochmolekulare Fischsperma-DNA (Sigma)
in 1 x TE-Puffer
über Nacht bei 4°C gerührt
vor Verwendung 5 min aufgekocht und auf Eis abgekühlt

Transformationsmedium

240 µl PEG-Lösung
36 µl Lithiumacetatlösung
50 µl Träger-DNA-Lösung
30 µl H₂O
4 µl Plasmidpräparations-DNA (siehe 2.4.6.)

Für die Transformation von Hefe wurde das „Best-Method“-Protokoll von R.D. Gietz (<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.html>) verwendet. Hefezellen des Stammes MaV203 (Invitrogen) wurden auf YPAD-Medium ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie in 250 ml flüssiges YPAD-Medium überimpft und über Nacht bei 30°C und 120 RpM inkubiert. Am nächsten Tag wurden 300 ml frisches YPAD-Medium mit der Übernachtskultur bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 angeimpft. Die Kultur wurde für 4-5 Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 2,0 erreicht wurde. Für 10 Transformationsansätze wurden 50 ml Kultur durch 5 minütige Zentrifugation bei 5000 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde einmal mit sterilem H₂O gewaschen, erneut zentrifugiert und die Hefezellen durch Zugabe von H₂O auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Pro Transformationsansatz wurden

100 µl Hefezellen eingesetzt, durch Zentrifugation (15 s, 5000 g) sedimentiert und der Überstand komplett entfernt. Die sedimentierten Hefezellen wurden mit dem Transformationsmedium versetzt und durch starkes Mischen auf dem Vortexschüttler vollständig resuspendiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 60 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach diesem Hitzeschock wurden die Zellen durch 15 sekündige Zentrifugation bei 14.000 g sedimentiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Sediment in 1 ml sterilem H₂O rückgelöst. 20 µl dieser Zellsuspension wurden auf SC-Medium mit den jeweiligen Auxotrophiemarkern ausplattiert und bis zum Erscheinen der Kolonien (i.d.R. 3-5 Tage) bei 30°C inkubiert. Die erfolgreiche Transformation wurde durch eine Plasmidpräparation (2.4.17) und anschließender PCR mit Gen- und Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (vgl. Tab. 7) nachgewiesen.

2.4.17. Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Die Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens erfolgte analog zu 2.4.15 mit folgenden Ausnahmen: Es wurde der 10fache Ansatz angesetzt und die Transformation erfolgte seriell, d.h. die Hefezellen wurden zuerst mit OWL1-pDEST32 transformiert, Kolonien und Kultur angezogen und überprüft. Diese Zellen wurden erneut kompetent gemacht um sie mit einer cDNA-Bank in pDEST-22 zu transformieren. Dieser Transformationsansatz wurde auf SC-Leu-Trp-His-Medium unter Zugabe von 20 mM und 40 mM 3AT ausplattiert. Die anschließende Inkubationsphase dauerte 14 Tage.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Konstrukte in Hefevektoren und die für die Nachweis-PCR verwendeten Oligonukleotiden.

Konstrukt	Auxotrophiemarker	Oligonukleotide für PCR-Reaktion	
		Oligonukleotide 1	Oligonukleotide 2
HFR1 in pDEST22	Tryptophan	5'CGGTCCGAAC CTCATAACAACCTC	5'TCATAGTCTTCTCA TCGCATGGG3'
OWL1 in pDEST 32	Leucin	5'AACCGAAGTG CGCCAAGTGTCTG	5'TCACTGGCCTTCT TGTGGTATACT3'
cDNA in pDEST22	Tryptophan	5'CGGTCCGAAC CTCATAACAACCTC	AGCCGACAACCTTG ATTGAGAC

2.4.18. Plasmidpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Glasperlensuspension:

50% Glas-Perlen (v/v; Sigma)

in TE-Puffer (siehe 2.4.15)

Die Plasmidpräparation erfolgte modifiziert gemäß dem Qiagen-Miniprep-Protokoll (Qiagen). Im Einzelnen wurden 5 ml YPAD-Medium mit den zu untersuchenden Hefetransformanden inokuliert und über Nacht bei 30°C und 120 RpM inkubiert. Die Kultur wurde am nächsten Tag sedimentiert, mit 20 µl Glasperlen und 250 µl P1-Puffer versetzt. Anschließend wurden durch 5 minütiges starkes Vortexen die Hefezellen aufgebrochen. Nach Zugabe des P2- und N3-Puffers wurde 30 min bei RT inkubiert um einen möglichst effektiven RNase-Verdau zu gewährleisten, bevor der Niederschlag durch 10 minütige Zentrifugation sedimentiert wurde. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten gemäß dem Protokoll des Herstellers. Für eine PCR wurden 4 µl, für eine Transformation in *E. coli* 10 µl des Eluats verwendet.

2.4.19. Bestimmung der Stärke der Interaktion

Um die Stärke der Interaktion zu bestimmen, wurden je Transformation drei Kolonien auf SC-Leu-Trp-His ausgestrichen und diese „Masterplatte“ ÜN bei 30°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde das Koloniemuster mit der Samtstempel-Methode auf SC-Leu-Trp-His-Platten mit 3AT-Konzentrationen zwischen 10 und 20 mM übertragen. Durch Nachreinigen mit frischen Samtstempeln („Replika-Cleaning“) wurden überzählige Hefezellen entfernt. Anschließend wurden die Platten für vier Tage bebrütet (30°C) wobei nach 24 h erneut ein „Replika-Cleaning“ vorgenommen wurde. Das Koloniewachstum wurde photographisch dokumentiert.

2.5. Proteinbiochemische Arbeiten

2.5.1. Proteinüberexpression in *E. coli*

Die jeweiligen Überexpressionsvektoren (vgl. Tab. 8) wurden in chemikompetente Zellen transformiert und über Nacht auf Selektionsplatten bebrütet. Am nächsten Tag wurden 50 ml LB-Medium + 1‰ Ampicillinlösung (100 mg/ml) mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C angezogen. Diese Übernachtskultur wurde am nächsten Tag in 2000 ml frisches LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Dann wurde durch Zugabe von IPTG (100 mM Stocklösung) die Überexpression induziert. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Kulturen durch Zentrifugation geerntet und das Sediment bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 8: Übersicht über die Überexpressionsbedingungen verschiedener Fusionsproteine

Fusionsprotein	Vektor	Bakterienstamm	IPTG-Konzentration	Zeitpunkt der Ernte
OWL1-GST	pGEX-4T-1;	BL21 (DE3)	0,2 mM	3 h
PAT1-GST	pGEX-4T-1	BL21 (DE3)	0,2 mM	3 h
HFR1-6xHis	pGEX-4T-1-GST+6xHis	BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	1 mM	2 h

2.5.2. Denaturierender Bakterienaufschluss

Inclusion-Body-Solubilisierungspuffer

8 M Harnstoff

50 mM Tris/HCl (pH8)

1 mM DTT

1 mM EDTA

200 ml induzierte Bakterienkultur (vgl. 2.5.1) wurden sedimentiert (6000 g, 10 min, 4°C), und in 12 ml Resuspendierungspuffer rückgelöst. Diese Suspension wurde 1 h bei 4°C geschüttelt und anschließend sechsmal je 30 s bei 100 V auf Eis sonifiziert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden nun für 20 min und 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml Inclusion-Body-Solubilisierungspuffer durch einstündiges Rühren bei Raumtemperatur resuspendiert. Durch erneute Zentrifugation (6000 g, 10 min, RT) wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert. Der Überstand wurde in einen Dialyseschlauch (SERVAPOR, Ø 16 mm; Serva; angefeuchtet in ddH₂O) überführt.

2.5.3. Dialyse zur Rückfaltung denaturierter Proteine

Dialysepuffer

50 mM	NaH ₂ PO ₄
50 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
1 mM	PMSF
1 mM	Ascorbat

Der mit der Probe befüllte Dialyseschlauch wurde zuerst für 2 h in 2000 ml Dialysepuffer unter konstantem Rühren bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C für über Nacht gegen 2000 ml frischen Dialysepuffer dialysiert. Die Probe wurde daraufhin erneut durch Zentrifugation (15 min, 10000 g, 4°C) von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

2.5.4. „Pull-Down-Assay“

Waschpuffer 1

50 mM	NaH ₂ PO ₄
150 mM	NaCl
25 mM	Imidazol
1 mM	PMSF
1 mM	Ascorbat

Waschpuffer	2
50 mM	NaH ₂ PO ₄
50 mM	NaCl
25 mM	Imidazol
1 mM	PMSF
1 mM	Ascorbat

Elutionspuffer	
50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
100 mM	Imidazol

Für den Pull-Down-Assay wurde der dialysierte Extrakt von HFR1-6xHis mit 0,2 Volumen 50% Ni-NTA-Agaroselösung (Qiagen) versetzt und für eine Stunde unter konstantem Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose durch Zentrifugation (15 s, 1000 UpM) sedimentiert und zweimal mit Waschpuffer 1, einmal mit Waschpuffer 2 gewaschen (je 10 Volumina). Jeder Waschschrift wurde vor dem Zentrifugieren für 5 min unter Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die dialysierten Extrakte von PAT1-GST bzw OWL1-GST zu der Ni-NTA-Agarose gegeben. Nach Inkubation für zwei Stunden unter Schütteln bei 4°C wurde erneut zweimal mit 10 Volumina Waschpuffer 2 gewaschen um unspezifische Bindungen zu entfernen. Anschließend wurde vier Elutionsschritte mit 0,5 Volumina Elutionspuffer durchgeführt.

2.5.5. Kernisolation aus Pflanzenmaterial

Honda-Puffer (Xia *et al.*, 1997)

2,5%	Ficoll 400
5%	Dextran T40
400 mM	Saccharose
25 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
10 mM	MgCl ₂

500 mg Pflanzenmaterial wurde in 1 ml Hondapuffer durch Mörsern homogenisiert. Dieser Extrakt wurde durch Miracloth gefiltert und anschließend mit Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden Kerne und andere zelluläre Bestandteile sedimentiert (1500 g, 5 min, 4°C). Das Sediment wurde einmal mit Hondapuffer mit 0,1% Triton X-100 gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml Honda-Puffer resuspendiert. Durch erneute Zentrifugation (100 g, 5 min, 4°C) wurden zelluläre Bruchstücke abgetrennt. Die Kerne wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt abgetrennt (1800 g, 5 min, 4°C) der Überstand abgenommen und die Nuclei vorsichtig in 200 µl Hondapuffer resuspendiert.

2.5.6. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Homogenisationspuffer

50 mM	Tris/HCl (pH 7,9)
100 mM	Kaliumacetat
20%	Glycerin (v/v)
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0,5%	„Proteinaseinhibitor-Cocktail“ (Sigma-Aldrich), gemäß dem Protokoll des Herstellers verdünnt

2 x SDS-Beladungspuffer

100 mM	Tris (pH 6,8)
4%	SDS (w/v)
20%	Glycerin (v/v)
200 mM	DTT
0,001%	Bromphenolblau (w/v)

A. thaliana-Pflanzen wurden ihrem Gewicht entsprechend in einem Volumen eisgekühltem Homogenisationspuffer auf Eis mit einem Mörser zerkleinert. Dieses Homogenat wurde 10 min bei 4°C und 10.000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit einem Volumen 2 x SDS-Beladungspuffer versetzt und diese Proben für 5 min auf 90°C erhitzt.

2.5.7. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Proteinextrakt	siehe Abschnitt 2.5.6.
5%	Alkalische Phosphatase (v/v, Sigma-Aldrich)

Der Proteinextrakt wurde mit Alkalischer Phosphatase versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt wie unter Abschnitt 2.5.6. beschrieben behandelt, auf ein SDS-Gel geladen und nach der Auftrennung ein „Western“-Transfer und ein immunologischer Proteinnachweis auf OWL1 durchgeführt.

2.5.8. Proteinauftrennung über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel (10% Acrylamid)

10%	Acrylamid/Bisacrylamidmischung (v/v), (Rotiphorese®Gel 40 (29:1); Firma Roth)
375 mM	Tris (pH 8,8)
0,1%	SDS (w/v)
0,1%	APS (v/v)
0,04%	TEMED (v/v)

Sammelgel (5% Acrylamid)

5%	Acrylamid/Bisacrylamidmischung (v/v), (Rotiphorese®Gel 40 (29:1); Firma Roth)
250 mM	Tris (pH 6,8)
0,1%	SDS (w/v)
0,1%	APS (v/v)
0,1%	TEMED (v/v)

10 x Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer

2 M	Glycin
250 mM	Tris
36 mM	SDS

Es wurde das System nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zunächst ein Polyacrylamidgel mit 5%igem Sammel- und 10%igem Trenngel hergestellt, wobei eine „Mini-Gel-Apparatur“ der Firma BioRad verwendet wurde. Die Herstellung erfolgte dabei gemäß dem Herstellerprotokoll, für das Überschichten des Trenngels wurde ddH₂O verwendet. Anschließend wurde das Gel in die Laufkammer gesetzt, 1 x Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer eingefüllt und die vorbereiteten Proteinproben in die Taschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 1,5 h.

2.5.9. „Western“-Transfer

Transferpuffer

39 mM	Glycin
48 mM	Tris
0,037%	SDS (w/v)
20%	Methanol (v/v)
pH 8,3 (HCl)	

Der „Western“-Transfer wurde als Nasstransfer in einer „Mini Trans-Blot“-Apparatur der Firma BioRad durchgeführt. Der Aufbau der Transferapparatur wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers vorgenommen, wobei eine PVDF-Membran der Firma GE Healthcare verwendet wurde, die zuvor durch Methanol aktiviert wurde. Der Transfer erfolgte unter Verwendung des oben beschriebenen Transferpuffers bei einer Stromstärke von 230 mA für 1,5 h.

2.5.10. Immunologischer Proteinnachweis

10 x TBS

200 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
1,37 M	NaCl

Blockierungslösung

1%	Tween 20 (v/v)
----	----------------

in 1 x TBS; Zusatz von Milchpulver oder Casein gemäß Tabelle

Waschlösung

1% Tween 20 (v/v)
in 1 x TBS

Detektionssubstrate**NBT/BCIP-Lösung**

Detektionspuffer

0,1 M Tris/HCl (pH 9,5)

0,1 M NaCl

Gebrauchslösung

NBT/BCIP-Stammlösung der Firma Roche

1:50 in Detektionspuffer verdünnt.

ECL-Lösung

Lösung 1

44 mg Luminol in

100 ml 100mM Tris/HCl (pH 8,6)

Lösung 2

11 mg p-Cumarsäure in

10 ml DMSO

Gebrauchslösung

90% Lösung 1 (V/V)

10% Lösung 2 (v/v)

0,5% H₂O₂

Die PVDF-Membran wurde für 2 h in 100 ml Blockierungspuffer bei RT geschüttelt. Anschließend wurde der Blockierungspuffer abgenommen und 3 ml in 1 x TBS verdünnter primärer Antikörper zugegeben. Die Membran wurde in der Antikörperlösung für mindestens 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde dreimal für je 15 min unter starkem Schütteln in 100 ml Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde die Membran in 10 ml verdünntem sekundären Antikörper (1:10000 in 1 x TBS) inkubiert. Für die Zusammensetzung des

Blockierungspuffers, die Verdünnung der primären Antikörper sowie den zugehörigen sekundären Antikörper siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Überblick über die verwendeten Antikörper, deren Verdünnung, der zugehörige sekundäre Antikörper sowie der verwendete Waschpuffer.

Protein	1. Antikörper	Verdünnung 1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierungspuffer
OWL1	Anti-OWL1 (V. Wachtler)	1:2000	Anti-Maus (Invitrogen)	Waschpuffer + 3% Milchpulver +
PHYA	Anti-PHYA (A. <i>thaliana</i> , E. Schäfer)	1:1000	Anti-Kaninchen (Sigma)	Waschpuffer + 3% Milchpulver
GST	Anti-GST (Sigma)	1:10000	Anti-Maus (Invitrogen)	Waschpuffer + 3% Milchpulver
6xHis	Anti-Penta-His (Qiagen)	1:2000	Anti-Maus (Sigma)	Waschpuffer + 1% Casein (alkalilöslich)

Um den sekundären Antikörper zu detektieren, wurden in Abhängigkeit des verwendeten sekundären Antikörpers zwei unterschiedliche Systeme verwendet (vgl. Tabelle 10): Bei der Verwendung des NBT/BCIP-Systems wurde die Membran bis zum Erscheinen der Signale in Gebrauchslösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei RT, für 6 x 9 cm Membran wurden 2 ml Gebrauchslösung verwendet. Die Farbreaktion wurde durch Waschen in ddH₂O abgestoppt.

Tabelle 10: Überblick über die verwendeten sekundären Antikörper, deren Verdünnung, Hersteller, sowie das verwendete Detektionssubstrat.

Antikörper	Hersteller	Detektionssubstrat
Anti-Maus (gekoppelt an Alkalische Phosphatase)	Invitrogen	NBT/BCIP-Lösung
Anti-Maus (gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase)	Invitrogen	ECL-Lösung
Anti-Kaninchen (gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase)	Sigma	ECL-Lösung

Für das ECL-System wurde die Membran in frisch zubereiteter Gebrauchslösung (4 ml für 6 x 9cm) 2 min inkubiert, in Frischhaltefolie gewickelt und ein ECL-Film (GE Healthcare) aufgelegt. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Stärke des Signals und lag zwischen 30 s und 15 min. Der Film wurde unter Verwendung eines handelsüblichen Fotoentwicklers und -fixierers behandelt.

2.5.11. Coomassie-Färbung

Coomassie-Lösung

30%	Ethanol
10%	Essigsäure
0,2%	Coomassie Brilliant Blau R250

SDS-Gele wurden nach der Gelelektrophorese kurz mit ddH₂O gespült und anschließend in einer ausreichenden Menge Coomassielösung unter Schütteln bei RT für mindestens 1 h geschüttelt. Für die Entfärbung wurden die Gele 3-5mal für je 2 min in der Mikrowelle in ddH₂O gekocht, bis die Banden deutlich zu erkennen und nur noch ein minimaler Hintergrund vorhanden waren.

2.6. Physiologische Untersuchungen

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden als Dunkelrotlichtquellen LED-Platten mit einem Emissionsmaximum von $\lambda = 740$ nm (Quantum devices und PVP GmbH) eingesetzt. Als Weißlichtquelle wurden Leuchtstoffröhren (FH 21W/830, Osram) verwendet.

2.6.1. Bestimmung der Keimungsrate nach Bestrahlung mit einem verschiedenen Lichtbedingungen

Für die Bestimmung der Keimfähigkeit von *A. thaliana*-Mutanten unter Niedrigst-Fluenzbedingungen wurden die Samen sterilisiert und auf 0,5 x MS-Medium ausgelegt. Unmittelbar nach der Ausplattierung wurden die Platten für 10 min mit dunkelrotem Licht ($0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) beleuchtet um eventuell vorhandenes P_{FR} in P_R umzuwandeln. Anschließend wurden die Samen im Dunklen bei RT inkubiert. Um die Keimfähigkeit unter Rotlicht zu überprüfen, wurden nach 3h ein Rotlichtpuls (5 min, $0,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) gegeben. Für die Determinierung der Keimfähigkeit unter Dunkelrot- und Weißlicht wurden die Samen 48 h im Dunkeln inkubiert und dann ein DR- ($0,5 \text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$) bzw. WL-Puls ($80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) gegeben. Nach erneuter 48h Inkubation im Dunkeln wurde die Keimungsrate ermittelt, wobei alle Samen mit herausgewachsener Wurzel als gekeimt gewertet wurden.

2.6.2. Bestimmung der Hypokotyllänge nach Bestrahlung mit verschiedenen Lichtbedingungen

Samen wurden wie unter Abschnitt beschrieben sterilisiert und auf 0,5 x MS ausgelegt. Anschließend wurden die Samen für eine Woche im Kühlschrank bei 4°C stratifiziert und dann bei Raumtemperatur 20 min mit Rotlicht bestrahlt, um eine gleichmäßige Keimung zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Samen über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend in die jeweilige Lichtbedingung überführt. Um Niedrigst-Fluenzen zu simulieren wurde für 3 Tage die Inkubation im Dunklen durch einen fünf Minuten langen Dunkelrotlichtpuls der Stärke $0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ einmal pro Stunde unterbrochen. Kontinuierliches Dunkelrotlicht wurde für drei Tage mit einer Intensität von $0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ appliziert, kontinuierliches Rotlicht mit einer Intensität von $0,03 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Anschließend wurden die Keimlinge auf einer MS-Medien-Platte der Länge nach ausgelegt, mit einer Digitalkamera aufgenommen und im Computer mit dem Programm „ImageJ“ (NIH) die Hypokotyllänge gemessen.

2.6.3. Bestimmung der negativ-gravitropischen Ausrichtung von Keimlingen unter Dunkelrotlicht

Sterilisierte *A. thaliana*-Samen wurden auf 0,5 x MS-Medium in großen rechteckigen und durchsichtigen Kunststoffboxen ausgelegt (Sterilisation für 2 Tage unter starkem UV-Licht; $\lambda = 254 \text{ nm}$). Dabei wurden die Samen auf einer geraden Linie in ausreichendem Abstand (ca. 1 cm) zueinander platziert. Anschließend wurden die Samen wie bereits beschrieben zuerst einem Kälteschock und dann einem Weißlichtpuls ausgesetzt und anschließend für 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Für den eigentlichen Lichtversuch wurden die Platten so mit schwarzem Tonpapier umhüllt, dass nur eine Seite, parallel zur Samenreihe, frei blieb. Mit dieser offenen Seite nach oben wurden die Platten senkrecht unter die Dunkelrotlichtquelle gestellt und für drei Tage mit Dunkelrotlicht ($0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) bestrahlt. Anschließend wurden die Platten fotografiert und der Winkel zwischen Vertikale und Hypokotyl mit dem Programm „ImageJ“ (NIH) vermessen. Alle Werte wurden auf die Zehnerstelle gerundet, die Verteilung der Werte mit dem Programm Excel (Microsoft) grafisch dargestellt. Keimlinge, die absolut negativ gravitropisch, also entgegen der Schwerkraft wuchsen, wurde der Wert 0 zugeordnet. Keimlingen, die im Uhrzeigersinn abgelenkt erhielten positive Werte, Keimlingen, die gegen den Uhrzeigersinn wuchsen, negative Werte.

2.6.4. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Keimlingen nach Bestrahlung mit Dunkelrotlichtpulsen

Auch für diesen Versuch wurden Samen wie bereits beschrieben behandelt und auf 0,5 x MS-Medium ausplattiert. Die Platten wurden für eine Woche bei 4°C stratifiziert, anschließend einem einstündigen Weißlichtpuls ausgesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss aufbewahrt. Dann wurden die Samen für drei Tage entweder jede Stunde einem fünf-minütigen Dunkelrotlichtpuls der Stärke $0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ausgesetzt (Niedrigst-Fluenzen) oder kontinuierlichem Dunkelrotlicht ausgesetzt. Nach drei Tagen wurden die Platten für weitere drei Tage unter Weißlicht gestellt. Auch bei diesem Versuch wurde eine Dunkelkontrolle durchgeführt, die während der Dunkelrotphase unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde und zeitgleich mit den Versuchsplatten unter Weißlicht gestellt wurde. Nach der Weißlichtphase wurden die Keimlinge geerntet und über Nacht im

Dunkeln in 80% Aceton geschüttelt. Für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde die Absorption bei $\lambda = 660 \text{ nm}$ und 647 nm gegen 80% Aceton gemessen, der Chlorophyllgehalt gemäß der Formel

$$\text{Chlorophyll}_{a+b} = 7,15 \times E_{660\text{nm}} + 18,71 \times E_{647\text{nm}}$$

berechnet und auf das Frischgewicht der Keimlinge bezogen (Lichtenthaler 1987).

2.6.5. Statistische Untersuchungen

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Wurde ein repräsentatives Experiment gezeigt, so wurden in mindestens zwei weiteren Experimenten vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test (Wildtyp im Vergleich mit Mutantenlinien) verifiziert.

2.7. Computerprogramme

Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme siehe Tabelle 11.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Computerprogramme

Programm	Quelle	Funktion
BLASTn	NCBI TAIR	Vergleich DNA-Sequenz gegen Datenbank
BLASTp	NCBI TAIR	Vergleich Proteinsequenz gegen Datenbank
ClustalW	EBI	Direkter Vergleich von Proteinsequenzen
NetPhos	CBS Prediction server	Vorhersage von Phosphorylierungsstellen
SMART	EMBL	Vorhersage von Aminosäuremotiven
Lasergene	DNA Star	Analyseprogramme für DNA- und Proteinsequenzen
Image J	NIH	Bildbearbeitungs- und Meßprogramm

3. ERGEBNISSE

3.1. Der Effekt von Reis phyA in *A.thaliana* unter besonderer Berücksichtigung der N-terminalen Serinreste

3.1.1. Sequenzvergleich verschiedener phyA

In allen bisher bekannten Pflanzengenomen findet sich die Information für mindestens ein Homolog des Dunkelrotlichtrezeptors phyA. Bei der Erforschung dieses Lichtrezeptors wurden lange Jahre vor allem phyA aus Hafer (*Avena sativa*; phyA/A.s.) verwendet, dass sowohl in *Nicotiana tabacum* als auch in *Arabidopsis thaliana* transformiert wurde (Keller *et al.*, 1989; Boylan *et al.* 1991). Neben Hafer wurden allerdings auch einige Studien an phyA aus Reis (*Oryza sativa*; phyA/O.s.) durchgeführt (Kay *et al.* 1989). Ähnlich wie in *A. thaliana* zeigen auch Reis phyA-Mutanten unter Dunkelrotlicht eine Inhibierung der Photomorphogenese, die sich vor allem in einer Verlängerung der Koleoptilen niederschlägt. Außerdem konnte in *Oryza sativa* vergleichbar zu *A. thaliana* sowohl eine VLFR (Dunkelrotlichtpulse; DR_p), als auch eine HIR (kontinuierliches Dunkelrotlicht, DR_k) nachgewiesen werden, die im Wesentlichen phyA-abhängig ist (Takano *et al.*, 2001, 2005). Im Unterschied zu *A. thaliana* spielt in *O. sativa* allerdings auch phyC eine wichtige Rolle in der DR_k-Perzeption. Trotz dieser Gemeinsamkeiten sind die Sequenzen zwischen den verschiedenen Spezies nur bedingt identisch (vgl. Tab. 12).

Tabelle 12: Vergleich der Sequenzhomologie von phyA zwischen verschiedenen häufig für Studien verwendeten Pflanzenarten.

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Avena sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>		63%	63%	78%
<i>Avena sativa</i>	63%		88%	64%
<i>Oryza sativa</i>	63%	88%		64%
<i>Nicotiana tabacum</i>	78%	64%	64%	

Ein genauer Vergleich der Sequenzen von phyA aus Reis, Hafer, Tabak und *A. thaliana* ergibt einen auffälligen Unterschied im N-terminalen Bereich. In allen bisher bekannten Phytochromen sind unter den ersten 20 Aminosäuren gehäuft Serine zu finden, welche als mögliche Phosphorylierungsstellen in Frage kommen. In phyA ist diese Sequenzbesonderheit besonders stark ausgeprägt. Tatsächlich wurde für drei Serine des Hafer-phyA (S-7, S-17, S-598) eine Phosphorylierung *in vitro* nachgewiesen (McMichael & Lagarias, 1990; Lapko *et al.*, 1996, 1997, 1999). Bei einem Vergleich verschiedener phyA aus Monokotylen und Dikotylen zeigte sich, dass in Monokotylen diese Serine in der Regel Cluster bilden, in denen bis zu fünf Serine aufeinander folgen (vgl. Abb. 4). So verfügt phyA/O.s. unter den ersten 20 Aminosäuren über 10 Serine, verteilt auf jeweils eine Zweier-, Dreier und Fünfergruppe.

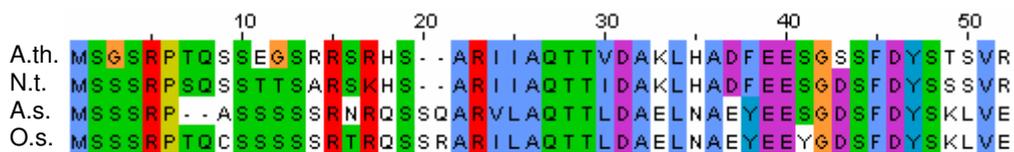


Abbildung 4: Vergleich der ersten 50 Aminosäuren von phyA aus *Arabidopsis thaliana* (A.th.), *Nicotiana tabacum* (N.t.), *Avena sativa* (A.s.) und *Oryza sativa* (O.s.).

In *A. thaliana* waren solche Cluster dagegen nicht so ausgeprägt zu finden, hier sind sieben Serine gleichmäßig über die ersten 20 Aminosäuren verteilt. Damit findet sich in phyA/O.s. ein stärkeres putatives Phosphorylierungspotential. Um die Funktion der N-terminalen Serinreste genauer zu untersuchen wurden *A. thaliana* phyB und phyAB-Mutanten mit phyA/O.s. komplementiert.

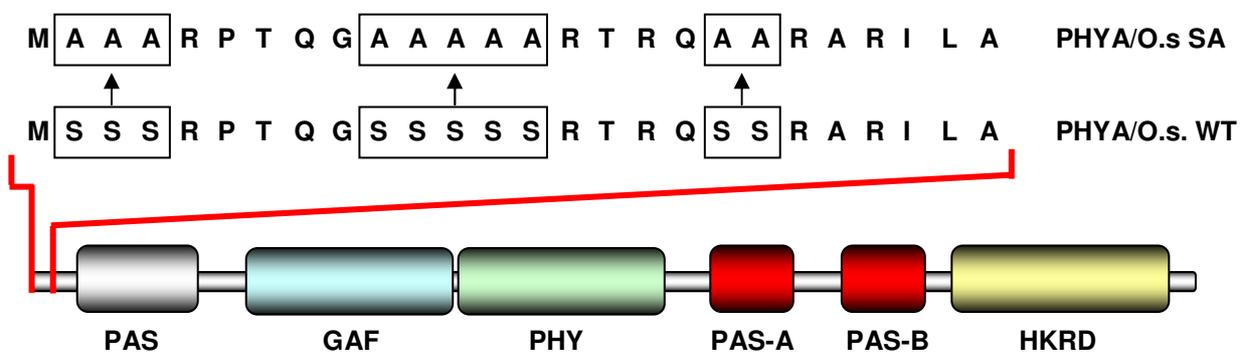


Abbildung 5: Die Substitution der Alanine im N-Terminus von phyA O.s.

Dabei wurde zum einen Wildtyp *phyA/O.s.* verwendet (*phyA/O.s.WT*), zum anderen ein Konstrukt, bei dem die ersten zehn Serine durch Alanine substituiert worden waren (*phyA/O.s.SA*; vgl. Abb. 5; Stockhaus *et al.*, 1992). Durch eine phänotypische Charakterisierung sowohl unter HIR als auch unter VLFR-Bedingungen sollten die Auswirkungen von additiven bzw. fehlenden putativen Phosphorylierungsstellen auf beide Signalwege untersucht werden.

3.1.2. Akkumulation von Reis *phyA* in *A. thaliana* Komplementationsmutanten

PHYA/O.s.WT und *PHYA/O.s.SA* wurden in die *A. thaliana*-Mutanten *phyB* und *phyA/phyB* (*phyAB*) unter Kontrolle eines CaMV 35SPromotors transformiert. Dies sollte zu einer lichtunabhängigen, konstanten Überexpression von *PHYA O.s.* führen. Um die Mengen an *phyA* zu bestimmen, wurde eine Immunodetektion mit *phyA*-spezifischem Antikörper durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwei Linien von *phyB* und *phyAB* mit Überexpression von *phyA/O.s.WT* (*phyB/WT*; *phyAB/WT*) bzw. *phyA/O.s.SA* (*phyB/SA*; *phyAB/SA*) untersucht. Eine Analyse von drei Wochen alten, im Weißlicht gezogenen Pflanzen zeigte mit einer Ausnahme mittlere bis hohe Protein-Akkumulation, während in Wildtyppflanzen nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden konnte (vgl. Abb. 6). Diese Ergebnisse wurden durch von Dr. C. Bolle an etiolierten Keimlingen durchgeführte Immunodetektionen bestätigt.

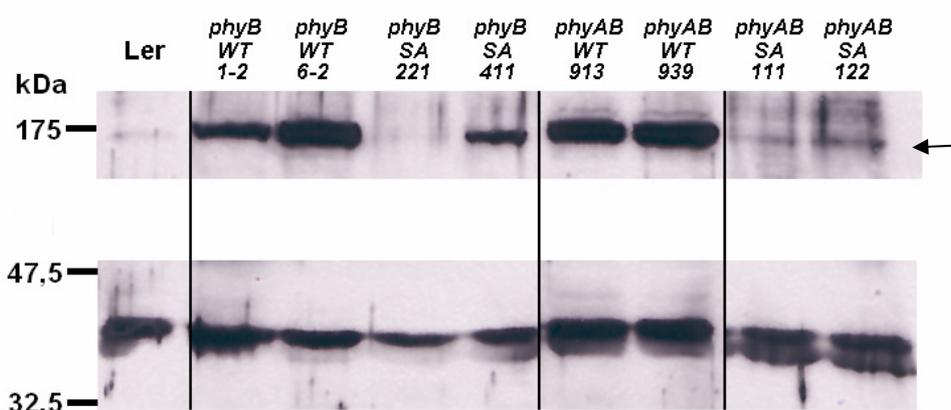


Abbildung 6: Immunodetektion von Reis *phyA* (*phyA/O.s.*) in verschiedenen *A. thaliana* Mutantenlinien. *phyB WT*, *phyAB WT*: *phyB* bzw. *phyA/phyB* (*phyAB*) transformiert mit Wildtyp *phyA/O.s.* *phyB SA*, *phyAB SA*: *phyB* bzw. *phyAB* transformiert mit *phyA/O.s.* mit Serin-zu-Alanin-Substitution im N-Terminus. Es wurde die *phyA*-Akkumulation in drei-Wochen-alten Pflanzen durch Immunodetektion mit *phyA*-spezifischem Antikörper bestimmt. Das *phyA*-spezifische Signal wird mittels Pfeil markiert. Der untere Bereich der Abbildung zeigt ein unspezifisches Signal als Ladungskontrolle.

So konnte gezeigt werden, dass lichtunabhängig *PHYA/O.s.WT* und *PHYA/O.s.SA* konstant überexprimiert werden. Für die phänotypischen Analysen wurden mit *phyB/WT1-2*, *phyB/SA221*, *phyAB/WT913* und *phyAB/SA111* Mutanten mit einer schwächeren Expressionsrate ausgewählt. Mit *phyB/W 6-2*, *phyB/SA411*, *phyAB/WT939* und *phyAB/SA122* wurden zusätzlich starke Überexprimierer untersucht.

3.1.3. Bestimmung der Keimungsrate nach Bestrahlung mit R- oder DR-Licht

Sobald Samen durch Wasserkontakt zu quellen beginnen, werden durch unterschiedliche genetische, biochemische und physiologische Prozesse die Vorbereitungen für den Keimungsprozess initiiert. Bei *A. thaliana* als klassischem Lichtkeimer ist Licht als finaler Keimungsauslöser unbedingt von Nöten. Schon in trockenen Samen ist der wichtigste Rotlicht-Rezeptor *phyB* zu finden, so dass bei Exposition zu Weiß- oder Rotlicht schon kurze Zeit nach der Quellung die Keimung ausgelöst werden kann. *PhyB* ist aber nur in der Lage Rotlicht oberhalb des Schwellenwertes von $0,1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ zu detektieren, schon grünes und gelbes Licht sind für die Keimungsauslösung über *phyB* wenig effizient. Somit kann geschlossen werden kann, dass unter physiologisch relevanten Bedingungen bis zu einer Wellenlänge von 520 nm und ab 710 nm die Keimung ausschließlich über *phyA* induziert wird (Shinomura *et al.* 1996). Allerdings wird eine effiziente Keimung durch *phyA* erst ca. 48 h nach der Quellung erreicht, da *phyA* im Unterschied zu *phyB* erst neu synthetisiert werden muss.

Im in Abb. 7 dargestellten Experiment wurden Samen mit R- oder DR-Licht bestrahlt. In beiden Fällen wurden erst 48 h nach dem Befeuchten der Samen bestrahlt, da auch *35S-PHYA/O.s.* erst neu synthetisiert werden muss. Unter diesen Bedingungen zeigte die *phyAB*-Mutante keine signifikante Keimung. Nach Bestrahlung mit Dunkelrotlicht konnte *phyA/O.s.WT* nur partiell den Verlust von *phyA* und *B* ersetzen. Dagegen bewirkte *phyA/O.s.SA* eine Erhöhung der Keimungsrate auf Wildtyp-Niveau. Nach Bestrahlung mit Rotlicht konnte für *phyAB/SA* sogar ein hypersensitiver Phänotyp mit Erhöhung der Keimungsrate um ca. 20% erzielt werden. Bei *phyAB/WT* dagegen lag die Keimungsrate unter der des Wildtyps. Das bedeutet, dass *phyA/O.s.SA* unter beiden Lichtbedingungen aktiver war und nicht nur für *phyA* sondern auch für *phyB* komplementieren konnte.

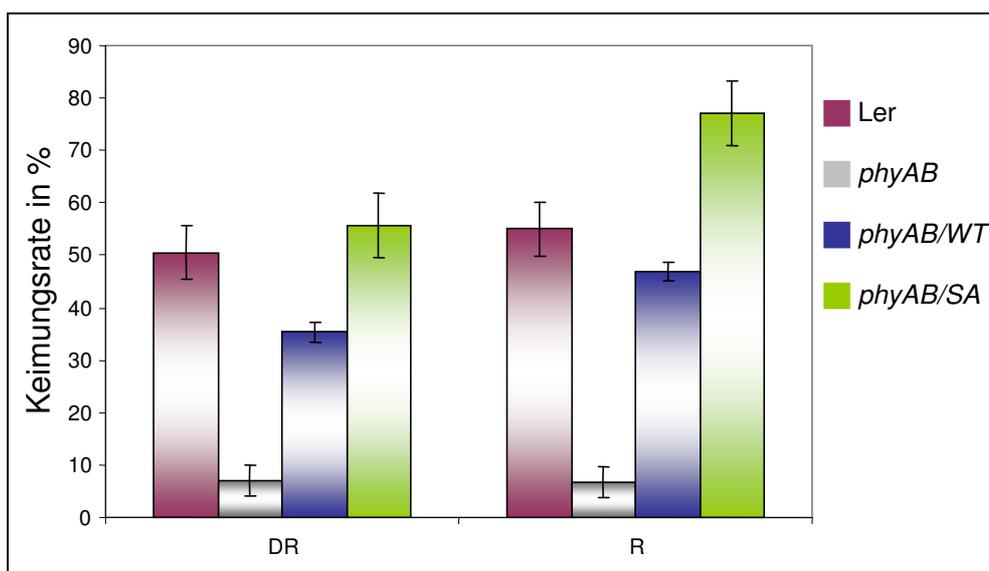


Abbildung 7: Keimungsrate nach Bestrahlung mit Rot- oder Dunkelrotlicht. 48h gequollenen Samen wurden entweder einem 5 minütigen Rotlicht- (R) oder Dunkelrotlichtpuls (DR) ausgesetzt. 48 h später wurde die Keimungsrate bestimmt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.1.4. Bestimmung der Hypokotyllänge unter verschiedenen Lichtbedingungen

Etiolierte Keimlinge versuchen durch ein verstärktes Hypokotylwachstum, Licht zu erreichen. Bereits durch geringste Lichtmengen kann im Rahmen der VLFR die Hypokotylelongation partiell inhibiert werden. Höhere Lichtquantitäten führen vor allem über die phyA-vermittelte HIR und die phyB-vermittelte LFR zu einem kurzen Hypokotyl (Nagantani *et al.*, 1993; Somers *et al.*, 1991).

Um den Effekt von phyA/O.s.WT und phyA/O.s.SA auf diese drei verschiedenen Signalwege zu untersuchen, wurden Keimlinge der verschiedenen Mutantenlinien für drei Tage unter Rotlicht (LFR), konstantem Dunkelrotlicht (HIR) und Pulsen von Dunkelrotlicht (VLFR) gezogen.

Sowohl in konstantem Rot- als auch unter Pulsen von Dunkelrotlicht führte die Expression von phyA/O.s.WT zu einem hypersensitiven Phänotyp, also zu einer minimalen, aber signifikanten Verstärkung der Hypokotylverkürzung (Abb. 8). Dabei war zu beobachten, dass dieser Effekt im phyAB-Mutantenhintergrund geringfügig stärker ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu konnte zwar durch Einbringung von phyA/O.s.SA unter gepulstem DR-Licht im phyB-Hintergrund eine dem Wildtyp vergleichbare Hypokotyllänge erzielt werden. Da aber im phyAB-Hintergrund weiterhin eine Hypokotylverlängerung beobachtet wurde, ist dieser Effekt auf endogenes A.

thaliana -*phyA* zurückzuführen. Im Rotlicht konnte für die Linien *phyB*/SA und *phyAB*/SA im völligen Gegensatz zu *phyB*/WT und *phyAB*/WT kaum eine Inhibierung der Hypokotylelongation beobachtet werden.

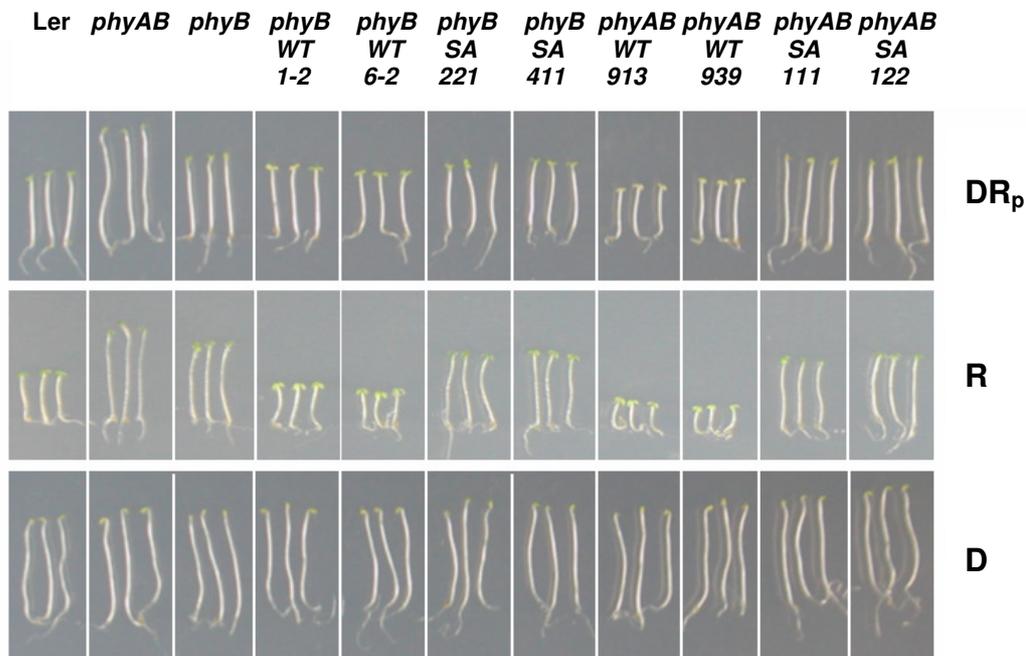


Abbildung 8: Hypokotyllänge der verschiedenen Pflanzenlinien unter Pulsen von Dunkelrotlicht und konstantem Rotlicht. Untersucht wurden *phyB* und *phyAB*-Pflanzen (*phyB*; *phyAB*) mit einer Überexpression von Reis Wildtyp-*phyA* (WT) oder von Reis *phyA* mit S zu A Substitutionen im N-Terminus (SA). Die Keimlinge wurden für drei Tage in der jeweiligen Lichtbedingung angezogen. Als Vergleichswert wurden dunkel-gezogene Keimlinge gezeigt. DR_p = Dunkelrotlichtpulse; R = Rotlicht; D = Dunkel.

Im konstanten Dunkelrotlicht zeigte sich ein völlig anderes Bild. Für alle Linien im *phyB*-Mutantenhintergrund konnten keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp entdeckt werden. Dies ist wahrscheinlich auf das endogene *A. thaliana*-*phyA* zurückzuführen. Im *phyAB*-Hintergrund ohne endogenes *phyA* wurde allerdings ein Verkürzung auf Wildtyp-Niveau für *phyAB*/SA beobachtet während *phyAB*/WT im Vergleich zum Wildtyp immer noch ein verlängertes Hypokotyl aufwies (vgl. Abb. 9).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die LFR als auch die VLFR durch *phyA*/O.s.SA über den Wildtyp-Wert hinaus verstärkt werden kann, während *phyA*/O.s.WT kaum substituieren kann. Der gegensätzliche Effekt zeigt sich für die HIR.

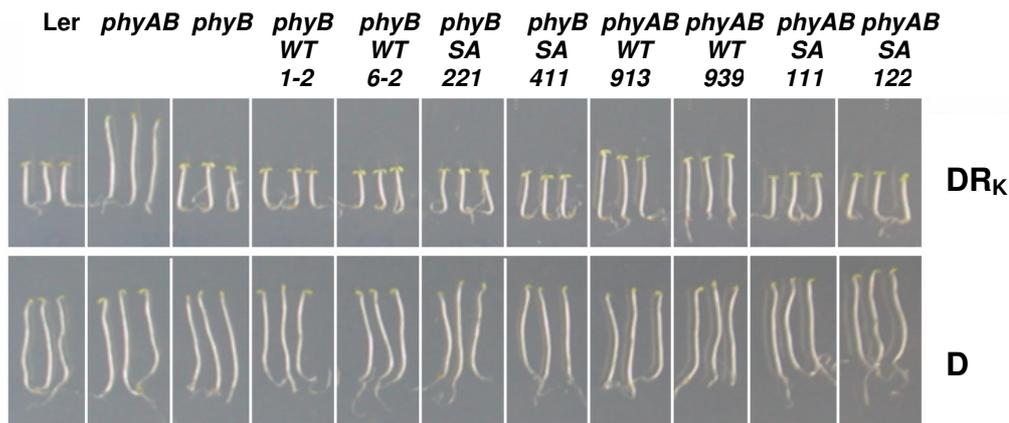


Abbildung 9: Hypokotylllänge der verschiedenen Pflanzenlinien unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht. Legende siehe Abb. 8. Die Keimlinge wurden für drei Tage in der jeweiligen Lichtbedingung angezogen. Als Vergleichswert wurden dunkel-gezogene Keimlinge gezeigt. DR_K= kontinuierliches Dunkelrotlicht; D= Dunkel.

Hier verbessert die Expression von *phyA/O.s.SA* in *phyAB* die Inhibierung der Hypokotylelongation auf Wildtyp-Niveau, während bei *phyAB/O.s.WT* weiterhin eine signifikante Hypokotylelongation zu beobachten ist.

3.1.5. Determinierung des agravitropischen Wachstums

Sowohl unter rotem- als auch dunkelrotem Licht verlieren Keimlinge die Befähigung senkrecht zur Schwerkraft zu wachsen und beginnen sich zufällig zu orientieren wodurch sie eine Art Schwingungsbewegung ausführen. *phyA*-Keimlinge wachsen mangels Dunkelrotlichtrezeptors unter dunkelrotem Lichtbedingungen weiterhin senkrecht zur Gravitationsquelle (Poppe et al., 1996; Robson & Smith, 1998). Dieser Effekt wird im Dunkelrotlicht *phyA*-abhängig über eine VLFR vermittelt. Nun stellt sich die Frage, inwiefern die unterschiedlichen *Reis phyA*-Konstrukte in der Lage sind, diesen Effekt in den *phyB* und *phyAB*-Mutante zu vermitteln. Für alle Mutantenlinien im *phyB*-Hintergrund konnte unter Dunkelrotlicht kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (nicht gezeigte Daten). Dies war vermutlich auf endogenes *phyA* zurückzuführen. Im *phyAB*-Hintergrund allerdings führte die Einbringung des Ser/Ala-Substituts zu einem dem Wildtyp vergleichbaren Phänotyp. Eine Überexpression von *phyA/O.s.WT* verbesserte den phänotypischen Defekt der *phyAB*-Mutante dagegen nur

marginal, mit einer Hauptabweichung von 10° , während *phyA*-Pflanzen völlig senkrecht wachsen (Abb. 10).

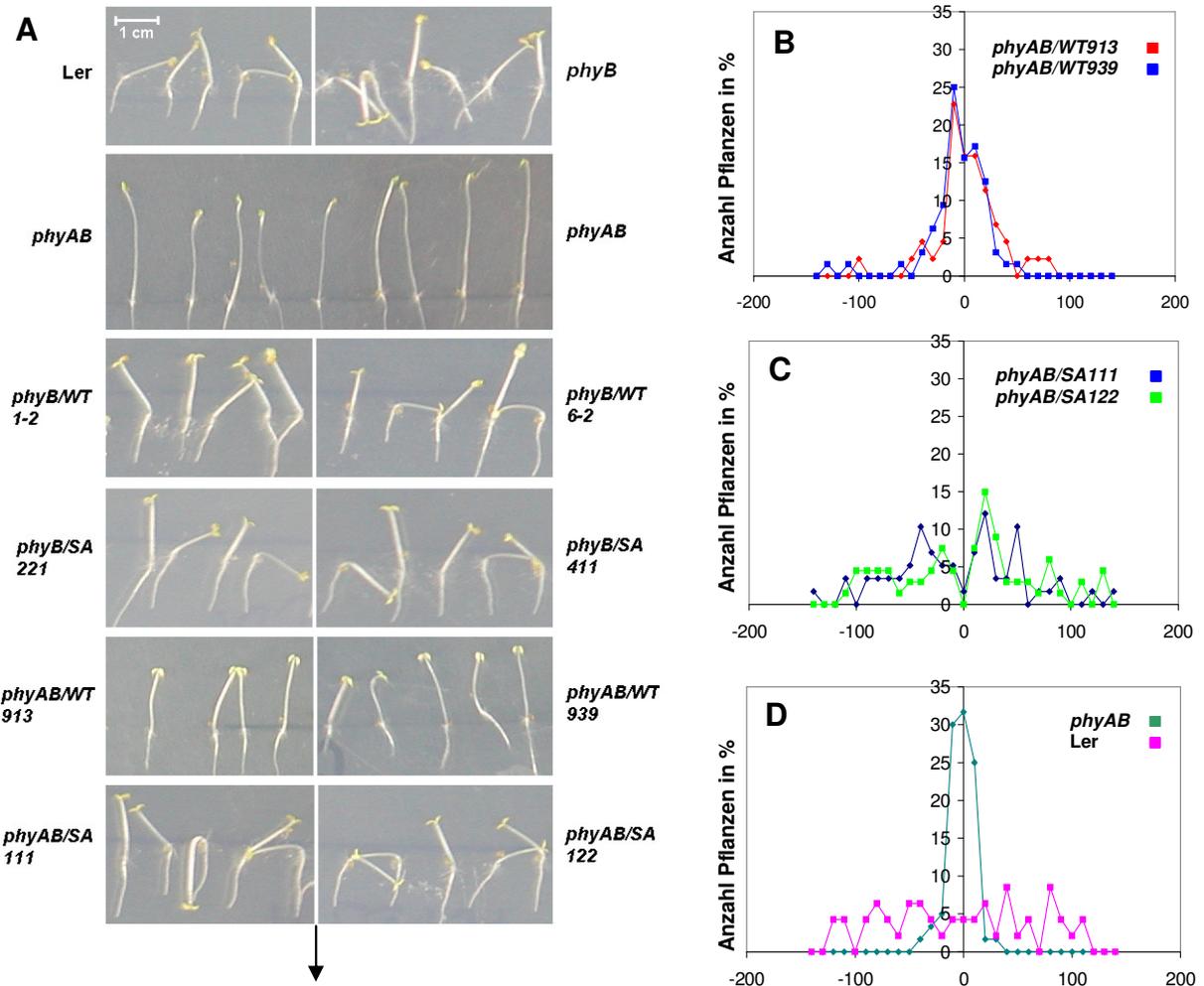


Abbildung 10: Wachstumswinkel der verschiedenen Linien unter konstantem Dunkelrotlicht. Keimlinge wurden für drei Tage unter Dunkelrotlicht auf vertikalen Platten angezogen (A). Anschließend wurde der Winkel zwischen Hypokotyl und Vertikaler ermittelt und in 10° -Schritten dargestellt (B,C,D). $n(\text{phyAB}/\text{WT939}) = 44$, $n(\text{phyAB}/\text{WT913}) = 64$, $n(\text{phyAB}/\text{SA111}) = 58$, $n(\text{phyA}/\text{SA122}) = 67$, $n(\text{phyAB}) = 60$, $n(\text{Ler}) = 47$; Die Abszisse gibt den Wachstumswinkel in Grad, die Ordinate die Anzahl der Keimlinge in Prozent an. Durch den Pfeil wird die Schwerkraft symbolisiert.

Unter Rotlicht zeigt sich für *phyAB* nur eine stark verminderte Schwingungsbewegung. *phyA/O.s.WT* konnte diesen Phänotyp auf Wildtyp-Niveau setzen, während *phyA/O.s.SA* keinerlei Effekt zeigte (nicht gezeigte Daten). Interessanterweise zeigte sich, dass im Dunkeln gewachsene Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp weniger vertikal wuchsen. Sowohl die Keimlinge der *phyAB/SA*- als auch der *phyAB/WT*-Linien nahmen mehrheitlich eine Position

zwischen 10° und 20° Abweichung von der Vertikalen ein, während Wildtyp-Keimlinge im Dunkeln zu über 40% völlig senkrecht wuchsen (Abb. 11).

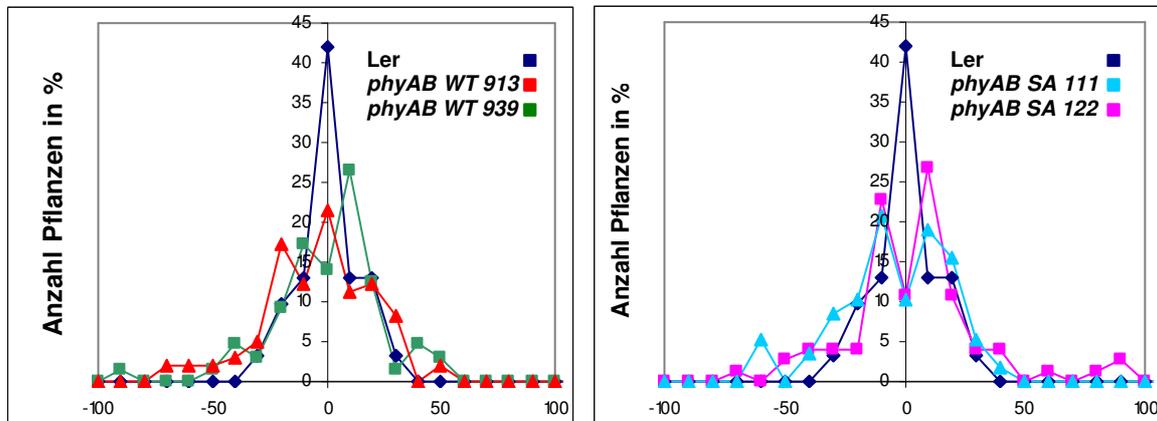


Abbildung 11: Orientierung der Hypokotyle im Dunkeln. Keimlinge wurden für drei Tage bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß auf vertikalen Platten angezogen. Anschließend wurde der Winkel zwischen Hypokotyl und Vertikaler bestimmt und in 10°-Schritten graphisch dargestellt. $n(\text{phyAB}/\text{WT939}) = 75$, $n(\text{phyA}/\text{WT913}) = 58$, $n(\text{phyAB}/\text{SA111}) = 64$, $n(\text{phyAB}/\text{SA122}) = 98$, $n(\text{Ler}) = 31$; Die Abszisse gibt den Wachstumswinkel in °, die Ordinate die Anzahl an Keimlingen in % an.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bezüglich des Verlustes des negativ-gravitropischen Wachstums unter Rot- und Dunkelrotlicht phyA O.s.SA und phyA O.s.WT den genau entgegengesetzten Komplementationseffekt im phyAB-Hintergrund hatten. Zusätzlich zeigten sowohl die phyAB/WT- als auch die phyA/SA-Linien im Dunkeln schwache Schwingungsbewegungen (vgl. Tab. 13).

Tabelle 13: Überblick über die Hypokotylausrichtung unter verschiedenen Lichtbedingungen

	<i>phyAB</i> /WT	<i>phyAB</i> /SA	<i>phyAB</i>	
Dunkelrotes Licht	V	V	I	V Willkürliche Ausrichtung mit starken Schwingungsbewegungen ähnlich dem Wildtyp V Schwache Schwingungsbewegungen, intermediärer Phänotyp I Keine Schwingungsbewegungen, vertikales Wachstum
Rotes Licht	V	V	I	
Dunkel	V	V	I	

3.1.6. Akkumulation von Chlorophyll nach Bestrahlung mit Dunkelrotlicht

Mehrtägige Bestrahlung mit Dunkelrotlicht resultiert bei Wildtypkeimlingen in einem Unvermögen, im Weißlicht zu ergrünen (Barnes *et al.*, 1996). Dieses als „Far-red-Killing“-Effekt bekannte Phänomen kann auf das Enzym PORA zurückgeführt werden. PORA katalysiert die Umsetzung von reduziertem Protochlorophyllid zu Chlorophyll und akkumuliert in etiolierten Keimlingen zu großen Mengen. Bei Belichtung wird Protochlorophyllid reduziert und durch PORA zu Chlorophyll umgesetzt, während gleichzeitig die PORA-Expression negativ reguliert wird. Dunkelrotlicht induziert zwar die Repression der PORA-Expression, hemmt aber gleichzeitig die enzymatische Aktivität des Proteins. Darüber hinaus akkumuliert Protochlorophyllid im Dunkelrotlicht in der nicht phototransformierbaren F_{632} -Form. Aus diesem Grund erfolgt unter Bestrahlung mit reinem Dunkelrotlicht keine Ergrünung der Keimlinge (Runge *et al.* 1996). Bei einem anschließenden Transfer des Keimlings in Weißlicht unterbleibt weiterhin die Chlorophyllsynthese, da kaum noch PORA vorhanden ist. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Akkumulation von F_{632} unter Weißlicht zu photooxidativem Stress führt (Franck *et al.*, 2000). Dieser „Far-red-Killing“ Effekt kann nicht nur nach kontinuierlichem Dunkelrotlicht, sondern auch nach DR-Pulsen beobachtet werden. Allerdings sind unter letzteren Lichtbedingungen Wildtypkeimlinge noch in der Lage eingeschränkt Chlorophyll zu produzieren (Fankhauser & Casal, 2004).

Im vorliegenden Experiment wurden Keimlinge der unterschiedlichen Mutantenlinien drei Tage entweder in kontinuierlichem Dunkelrotlicht oder unter DR-Pulsen angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen für drei Tage ins Weißlicht transferiert und dann der Chlorophyllgehalt bestimmt. Alle Linien mit Ausnahme von *phyAB* zeigten eine vollständige Ergrünungsblockade nach Bestrahlung mit kontinuierlichem Dunkelrotlicht (nicht gezeigte Daten). Damit konnten sowohl die Wildtyp-Form des Reis-*phyA*, als auch die Ser/Ala-Substitution *phyA/A.th.* ersetzen. Unter Pulsen von Dunkelrotlicht zeigte sich allerdings ein anderes Bild (Abb. 12): Sowohl in *phyB*- als auch in *phyAB*-Mutanten verstärkten die Expression von *phyA/O.s.WT* die Ergrünungsblockade. Für *phyB/SA* war eine Normalisierung der Ergrünungsblockade auf Wildtyp-Niveau zu beobachten. Dieser Effekt ist vermutlich auf das endogene *phyA* zurückzuführen, da sowohl für *phyAB/SA* als auch für *phyAB* eine starke Ergrünung und damit einen völligen Verlust der Ergrünungsblockade zu beobachten war.

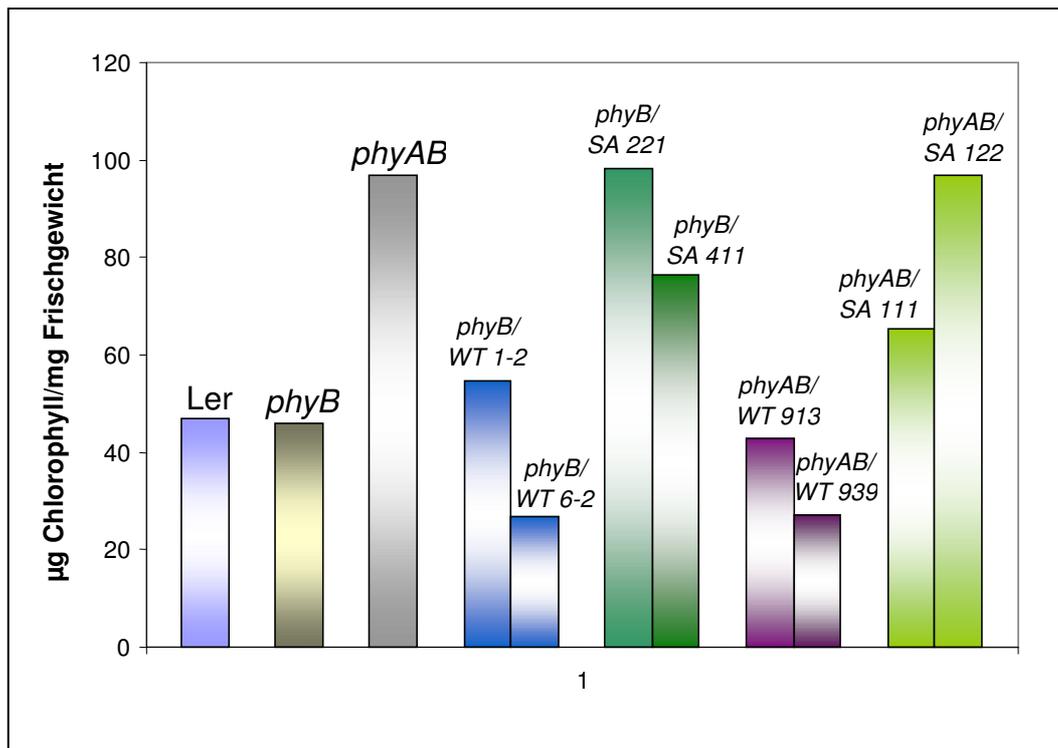


Abbildung 12: Akkumulation von Chlorophyll nach Inkubation unter Pulsen von Dunkelrotlicht und anschließendem Transfer ins Weißlicht. Keimlinge wurden für drei Tage unter Pulsen ($0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; 5 min/h) angezogen und anschließend für drei Tage in Weißlicht ($80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) überführt. Dann wurde der Chlorophyllgehalt pro mg Frischgewicht bestimmt. Angegeben sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes.

3.1.7. Bestimmung des Blühzeitpunktes

Für *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg als typische Langtagpflanze wird die Blühinduktion durch Überschreitung einer kritischen Tageslänge induziert und bedarf nicht der Vernalisierung. Der Eintritt in die Blüte wird dabei über verschiedene Lichtrezeptoren, vornehmlich phyA, phyB und verschiedene Cryptochrome, gesteuert. phyA hat dabei einen fördernden Effekt auf die Blühinduktion, phyB und Cryptochrome einen hemmenden. Für die phyA-Mutante resultiert das in einer Verzögerung der Blühinduktion, während phyB-Mutanten früher blühen (Reed *et al.*, 1994; El-Din El-Assal *et al.*, 2001; 2003).

Im vorliegenden Experiment wurden die unterschiedlichen Linien unter Langtagbedingungen (16 h WL/Tag) bis zum Erscheinen der In fluoreszenz angezogen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Anzahl der Rosettenblätter bestimmt (Abb. 13).

Hierbei zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen Wildtyppflanzen bei einer Rosettengröße von $7 \pm 0,45$ Blättern die Infloreszenz bildeten. *phyB* kam bereits mit durchschnittlich $5,25 \pm 0,49$ Blättern zur Blüte, *phyAB* sogar noch früher mit $4 \pm 0,5$ Blättern.

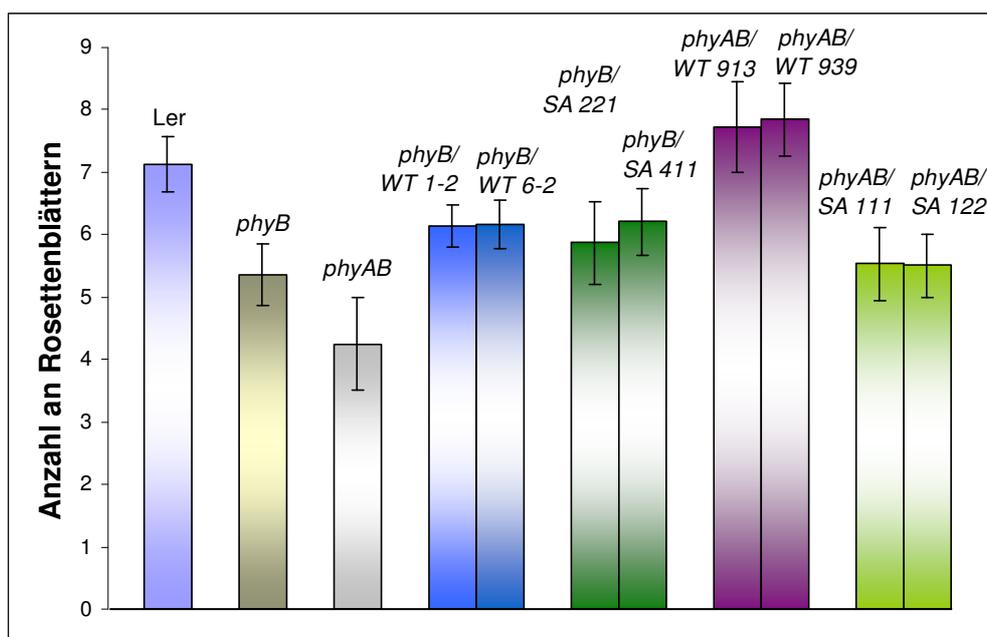


Abbildung 13: Bestimmung des Zeitpunkts der Blüte. Pflanzen wurden bis zum Erscheinen der Infloreszenz unter Langtagbedingungen (16 h Licht/Tag) auf Erde kultiviert. Als Maß für den Eintritt in die Blüte wurde die Anzahl an Rosettenblättern zum Zeitpunkt des Erscheinens der Infloreszenz gemessen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Für *phyB/WT* und *phyB/SA* konnte eine Verlängerung der vegetativen Phase auf ungefähr $6 \pm 0,39$ Blätter beobachtet werden. Ohne endogenes *phyA* zeigte sich allerdings für *phyAB/WT*-Linien eine Verlängerung der Zeitspanne bis zur Blühinduktion auf Wildtypniveau. *phyAB/SA*-Linien hingegen waren mit einer durchschnittlichen Rosettengröße von $5,5 \pm 0,5$ Blättern zwar später zur Blüte gekommen als *phyAB*, allerdings konnte durch *phyA/O.s.SA* nur auf *phyB*-Niveau komplementiert werden. Somit kann anscheinend *phyA/O.s.WT* bezüglich der Blühinduktion für *phyA* und *phyB* zumindest teilweise komplementieren, während *phyA/O.s.SA* dies nur für *phyA* vermag.

Die phänotypische Charakterisierung der Linien *phyB/WT*, *phyB/SA*, *phyAB/WT* und *phyAB/SA* ergab in vielen Fällen gegensätzliche Auswirkungen einer Überexpression von Reis-*phyA* oder von Reis *phyA* mit mutagenisiertem N-Terminus. Das kann als starkes Indiz gewertet werden, dass die Initiierung der HIR oder der VLFR im *phyA*-Molekül selbst seinen Ursprung nimmt. Dabei scheint den Serinresten des N-Terminus als putativen Phosphorylierungsstellen eine besondere Rolle zu zukommen. Beide Signalwege sind zumindest teilweise voneinander unabhängig und verfügen über spezifische Komponenten. Bisher konnten allerdings für die VLFR keine spezifischen Intermediate molekular charakterisiert werden. Mit *owl1* wird im Folgenden die erste Mutante mit spezifischen Defekten in der VLFR, ohne Funktion in der HIR, beschrieben werden.

3.2. Die Mutante *owl1-1*

owl1-1 wurde von Dr. C. Bolle im Rahmen eines Mutanten“screens“ unter schwachem kontinuierlichem DR-Licht isoliert. Dabei fiel *owl1-1* durch ein geringfügig verlängertes Hypokotyl sowie einen eingeschränkten „Far-red-Killing“ Effekt auf. Weitere Studien im Rahmen der Diplomarbeit von V. Wachtler zeigten, dass dieser Phänotyp unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht nicht reproduzierbar war. Darüber hinaus war im Rahmen dieser Diplomarbeit ein Anti-OWL1-Antikörper in Mäusen sowie zwei OWL1-Überexpressionslinien mit OWL1 unter der Kontrolle des 35S-Promotors (OWL1-OE1, OWL1-OE2) hergestellt worden, die auch für die vorliegende Arbeit verwendet wurden (Wachtler 2000).

In *owl1-1* ist der offene Leserahmen eines Gens, das für ein J-Protein kodiert, durch eine T-DNA-Insertion unterbrochen. Dieses J-Protein trägt als einzige bekannte Aminosäure-Motive eine J-Domäne am N-Terminus. OWL1 wurde erstmals 1995 von Kushnir *et al.* beschrieben, der auf der Suche nach *A. thaliana*-Proteinen, die eine erhöhte Toleranz gegenüber oxidativen Stress bewirken, eine in Hefe-Expressionsvektor klonierte cDNS-Bank aus *A. thaliana* in *S. cerevisiae* transformiert hatte. Um oxidativen Stress zu simulieren, wurde die Hefe auf Diamidhaltigem Medium angezogen. Unter diesen Bedingungen konnten drei Proteine, darunter OWL1, isoliert werden, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Diamid vermittelten (Kushnir *et al.* 1995). Die *A. thaliana*-Mutante *owl1* wurde daher auf ihren Phänotyp unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht (u.a. Hitze, Kälte, osmotischer und oxidativer Stress), allerdings ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp zu finden.

3.2.1. Molekulare Charakterisierung der Mutanten *owl1-1* und *owl1-2*

Neben *owl1-1* wurde mit Hilfe von reverser Genetik im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Allel, *owl1-2* isoliert. Bei den Linien *owl1-1* und *owl1-2* handelte es sich um Mutanten im *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col). OWL1 (At2g35720) ist auf Chromosom II lokalisiert. In der Mutante *owl1-1* ist das Gen durch T-DNA-Insertion im zweiten Exon unterbrochen, während die Mutante *owl1-2* eine T-DNA-Insertion im 5. Intron trägt.

Um die Homozygotie der beiden Mutanten zu verifizieren wurde genomische DNA aus beiden Linien extrahiert. Anschließend wurde durch eine PCR-Reaktion mit die Insertionsstelle flankierenden Oligonukleotiden das Vorhandensein der Insertion überprüft. Für die Oligonukleotidkombination 1/2 ist im Wildtyp-Gen ein Produkt mit einer Länge von 1500 Bp zu erwarten, für Oligonukleotidkombination 3/4 ein Produkt von 1100 Bp (vgl. Abb. 14).

Es war nicht möglich, mit Kombination 1/2 für *owl1-1* oder mit Kombination 3/4 für *owl1-2* Produkte zu erzielen, was bedeutet, dass die T-DNA-Insertion auf beiden Chromosomen vorhanden ist, da im Wildtyp ein PCR-Produkt erhalten wurde. Um zu zeigen, dass das Ausbleiben der PCR-Produkte nicht auf eine mangelhafte Qualität der DNA zurückzuführen war, wurde im Gegenversuch mit den Oligonukleotiden 1/2 eine PCR-Reaktion auf genomische DNA von *owl1-2* und mit den Oligonukleotiden 3/4 auf *owl1-1* durchgeführt. In beiden Fällen konnten PCR-Produkte amplifiziert werden. Zusätzlich wurde versucht, die Insertion selbst mit Gen- und Insertions-spezifischen Oligonukleotiden nachzuweisen. Hier war es möglich, über eine PCR-Reaktion Produkte zu amplifizieren (nicht gezeigte Daten).

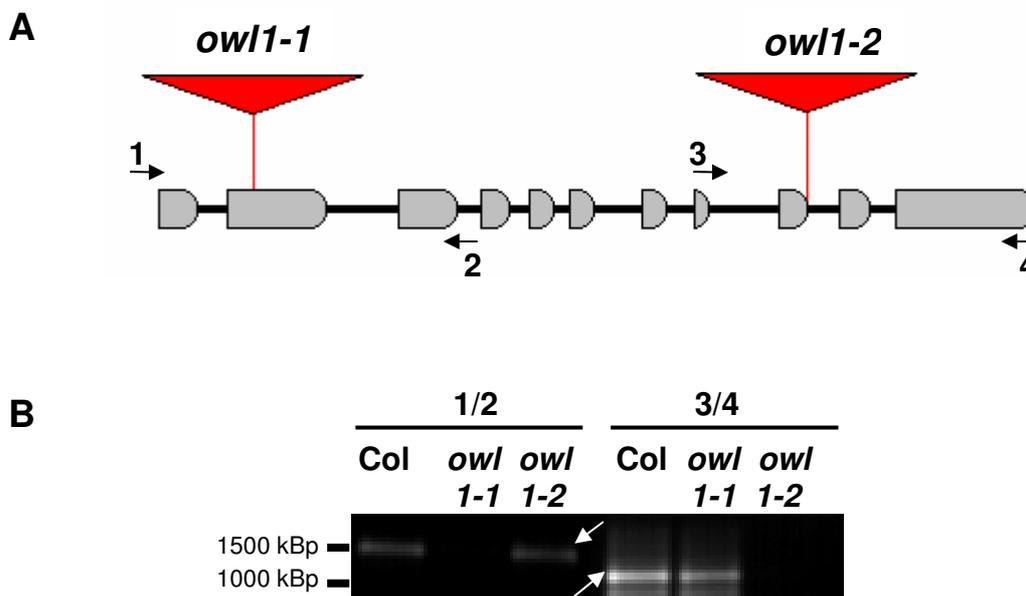


Abbildung 14: Überblick über die Lokalisation der T-DNA-Insertionen in den Mutantenlinien *owl1-1* und *owl1-2*. (A) Schematische Darstellung von *OWL1*. Graue Balken = Exons; schwarzer Strich = Introns. Numerierte Pfeile = für PCR-Reaktion verwendete Oligonukleotide; rotes Dreieck = T-DNA-Insertion. (B) Ergebnisse der PCR-Reaktion zum Nachweis der Insertionen in *owl1-1* und *owl1-2*. Pfeile weisen auf die relevanten Produkte hin. 1/2, 3/4 = Oligonukleotidkombination 1/2, 3/4.

Trotz der Unterbrechung eines Gens durch eine Insertion könnte es weiterhin zu einer Expression, beispielsweise eines verkürzten Produktes, kommen. Um die Expression von OWL1 in den beiden Mutantenlinien zu bestimmen wurde aus zwei-Wochen alten, in Weißlicht gezogenen Pflanzen RNA isoliert und mittels reverser Transkriptase transkribiert. Die so erhaltene cDNA wurde mit verschiedenen Oligonukleotidkombinationen auf ihren Gehalt an exprimierten OWL1-Fragmenten untersucht. Dabei wurde versucht, jeweils ein Fragment des 5'- und des 3'-Bereichs zu amplifizieren (vgl. Abb. 15).

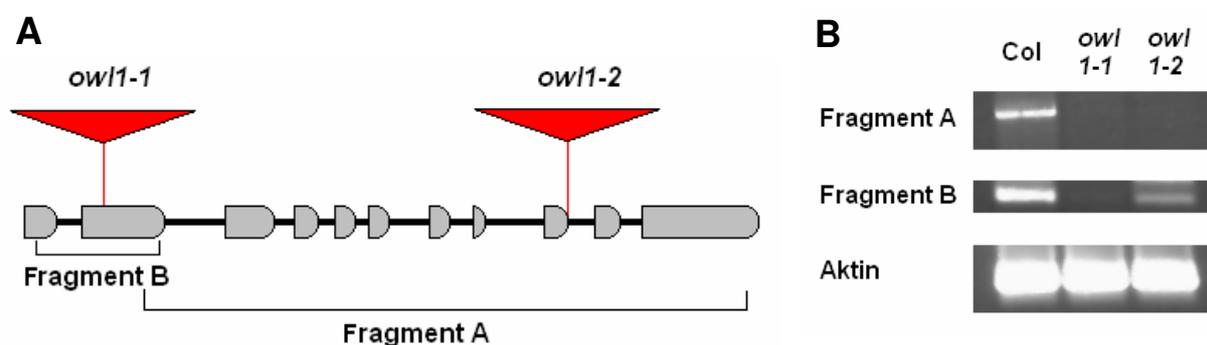


Abbildung 15: Überprüfung der Expression von OWL1 in *owl1-1* und *owl1-2* anhand von RT-PCR. (A) Überblick über die Lokalisation der amplifizierten Produkte. (B) Ergebnisse der RT-PCR mit Aktin als Kontrollwert.

Während für die Mutante *owl1-1* in keinem Fall Produkte nachgewiesen werden konnten, war es für die Mutante *owl1-2* möglich, ein Produkt zu amplifizieren. Dies bedeutet, dass ein Teil des Gens weiterhin exprimiert wird. Trotzdem fällt auf, dass im Vergleich zu der Transkriprate im Wildtyp *owl1-2* über eine reduzierte Transkriptkonzentration verfügt, was möglicherweise auf eine erhöhte Instabilität des verkürzten Transkriptes zurückzuführen ist.

Nach der Bestimmung der Transkriptionsrate von OWL1 sollte anhand einer Immunodetektion der Proteingehalt von OWL1 in den Linien *owl1-1*, *owl1-2* sowie der Überexpressionslinien OWL1-OE1 und OWL1-OE2 überprüft werden. Dazu wurde ein Gesamtproteinextrakt aus drei-Wochen-alten Wildtyp- und Mutantepflanzen gewonnen und das Protein mit OWL1-spezifischen Antikörpern detektiert. Während es möglich war, OWL1 im Wildtyp, sowie eine erhöhte Konzentration in den beiden Überexpressionslinien zu detektieren, war es nicht möglich, OWL1 in den Mutanten *owl1-1* und *owl1-2* nachzuweisen (vgl. Abb. 16). Darüber hinaus konnte in *owl1-2* auch kein verkürztes Protein entdeckt werden.

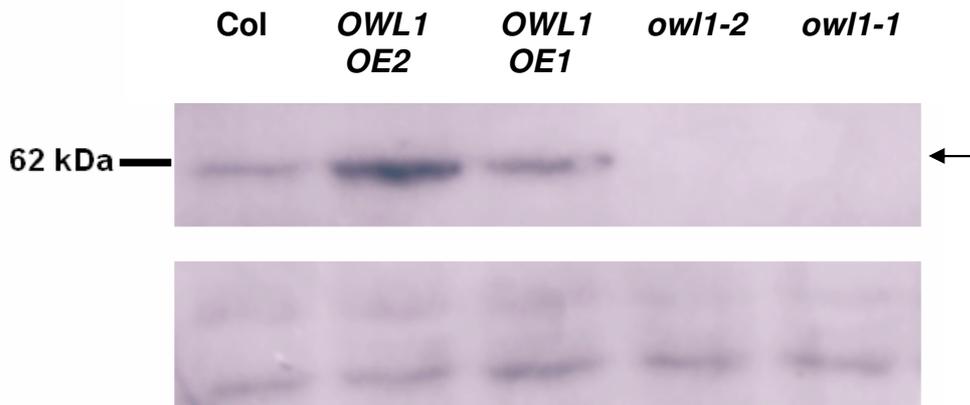


Abbildung 16: Gehalt an OWL1 im Pflanzenextrakt von *owl1-1*, *owl1-1*, OWL1-OE1, OWL1-OE2 sowie des Wildtypes. Gesamtprotein wurde aus drei-Wochen alten Pflanzen extrahiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend eine Immunodetektion mittels OWL1-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Der Pfeil weist auf das spezifische Signal von OWL1 hin, die unteren Banden stellen unspezifische Signale als Ladungskontrolle dar.

Trotzdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass in *owl1-2* ein verkürztes Protein gebildet wird. Zum einen ist bereits die Konzentration an mRNA stark reduziert, was zu einer verminderten Proteinkonzentration - eventuell unter der Detektionsgrenze - führen kann. Zum anderen waren auf Grund von unspezifischen Antikörperbindungen im niedrigeren Peptidbereich immer eine Vielzahl von Signalen detektiert worden. Da diese unspezifischen Signale teilweise relativ stark waren, ist es durchaus denkbar, dass ein schwaches Signal des verkürzten OWL1 überdeckt worden wäre.

3.2.2. Phänotypische Charakterisierung der Linien *owl1-1*, *owl1-2*, *OWL1-OE1* und *OWL1-OE2*

Um die Rolle von OWL1 in der Lichtsignaltransduktion zu testen wurde an den Mutationslinien *owl1-1* und *owl1-2* sowie den Überexpressionslinien *OWL1-OE1* und *OWL1-OE2* eine phänotypische Charakterisierung im Bezug auf die Inhibierung der Hypokotyllänge unter verschiedenen Lichtbedingungen, dem agravitropischen Verhalten, dem Keimungsvermögen, der Ergrünungsblockade sowie der Blütezeit durchgeführt. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die VLFR und die HIR gelegt.

3.2.2.1. Inhibierung der Hypokotylelongation

Für diesen Versuch wurden Keimlinge der verschiedenen Linien für drei Tage unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht (HIR), Pulsen von Dunkelrotlicht (VLFR) und kontinuierlichem Rotlicht (LFR) angezogen. Als Referenz wurden parallel Keimlinge im Dunkeln bei gleicher Temperatur kultiviert.

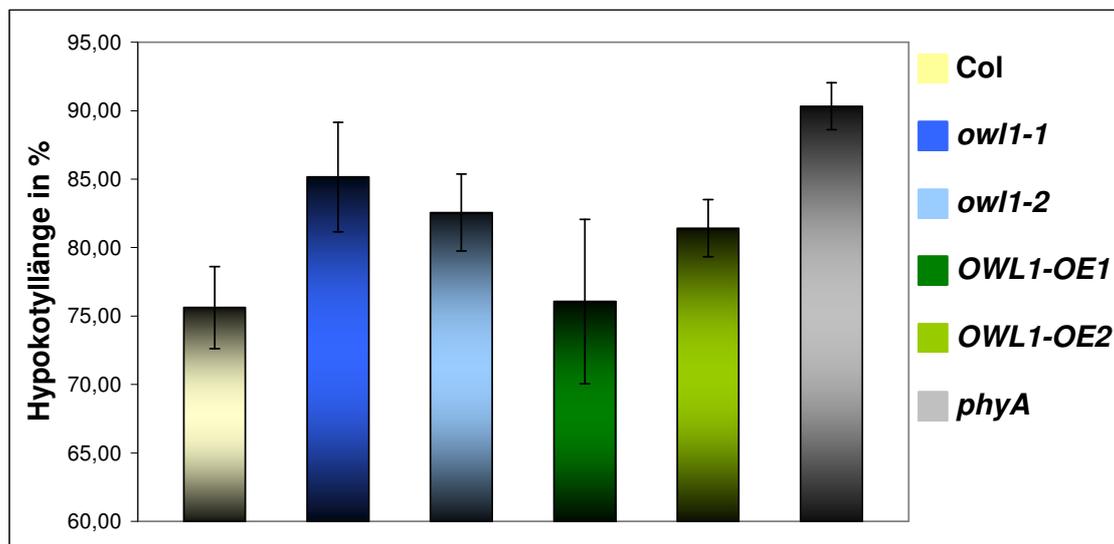


Abbildung 17: Hypokotyllänge nach drei-tägiger Bestrahlung mit Pulsen von Dunkelrotlicht ($0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 5 min/h). Angegeben ist die Hypokotyllänge in % zur Hypokotyllänge von dunkel gezogenen Keimlingen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Bei der Bestimmung der Hypokotyllänge fiel auf, dass unter Pulsen von dunkelrotem Licht *owl1-2* und *owl1-2* im Vergleich zum Wildtyp signifikant verlängert waren ($p < 0,01$). Allerdings war gegenüber *phyA* immer noch eine deutliche Hypokotylverkürzung zu verzeichnen, womit dieser Phänotyp als intermediär zu bezeichnen ist (vgl. Abb. 17). Für die Überexpressionslinien war zu beobachten, dass die schwächere Überexpressionslinie *OWL1 OE1* eine Hypokotyllänge ähnlich dem Wildtyp zeigte, während auch die stärkere Überexpressionslinie *OWL1 OE2* ein verlängertes Hypokotyl aufwies. Dies könnte als Indiz für eine Substratüberschusshemmung gewertet werden.

Weder unter kontinuierlichem Rot, noch unter Dunkelrotlicht konnte ein signifikanter Unterschied gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden (Abb. 18). Diese Resultate deuten darauf hin, dass bezüglich der Inhibierung der Hypokotylelongation durch *OWL1* ein spezifischer Defekt nur in der VLFR vorhanden ist.

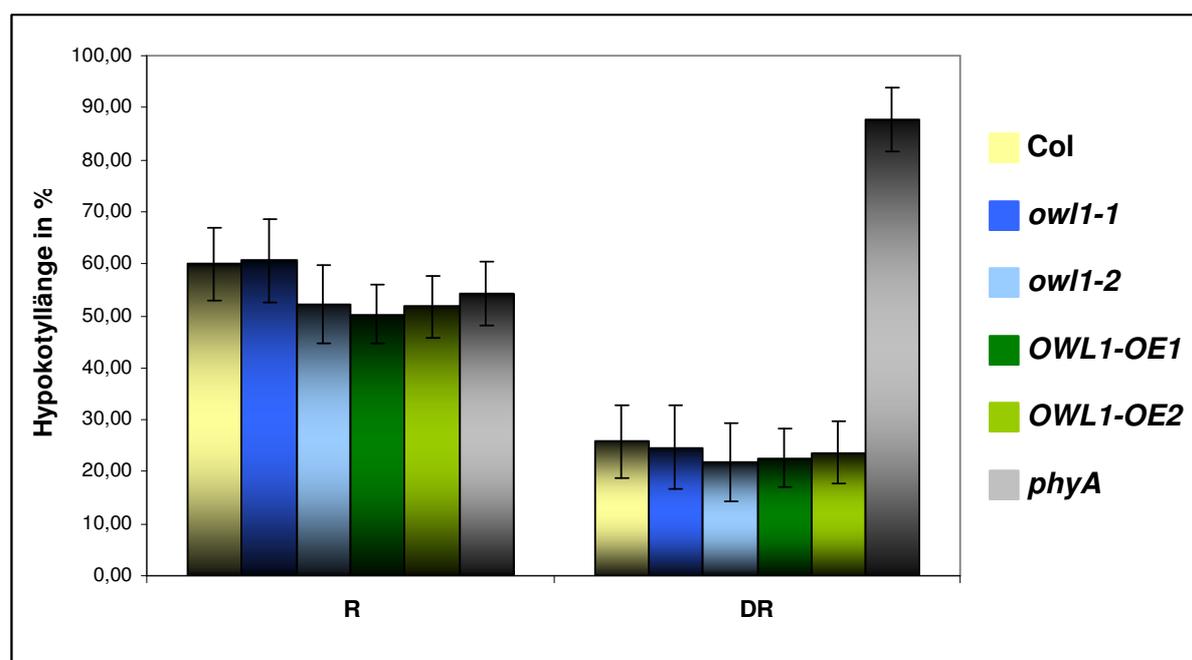


Abbildung 18: Hypokotyllänge nach drei-tägiger Bestrahlung mit kontinuierlichem Dunkelrot ($0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; DR) oder Rotlicht ($0,05 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; R). Angegeben ist die Hypokotyllänge in % zur Hypokotyllänge von dunkel gezogenen Keimlingen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Durch Bestimmung der Hypokotyllänge von *owl1-1* und *owl1-2* unter geringen, sich steigernden Dosen von Rotlicht konnte die Beobachtung eines spezifischen Defektes in der VLFR zusätzlich noch bekräftigt werden. Bei Lichtintensitäten von weniger als $0,02 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ und damit im Aktionsbereich der VLFR waren die Hypokotyle von *owl1-1* und *owl1-2* signifikant verlängert, ebenso wie bei *phyA* ($p < 0,01$). Höhere Lichtintensitäten führten über die *phyB*-vermittelte LFR

in allen vier Linien zu einem vergleichbar verkürzten Hypokotyl (vgl. Abb. 19). In diesem Bereich waren keinerlei signifikanten Unterschiede festzustellen.

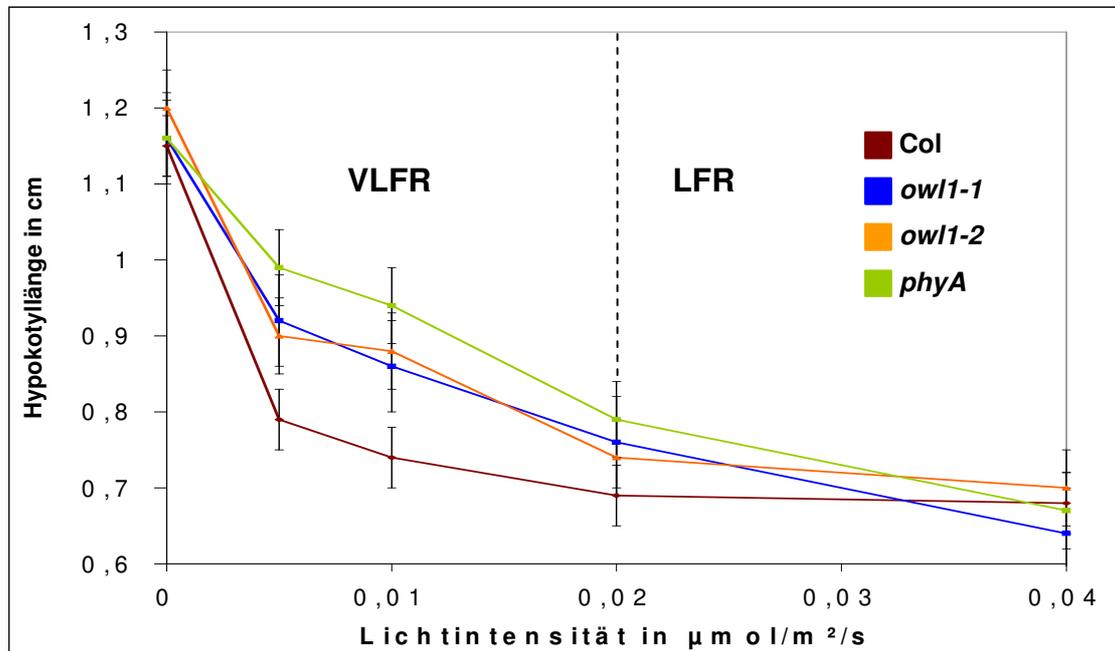


Abbildung 19: Hypokotyllänge nach dreitägiger Bestrahlung Rotlicht verschiedener Intensitäten. Keimlinge wurden entweder für drei Tage im Dunkeln oder unter Rotlicht der Intensitäten 0,005, 0,01, 0,02 und 0,04 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ inkubiert. Angegeben ist die Hypokotyllänge in cm (Ordinate) gegen die Lichtintensität in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Abszisse). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.2.2.2. Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen.

In einem weiteren Experiment wurde die Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen untersucht. Dazu wurden zum einen Samen mit Wasser zum Quellen gebracht. Drei Stunden später wurde für 5 min mit Rotlicht bestrahlt, um die Effektivität der phyB-vermittelten LFR zu bestimmen. Zum anderen wurden Keimlinge für 48 h im Dunkeln inkubiert und anschließend für 15 min Dunkelrotlicht (VLFR) bzw. Weißlicht (Gesamtkeimungsrate) ausgesetzt. Die Keimungsrate wurde nach erneuter Inkubation für zwei Tage im Dunkeln bestimmt. Im ersten Fall sollte nur die phy-vermittelte VLFR, im zweiten Fall zusätzlich die phyB-vermittelte LFR angeregt werden. Durch Bestrahlung mit Dunkelrotlicht konnte für *owl1-1* und *phyA* keine Keimung induziert werden (vgl. Abb. 20). Dagegen war für die Überexpressionslinie mit $55\% \pm 3\%$ Keimungsrate eine deutliche Verbesserung gegenüber dem Wildtyp ($19\% \pm 2,5\%$) zu

beobachten. Im Gegensatz dazu waren alle Linien in der Lage, unter Rotlicht und Weißlicht zu über 90% zu keimen. Nur bei *phyB* war im Rotlicht die Keimfähigkeit reduziert.

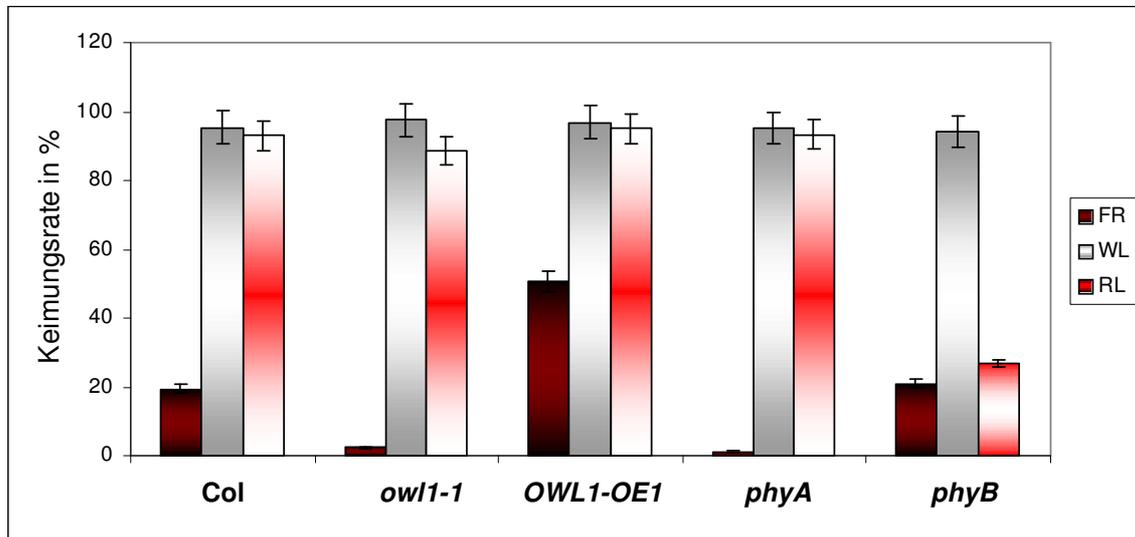


Abbildung 20: Keimungsrate von *owl1*-Mutantenlinien unter verschiedenen Lichtbedingungen. Samen wurden drei Stunden nach dem Auslegen mit Rotlicht bestrahlt (RL) oder für 48 h dunkel aufbewahrt und dann 5 min Dunkelrotlicht (FR) oder Weißlicht (WL) ausgesetzt. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben.

3.2.2.3. Agravitropisches Wachstum unter Dunkelrotlicht

Für diesen Versuch wurden Keimlinge der unterschiedlichen Linien für drei Tage auf vertikalen Platten unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht ($0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) angezogen und anschließend der Winkel zwischen Hypokotyl und Vertikaler vermessen. Sowohl bei Wildtyp-Pflanzen, als auch bei den Überexpressionslinien zeigte sich eine hochgradig zufällige Ausrichtung des Hypokotyls unter diesen Lichtbedingungen. Bei *owl1-1* und *owl1-2* hingegen häuften sich Hypokotyle mit einer eher vertikalen Ausrichtung (Abb. 21). Folglich führte die Abwesenheit von OWL1 zu einer Abschwächung dieser Reaktion des VLFR-Signalwegs. Nichtsdestotrotz zeigten *owl1-1* und *owl1-2* gegenüber *phyA* immer noch eine deutlich verstärkte Schwingungsbewegung. Somit kann festgehalten werden, dass der Verlust von OWL1 zwar mit einem eingeschränkten Verlust des negativ-gravitropischen Wachstums unter Dunkelrotlicht einhergeht, allerdings nicht zu einem völligen Verlust führt. Bezüglich des Verlustes des negativ-gravitropischen Wachstums unter Rotlicht konnten keinerlei Unterschiede zwischen *owl1-1*,

owl1-2, *OWL1-OE1* und *OWL1-OE2* festgestellt werden (nicht gezeigte Daten). Folglich handelt zeigt *owl1* auch bei dieser Reaktion spezifische Defekte nur in der VLFR.

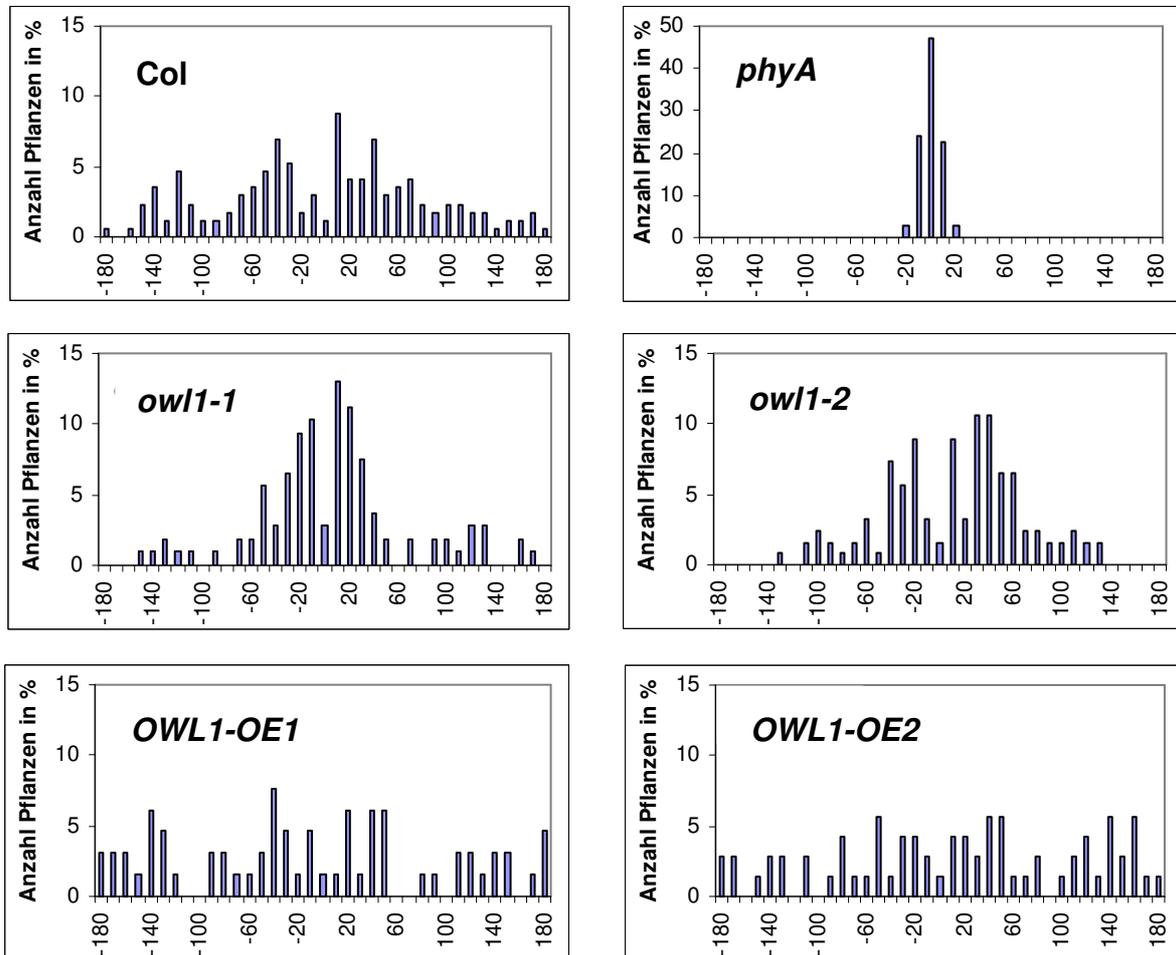


Abbildung 21: Verteilung der Hypokotylwachstumswinkel der Linien *owl1-1*, *owl1-2*, *OWL1-OE1*, *OWL1-OE2*, *phyA* sowie des Wildtyps. Pflanzen wurden für drei Tage auf vertikalen Platten unter Dunkelrotlicht angezogen. Anschließend wurde der Winkel zwischen Hypokotyl und Vertikale vermessen und in 10°-Schritten aufgetragen. Abszisse = Wachstumswinkel in °, Ordinate = Anzahl Pflanzen in %. n (Col) = 172, n (*owl1-1*) = 107, n (*owl1-2*) = 123, n (*OWL1-OE1*) = 70, n (*OWL1-OE2*) = 65, n (*phyA*) = 66. Bitte die abweichende Ordinate bei *phyA* beachten.

3.2.2.4. Ergrünungsvermögen nach Bestrahlung mit Dunkelrotlicht

Um das Ergrünungsvermögen nach Bestrahlung mit Dunkelrotlicht zu untersuchen, wurden Keimlinge entweder für fünf Tage unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht oder unter Pulsen von Dunkelrotlicht angezogen und anschließend für drei Tage in Weißlicht überführt. Unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht konnten alle untersuchten Linien mit Ausnahme von *phyA* kein Chlorophyll akkumulieren. Nach Bestrahlung mit Dunkelrotlichtpulsen allerdings waren *owl1-1* und *owl1-2* in der Lage, deutlich besser als der Wildtyp zu ergrünen. Die Überexpression von OWL1 allerdings führte in *OWL1-OE1* und *OWL1-OE2* zu einer stärkeren Unterdrückung der Chlorophyllakkumulation als im Wildtyp (vgl. Abb. 22).

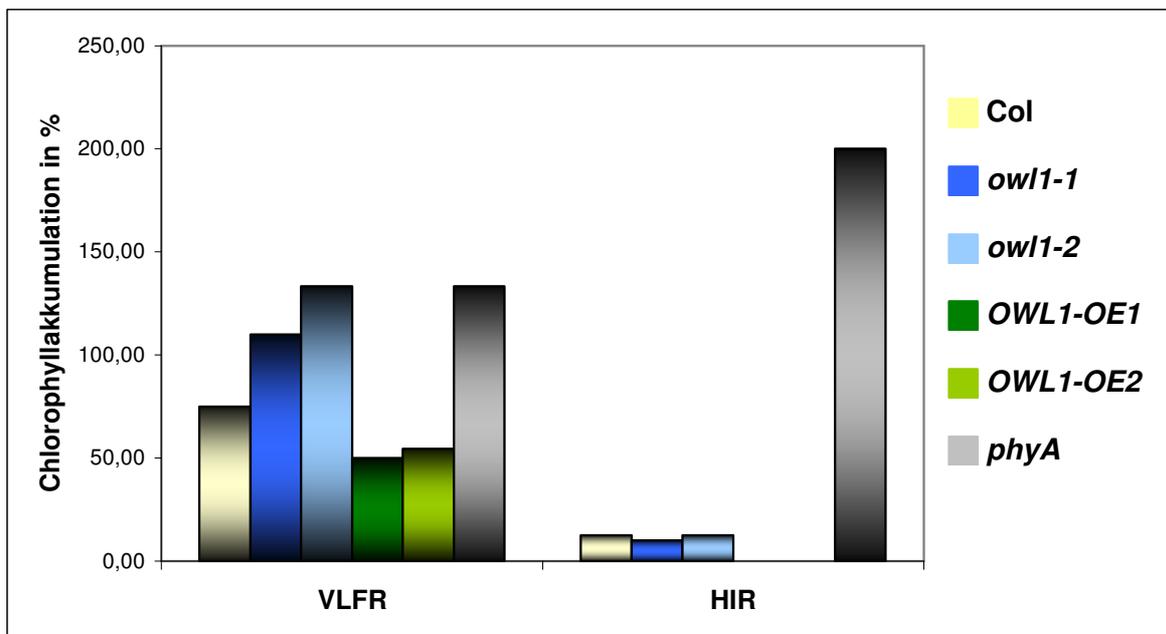


Abbildung 22: Gehalt an Chlorophyll in verschiedenen *owl1*-Linien sowie *phyA* und Wildtyp nach fünftägiger Inkubation in kontinuierlichem Dunkelrotlicht (HIR; $0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) oder unter Dunkelrotlichtpulsen (VLFR; $0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 5 min/h) und anschließender dreitägiger Überführung in Weißlicht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Angegeben ist der Chlorophyllgehalt im Vergleich zu dem Chlorophyllgehalt von Keimlingen, die 5 Tage im Dunkeln und 3 Tage im Weißlicht angezogen wurden (100%). Mindestens drei weitere Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

3.2.2.5. Zeitspanne bis zur Induktion der Blüte

Um die Funktion von OWL1 in der adulten Pflanze zu untersuchen, wurde die, u.a. durch *phyA* gesteuerte, Blühinduktion untersucht. Hierfür wurden Pflanzen unter Langtag-Bedingungen bis zur Blütenbildung angezogen und als Maß für den Zeitpunkt der Blühinduktion die Anzahl der Rosettenblätter bei Erscheinen der Infloreszenz bestimmt. Unter diesen Bedingungen kam der Wildtyp bei einer durchschnittlichen Rosettengröße von $13 \pm 0,73$ Blättern zur Blüte (Abb. 23). Ein Verlust von *phyB* verkürzte die Zeit bis zur Blühinduktion erheblich (6 Blätter $\pm 0,76$), während die Mutante *phyA* mit Rosettengrößen von über 20 Blättern $\pm 1,6$ erheblich später zur Blüte kamen. Bezüglich der *owl1*-Linien konnten zwar nur geringe, aber doch signifikante Unterschiede determiniert werden: Der Verlust von OWL1 führte zu einer Verlängerung der Zeit bis zur Blühreife $p < 0,01$. Dagegen resultierte die starke Überexpression von OWL1 in *OWL1-OE2* zur früheren Induktion der Blüte ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu konnte für den schwachen Überexpressor *OWL1-OE1* kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden.

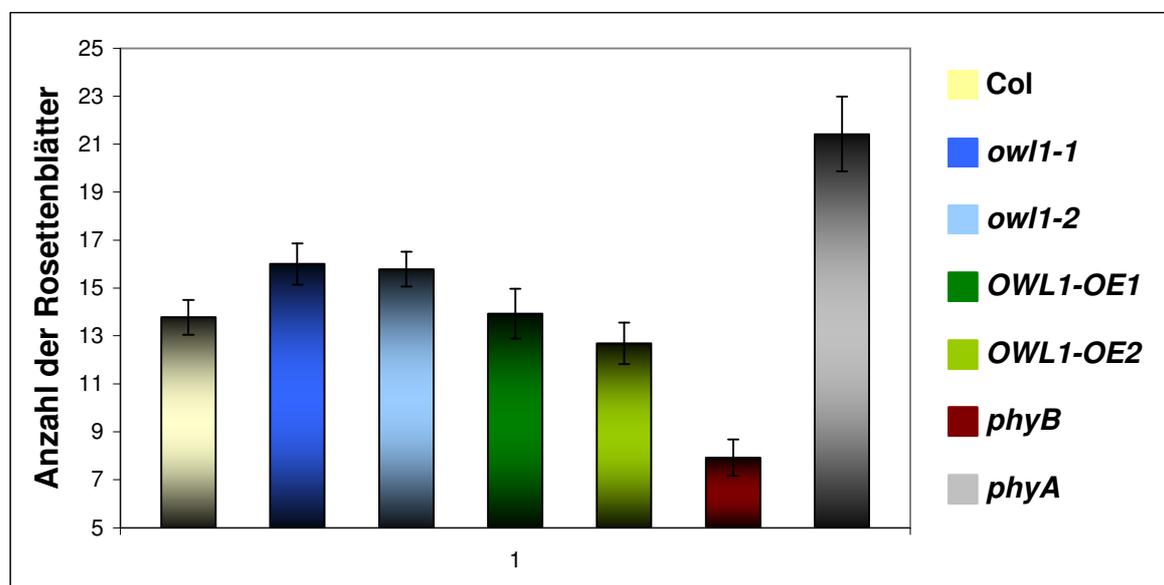


Abbildung 23: Bestimmung des Zeitpunkts der Blüte. Pflanzen wurden bis zum Erscheinen der Infloreszenz unter Langtagbedingungen (16 h Licht/Tag) auf Erde kultiviert. Als Maß für den Eintritt in die Blüte wurde die Anzahl an Rosettenblättern zum Zeitpunkt des Erscheinens des Infloreszenz gemessen. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung angegeben.

Die phänotypische Charakterisierung von *owl1-1* und *owl1-2* hat gezeigt, dass der Verlust von OWL1 in einer Störung der phyA-vermittelten VLFR aber nicht der HIR resultiert. Bisher waren keine Mutanten mit einem so selektiven Effekt nur in der VLFR molekular charakterisiert worden. Zusätzlich konnte ein Defekt in der Blütezeit festgestellt werden, ein physiologischer Prozess, der bisher nicht der VLFR zugeordnet worden war. Das impliziert eine größere Bedeutung der VLFR als bisher angenommen.

3.2.3. Proteinbiochemische Charakterisierung von OWL1

3.2.3.1. Akkumulation von OWL1 während unterschiedlicher Entwicklungsstadien

Im Rahmen der Diplomarbeit von V. Wachtler war gezeigt worden, dass OWL1 zu vergleichbaren Mengen in allen untersuchten Pflanzenteilen (Wurzel, Hypokotyl, Blatt, Blüte) zu detektieren war. Analyse von Microarray-Daten mit Hilfe der AtGen Express Consortium Daten hatte bestätigt, dass die Expression von OWL1 in allen Geweben ähnlich stark war.

In einem nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob die OWL1-Akkumulation entwicklungsabhängig ist. Aus diesem Grund wurden Wildtyp-Pflanzen eine bis sechs Wochen nach der Aussaat Gewebeproben entnommen und auf ihren Proteingehalt überprüft. Damit konnten die Entwicklungsstadien von dem jungen Keimling bis hin zur Pflanze kurz vor dem Abreifen untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass OWL1 konstant während allen Entwicklungsstadien akkumuliert und die OWL1-Konzentration keine signifikanten Unterschiede aufweist (Abb. 24).

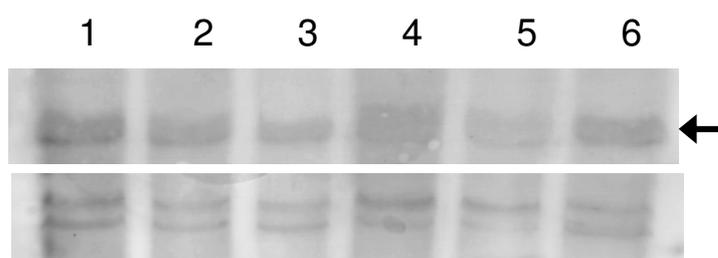


Abbildung 24: OWL1-Gehalt in Wildtyp-Pflanzen im Alter von ein bis sechs Wochen (1-6). Pflanzen wurden auf 1 x MS-Medium unter Weißlicht ($80\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) kultiviert und OWL1 über Immunodetektion mit spezifischem Antikörper nachgewiesen. Durch den Pfeil wird auf das Signal von OWL1 hingewiesen. Die unteren Banden zeigen unspezifische Signale und dienen als Ladungskontrolle.

3.2.3.2. Intrazelluläre Lokalisation von OWL1

Anhand von Computerprogrammen zur Vorhersage der intrazellulären Lokalisation von Proteinen war es nicht möglich, die Lokalisation von OWL1 vorherzusagen. Daher wurde das Gen *OWL1* in Vektoren für N- und C-terminale GFP-Fusion kloniert. Diese Vektoren wurden mittels Beschuss durch eine Partikelkanone in epidermale Zwiebelzellen eingebracht. Die transiente Expression und somit die Lokalisation der Konstrukte wurde durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

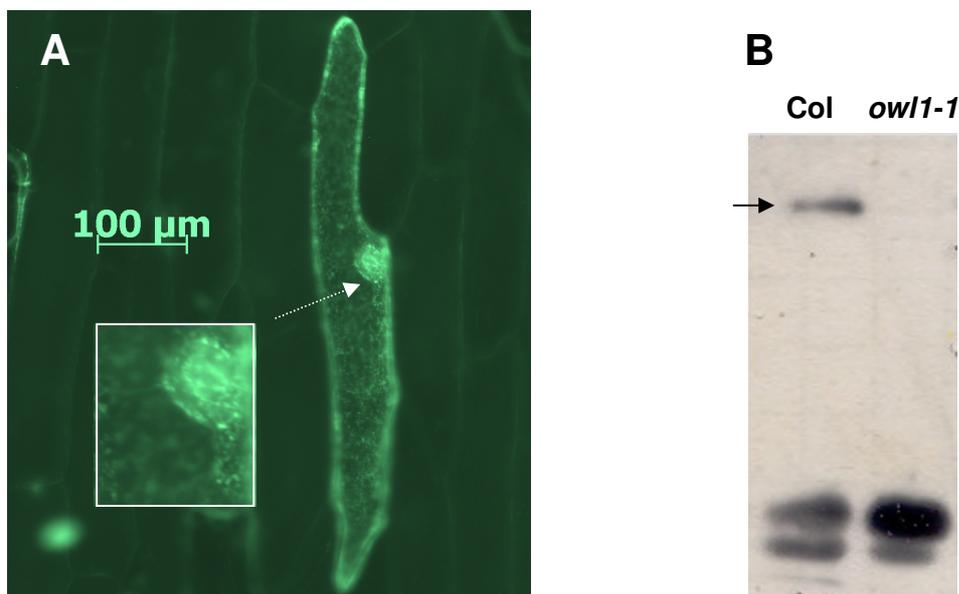


Abbildung 25: Intrazelluläre Lokalisation von OWL1. (A) Intrazelluläre Lokalisation von OWL1-GFP in transient transformierten Zwiebelepidermiszellen mit Detailansicht des Kerns. (B) Immunodetektion von OWL1 (Pfeil) in isolierten Kernen des Wildtyps (Col) sowie in *owl1-1*. Kerne wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und OWL1 mit OWL1-spezifischem Antikörper detektiert. Die untere Bande ist auf unspezifische Antikörperbindung zurückzuführen und dient als Ladungskontrolle.

Für das N- und das C-terminale Fusionsprotein konnte sowohl eine cytoplasmatische als auch eine nukleäre Lokalisation determiniert werden. Interessanterweise wurde in beiden Kompartimenten eine Aggregatbildung beobachtet, die unabhängig von einer Bestrahlung mit Dunkelrotlicht war (Abb. 25 A, Detailansicht). Ähnliche Resultate konnten auch durch Transformation von Protoplasten erzielt werden (nicht gezeigte Daten). Ferner wurden aus Wildtyp- und *owl1*-Pflanzen Kerne isoliert und durch Immunodetektion mit OWL1-spezifischen Antikörpern der Proteingehalt bestimmt. In Kernen der Wildtyp-Pflanzen konnte dabei ein starkes OWL1-spezifisches Signal detektiert werden (vgl. Abb. 25).

3.2.3.4. Untersuchung von OWL1 auf Phosphorylierungen

Phosphorylierungen von Proteinen gehören zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen. Über sie kann sowohl Proteinaktivität als auch Proteininstabilität gesteuert werden (Rattan *et al.*, 1992; Rattan 1996). Um zu untersuchen, ob auch OWL1 phosphoryliert vorliegt, wurde in einem ersten Schritt die Sequenz von OWL1 unter Verwendung des NetPhos Prediction Servers auf putative Phosphorylierungsstellen hin untersucht (vgl. Abb. 26).

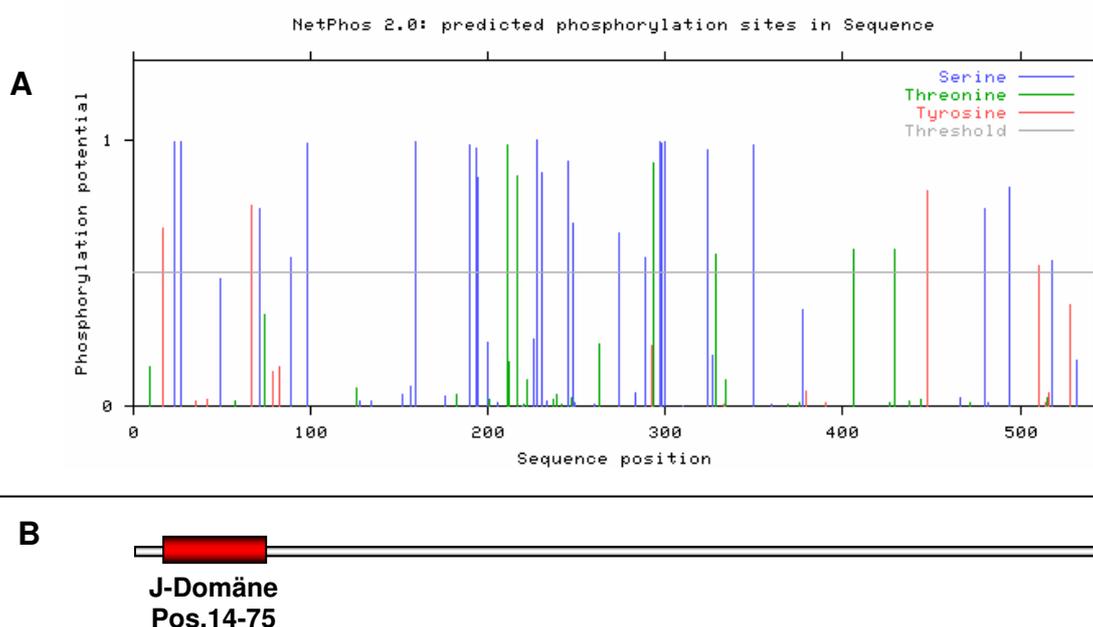


Abbildung 26: Vorhersage der Phosphorylierungsstellen anhand des NetPhos Prediction Servers (Phosphobase, CBS, Dänemark). (A) Schema der potentiellen Phosphorylierungsstellen. Die Abszisse gibt die Position in der Aminosäuresequenz, die Ordinate das Phosphorylierungspotential an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten an. Nur Aminosäurereste mit einem Potential von über 0,5 wurden als potentielle Phosphorylierungsstellen in Betracht gezogen. (B) Schematische Darstellung von OWL1 mit Markierung der J-Domäne, analog zur Abszisse von Abb. A.

Dabei konnten eine große Anzahl von putativen Phosphorylierungsstellen ermittelt werden. 33 Aminosäuren wiesen eine Phosphorylierungswahrscheinlichkeit von über 50%, 15 sogar eine Wahrscheinlichkeit von über 90% auf (vgl. Tab. 14). Dies war ein starkes Indiz für eine Phosphorylierung von OWL1.

Tabelle 14: Anzahl putativer Phosphorylierungsstellen in OWL1 laut NetPhos.

Aminosäurerest	Gesamt	Phos. wahrsch. > 50%	Phos.wahrsch. > 90%
S	44	23	13
T	28	6	2
Y	15	4	/

Um die errechneten Ergebnisse experimentell zu verifizieren, wurde Proteinextrakt aus Wild-Typ-Pflanzen mit Alkalischer Phosphatase verdaut. Auf diese Weise ist es möglich, Phosphorylierung zu entfernen, was sich in der Regel in einem veränderten Laufverhalten des Proteins während der Elektrophorese niederschlägt. Tatsächlich konnte nach Behandlung mit Alkalischer Phosphatase ein solcher Effekt determiniert werden. Während OWL1 ohne Inkubation mit Alkalischer Phosphatase eine Größe von ca. 60 kDa aufwies, wanderte OWL1 nach der Behandlung schneller und so dass das OWL1-spezifische Signal deutlich unterhalb von 60 kDa bei ca. 58 kDa erschien.

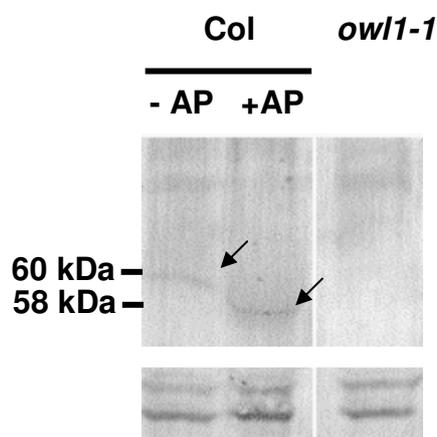


Abbildung 27: Immunologische Detektion von OWL1 in Pflanzenextrakten nach Behandlung mit Alkalischer Phosphatase. Alle Extrakte wurden für 45 min auf Eis inkubiert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt, durch „Western“-Transfer auf eine PVDF-Membran transferiert und OWL1 durch Immunodetektion mit OWL1-spezifischem Antikörper nachgewiesen. Col = Extrakt aus Col; *owl1-1* = Extrakt aus *owl1-1*; +/-AP = Behandlung mit/ohne Alkalischer Phosphatase. Pfeile weisen auf das Signal von OWL1 hin. Die unteren Banden sind auf ein unspezifisches Signal zurückzuführen und dienen als Ladungskontrolle.

3.2.3.5. Bestimmung der phyA-Degradationsrate in *owl1*- und *OWL1-OE*-Linien

phyA in seiner P_{FR} -Form ist äußerst instabil. Aus diesem Grund nimmt unter Licht der phyA-Gehalt kontinuierlich ab (Hennig *et al.*, 1999). Für OWL1 als Komponente in der phyA-vermittelten VLFR wäre es somit denkbar, dass es die phyA-Stabilität beeinflusst. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Keimlinge des Wildtyps, sowie von *owl1-1* und *OWL1-OE2* für 4 Tage im Dunkeln vorgezogen und anschließend ins Rotlicht transferiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben genommen und mittels Immunodetektion mit phyA-spezifischen Antikörper der phyA-Gehalt der Sämlinge bestimmt (Abb. 28).

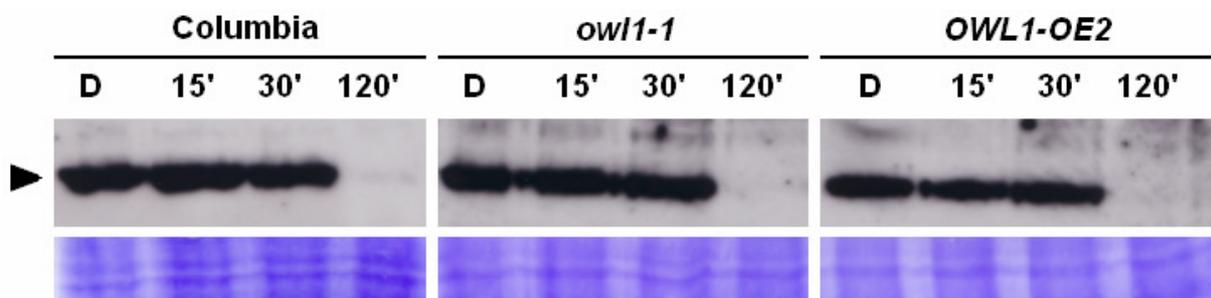


Abbildung 28: Gehalt an phyA nach Bestrahlung mit Rotlicht. Etiolierte, vier Tage alte Keimlinge wurden mit starkem Rotlicht ($30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, Pflanzenextrakt gewonnen und anschließend eine Immunodetektion mit phyA-spezifischem Antikörper durchgeführt. Die unteren Banden zeigen eine Coomassiefärbung der Proteinextrakte als Ladungskontrolle. D= Dunkel; 15', 30', 120'= 15, 30, 120 min Rotlicht.

In allen Linien konnte in allen untersuchten Linien nach 30 min eine beginnende Degradation festgestellt werden, nach 2 h Rotlichtbestrahlung war so gut wie kein phyA mehr detektierbar. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass OWL1 nicht die phyA-Stabilität beeinflusst.

3.2.3.6. Untersuchung des OWL1-Gehaltes in phyA-Signalwegs-Mutanten

Neben *owl1* sind einige wenige Mutanten mit phänotypischen Defekten sowohl in der VLFR als auch in der HIR beschrieben worden. Über das genaue Zusammenwirken der Proteine ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur wenig bekannt. Um eine mögliche Beeinflussung der OWL1-Stabilität durch andere bekannte VLFR-Interaktoren zu untersuchen, wurde der Gehalt an OWL1 in verschiedenen Mutantenlinien determiniert. Dabei war es möglich, die Mutantenlinien *spa1-2*, *pk1-1*, *fhy1-1* sowie *phyA* zu untersuchen. SPA1 war besonders interessant, da dieses Protein an der Ubiquitin-abhängigen Proteindegradation beteiligt ist, während PKS1 mit *phyA* direkt im Cytoplasma interagiert und FHY1 für den Kernimport von *phyA* zuständig ist. Allerdings konnten in keiner Linie nennenswerte Unterschiede bezüglich ihres Gehaltes an OWL1 festgestellt werden (vgl. Abb. 29).

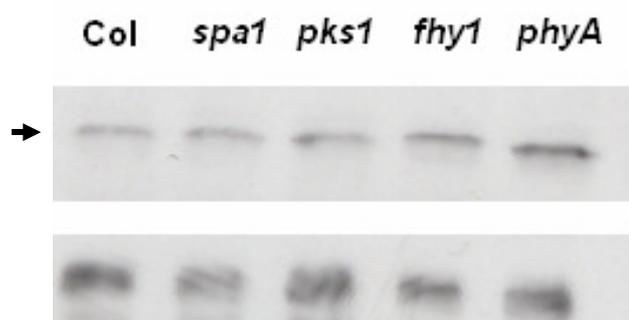


Abbildung 29: Konzentration an OWL1 in verschiedenen Mutanten des *phyA*-Signalwegs. Eine Immunodetektion mit OWL1-spezifischem Antikörper wurde am Pflanzenextrakt drei-Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Der Pfeil weist auf das Signal von OWL1 hin. Die untere Bande zeigt ein unspezifisches Signal und ist fungiert als Ladungskontrolle.

Leider war es nicht möglich, das reziproke Experiment durchzuführen und den Gehalt von PKS1, SPA1 und FHY1 in *owl1* zu untersuchen, da keine Antikörper gegen diese Proteine verfügbar waren.

3.2.3.7. Identifizierung von OWL1-Interaktionsproteinen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System

Um mögliche Interaktionspartner von OWL1 zu identifizieren, wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid-Screen vorgenommen. Dabei wurde OWL1 durch Klonierung in den Vektor pDEST32 mit einer DNA-Bindedomäne (GAL-DB) fusioniert, eine cDNA-Bank über Klonierung in pDEST22 mit einer Aktivierungsdomäne (GAL-AD). OWL1-DB wurde in Hefe transformiert, selektiert und diese Zellen mit der cDNA-Bank transformiert. Als Reporter einer möglichen Interaktion wurde die Komplementierung der Histidin-Auxotrophie über Expression des HIS3-Gens des benutzten Hefestammes verwendet. Da der *his*-Phänotyp des verwendeten Hefestammes nicht stark ausgeprägt ist („leaky phenotype“) wurden zusätzliche verschiedene Konzentrationen (20, 40 mM) des Histidinsynthese-Inhibitors 3AT verwendet, um Hintergrundwachstum zu unterdrücken. Auf diese Weise war es möglich, 58 Kolonien mit einer putativen Interaktion anzuziehen. Nach Isolation und Sequenzierung der Vektoren konnten 25 putativen Interaktoren benannt werden (vgl. Tab. 15). Auffällig war, dass viele putative Interaktoren in Stressantworten involviert waren. So konnte mit RD19 ein Protein identifiziert werden, das durch Austrocknung von Pflanzengewebe induziert wird (Koizumi *et al.*, 1993). Auch TIP2 ist in die Stressreaktion auf Austrocknung involviert (Loqué *et al.*, 2005). APX1, die cytosolische Ascorbat Peroxidase, ist an der Deaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt (Kubo *et al.*, 1993). Zusätzlich konnten auch Proteine mit einer Beteiligung an der Entwicklung isoliert werden. PIE1 wurde beschreiben als Regulator der Blütezeit im Bereich der Vernalisation während WAV2 in das Wurzelwachstum involviert ist (Noh *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2002). Es war möglich, für WAV2, PIE1, CLP und RD19 durch reverse Genetik Mutanten zu erhalten. Homozygote Linien wurden isoliert und auf ihren Phänotyp bezüglich des negativ gravitropischen Wachstums untersucht.



Abbildung 30: Verlust des agravitropischen Wachstums von *wav2*, *pie1* und *rd19*-Mutantenlinien. Pflanzen wurden für drei Tage unter DR-Licht ($0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) auf vertikalen Platten gezogen.

Dabei konnten allerdings keinerlei Auffälligkeiten beobachtet werden (Abb. 30). Auch bei der Inhibierung der Hypokotylelongation zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede (nicht gezeigte Daten).

Der interessanteste putative Interaktor war HFR1, ein positiver Regulator der phyA-vermittelten HIR. Deshalb wurde diese Interaktion genauer charakterisiert.

Tabelle 15: Über Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifizierte putative OWL1-Interaktionspartner

Locus	Name	Proteinfamilie/Funktion	Erstbeschreibung
At1g02340	HFR1	bHLH-Protein Positiver Regulator der Lichtsignaltransduktion	Fankhauser & Chory 2000
At1g07890	APX1	Cytosolische Ascorbat Peroxidase	Kubo <i>et al.</i> , 1993
At1g21760		F-box-Protein	
At1g29050		unbekannt	
At1g71970		unbekannt	
At1g75230	F22H5.5	HhH-GPD base excision DNA repair family protein	
At1g76400		Mitglied der Ribophorin 1-Protein Familie	
At1g79510		unbekannt	
At2g13360	AGT1	Peroxisomales photorespiratorisches Enzym für Transaminations Reaktionen	
At3g02470		S-Adenosylmethionin Decarboxylase. Beteiligt an der Polyamine Biosynthese	
At3g11800	F26K24.9	Unbekannt	
At3g12810	PIE1	Ähnlichkeit mit ISWI und SWI2/SNF2 Protein Familie.	Noh <i>et al.</i> , 2003
At3g13410	MRP15.4	unbekannt	

At3g26520	TIP2	Gamma Tonoplast Intrinsisches Protein	Pih <i>et al.</i> , 1999
At3g60750	T4C21.160	Putative Transketolase	Noir <i>et al.</i> , 2005
At4g23250	EMB1290	Kinase	
At4g25210	F24A6.50	Transkriptionsregulator	Curaba <i>et al.</i> , 2003
At4g25370		Enthält N-terminale Clp- Domäne	
At4g25740	RPS10A	Ribosomenbestandteil	
At4g39090	RD19	Cystein Proteinase- ähnlich; induziert durch Austrocknung	Koizumi <i>et al.</i> , 1993
At5g20520	WAV2	Bem46-like protein. Negativer Regulator der Wurzelkrümmung	Takahashi <i>et al.</i> , 2002
At5g41800	K16L22.8	Mitglied der Aminosäure Transporter Familie	
At5g42680		Unbekannt	
At5g48320		Enthält DC1-Domäne	
At5g49020		Protein Arginin N- Methyltransferase Familien Protein	
At5g56030	HSP81-2	Mitglied der Hsp90- Proteinfamilie	Takahashi <i>et al.</i> , 1992

3.2.3.8. Die Interaktion zwischen HFR1 und OWL1

HFR1 wurde als Intermediat der phyA-vermittelten HIR beschrieben. Die Mutante *hfr1* zeigte unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlängertes Hypokotyl sowie ein Unvermögen, unter Dunkelrotlicht Schwingungsbewegungen auszuführen. Zusätzlich konnte eine Involvierung von HFR1 in die Cryptochrome 1 (*cry1*) vermittelte Blaulichtsignaltransduktion gezeigt werden (Duek & Fankhauser, 2003). Die Identifikation des *HFR1*-Locus führte zu der Erkenntnis, dass es sich um ein Gen handelte, das für einen putativen bHLH-Transkriptionsfaktor kodiert (Fairchild *et al.*, 2000; Fankhauser *et al.*, 2000; Soh *et al.*, 2000). Weitere Analysen ergaben, dass HFR1 im Dunkeln über das COP1-System im Proteasom degradiert wird und so die Regulation von HFR1 auf die Photomorphogenese inhibiert wird (Duek *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2005). Neben dieser Interaktion zwischen HFR1 und COP1 konnte auch kürzlich eine weitere mit dem Protein LAF1, einem R2R3-MYB Faktor bewiesen werden (Jang *et al.*, 2007). Neueste Studien haben darüber hinaus ergeben, dass HFR1 lichtabhängig über die Casein-Kinase II phosphoryliert wird, was zu einer erhöhten Stabilität des Proteins im Licht führt (Park *et al.*, 2008).

A. Bestätigung der Interaktion über das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Um die im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen entdeckte Interaktion zwischen OWL1 und HFR1 zu bestätigen, wurde der gesamte offene Leserahmen von *HFR1* in den Vektor pDEST22 kloniert.

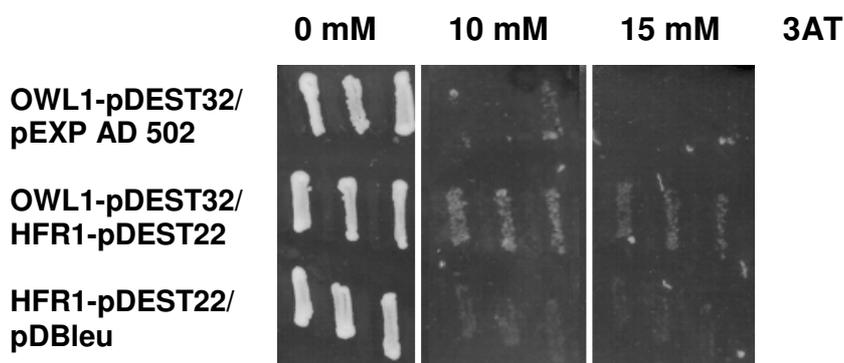


Abbildung 31: Die Interaktion zwischen OWL1 und HFR1 im Hefe-Zwei-Hybrid System. Mav203-Hefezellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten transformiert und auf SC-Leu-Trp-His + 0/10/15mM 3AT übertragen. Die obere und untere Reihe zeigen Tests auf Autoaktivierung von OWL1-pDEST32 und HFR1-pDEST22, die mittlere Reihe den Interaktionstest zwischen HFR1 und OWL1.

Anschließend wurde dieses Konstrukt zusammen mit OWL1-pDEST32 in kompetente Hefezellen kotransformiert und die Kolonien auf Nährmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an 3AT angezogen. Dabei zeigte sich, dass die im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-„Screens“ detektierte putative Interaktion zwischen OWL1 und HFR1 bestätigt werden konnte. Während die Untersuchungen auf Autoaktivierung von OWL1 und HFR1 ein negatives Ergebnis erbrachten, war sowohl auf 10 mM als auch auf 15 mM ein deutliches Wachstum für den Transformant OWL1-pDEST32/HFR1-pDEST22 zu verzeichnen (Abb. 31).

B. Bestätigung der Interaktion mittels „Pull-Down-Assay“

Um die über das Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren festgestellte Interaktion zwischen OWL1 und HFR1 zu bestätigen, wurde ein „Pull-Down-Assay“ unter Verwendung von OWL1-GST und HFR1-6xHis Fusionsproteinen vorgenommen. Als Negativkontrolle diente dabei PAT1-GST, das laut Jang und Coautoren keine Interaktion mit HFR1 eingeht (Jang *et al.*, 2007).

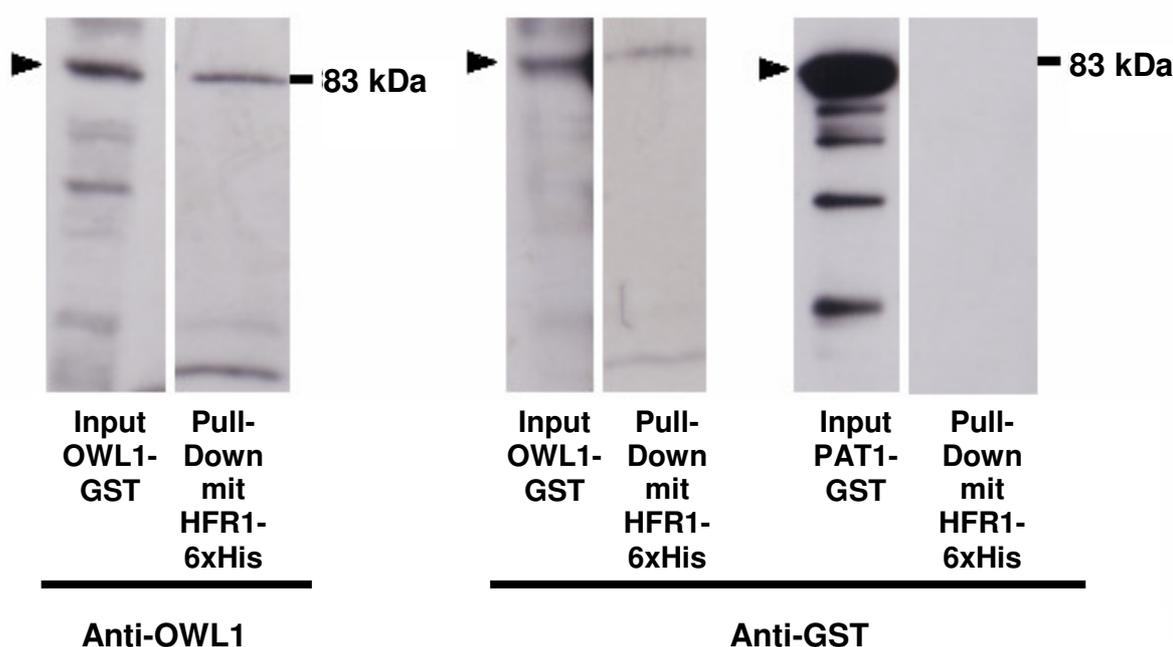


Abbildung 32: Pull-Down-Assay von HFR1-6xHis, OWL1-GST, PAT1-GST zur Überprüfung von Interaktionen. HFR1-6xHis wurde in *E. coli* überexprimiert und das Lysat auf Ni-NTA-Agarose gebunden. Das gebundene HFR1-6xHis wurde mit PAT1-GST- und OWL1-GST-Lysat inkubiert. Gezeigt sind der Input von OWL1-GST sowie von PAT1-GST und die Pull-Down-Fraktion. Links die Immunodetektion mit OWL1-spezifischem Antikörper, rechts mit GST-Antikörper. PAT1-GST fungierte als Negativkontrolle.

Die Fusionproteine OWL1-GST, PAT1-GST und HFR1-6xHis wurden in *E. coli* überexprimiert, aufgereinigt und anschließend ein Pull-Down-Assay über Bindung von HFR1-6xHis an Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Über dieses Verfahren konnte eindeutig eine Interaktion zwischen HFR1-6xHis und OWL1-GST detektiert werden.

Während sich trotz einer hohen Input-Konzentration an PAT1-GST keinerlei PAT1-GST im Pull-Down mit HFR1-6xHis befand, konnte für OWL1-GST ein deutliches Signal festgestellt werden. Dieses Signal zeigte sich sowohl in der Immunodetektion mit Anti-OWL1-Antikörper als auch mit Anti-GST-Antikörper (Abb. 32).

C. Die Akkumulation von OWL1 in *hfr1* sowie *HFR1*-Überexpressionslinien

Die über das Hefe-Zwei-Hybrid-System entdeckte Interaktion zwischen HFR1 und OWL1 konnte durch eine „Pull-Down-Assay“ bestätigt werden. Nun stellte sich die Frage, in welchem Zusammenhang der putative Transkriptionsfaktor HFR1 und das J Protein OWL1 stehen. Als erster Schritt wurde daher der Gehalt an OWL1 in *hfr1* sowie zwei *HFR1*-OE-Linien bestimmt. Eine Immunodetektion mit OWL1-spezifischem Antikörper zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede im Extrakt der verschiedenen Linien (Abb. 33). Das reziproke Experiment konnte mangels HFR1-spezifischen Antikörpers nicht durchgeführt werden.

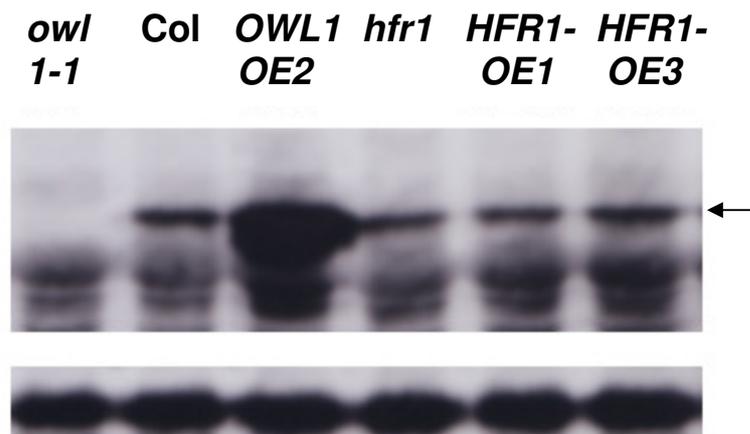


Abbildung 33: Konzentration an OWL1 in *hfr1* und *HFR1*-OEA-Linien. Eine Immunodetektion mit OWL1-spezifischem Antikörper wurde am Pflanzenextrakt drei-Wochen alter Pflanzen durchgeführt. Der Pfeil weist auf das Signal von OWL1 hin. Die untere Bande zeigt ein unspezifisches Signal, das als Ladungskontrolle fungiert.

D. Die Doppelmutantenlinien *owl1-1/hfr1* und *OWL1-OE2/hfr1*

Um Erkenntnisse über die genetische Interaktion zwischen *HFR1* und *OWL1* zu erlangen, wurden durch Kreuzungen zwischen den Mutanten *owl1-1* bzw. *OWL1-OE2* und *hfr1* Doppelmutanten erzeugt. Anschließend wurde der Verlust des agravitropischen Wachstums der Linien *owl1-1/hfr1* und *OWL1-OE2/hfr1* unter DR-Licht bestimmt (Abb. 34).

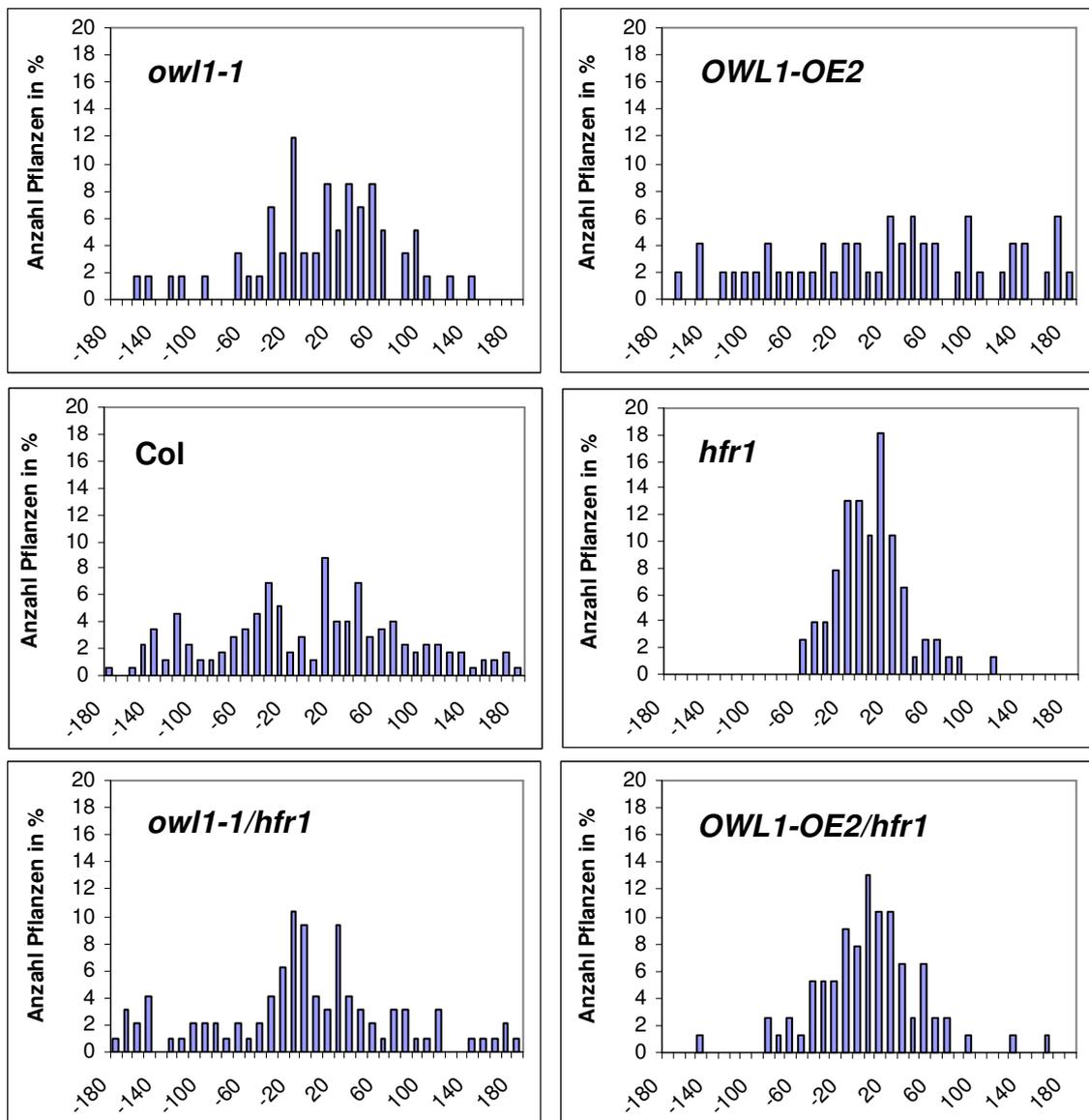


Abbildung 34: Verteilung der Hypokotylwachstumswinkel der Linien *owl1-1/hfr1*, *OWL1-OE/hfr1* sowie der Elternlinien *owl1-1*, *OWL1-OE2* und *hfr1* und des Wildtyps. Pflanzen wurden für drei Tage auf vertikalen Platten unter Dunkelrotlicht angezogen. Anschließend wurde der Winkel zwischen Hypokotyl und Vertikale vermessen und in 10°-Schritten aufgetragen. Die Abszisse gibt den Wachstumswinkel in ° an, die Ordinate die Anzahl an Pflanzen in %. $n(\text{owl1-1}) = 59$; $n(\text{hfr1}) = 77$; $n(\text{OWL1-OE2}) = 49$; $n(\text{owl1-1/hfr1}) = 96$; $n(\text{OWL1-OE2/hfr1}) = 77$.

Für *hfr1* war eine Störung des agravitropischen Wachstums unter Dunkelrotlicht nachgewiesen worden (Fairchild *et al.*, 2000; Fankhauser *et al.*, 2000; Soh *et al.*, 2000). Wie in Abb. 34 zu sehen zeigte auch unter unseren Versuchsbedingungen *hfr1* ein deutlich vertikaleres Wachstum als der Wildtyp und hatte auch im Vergleich zu *owl1* einen stärkeren Phänotyp.

Für die Doppelmutante *owl1-1/hfr1* wären folgende Phänotypen denkbar: Ein additiver Phänotyp, vergleichbar mit *phyA* (Abb. 34), würde für eine Involvierung von OWL1 und HFR1 in unterschiedlichen Signalwegen sprechen. Die *in vitro*-Studien implizieren aber eine Interaktion der beiden Proteine und somit eine Beteiligung am gleichen Signalweg. Daher sollte die Doppelmutante entweder einen *hfr1*- oder in einem *owl1-1*-Phänotyp aufzeigen, je nach Positionierung von OWL1 und HFR1 in der Signalkette. Die Analyse der Doppelmutante *owl1-1/hfr1* zeigte eine Ausrichtung der Hypokotyle, die mit der von *owl1-1* vergleichbar war. Dies bestätigt, dass HFR1 und OWL1 in dem gleichen Signalweg positioniert sein müssen und impliziert, dass OWL1 oberhalb von HFR1 funktional ist.

Durch die Überexpression von OWL1 in *hfr1* (*OWL1-OE2/hfr1*) konnte ein intermediärer Phänotyp erzielt werden. Dies weist darauf hin, dass eine Überexpression von OWL1 partiell den Verlust von HFR1 in der *hfr1*-Mutante komplementieren kann.

4. DISKUSSION

Um die Funktionsweise der in ihrem Aufbau sehr komplexen Phytochrome zu analysieren sind in den letzten 20 Jahren eine Vielzahl von Studien mit verschiedenen phyA-Konstrukten durchgeführt worden. Unter der Verwendung von unterschiedlichen phyA-Mutantenallelen sowie Überexpressions- und Deletionskonstrukten konnten entscheidende Erkenntnisse bezüglich der Bereiche, die für die Lokalisation, Phosphorylierung, Chromophorbinding, Regulation und Signaltransduktion wichtig sind, gewonnen werden.

Bei den meisten älteren Studien, die sich mit der Funktion von phyA befassen, wurde Hafer phyA (phyA *A.s.*) verwendet, das in Tabakpflanzen überexprimiert wurde. Aber auch Experimente in *A. thaliana* Wildtyppflanzen wurden durchgeführt (zur Übersicht siehe Tab. 16).

Tabelle 16: Übersicht über die in früheren Studien verwendeten phyA-Deletions- und Substitutionskonstrukten. Angegeben sind der Ursprungsorganismus des verwendeten phyA (Quelle), der transformierte Organismus (Transformant) sowie die Hypokotyllänge unter Pulsen von Dunkelrotlicht (DR_p), kontinuierlichem Dunkelrotlicht (DR_k) und Rotlicht (RL) im Vergleich zum Wildtyp. / = nicht durchgeführt.

Konstrukt	Quelle	Transformant	Hypokotyllänge			Autoren
			DR _k	DR _p	RL	
Δ6-12	<i>Avena sativa</i>	<i>N. tabacum</i>	lang	kurz	/	Casal <i>et al.</i> , 2001
Δ6-12	<i>Avena sativa</i>	<i>A. thaliana</i> Wildtyp	lang	= WT	/	Casal <i>et al.</i> , 2001
Δ6-12	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i> phyA-Mutante	lang	=WT	/	Trupkin <i>et al.</i> , 2007
ΔN52	<i>Avena sativa</i>	<i>A. thaliana</i> Wildtyp	lang	/	kurz	Boylan <i>et al.</i> , 1994
ΔC616	<i>Avena sativa</i>	<i>A. thaliana</i> Wildtyp	sehr lang	/	sehr lang	Boylan <i>et al.</i> , 1994
ΔC617-686	<i>Avena sativa</i>	<i>A. thaliana</i> Wildtyp	lang	/	leicht verlängert	Boylan <i>et al.</i> , 1994
C→S(322)	<i>Avena sativa</i>	<i>A. thaliana</i> Wildtyp	=WT	/	=WT	Boylan <i>et al.</i> , 1994
1-595/β-Gluc/ GFP/NLS	<i>Avena sativa</i>	<i>A. thaliana</i> phyA-Mutante	lang	leicht verlängert	/	Mateos <i>et al.</i> , 2006

In diesen Untersuchungen zeigte sich das Problem, dass weiterhin endogenes phyA vorhanden war, was eine Interpretation der Ergebnisse erschwerte. Darüber hinaus stellt sich die Frage, in wie weit phyA aus Monokotylen in Dikotylen funktional ist, worin die Unterschiede liegen und ob sich die Ergebnisse auf das endogene phyA von Tabak oder *A. thaliana* übertragen lassen. Die Homologie zwischen phyA aus *A. thaliana* (phyA/A.th.) und phyA aus Hafer bzw. Reis (phyA/O.s.) beträgt nur ca. 63%. Vor allem im N-terminalen Bereich bis Position 20 sind deutliche Unterschiede zu sehen, verfügen phyA A.s. und phyA O.s. doch über 10 Serinreste, verteilt auf drei Gruppen, phyA A.th. dagegen nur über sieben Serine.

Bei der Beantwortung dieser Fragen sind die Resultate des Deletionskonstruktes phyA Δ 6-12 sehr aufschlussreich. Dieses phyA/A.s.-Konstrukt wurde 2002 von Casal und seinen Koautoren sowohl in Tabak als auch in Wildtyp-Pflanzen von *A. thaliana* transformiert (Casal *et al.*, 2002). 2007 wurde eine zweite Studie veröffentlicht, in der phyA A.th. ebenfalls zwischen Position 6 und 12 deletiert wurde. Dieses Konstrukt wurde in die *A. thaliana* Mutante *phyA* transformiert (Trupkin *et al.*, 2007). In beiden Publikationen wurden ausführliche physiologische Untersuchungen unter Niedrigst-Fluenzen und kontinuierlichem Dunkelrotlicht veröffentlicht. Damit lässt sich genau vergleichen, in wie weit die Ergebnisse zum einen von Tabak auf *A. thaliana* und zum anderen von phyA/A.s. auf phyA/A.th. übertragbar sind. Die Analyse der Hypokotyllänge ergab, dass in Tabak durch die Überexpression von phyA Δ 6-12 sowohl die VLFR als auch die HIR durch die Expression des Monokotylen-Deletionskonstruktes in höchstem Maße verstärkt waren. Schon früher hatten Analysen gezeigt, dass phyA/A.s. in Tabak zu einem hypersensitiven Phänotyp führte (Keller *et al.* 1989; Cherry *et al.* 1991); durch Deletion der Aminosäuren 6-12 wurde dieser Effekt noch erhöht. Auch in *A. thaliana* resultierte die Expression von phyA/A.s. in einem hypersensitiven Phänotyp in der VLFR und der HIR. Dagegen hatte die Deletion der sechs Aminosäuren in Hafer phyA (phyA Δ 6-12/A.s.) kaum Einfluss auf die Hypokotyllänge unter Lichtpulsen (VLFR). Unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht allerdings waren die Hypokotyle signifikant verlängert, es war also ein hyposensitiver Phänotyp erzielt worden. Die Studie mit der Expression von *A. thaliana* phyA Δ 6-12 in der *A. thaliana*-Mutante *phyA* zeigte wenn auch nicht identische, so doch ähnliche Ergebnisse zu den Resultaten von phyA/A.s. in *A. thaliana*. Unterschiede können sicher zum Teil auf endogenes phyA bei der Transformation von phyA Δ 6-12 (A.s.) in den *A. thaliana*-Wildtyp zurückgeführt werden. Die Ergebnisse von *A. thaliana* stehen aber in völligem Gegensatz zu den Beobachtungen an Tabak. Das kann als Indiz gewertet werden, dass Resultate zwischen verschiedenen Arten, die mit den gleichen phyA-Konstrukten transformiert wurden,

nicht ohne weiteres übertragen werden können. Wahrscheinlich wirken hier artspezifische Mechanismen, die auf unterschiedliche enzymatische Ausstattung und ihre Feinregulierung zurückgeführt werden können. Allerdings ist anscheinend die Homologie zwischen phyA aus Monokotylen und Dikotylen doch so stark ausgeprägt, dass in den Wirtsorganismen weitgehend die gleichen Mechanismen induziert werden wenn ein artfremdes phyA eingebracht wird. Das bedeutet, dass Ergebnisse mit phyA aus unterschiedlichen Arten durchaus übertragbar sind, solange nur der gleiche Wirtsorganismus transformiert wurde. Außerdem haben neuere Arbeiten ergeben, dass phyA aus Reis ähnliche Funktionen erfüllt wie das Gegenstück aus *A. thaliana*.

In der vorliegenden Studie wurden *A. thaliana phyB* und *phyAB*-Mutanten mit phyA/O.s. komplementiert. Dabei wurden zum einen das Wildtyp Reis phyA (phyA/O.s.WT) verwendet, zum anderen Reis phyA mit zehn Serin zu Alanin Substitutionen im N-Terminus. Eine wichtige Fragestellung in der phyA-Forschung war immer, wie ein Molekül – phyA – drei unterschiedliche Signalwege initiieren kann. Daher sollte insbesondere überprüft werden, inwiefern diese Signalinitiierung durch die N-terminalen Serinreste beeinflusst wird. Diese Serinreste könnten als lichtabhängige Phosphorylierungsstellen fungieren, zumal in Hafer bereits anhand von *in vitro* Studien Phosphorylierungen im N-Terminus von phyA nachgewiesen wurden (McMichael & Lagarias, 1990; Lapko *et al.*, 1996, 1997, 1999). Da in allen *phyB/SA*- und *phyB/WT*-Linien endogenes phyA die Interpretation der Resultate erschwerte, wie im Vergleich mit den *phyAB*-Linien ersichtlich wurde, wird im Folgenden vor allem auf die Ergebnisse der *phyAB/SA*- und *phyAB/WT*-Linien eingegangen werden.

Bei der Untersuchung der VLFR zeigte sich, dass das Vorhandensein von Serinresten entscheidend war für die Inhibierung der Hypokotylelongation und für den „Far-red-Killing“-Effekt unter Niedrigstfluenzen. Dabei resultierte das Einbringen von phyA/O.s.WT in den *phyAB*-Mutantenhintergrund in beiden Fällen sogar in einen hypersensitiven Phänotyp, was wahrscheinlich auf die zusätzlichen Serinreste und damit auf zusätzliche putative Phosphorylierungsstellen zurückzuführen ist. Die Keimungsrate nach Applikation eines Dunkelrotlichtpulses und der Verlust des negativ-gravitropischen Wachstums konnte dagegen nur durch das Einbringen des S/A-Substituts komplementiert werden. Diese beiden physiologischen Reaktionen werden daher durch die im Vergleich zu phyA/A.th. zusätzlichen putativen Phosphorylierungsstellen von phyA/O.s.WT sogar behindert. Somit können die verschiedenen VLFR in zwei Gruppen unterteilt werden: Gruppe I umfasst die Inhibierung der Hypokotylelongation und den „Far-red-Killing“-Effekt und benötigt Serinreste. Gruppe II

besteht aus Keimung und dem Verlust des agravitropischen Wachstums. Diese physiologischen Reaktionen können auch in Abwesenheit von Serinresten stattfinden und werden durch im Vergleich zu *A. thaliana* zusätzliche Serine inhibiert (vgl. Tab. 17).

Tabelle 17: Übersicht über die Komplementation verschiedener VLFR in den Linien *phyAB/SA*, *phyAB/WT*

	<i>phyAB/SA</i>	<i>phyAB/WT</i>	
Keimung			
Verlust des agravitropischen Wachstums			
Inhibierung der Hypokotylelongation			
„Far-red-Killing“-Effekt			
Nicht komplementiert		Komplementiert	
Partiell komplementiert		Hypersensitiv	

Da die Prozesse beider Gruppen im Rahmen der VLFR gleichzeitig ablaufen, ist es wahrscheinlich, dass unter Niedrigst-Fluenzen nicht alle Serin-Gruppen phosphoryliert werden. Vermutlich handelt es sich um ein gewisses Phosphorylierungsmuster, das auf der einen Seite durch phosphorylierte Serine Inhibierung der Hypokotylelongation und den „Far-red-Killing“-Effekt positiv steuert, über die nicht phosphorylierten Bereiche Keimung und Inhibierung des agravitropischen Wachstums (vgl. Abb. 35). Es ist auch gut denkbar, dass im Dunkeln ebenfalls ein Phosphorylierungsmuster besteht, das aber einen inhibierenden Charakter auf die Photomorphogenese hat. Durch Licht könnte sich das Muster verschieben oder verstärken und damit fördernd wirken. Dies würde eine spezifische Regulation über Phosphatasen und Kinasen implizieren. Tatsächlich wurde kürzlich mit PAPP2C eine Phosphatase identifiziert, die spezifisch mit dem N-Terminus von phyA und phyB interagieren kann (Phee *et al.* 2008). Darüber hinaus wurde von mir eine weitere Phosphatasemutante mit Defekten in der VLFR identifiziert. In den Linien *phyAB/WT* wurde nun durch Komplementation mit *phyA/O.s.* zusätzliche Serine und damit zusätzliche putative Phosphorylierungsstellen eingefügt. Dadurch

könnte das Phosphorylierungsmuster gestört werden und so dass im Dunkeln bestehende inhibierende Muster erhalten bleiben. Das würde zu der fehlenden Komplementation von Keimung und Inhibierung des Agravitropismus in *phyAB/WT* führen.

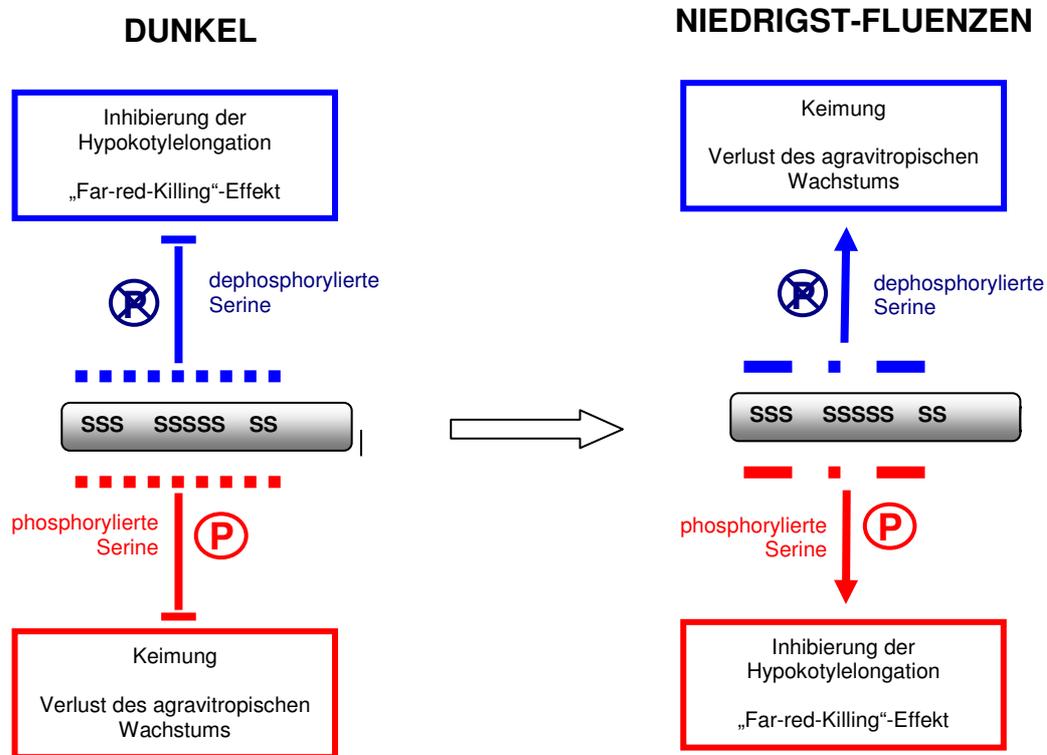


Abbildung 35: Modell putativer Phosphorylierungszustände im N-Terminus von *phyA* im Dunkeln sowie unter Niedrigst-Fluenzen. Pfeile stehen für fördernde, Balken für hemmende Wirkung. Gestrichelte Linien zeigen verschiedene Phosphorylierungsmuster an.

Allerdings sollte dann im Umkehrschluss für *phyAB/SA* eine hohe Dunkelkeimungsrate und Schwingungsbewegungen im Dunkeln zu erwarten sein. Tatsächlich hatte sich bei den vorgenommenen Keimungsexperimenten immer das Problem gestellt, dass bei *phyAB/SA* und *phyAB/WT* eine sehr hohe Dunkelkeimung vorhanden war. *phyAB/SA* und *phyAB/WT*-Linien hatten außerdem im Dunkeln leichtere Schwingungsbewegungen ausgeführt. Darüber hinaus hatten 1996 Robson und Smith in *phyA*-Keimlingen, die Hafer-*phyA* überexprimierten, einen Verlust des agravitropischen Wachstums im Dunkeln beschrieben (Robson & Smith, 1996). Sollten die verschiedenen VLFR sowie die Unterdrückung derselben im Dunkeln tatsächlich auf variable Phosphorylierungsmuster zurückgehen, so könnte man diese These über Konstrukte überprüfen, bei denen nur bestimmte Serine durch Alanine substituiert wurden. Dabei würde es sich als erster Schritt anbieten, nur die gegenüber *A. thaliana* additiven Serine

durch Alanine zu ersetzen. Durch zusätzliche Substitutionen und massenspektrometrische Untersuchungen wäre es dann möglich, die relevanten Phosphorylierungsstelle/n einzukreisen.

Bei der Charakterisierung der HIR zeigte sich dagegen, dass ausschließlich *phyA/O.s.SA* effektiv für alle untersuchten physiologischen Prozesse komplementieren konnte. *phyA/O.s. WT* führte nur zu einer geringfügigen Verkürzung der Hypokotyllänge, folglich war dieses Konstrukt weniger aktiv und die zusätzlichen Serinreste wirkten sich sogar hemmend auf die Funktionalität aus. Auch die Anthocyanakkumulation war in früheren Studien von Dr. C. Bolle analysiert worden: hier konnte nur *phyA/O.s.SA* komplementieren, nicht aber das Wildtyp-Protein. Dieses Ergebnis läuft auf den ersten Blick Beobachtungen entgegen, dass *phyA/A.s.* in *A. thaliana* Wildtyppflanzen zu einem hypersensitiven Phänotyp führt (Boylan & Quail 1991). Die Erklärung für diese Hypersensitivität liegt vermutlich in einem additive Effekt aus dem endogen im Wildtyp vorhandenen *phyA* und dem nur schwach aktiven überexprimierten *phyA/A.s.* Dagegen war es für den HIR-abhängigen „Far-red-Killing“-Effekt unerheblich, ob die putativen Phosphorylierungsstellen vorhanden waren, da für beide Konstrukte eine effektive Komplementation zu verzeichnen war. Bezüglich der Kotyledonöffnung unter DR_K konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen beiden Konstrukten festgestellt werden (vgl. Tab. 18).

Tabelle 18: Überblick über den Grad der Komplementation verschiedener HIR-Reaktionen durch die Konstrukte *phyA/O.s.WT* sowie *phyA/O.s.SA*.

	<i>phyAB/SA</i>	<i>phyAB/WT</i>	
Inhibierung der Hypokotylelongation			
„Far-red-Killing“-Effekt			
Anthocyan-Akkumulation			
Kotyledonenöffnung unter DR_K			
Nicht komplementiert		Komplementiert	
Partiell komplementiert		Hypersensitiv	

Somit zeigt sich, dass zwei physiologische Reaktionen der HIR, die Inhibierung der Hypokotylelongation und die Anthocyanakkumulation, durch zusätzliche Serinreste gehemmt wurden. Dagegen erfolgten die Kotyledonenöffnung und der „Far-red-Killing“-Effekt unabhängig von der Sequenz des N-Terminus.

Die Inhibierung der Hypokotylelongation ist die einzige physiologische Reaktion, die sowohl für die VLFR als auch für die HIR untersucht wurde und die in beiden Fällen durch die Serin/Alanin-Substitutionen beeinflusst wurde. Deshalb soll im Folgenden besonders auf diese Reaktion eingegangen werden. Es ist schwierig zu erklären, dass ausgehend von den Serinresten des N-Terminus die gleiche Reaktion einmal durch putative Phosphorylierungsstellen gehemmt und einmal, im Rahmen der VLFR, initiiert wird. Zusätzlich zeigt sich, wenn Phosphorylierungen nicht möglich sind (S/A-Substitut) der reziproke Phänotyp. Nimmt man noch dazu, dass sich zwei Reaktionen, der HIR-„Far-red-Killing“-Effekt und Kotyledonenöffnung, Serin-unabhängig verhielten, liegt der Verdacht nahe, dass der auslösende Mechanismus für die HIR-Reaktionen nicht bei den Serin-Resten des N-Terminus zu finden ist, sondern in einem anderen Teil des phyA-Moleküls lokalisiert ist. Ein Indiz für diese Theorie findet sich in einer Studie an *A. thaliana*, in der Wildtyppflanzen mit phyA A.s.-Deletionskonstrukten transformiert worden waren. Dabei handelte es sich um die Konstrukte $\Delta N52$, $\Delta C616$ und $\Delta 617-686$ (Boylan *et al.* 1994). Für alle drei Konstrukte konnten unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht signifikant verlängerte Hypokotyle ermittelt werden. Das bedeutet, dass durch die transformierten Konstrukte sogar die endogene phyA-Antwort gestört wurde. Allerdings war der mit Abstand stärkste Effekt bei $\Delta C616$ zu verzeichnen. Da dieses Konstrukt auch zu stark verlängerten Hypokotylen unter Rotlicht führte, liegt der Verdacht nahe, dass im deletierten Bereich ein allgemeiner Aktivator der Hypokotylverkürzung lokalisiert ist, im noch vorhandenen N-terminalen Bereich ein Supressor. Durch Deletion des C-Terminus fungiert das verkürzte phyA als Supressor und unterdrückt auch die endogene phyA und phyB-Antwort. Die Frage ist nun, worin dieser Suppressor besteht. Hier könnte man nun die Serinreste des N-Terminus anführen, die ja für manche HIR-Reaktion eine Auswirkung haben. Auch die Linien *phyB/WT*, *phyB/SA*, *phyAB/WT* und *phyAB/SA* waren bezüglich Hypokotyllänge und agarvitropischem Wachstum unter Rotlicht untersucht worden, da phyA in *A. thaliana* auch die LFR beeinflusst. Diese Untersuchungen hatten ergeben, dass phyA/O.s.WT den phyB-Defekt in *phyAB* und *phyB* komplementieren konnte, ja sogar bei der Hypokotyllänge zu einem hypersensitiven Phänotyp führte. phyA/O.s.SA dagegen hatte nur eine geringe Komplementation zur Folge. Folglich muss die Signalinduktion der LFR positiv

über die Serinreste gesteuert werden. Da phyA/O.s.SA nicht die LFR initiieren konnte, $\Delta N52$ aber unter Rotlicht hypersensitiv war, muss die Suppression für die phyB-Antwort vermutlich in den de-phosphorylierten Serinen des N-Terminus zu finden sein. Ein völlig dephosphorylierter N-Terminus als Suppressor würde aber im Widerspruch zu den Ergebnissen der HIR stehen, deshalb erscheint wieder die Möglichkeit eines inhibitorisch wirkenden Phosphorylierungsmusters am wahrscheinlichsten. Eine zweite Erklärung für den Verlust der endogenen phyA und phyB-Antwort in der Studie von Boylan *et al.* wäre, dass ein inaktives phyA-Deletionskonstrukt mit endogenem phyA nicht funktionale Dimere bildet und so phyA und phyB-Antwort unterdrückt. Dies kann aber ausgeschlossen werden, da eine Überexpression des inaktiven phyA/A.s. C \rightarrow S(322) in Wildtyppflanzen keinerlei Auswirkungen auf die endogene phyA-Antwort hatte. Leider behandelten Boylan *et al.* in ihrer Publikation nicht die VLFR. Allerdings ergaben Untersuchungen an einem phyA-Konstrukt bestehend aus Hafer-phyA(1-595)/ β -Glucuronidase/GFP/NLS, dass das dimerisierte Protein im phyA-Hintergrund keine HIR erzeugen konnte, allerdings eine - wenn auch etwas abgeschwächte - VLFR (Mateos *et al.*, 2006). Folglich bleibt festzuhalten, dass der N-Terminus allein nicht ausreichend für eine funktionierende HIR ist, dass sein N-terminales Phosphorylierungsmuster aber als Suppressor der HIR sowie der schwachen LFR von phyA dienen könnte. Nun stellt sich die Frage, wie die stark eingeschränkte HIR von *phyAB/WT* erklärt werden kann. In *phyA/O.s.WT* sind zusätzliche putative Phosphorylierungsstellen vorhanden, die möglicherweise eine Verschiebung des Phosphorylierungsmusters bewirken und damit auch im Dunkelrotlicht die Hemmung der Inhibierung der Hypokotylelongation aufrechterhalten. Nun stellt sich die Frage, warum sich die additiven Serine einmal fördernd (VLFR) und einmal hemmend (HIR) auf die gleiche physiologische Reaktion auswirken und was die biologische Funktion dieses Effektes ist.

Es ist gut denkbar, dass sich bei der Inhibierung der Hypokotylelongation die VLFR und die HIR gegenseitig ausschließen. Unter Niedrigst-Fluenzen ist eine zu starke Hypokotylverkürzung nicht sinnvoll, da die niedrigen Lichtquantitäten nicht zum Überleben der Pflanze ausreichen. Ein verlängertes Hypokotyl erhöht die Wahrscheinlichkeit, bessere Lichtbedingungen zu finden. Deshalb muß die starke Inhibierung der Hypokotylelongation der HIR unter VLFR-Bedingungen unterbunden werden. Folgendes Modell wäre somit denkbar (vgl. Abb. 36):

Durch N-terminale Phosphorylierungen wird der Mechanismus der HIR-gesteuerten Hypokotylverkürzung inhibiert. Gleichzeitig wird aber durch das Verschieben des Phosphorylierungsmusters die VLFR-gesteuerte Reaktion freigeschaltet. *phyA/O.s.SA* führt unter HIR-Bedingungen zu einer Komplementation auf Wildtyp-Niveau, allerdings zu keinem

hypersensitivem Phänotyp. Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass für eine HIR-induzierte Hypokotylverkürzung eine vollständige Dephosphorylierung des N-Terminus von Nöten ist. Gleichzeitig führt der Verlust der Serinreste zu einer nur schwachen Komplementation der VLFR. Die Funktion könnte sein, dass eine aktive HIR die Ausführung der VLFR hemmt.

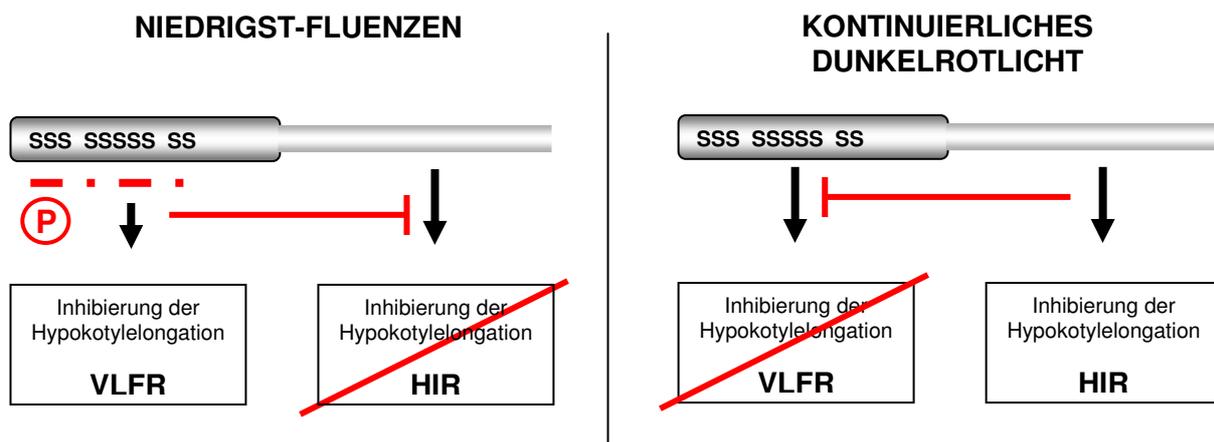


Abbildung 36: Modell der Regulation der Inhibition der Hypokotylelongation über die Serinreste des N-Terminus von phyA im Rahmen der HIR und der VLFR. Gestrichelte rote Linie: Phosphorylierungen. Roter Balken: Inhibition. Schwarzer Pfeil: Förderung

Diese Resultate und Schlussfolgerungen laufen allerdings auf den ersten Blick den eingangs erwähnten Ergebnissen an *phyA Δ 6-12* entgegen. Diese zeigten, dass der Verlust der Serin-Reste im deletierten Bereich zu einer starken Einschränkung der HIR führte, während die VLFR kaum beeinflusst war (Casal *et al.*, 2002; Trupkin *et al.*, 2007). Dabei war die Inhibition der Hypokotylelongation, der Far-red-Killing-Effekt, sowie die Anthocyanakkumulation betrachtet worden. Eine Erklärung für diese Resultate wäre, dass durch die Deletion und die daraus resultierende Entfernung fünf putativer Phosphorylierungsstellen zu einer Verschiebung des Phosphorylierungsmusters führt. Möglicherweise resultiert die Deletion in einem besonders starken hemmenden Signal für die HIR, beeinflusst aber nicht die VLFR. Ebenso wäre denkbar, dass die Deletion zu einer Strukturänderung des gesamten phy-Moleküls führt, auch den HIR-Bereich beeinflusst und somit eine Störung der Signaltransduktion der HIR nach sich zieht.

Ausgehend von unseren Untersuchungen sowie unter Einbeziehung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen konnte folgendes Modell der HIR und der VLFR entworfen werden (vgl. Abb.

37): Der Serin-reiche N-Terminus von phyA liegt im Dunkeln partiell phosphoryliert vor. Dieses Phosphorylierungsmuster wirkt hemmend auf die Photomorphogenese und inhibiert sowohl VLFR als auch HIR. Bestrahlung mit Niedrigst-Fluenzen resultiert in einer Veränderung dieses Musters. Während die Hemmung auf bestimmte HIR bestehen bleibt, wird die VLFR freigeschaltet. Dabei werden einige der VLFR-Reaktionen über nach Belichtung dephosphorylierte, andere über phosphorylierte Serine aktiviert. Durch starke Belichtung mit Dunkelrotlicht wird der N-Terminus komplett dephosphoryliert. Damit entfällt die Hemmung auf alle HIR-Reaktionen, die Photomorphogenese wird initiiert.

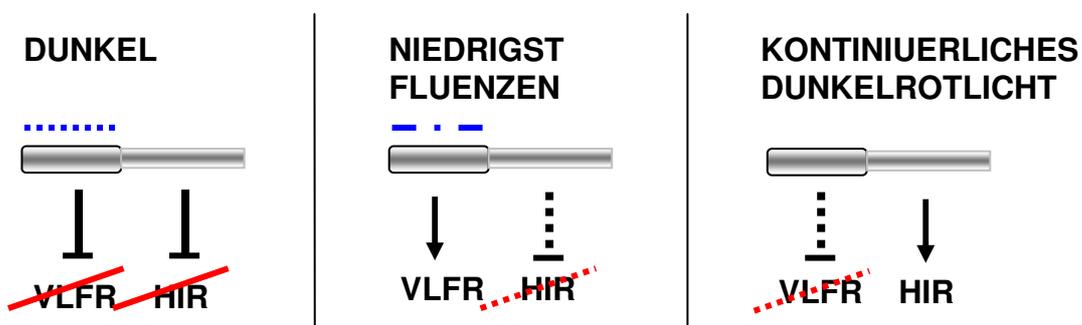


Abbildung 37: Überblick über die Abhängigkeit von HIR und VLFR von N-terminalen Phosphorylierungszuständen von phyA. Pfeile weisen auf eine fördernde, Balken auf eine hemmende Wirkung hin. Blaue Linien stehen für verschiedene Phosphorylierungsmuster. Durchgehende rote und schwarze Linien zeigen eine vollständige, gestrichelte eine partielle Inhibition an.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie die Signalweiterleitung ausgehend von den Phosphorylierungszuständen von phyA erfolgt. Wahrscheinlich ist, dass dabei die Bindung von Interaktoren eine entscheidende Rolle spielt. Dabei sind zwei Modelle denkbar: Sowohl der HIR- als auch der VLFR-Bereich verfügen über ein eigenes Set an Interaktoren, die den jeweiligen Zustand wahrnehmen und weiter vermitteln. Diese These ist vermutlich zu verneinen, da einige Mutanten des phyA-Signalweges isoliert wurden, bei denen sowohl HIR als auch VLFR gestört sind. Deshalb müssen die beiden Signalwege zumindest partiell überlappen und über identische Komponenten laufen. Wahrscheinlicher erscheint aber, dass für beide Bereiche identische Intermediate verantwortlich sind, die mit einer höheren Effektivität an das licht-induzierte Phosphorylierungsmuster, und damit den VLFR-Bereich binden, als an den Bereich der HIR, oder auch umgekehrt. Welche Faktoren dafür allerdings in Frage kommen,

bleibt unklar. Da allerdings kürzlich beschrieben wurde, dass die mit phyA und phyB interagierende Phosphatase PAPP2C indirekt auch die Dephosphorylierung von PIF3 beeinflusst (Phee *et al.*, 2008). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass PIF3 zu den gesuchten Faktoren gehört.

Eine große Anzahl von Signalintermediaten wurde für die HIR anhand von Mutanten-„screens“ unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht (Nagatani *et al.*, 1993; Hoecker *et al.*, 1998; Bolle *et al.* 2000; Zeidler *et al.* 2001) isoliert. Dabei wurden in der Regel die Hypokotyllänge unter kontinuierlichem Dunkelrotlicht, sowie das Ergrünungsvermögen betrachtet. Nur einige dieser Mutantenlinien wie *pks1*, *pks2*, *spa1* und *fhy1* (Hoecker *et al.*, 1998; Cerdán *et al.*, 1999; Baumgardt *et al.*, 2002; Lariguet *et al.*, 2003) zeigten zusätzliche Defekte in der VLFR. Für die Mutanten *cp3* und *eve1/dwarf1/dim1* (Quinn *et al.*, 2002; Luccioni *et al.*, 2002) wurde eine verstärkte VLFR beschrieben. Außerdem gelang es die verminderte VLFR des Ökotyps Columbia an zwei Loci (*VLFR1*, *VLFR2*) festzumachen, die allerdings nicht genauer charakterisiert wurden (Yanovsky *et al.* 1997; Botto *et al.* 2003). Die Isolierung von spezifischen VLFR-Mutanten erwies sich als schwierig, da durch die geringe Lichtmenge der Niedrigst-Fluenzen nur schwache phänotypische Effekte zu erzielen sind. Dies bringt die Gefahr von großen Mengen an falsch positiven und falsch negativen Mutanten mit sich.

Die Mutante *owl1-1* fiel in einem „Screen“ unter schwachem Dunkelrotlicht durch ein leicht verlängertes Hypokotyl und ein verbessertes Ergrünungsvermögen auf. Eine nähere Analyse ergab, dass *owl1-1* nicht in der HIR behindert ist, sondern nur spezifische Defekte in der VLFR aufwies. Untersucht wurden dabei die Keimung unter Dunkelrotlicht, der „Far-red-Killing“-Effekt, die Inhibierung der Hypokotylelongation und das agravitropische Wachstum. Für alle vier physiologischen Effekte konnte ein intermediärer Phänotyp zwischen Wildtyp und der *phyA*-Mutante beobachtet werden. Auch das zweite isolierte Mutanten-Allel, *owl1-2*, zeigte diese Phänotypen. Neben diesen Mutantenlinien waren auch Überexpressionslinien analysiert worden, die OWL1 kontinuierlich überexprimierten (*OWL1-OE1*, 2). Für diese Überexpressionslinien konnte nur für den „Far-red-Killing“-Effekt und die Keimung der gegensätzliche Phänotyp, also eine Erhöhung der VLFR, gezeigt werden. Im agravitropischen Wachstum war der Phänotyp vergleichbar dem Wildtyp, für die Inhibierung der Hypokotylelongation in einer Linie sogar hyposensitiv. Bei letzterer handelte es sich allerdings um eine Linie mit einer sehr starken Überexpression. Durch die hohe Konzentration an OWL1 könnte es zu einer Art Substrat-Überschuss-Hemmung kommen und so die Inhibierung der Hypokotylelongation unterbunden werden. Dies erscheint umso wahrscheinlicher, da

folgenden Beobachtung gemacht wurde: *OWL1-OE1* zeigte im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen eine von Generation zu Generation abnehmende Überexpressionsrate. Dieser Effekt war vermutlich auf ein schleichendes „Silencen“ der Insertion zurückzuführen. Mit dieser Abnahme an OWL1-Konzentration ging auch eine allmähliche Verkürzung der Hypokotyllängen unter gepulstem Dunkelrotlicht einher.

Als nächster Schritt sollte die proteinbiochemische Rolle von OWL1 in der VLFR untersucht werden. J Proteine sind als Interaktoren Hsp70-Proteine bekannt. Hsp70-Proteine stellen eine Schlüsselkomponente der zellulären Stressantwort und der Chaperontätigkeit dar. Durch ihre Bindung an Zielproteine wird ATP-abhängig die Faltung von Peptidketten zu nativen Proteinen sowie Proteinabbau und -import reguliert. Da Hsp70-Proteine nur über eine schwache eigene ATP-Hydrolyse verfügen, fungieren J Proteine als Verstärker. Namensgebend für die J Proteine ist ein Aminosäuremotiv namens J Domäne, benannt nach dem ersten beschriebenen Vertreter in *E.coli*, DnaJ.

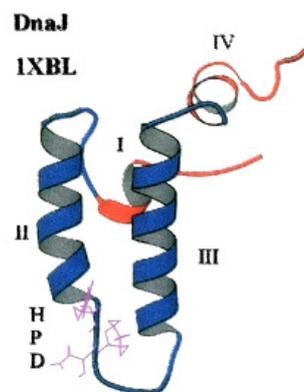


Abbildung 38: Tertiärstruktur eines Teiles von DNAJ-1XBL aus *E.coli* als Beispiel für die Struktur der J-Domäne. Helix I und IV in rot, Helix II und III in blau, das HPD-Motiv in flieder. Aus: Hennessy *et al.* 2005

Bei der J Domäne handelt es sich um eine Aminosäuresequenz, die bis auf wenige Ausnahmen immer ein HPD-Tripeptid enthält und in der Tertiärstruktur über vier aufeinander folgende α -Helices verfügt. Dabei ist das HPD-Tripeptid in allen bisher bekannten Tertiärstrukturen in der Schleife zwischen Helix II und Helix III zu finden (Abb. 38). Über die J Domäne erfolgt die Bindung an Hsp70-Proteine, wobei das HPD-Motiv essentiell zu sein scheint. Zusätzlich zu der J

Domäne können J Proteine über weitere Aminosäuremotive verfügen, über die sie üblicherweise in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt werden können (Abb. 39):

Proteine vom Typ I, auch Hsp40-Proteine genannt, weisen die stärkste Homologie zu DnaJ auf. Neben der J Domäne verfügen sie eine Glycin-Phenylalanin (G/F)-reiche Sequenz, sowie eine Zinkfinger-ähnliche Domäne (CXXCXGXG). Auch die Typ II oder Hsp-40-ähnlichen Proteine weisen den Glycin-Phenylalanin-reichen Bereich auf, allerdings fehlt in dieser Gruppe die Zinkfingerdomäne. Für beide Gruppen konnte eine Bindung an nicht-native Peptidketten gezeigt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um klassische Cochaperone handelt. Mitglieder der Typ III-Gruppe dagegen verfügen nur über eine J Domäne. Bis jetzt konnte für keines dieser Proteine eine Bindung an Nicht-native Proteine gezeigt werden. Aus diesem Grund wird im Moment davon ausgegangen, dass es sich bei TypIII-Proteinen nicht um Cochaperone handelt, zumal für viele Mitglieder dieser Gruppe die unterschiedlichsten Funktionen beschrieben wurden (Walsh *et al.*, 2004; Hennessy *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006).

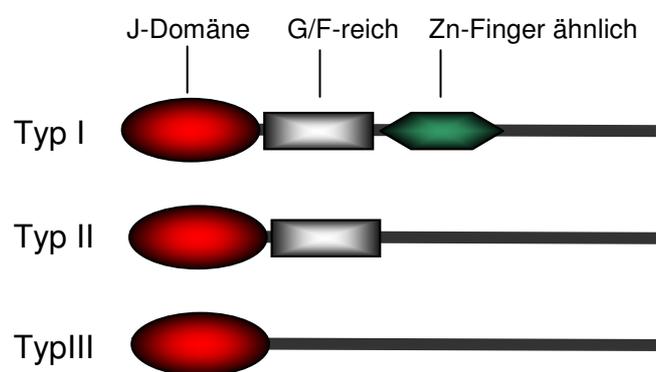


Abbildung 39: Die Unterteilung der J-Proteine anhand ihrer Domänenstruktur . Nach Qiu *et al.* 2006.

Für das mammale P58^{IPK} wird eine Involvierung in multiple Stressantworten vermutet. Diese These wird durch ein multiples Krankheitsbild von Knock-out Mäusen gestützt. *In vitro*-Analysen zeigten eine Regulierungsfunktion von P58 im Bezug auf verschiedene Interferon-induzierte Kinasen (Tang *et al.*, 1996; Ladiges *et al.*, 2005; Oyadomari *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2007). Das Hefeprotein Zuotin I ist ein wichtiger Bestandteil von ribosomalen Komplexen und zusammen mit diversen Hsp70-Proteinen in die die Translation involviert (Zhang *et al.*, 1992; Wilhelm *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1998). In *A. thaliana* ist dagegen kaum etwas über die

Gruppe der J-Proteine bekannt. J. Miernyk konnte anhand von BLAST-Analysen mit bekannten J-Protein-Sequenzen 2001 89 J-Proteine in *A.thaliana* identifizieren, und damit ungefähr um zwei Drittel mehr, als bei einem Genom dieser Größe und bei der in *A. thaliana* vorliegenden Anzahl von HSP70-Proteinen zu erwarten gewesen wäre (Miernyk 2001).

Bei eigenen Recherchen in der Datenbank von SMART konnten 101 unterschiedliche J-Proteine identifiziert werden (Tab. 19). Diese wurden anhand der Domänenstruktur in die Gruppen Typ I, Typ II, Typ II-III, Typ III sowie zwei Sondergruppen unterteilt. Typ II-III beinhaltet Proteine, die nur noch eine sehr rudimentäre G/F-reiche Sequenz aufweisen. Bei den Sonderformen handelte es sich um die Domänenkombination J-Domäne/Zinkfingerdomäne mit zwei Vertretern, sowie J-Domäne ohne HPD-Motiv/G/F-Motiv. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Miernyk (89 J-Proteine) und den eigenen Resultaten (101 J-Proteine) sind dabei zum großen Teil auf J-Proteine ohne HPD-Motiv zurückzuführen, die in der Studie von Miernyk nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 19: Verteilung der J-Proteine von *A.thaliana* anhand der Domänenstruktur

Domänenstruktur	Anzahl der Proteine
Typ I	5
Typ II	13
Typ II-III	7
Typ III	71
Andere:	
HPD + Zinkfinger-ähnliche Domäne	2
·HPD + G/F-Motiv	3
Gesamt	101
Davon ohne HPD-Motiv	9

Folglich sind zwei Drittel der J-Proteine Typ III-Proteine, die nicht mehr die ursprüngliche Rolle als Cochaperone wahrnehmen, wobei das Fehlen des HPD-Motivs bei 9 Proteinen wahrscheinlich zu einem Verlust der Interaktion mit Hsp70 führt. Das impliziert dass viele

J Proteine in *A. thaliana* andere Rollen als als Cochaperon wahrnehmen und möglicherweise zum Teil nicht mehr mit Hsp70 interagieren. Allerdings wurde nur für einen verschwindend kleinen Bruchteil der Typ III-Proteine von *A. thaliana* die tatsächliche biochemische Funktion untersucht, so für das J Domänen Protein TOC12. Bei ihm wurde eine wichtige Rolle am Import chloroplastidärer Proteine durch die äußere Chloroplastenmembran beschrieben (Becker *et al.* 2004). ARG1 und ARL2 sind in den Wurzel-Statocysten funktional und sind an der lateralen Auxin-Verteilung in der Wurzelspitze beteiligt (Harrison *et al.*, 2008). Die geringe Anzahl an Studien über TypIII-Proteine in *A. thaliana* macht es schwierig, Vorhersagen über die eigentliche biochemische Funktion von OWL1 zu treffen. Daher wurde zuerst versucht, OWL1 in Beziehung zu bereits bekannten Komponenten der VLFR zu setzen. In einem ersten Schritt wurde der Gehalt von OWL1 in verschiedenen bekannten VLFR-Mutanten untersucht, sowie die Degradationsgeschwindigkeit von phyA in *owl1-1* und OWL1 OE2. Allerdings konnten in keinem Fall signifikante Unterschiede determiniert werden. Über Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems war es allerdings möglich, eine Reihe von putativen Interaktoren zu identifizieren. Dazu gehörte auch das bHLH-Protein HFR1, wobei es möglich war, diese Interaktion durch einen „Pull-Down-Assay“ zu bestätigen. Als bHLH-Protein gehört HFR1 zu einer Gruppe putativer Transkriptionsfaktoren, die als positive Regulatoren die HIR beeinflussen und auch in die Blaulichtantwort involviert sind (Fairchild *et al.*, 2000; Fankhauser *et al.*, 2000; Soh *et al.*, 2000; Duek *et al.* 2003). Allerdings sind bezüglich der Interaktion zwischen HFR1 und OWL1 drei Hypothesen denkbar, die es gilt anhand von zukünftigen Analysen zu überprüfen.

Zum einen könnte OWL1 die Stabilität von HFR1 beeinflussen. Da OWL1 ebenfalls ein positiver Regulator der Photomorphogenese ist, erscheint es wahrscheinlich, das OWL1 die Stabilität von HFR1 erhöhen könnte. Um diese These zu überprüfen, wäre es nötig, den HFR1-Gehalt in *owl1* und OWL1OE-Linien mit Hilfe von HFR1-spezifischem Antikörper zu überprüfen. Da ein HFR1-spezifischer Antikörper nicht verfügbar ist, wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt versucht, durch Kreuzungen zwischen HFR1-HA-Überexpressionslinien und *owl1-1* und OWL1-OE2 Linien zu erzeugen, in denen unter Verwendung von HA-Antikörpern der Gehalt von HFR1 bestimmt werden kann.

Dies ist allerdings nicht der einzige mögliche Zusammenhang zwischen HFR1 und OWL1. Da HFR1 nukleär lokalisiert ist, OWL1 cytoplasmatisch und nukleär, wäre es denkbar, das HFR1 unter Beteiligung von OWL1 in den Kern transportiert wird. Dies könnte man anhand von Protoplasten aus *owl1* untersuchen, die transient mit HFR1 transformiert sind. So ließe sich

feststellen, ob der Kernimport von HFR1-RFP in Abwesenheit von OWL1 weiterhin effektiv vonstatten geht.

Als letzte Möglichkeit wäre zu nennen, dass OWL1 zusammen mit anderen Proteinen Bestandteil eines funktionalen Komplexes unter Beteiligung von HFR1 ist. Dafür würde sprechen, dass auch HFR1 im Kern in Akkumulaten zu finden ist (Jang *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2007). Allerdings müsste untersucht werden, ob OWL1 mit HFR1 in den gleichen Strukturen kolokalisiert. In den letzten Jahren wurden einige Interaktionen von HFR1 beschrieben. Dabei handelte es sich sowohl um Interaktionen mit anderen positiven Regulatoren der Photomorphogene wie zum Beispiel LAF1 (Jang *et al.*, 2007), als auch um Supressoren, über die HFR1 degradiert wird (COP1) (Duek *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2005). Da auch OWL1 ein positiver Regulator der VLFR ist könnte der photomorphogense-induzierende Komplex HFR1, LAF1, OWL1 und ein HSP70-Protein enthalten, da die einzige bekannte Aufgabe der J-Domäne die Interaktion mit HSP70-Protein ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, eine mögliche Interaktion zwischen LAF1 und OWL1 zu überprüfen. Trotzdem stellt sich die Frage, wie der zwar alle VLFR-betreffende, aber nur intermediär ausgeprägte Phänotyp von *owl1* mit dem Phänotyp von *hfr1* einhergehen kann. *hfr1* zeigt zusätzliche Phänotypen in der HIR und in der Blaulichtantwort aber von den bekannten VLFR ist nur ein Defekt bezüglich des Verlustes des agravitropischen Wachstums beschrieben und keinen bei der Keimung (Soh *et al.* 2000). Allerdings ist nicht bekannt, ob die anderen bekannten VLFR schon überprüft wurden, zumal nur wenige Arbeitsgruppen über die technische Ausstattung für die erforderlichen Versuche verfügen. Somit kann es durchaus sein, dass auch Defekte in Hypokotylverkürzung unter Dunkelrotlichtpulsen sowie der Ergrünungsblockade bestehen. Darüber hinaus ist es denkbar, dass die Zusammensetzung des HFR1-Komplexes je nach Lichtbedingung variiert und dass OWL1 nur bei Niedrigst-Fluenzen eine Rolle in diesem Komplex spielt. Durch den Verlust von OWL1 in *owl1* wird zwar die Effektivität des Komplexes in der VLFR herabgesetzt, aber nicht komplett unterbunden, was den intermediären Phänotyp von *owl1* erklären könnte. Zusätzlich hatte die Analyse des Verlustes des agravitropischen Wachstums unter Dunkelrotlicht bei den Doppelmutanten *owl1-1/hfr1* und *OWL1-OE2/hfr1* eine Lokalisierung von HFR1 und OWL1 im selben Signalweg impliziert. Der intermediäre Phänotyp von *OWL1-OE2/hfr1* zeigt, dass eine hohe Konzentration von OWL1 partiell den Phänotyp von *hfr1* komplementieren kann, der *owl1-1*-Phänotyp der Doppelmutante *owl1-1/hfr1*, das in diesem Signalweg OWL1 oberhalb von HFR1 anzusiedeln ist. Zusammenfassend muß

gesagt werden, dass die letzte Theorie- OWL1 als Bestandteil eines HFR1-Komplexes- am wahrscheinlichsten erscheint, weil damit auch der Phänotyp von *owl1* erklärt werden könnte.

Bei Untersuchungen der OWL1-Konzentration in verschiedenen Gewebetypen, Entwicklungsstadien und Lichtbedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Dies ist vor allem deswegen interessant, da die meisten beschriebenen Phänotypen das Keimlingsstadium betreffen. OWL1 wurde immer in gleich bleibenden Konzentrationen exprimiert, was nahe legt, dass OWL1 auch in der adulten Pflanze noch von Belang ist. Zum einen könnte dieses Ergebnis über die Involvierung von OWL1 in der Blütezeit zu erklären sein. *owl1*-Linien kamen im Vergleich zum Wildtyp später zur Blüte, *OWL1-OE*-Linien früher. Eine Steuerung der Blütezeit über den HIR-Mechanismus erscheint bei Betrachtung der natürlichen Lichtbedingungen unwahrscheinlich, da reines Dunkelrotlicht in höheren Quantitäten in der Natur kaum zu finden ist. Somit müsste die Blütezeit ebenfalls zu den VLFR gerechnet werden.

Eine andere Erklärung für die kontinuierliche Expression von OWL1 könnte in der Anzahl an putativen Interaktionspartnern liegen. Bei einigen war es möglich, Mutantenlinien zu beziehen und unter VLFR zu testen, wobei keinerlei Defekte determiniert werden konnten. Und obwohl eine Reihe von putativen Interaktoren mit Involvierung in Stressreaktionen isoliert wurde, war es in *owl1* nie möglich, eine Beeinflussung von Stressphänotypen festzustellen. Dabei waren oxidativer Stress, hohe Salzkonzentrationen, Wärme, Kälte sowie UV-Licht getestet worden. Vermutlich ist OWL1 Bestandteil mehrerer Proteinkomplexe, erfüllt dabei aber keine essentiellen Aufgaben bzw. wird in den *owl1*-Mutanten durch andere Proteine ersetzt. Mögliche Kandidaten könnten sich in der großen Anzahl von Typ III J-Proteinen finden. Somit bleibt festzuhalten, dass der einzige feststellbare Phänotyp von *owl1* in eine Beeinflussung der VLFR ohne Involvierung der HIR lag. Damit ist OWL1 das erste beschriebene Protein mit einer spezifischen Rolle in der VLFR, das darüber hinaus molekular analysiert wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für photoautotrophe Organismen wie Pflanzen ist es überlebenswichtig, Lichtqualität und -quantität sowie die Belichtungsrichtung und -dauer zu bestimmen um Wachstum und Entwicklungsprozesse optimal anzupassen. Aus diesem Grund haben Pflanzen eine Reihe von Lichtrezeptoren entwickelt. Die am besten bisher charakterisierten Rezeptoren fallen in die Familie der Phytochrome, die besonders den Rot/Dunkelrotlichtanteil (R/DR) des Lichtspektrums wahrnehmen können. Phytochrom A (phyA) ist hierbei ein spezielles Phytochrom höherer Pflanzen, das ausgehend von den bestehenden Lichtbedingungen drei unterschiedliche Signalwege, die Hochintensitätsreaktion (HIR), die Niedrigst-Fluenz-Antwort (VLFR) und die Rotlicht-Hochintensitätsreaktion (R-HIR), vermitteln kann. Die Regulation dieser Signalwege ist ein sehr komplexer Vorgang, der auf verschiedenen Stufen stattfindet. Dabei wird lichtabhängig über transkriptionelle und translationale Modifikationen die Proteinakkumulation und -stabilität von phyA und den Intermediaten der phyA-Signalwege gesteuert. Die vorliegende Arbeit fokussierte sich auf den bisher nur wenig erforschten Signalweg der Niedrigst-Fluenz-Antwort (VLFR). Der erste Teil der Arbeit befasste sich dabei mit dem Mechanismus, über den die selektive Initiierung der drei unterschiedlichen Signalwege ausgehend von phyA erfolgt. Der N-Terminus von phyA weist unter den ersten 20 Aminosäuren eine auffällige Häufung von Serinen auf, was eine Steuerung über Phosphorylierungen nahelegt. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Studien an *phyAB*-Doppelmutanten die entweder Wildtyp Reis phyA (*phyAB/WT*) oder Reis phyA mit Serin-zu-Alanin-Substitutionen im N-Terminus (*phyAB/SA*) überexprimierten, bestätigten diese Vermutung. Allerdings stellte sich die Regulierung zwischen VLFR und HIR als komplexer als vermutet heraus. Zwar konnte für alle untersuchten VLFR (u.a. Keimung und Inhibierung der Hypokotylelongation) ein Einfluss der Serine bei der Komplementation des *phyAB*-Phänotyps gezeigt werden, dieser variierte allerdings zwischen den betroffenen physiologischen Prozessen. Darüber hinaus wurde nur bei einem Teil der untersuchten HIR ein Effekt gefunden, auf das Vorhandensein der Serinreste zurückzuführen war. Zusätzlich wiesen *phyAB/WT* und *phyAB/SA* Defekte bei der Etiolierungsreaktion im Dunkeln auf. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Induktion entweder der HIR- oder der VLFR-Signalkette über eine alternative Phosphorylierung der N-terminalen Serinreste erfolgt. Spezifische Phosphorylierungsmuster im N-Terminus scheinen auch für eine erfolgreiche Unterdrückung der Photomorphogenese im Dunkeln entscheidend zu sein. Deshalb liegt nahe, dass das im

Dunkeln inhibitorisch wirkende Phosphorylierungsmuster durch Niedrigst-Fluenzen und kontinuierliches Dunkelrotlicht unterschiedlich verändert wird

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Mutante *owl1*, in der das Gen für ein J Protein durch T-DNA-Insertionen unterbrochen ist. Die Gruppe der J Proteine bindet an Hsp70-Proteine und hat als bekannteste Vertreter die Hsp40-Proteine. Bei *owl1* handelt es sich um die erste spezifische VLFR-Mutante, die molekular charakterisiert wurde. *owl1-1* zeigte spezifische Defekte in den VLFR-Reaktionen Keimung und Verlust des agravitropischen Wachstums unter Dunkelrotlicht, sowie Inhibierung der Hypokotylelongation und „Far-red Killing“-Effekt unter Dunkelrotlichtpulsen, aber keinerlei Beeinflussung von HIR oder der low-fluence-response in Rotlicht (LFR). OWL1 wird konstitutiv exprimiert und weist eine cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation auf. Es beeinflusst nicht die Stabilität von phyA oder anderen bekannten Intermediaten der VLFR. Um die Funktion von OWL1 in der Signaltransduktion genauer charakterisieren zu können, wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-„Screen“ durchgeführt, wobei putative Interaktoren von OWL1 isoliert wurden. Mittels des Hefesystems und *in vitro*-„Pull-down“ Analysen konnte eine Interaktion mit HFR1, einem bHLH-Protein, das an der phyA-abhängigen HIR beteiligt ist, nachgewiesen werden. Diese Interaktion konnte durch eine phänotypische Analyse von Doppelmutanten gestützt werden, da der Phänotyp der Linie *owl1-1/hfr1* eine Rolle beider Faktoren im selben Signalweg impliziert, wobei OWL1 oberhalb von HFR1 funktional sein muss. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von OWL1 zu einer partiellen Komplementation des *hfr1*-Phänotyps führt.

Die physiologische und biochemische Charakterisierung von OWL1 sowie die Isolation des mit OWL1 interagierenden Transkriptionsfaktors HFR1 werden dazu beitragen, den bisher kaum erforschten Signalweg VLFR aufzuschlüsseln und seine bisher unterschätzte Bedeutung für das pflanzliche Wachstum aufzuzeigen.

6. LITERATUR

- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Klimczak, L.J., Landry, L.G., Peng, T., Last, R.L. and Cashmore, A.R. (1997) An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 199-207.
- Bae, G. and Choi, G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 281-311.
- Baumgardt, R.L., Oliverio, K.A., Casal, J.J. and Hoecker, U. (2002) SPA1, a component of phytochrome A signal transduction, regulates the light signaling current. *Planta* **215**, 745-53.
- Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J. and Schleiff, E. (2004) Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol Biol Cell* **15**, 5130-44.
- Botto, J.F., Alonso-Blanco, C., Garzaron, I., Sanchez, R.A. and Casal, J.J. (2003) The Cape Verde Islands allele of cryptochrome 2 enhances cotyledon unfolding in the absence of blue light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**, 1547-56.
- Boylan, M., Douglas, N. and Quail, P.H. (1994) Dominant negative suppression of *Arabidopsis* photoresponses by mutant phytochrome A sequences identifies spatially discrete regulatory domains in the photoreceptor. *Plant Cell* **6**, 449-60.
- Briggs, W.R. and Olney, M.A. (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol* **125**, 85-8.
- Casal, J.J., Cerdan, P.D., Staneloni, R.J. and Cattaneo, L. (1998) Different phototransduction kinetics of phytochrome A and phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**, 1533-8.
- Casal, J.J., Davis, S.J., Kirchenbauer, D., Viczian, A., Yanovsky, M.J., Clough, R.C., Kircher, S., Jordan-Beebe, E.T., Schafer, E., Nagy, F. and Vierstra, R.D. (2002) The serine-rich N-terminal domain of oat phytochrome a helps regulate light responses and subnuclear localization of the photoreceptor. *Plant Physiol* **129**, 1127-37.
- Cerdan, P.D., Yanovsky, M.J., Reymundo, F.C., Nagatani, A., Staneloni, R.J., Whitlam, G.C. and Casal, J.J. (1999) Regulation of phytochrome B signaling by phytochrome A and FHY1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**, 499-507.
- Cherry, J.R., Hershey, H.P. and Vierstra, R.D. (1991) Characterization of Tobacco Expressing Functional Oat Phytochrome : Domains Responsible for the Rapid Degradation of Pfr Are Conserved between Monocots and Dicots. *Plant Physiol* **96**, 775-785.
- Cherry, J.R., Hondred, D., Walker, J.M. and Vierstra, R.D. (1992) Phytochrome requires the 6-kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5039-43.

- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y.K., Soh, M.S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T.R. and Song, P.S. (1999) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* **401**, 610-3.
- Christie, J.M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 21-45.
- Clack, T., Mathews, S. and Sharrock, R.A. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* **25**, 413-27.
- Curaba, J., Herzog, M. and Vachon, G. (2003) GeBP, the first member of a new gene family in *Arabidopsis*, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by KNAT1. *Plant J* **33**, 305-17.
- Duek, P.D., Elmer, M.V., van Oosten, V.R. and Fankhauser, C. (2004) The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol* **14**, 2296-301.
- Duek, P.D. and Fankhauser, C. (2003) HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J* **34**, 827-36.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Raz, V. and Koornneef, M. (2001) A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of CRY2. *Nat Genet* **29**, 435-40.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Wagemaker, C., Weller, J.L. and Koornneef, M. (2003) The role of cryptochrome 2 in flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**, 1504-16.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A. and Quail, P.H. (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* **14**, 2377-91.
- Fankhauser, C. (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J Biol Chem* **276**, 11453-6.
- Fankhauser, C. (2000) Phytochromes as light-modulated protein kinases. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 467-73.
- Fankhauser, C. and Casal, J.J. (2004) Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *Plant J* **39**, 747-60.
- Fankhauser, C. and Chory, J. (2000) RSF1, an *Arabidopsis* locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol* **124**, 39-45.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D. and Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 1539-41.
- Franck, F., Sperling, U., Frick, G., Pochert, B., van Cleve, B., Apel, K. and Armstrong, G.A. (2000) Regulation of etioplast pigment-protein complexes, inner membrane architecture, and protochlorophyllide a chemical heterogeneity by light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B. *Plant Physiol* **124**, 1678-96.

- Franklin, K.A., Allen, T. and Whitelam, G.C. (2007) Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor. *Plant J* **50**, 108-17.
- Goodman, A.G., Smith, J.A., Balachandran, S., Perwitasari, O., Proll, S.C., Thomas, M.J., Korth, M.J., Barber, G.N., Schiff, L.A. and Katze, M.G. (2007) The cellular protein P58IPK regulates influenza virus mRNA translation and replication through a PKR-mediated mechanism. *J Virol* **81**, 2221-30.
- Harrison, B.R. and Masson, P.H. (2008) ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J* **53**, 380-92.
- Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E. and Blatch, G.L. (2005) Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci* **14**, 1697-709.
- Hennig, L., Buche, C., Eichenberg, K. and Schafer, E. (1999) Dynamic properties of endogenous phytochrome A in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol* **121**, 571-7.
- Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczian, A., Kunkel, T., Kircher, S. and Schafer, E. (2006) FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* **47**, 1023-34.
- Hiltbrunner, A., Viczian, A., Bury, E., Tscheuschler, A., Kircher, S., Toth, R., Honsberger, A., Nagy, F., Fankhauser, C. and Schafer, E. (2005) Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1. *Curr Biol* **15**, 2125-30.
- Hoecker, U. and Quail, P.H. (2001) The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in Arabidopsis. *J Biol Chem* **276**, 38173-8.
- Hsieh, H.L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.H., Matsui, M., Goodman, H. and Deng, X.W. (2000) FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev* **14**, 1958-70.
- Jang, I.C., Yang, J.Y., Seo, H.S. and Chua, N.H. (2005) HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev* **19**, 593-602.
- Jang, I.C., Yang, S.W., Yang, J.Y. and Chua, N.H. (2007) Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes Dev* **21**, 2100-11.
- Kay, S.A., Nagatani, A., Keith, B., Deak, M., Furuya, M. and Chua, N.H. (1989) Rice Phytochrome Is Biologically Active in Transgenic Tobacco. *Plant Cell* **1**, 775-782.
- Kevei, E. and Nagy, F. (2003) Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol Plant* **117**, 305-313.
- Kim, J.I., Kozhukh, G.V. and Song, P.S. (2002) Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 457-63.

- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H. and Shinozaki, K. (1993) Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **129**, 175-82.
- Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. (1993) Genomic DNA structure of a gene encoding cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **315**, 313-7.
- Kushnir, S., Babiychuk, E., Kampfenkel, K., Belles-Boix, E., Van Montagu, M. and Inze, D. (1995) Characterization of *Arabidopsis thaliana* cDNAs that render yeasts tolerant toward the thiol-oxidizing drug diamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10580-4.
- Ladiges, W.C., Knoblauch, S.E., Morton, J.F., Korth, M.J., Sopher, B.L., Baskin, C.R., MacAuley, A., Goodman, A.G., LeBoeuf, R.C. and Katze, M.G. (2005) Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes* **54**, 1074-81.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Landry, L.G., Chapple, C.C. and Last, R.L. (1995) *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**, 1159-66.
- Lapko, V.N., Jiang, X.Y., Smith, D.L. and Song, P.S. (1999) Mass spectrometric characterization of oat phytochrome A: isoforms and posttranslational modifications. *Protein Sci* **8**, 1032-44.
- Lapko, V.N., Jiang, X.Y., Smith, D.L. and Song, P.S. (1997) Posttranslational modification of oat phytochrome A: phosphorylation of a specific serine in a multiple serine cluster. *Biochemistry* **36**, 10595-9.
- Lapko, V.N., Wells, T.A. and Song, P.S. (1996) Protein kinase A-catalyzed phosphorylation and its effect on conformation in phytochrome A. *Biochemistry* **35**, 6585-94.
- Lariguet, P., Boccalandro, H.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Chory, J., Casal, J.J. and Fankhauser, C. (2003) A growth regulatory loop that provides homeostasis to phytochrome a signaling. *Plant Cell* **15**, 2966-78.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. (1993) *Arabidopsis* Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Li, Q.H. and Yang, H.Q. (2007) Cryptochrome signaling in plants. *Photochem Photobiol* **83**, 94-101.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* **148**, 350-382.
- Lin, C. and Shalitin, D. (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 469-96.

- Liu, Z., Hong, S.W., Escobar, M., Vierling, E., Mitchell, D.L., Mount, D.W. and Hall, J.D. (2003) Arabidopsis UVH6, a homolog of human XPD and yeast RAD3 DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth. *Plant Physiol* **132**, 1405-14.
- Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L. and von Wieren, N. (2005) Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol* **137**, 671-80.
- Luccioni, L.G., Oliverio, K.A., Yanovsky, M.J., Boccalandro, H.E. and Casal, J.J. (2002) Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant Physiol* **128**, 173-81.
- Mateos, J.L., Luppi, J.P., Ogorodnikova, O.B., Sineshchekov, V.A., Yanovsky, M.J., Braslavsky, S.E., Gartner, W. and Casal, J.J. (2006) Functional and biochemical analysis of the N-terminal domain of phytochrome A. *J Biol Chem* **281**, 34421-9.
- McMichael, R.W. Jr and Lagarias, J.C. (1990) Phosphopeptide mapping of Avena phytochrome phosphorylated by protein kinases in vitro. *Biochemistry* **29**, 3872-8.
- Miernyk, J.A. (2001) The J-domain proteins of Arabidopsis thaliana: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. *Cell Stress Chaperones* **6**, 209-18.
- Monte, E., Al-Sady, B., Leivar, P. and Quail, P.H. (2007) Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. *J Exp Bot* **58**, 3125-33.
- Nagy, F., Kircher, S. and Schafer, E. (2001) Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *J Cell Sci* **114**, 475-80.
- Noir, S., Brautigam, A., Colby, T., Schmidt, J. and Panstruga, R. (2005) A reference map of the Arabidopsis thaliana mature pollen proteome. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 1257-66.
- Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E.A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H.P., Goodman, A.G., Harant, H., Garrison, J.L., Taunton, J., Katze, M.G. and Ron, D. (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* **126**, 727-39.
- Park, H.J., Ding, L., Dai, M., Lin, R. and Wang, H. (2008) Multisite Phosphorylation of Arabidopsis HFR1 by Casein Kinase II and a Plausible Role in Regulating Its Degradation Rate. *J Biol Chem* **283**, 23264-73.
- Phee, B.K., Kim, J.I., Shin, D.H., Yoo, J., Park, K.J., Han, Y.J., Kwon, Y.K., Cho, M.H., Jeon, J.S., Bhoo, S.H. and Hahn, T.R. (2008) A novel protein phosphatase indirectly regulates phytochrome interacting factor 3 via phytochrome. *Biochem J*
- Pih, K.T., Kabilan, V., Lim, J.H., Kang, S.G., Piao, H.L., Jin, J.B. and Hwang, I. (1999) Characterization of two new channel protein genes in Arabidopsis. *Mol Cells* **9**, 84-90.

- Polyak, S.J., Tang, N., Wambach, M., Barber, G.N. and Katze, M.G. (1996) The P58 cellular inhibitor complexes with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, to regulate its autophosphorylation and activity. *J Biol Chem* **271**, 1702-7.
- Qiu, X.B., Shao, Y.M., Miao, S. and Wang, L. (2006) The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2560-70.
- Quail, P.H. (1997) The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? *Bioessays* **19**, 571-9.
- Quinn, M.H., Oliverio, K., Yanovsky, M.J. and Casal, J.J. (2002) CP3 is involved in negative regulation of phytochrome A signalling in Arabidopsis. *Planta* **215**, 557-64.
- Rattan, S.I. (1996) Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging. *Exp Gerontol* **31**, 33-47.
- Rattan, S.I., Derventzi, A. and Clark, B.F. (1992) Protein synthesis, posttranslational modifications, and aging. *Ann N Y Acad Sci* **663**, 48-62.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M. and Chory, J. (1994) Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiol* **104**, 1139-1149.
- Robson, P.R. and Smith, H. (1996) Genetic and transgenic evidence that phytochromes A and B act to modulate the gravitropic orientation of Arabidopsis thaliana hypocotyls. *Plant Physiol* **110**, 211-6.
- 1) Rockwell, N.C. and Lagarias, J.C. (2006) The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* **18**, 4-14.
- 2) Rockwell, N.C., Su, Y.S. and Lagarias, J.C. (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-58.
- Runge, S., Sperling, U., Frick, G., Apel, K. and Armstrong, G.A. (1996) Distinct roles for light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants. *Plant J* **9**, 513-23.
- Sakamoto, A., Lan, V.T., Hase, Y., Shikazono, N., Matsunaga, T. and Tanaka, A. (2003) Disruption of the AtREV3 gene causes hypersensitivity to ultraviolet B light and gamma-rays in Arabidopsis: implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants. *Plant Cell* **15**, 2042-57.
- Smith, H. (1999) Phytochromes. Tripping the light fantastic. *Nature* **400**, 710-1, 713.
- Soh, M.S., Kim, Y.M., Han, S.J. and Song, P.S. (2000) REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 2061-74.

- Stockhaus, J., Nagatani, A., Halfter, U., Kay, S., Furuya, M., Chua, N.H. (1992) Serine-to-alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes Dev* **6**, 2364-2372.
- Takahashi, N., Goto, N., Okada, K. and Takahashi, H. (2002) Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 203-11.
- Takahashi, T., Naito, S. and Komeda, Y. (1992) Isolation and Analysis of the Expression of Two Genes for the 81-Kilodalton Heat-Shock Proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **99**, 383-390.
- Takano, M., Inagaki, N., Xie, X., Yuzurihara, N., Hihara, F., Ishizuka, T., Yano, M., Nishimura, M., Miyao, A., Hirochika, H. and Shinomura, T. (2005) Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell* **17**, 3311-25.
- Takano, M., Kanegae, H., Shinomura, T., Miyao, A., Hirochika, H. and Furuya, M. (2001) Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *Plant Cell* **13**, 521-34.
- Tang, N.M., Ho, C.Y. and Katze, M.G. (1996) The 58-kDa cellular inhibitor of the double stranded RNA-dependent protein kinase requires the tetratricopeptide repeat 6 and DnaJ motifs to stimulate protein synthesis in vivo. *J Biol Chem* **271**, 28660-6.
- Trupkin, S.A., Debrieux, D., Hiltbrunner, A., Fankhauser, C. and Casal, J.J. (2007) The serine-rich N-terminal region of *Arabidopsis* phytochrome A is required for protein stability. *Plant Mol Biol* **63**, 669-78.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y.C., Cyr, D. and Lithgow, T. (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* **5**, 567-71.
- Wang, D., Deng XW. (2004): Phytochrome signaling mechanism. in: Somerville, C, Meyerowitz, E: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0009, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Wilhelm, M.L., Reinbolt, J., Gangloff, J., Dirheimer, G. and Wilhelm, F.X. (1994) Transfer RNA binding protein in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **349**, 260-4.
- Xia Y, Nikolau BJ, Schnable PS. (1997) Developmental and hormonal regulation of the *arabidopsis* CER2 gene that codes for a nuclear-localized protein required for the normal accumulation of cuticular waxes. *Plant Physiol* **3**, 925-37.
- Yan, W., Schilke, B., Pfund, C., Walter, W., Kim, S. and Craig, E.A. (1998) Zuotin, a ribosome-associated DnaJ molecular chaperone. *EMBO J* **17**, 4809-17.
- Yang, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, X.W. and Wang, H. (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 804-21.

- Yeh, K.C. and Lagarias, J.C. (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13976-81.
- Zeidler, M., Bolle, C. and Chua, N.H. (2001) The phytochrome A specific signaling component PAT3 is a positive regulator of Arabidopsis photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol* **42**, 1193-200.
- Zhang, S., Lockshin, C., Herbert, A., Winter, E. and Rich, A. (1992) Zuotin, a putative Z-DNA binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **11**, 3787-96.

7. ABKÜRZUNGEN

7.1. Allgemeine Abkürzungen und Chemikalien

3AT	3-Aminotriazol
A.s.	<i>Avena sativa</i>
A.th.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BL	Blaulicht
Bp	Basenpaar
cDNA	DNA-Kopie der RNA
Col	<i>A. thaliana</i> var. Columbia
CTAB	Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DR	Dunkelrotlicht
DR _k	kontinuierliches Dunkelrotlicht
DR _p	Dunkelrotlichtpulse
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat als Natriumsalz
GFP	Green Fluorescent Protein
HIR	Hoch-Intensitäts-Reaktion
LB	lysogeny broth
Ler	<i>Arabidopsis thaliana</i> var. Landsberg erecta
LFR	„low fluence sesponse“; Niedrig Fluenz Antwort
N.t.	<i>Nicotiana tabacum</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Nt	Nukleotid
O.s.	<i>Oryza sativa</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol

phy	Phytochrom
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RL	Rotlicht
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	Über Nacht
VLF	“very low fluence“; Niedrigst Fluenz
VLFR	“very low fluence response“; Niedrigst Fluenz Antwort
WL	Weißlicht
WT	Wildtyp
YPAD	Yeast Extract - Peptone - Dextrose plus Adenine medium
SC	Synthetic complete

7.2. Basen und Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat (ATP, CTP, GTP, UTP)
dNTP	2'Desoxynuklooesid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

7.3. Maßeinheiten (sofern abweichend von IS-Norm)

Bp	Basenpaare
Da	Dalton
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
h	Stunde
min	Minute
Nt	Nukleotide
s	Sekunde
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

7.4. Nomenklatur

<i>PHYA</i>	Gen
<i>phyA</i>	Mutante
PHYA	Apoprotein
phyA	Holoprotein

8. EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 22.09.08

Julia Kneißl

9. ERKLÄRUNG ÜBER BISHERIGE PROMOTIONSVERSUCHE

Ich erkläre hiermit,

dass die Dissertation **nicht** ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

München, den 22.09.08

Julia Kneißl

10. LEBENS LAUF

Name: Julia Esther Kneißl

Geburtsdatum: 6. Februar 1981

Geburtsort: Augsburg

Bildungsweg:

7/2005-9/2008 Doktorarbeit in physiologischer Botanik unter Leitung von PD Dr. Cordelia Bolle an der Ludwig-Maximilians-Universität
Titel: Die Wahrnehmung von Niedrigst-Fluenzen durch Phytochrom A in *Arabidopsis thaliana*.

6/2005 Diplom in Biologie

7/2004 - 4/2005 Diplomarbeit in physiologischer Botanik in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. R. Herrmann an der Ludwig-Maximilians-Universität
Thema: Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten in der Phytochrom A-Signaltransduktion

10/2000 - 6/2005 Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Hauptfach: Botanik, physiologische Richtung
Nebenfächer: Genetik
Pharmakologie und Toxikologie
Botanik, systematische Richtung

9/1991 - 7/2000 Wernher-von-Braun-Gymnasium, Friedberg

9/1987 - 7/1991 Grundschule Kissing

11. PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSTEILNAHMEN

Teile dieser Dissertation wurden wie folgt in Fachzeitschriften publiziert und auf Tagungen präsentiert:

11.1. Publikationen

Kneissl, J, Shinomura, T., Furuya, M., Bolle, C. (2008). A Rice Phytochrome A in *Arabidopsis*: The Role of the N-terminus under red and far-red light. *Molecular Plant* 1, 84-102.

Kneissl, J., Wachtler, V., Chua, N-H., Bolle, C. (2008). OWL 1: How plants perceive very low fluences of light. In Bearbeitung.

11.2. Tagungsteilnahmen

International Plant Photobiology Meeting; Paris; 24.04.2006 - 28.04.2006; Posterbeitrag

21. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen; Dabringhausen; 26.02.2006 - 29.02.2008; Posterbeitrag

12. DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand im Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität im Arbeitskreis von Dr. Cordelia Bolle am Lehrstuhl von Prof. Dr. D. Leister.

Dr. Bolle möchte ich für die großartige Betreuung der Arbeit, die vielen interessanten Diskussionen und das hervorragende Arbeitsklima auf das Herzlichste danken. Eine bessere Doktor Mutter ist nicht denkbar!

Prof. Dr. D. Leister gilt mein Dank für die Bereitstellung der großzügigen Arbeitsmöglichkeiten und für seine Hilfe.

Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. H. Scheer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Nam-Hai Chua für die Bereitstellung der *hfr1*-Linien, Prof. Eberhard Schäfer für das Überlassen des *phyA*-Antikörpers sowie Prof. Ute Hoecker für den Samen der *spa1*-Linie.

Außerdem möchte ich Anina Neumann, Christine Matzenbacher, Elli Gerick, Ingrid Duschanek, Martina Reymers, Petra Ziemer, Patricia Torres und Christine Zöllmer, Andrea, Astrid, Susi, Tina, Jessy, Mathias, Ivo, Michael, Elena, Rhea, Serena, Ute, Alex und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfe bei den kleineren und größeren Tücken der Laborarbeit, die vielen aufmunternden Worte und das schöne Arbeitsklima danken.

Nicht zu vergessen sind auch Johanna und Tobi, die mich beim Schreiben der Arbeit super unterstützt haben, sowie Jörg, für viele lustige Unterhaltungen bei der täglichen Pendelei. Dankeschön!

Ein ganz besonderes, großes, dickes Dankeschön gilt Steffi Zintl für ihre Hilfe beim Kampf mit Hefe und ECL-System, sowie meiner alten Mitstreiterin Chantal Zuber für die vielen Tips und Tricks.

„Danke“ auch an die ultimativen „Gute-Laune-Lieferanten“: Billy, P, R, N, P und N.

Nicht zuletzt ein „Danke“ an meine Mutter und meine Schwester für ihre wundervolle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.