

**H₂O₂-Perzeption und Signaltransduktion:
Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der
Arabidopsis Histidinkinase 5 (AHK5)**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Michael Heunemann

aus Reichenbach im Vogtland

Tübingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

01.06.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Harter

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Claudia Oecking

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Wasserstoffperoxid als Signalmolekül.....	1
1.1.1 Perzeption von H ₂ O ₂	3
1.1.2 ROS und Phytohormone.....	4
1.2 Das Zweikomponentensystem.....	5
1.2.1 Die <i>Arabidopsis</i> Histidinkinase 5 (AHK5).....	10
1.3 Seneszenz.....	11
1.3.1 Seneszenz und Phytohormone.....	12
1.4 Die pflanzliche Immunantwort.....	13
1.5 Zielsetzung.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Antibiotika.....	17
2.1.3 Enzyme und kommerzielle Kits.....	17
2.1.4 Größenmarker.....	18
2.1.5 Antikörper.....	18
2.1.6 Synthetische Gene, Peptide, Proteine und Radioaktivität.....	18
2.1.7 Primer.....	19
2.1.8 Vektoren.....	21
2.1.9 DNA-Konstrukte.....	21
2.1.10 Verwendete Organismen.....	23
2.1.11 Medien.....	24
2.1.12 Geräte, Computerprogramme und Onlineressourcen.....	29
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Arbeit mit Bakterien.....	30
2.2.2 Arbeiten mit Proteinen.....	33
2.2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	34
2.2.4 Arbeiten mit Pflanzen.....	37
3 Ergebnisse	43
3.1 AHK5 ist ein positiver Regulator der Seneszenz in <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
3.2 Keine Veränderung der H ₂ O ₂ -Produktion in <i>ahk5-1</i> bei abiotischem & biotischem Stress..	48

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	ROS <i>Burst</i> nach flg22 Behandlung in <i>ahk5-1</i> nicht beeinträchtigt	48
3.2.2	Keine Änderung der H ₂ O ₂ Produktion in <i>ahk5-1</i> nach abiotischem Stress	49
3.3	Subzelluläre Lokalisation verschiedener GFP-Fusionsproteine von AHK5-Fragmenten	52
3.3.1	AHK5 besitzt kein Kernlokalisierungssignal.....	55
3.4	AHK5 homodimerisiert & interagiert mit ETR1 & NADPH-abhängigen Oxidasen <i>in planta</i> .	56
3.5	Etablierung einer stabilen HEK-Zell Expressionslinie zur Proteinproduktion.....	58
3.6	Expression von Proteinfragmenten von AHK5 in <i>E. coli</i> unter optimierten Bedingungen....	61
3.7	<i>In vitro</i> Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente.....	63
3.7.1	Autophosphorylierung von AHK5_C8 und Phosphattransfer auf AHP1.....	63
3.7.2	ARR4 besitzt Phosphataseaktivität.....	66
3.7.3	AHK5_C7 besitzt keine Autophosphorylierungsaktivität <i>in vitro</i>	66
3.7.4	Der Phosphattransfer erfolgt über ein Histidin-Aspartat- <i>Phosphorelay</i>	67
3.8	H ₂ O ₂ - bzw. redoxabhängige Dimerisierung der <i>Input</i> -Domäne von AHK5.....	68
3.9	AHK5 ist eine H ₂ O ₂ - bzw. redoxabhängige Sensor-Histidinkinase.....	71
4	Diskussion	72
4.1	AHK5 ist ein positiver Regulator der Seneszenz in <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
4.2	<i>In planta</i> H ₂ O ₂ -Gehalt in <i>ahk5-1</i> nach biotischem sowie abiotischem Stress.....	74
4.3	Subzelluläre Lokalisation verschiedener GFP-Fusionsproteine von AHK5-Fragmenten	75
4.4	<i>In planta</i> Protein-Protein-Interaktionsanalysen mittels FRET/FLIM	77
4.4.1	AHK5 interagiert mit dem Ethylrezeptor ETR1.....	78
4.4.2	AHK5 interagiert nicht mit dem Rezeptor für flg22 (FLS2).....	78
4.4.3	AHK5 interagiert mit den NADPH-abhängigen Oxidasen AtRbohC, D und F.....	79
4.5	Expression von Proteinfragmenten von AHK5 in <i>E. coli</i> unter optimierten Bedingungen....	81
4.6	<i>In vitro</i> Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente.....	82
4.7	Biochemische Charakterisierung der <i>Input</i> -Domäne von AHK5.....	84
4.8	Untersuchung der Aktivität von AHK5 abhängig von H ₂ O ₂	86
5	Ausblick	88
6	Zusammenfassung	90
7	Literaturverzeichnis	92
8	Anhang	107
	Curriculum vitae	110
	Danksagung	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalwege TCS und MSP.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gateway-Rekombinierungsreaktion.....	36
Abbildung 3: Anteil der Blätter einer bestimmten Farbe relativ zur Gesamtblattzahl.....	44
Abbildung 4: Bestimmung des <i>in planta</i> Chlorophyllgehalts.....	45
Abbildung 5: Lipidperoxidation während der Seneszenz	46
Abbildung 6: <i>In planta</i> H ₂ O ₂ -Gehaltsbestimmung mittels H ₂ DCFDA	47
Abbildung 7: ROS-burst nach flg22-Behandlung	49
Abbildung 8: <i>In planta</i> H ₂ O ₂ -Gehalt nach Behandlung mit abiotischem Stress.....	50
Abbildung 9: Proteindomänen, Faltungsanalyse & schematische Darstellung der AHK5-Fragmente .	51
Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine verschiedener AHK5-Fragmente..	53
Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation von AHK5_C7-GFP unter Kontrolle des AHK5-Promotors	54
Abbildung 12: Western Blot und spezifischer Nachweis der AHK5-GFP Fusionsproteine	54
Abbildung 13: Untersuchung der AHK5-Proteinsequenz auf Kernlokalisierungssignale.....	55
Abbildung 14: <i>In planta</i> Interaktionsanalyse mittels FRET/FLIM.....	57
Abbildung 15: Transiente Transformation von HEK-Zellen	59
Abbildung 16: Stabile Expression in HEK293-Zellen	60
Abbildung 17: Proteinnachweis von AHK5_C8 & AHK5_C9 aus E. coli Zellextrakten.....	61
Abbildung 18: IPTG-induzierte Expression einer endogenen Histidinkinase in E. coli Zellextrakten. ..	62
Abbildung 19: Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente mit ³³ P	65
Abbildung 20: Protein-Protein-Phosphorylierungsexperiment mit vollständigem MSP	67
Abbildung 21: Protein-Protein-Phosphorylierungsexperiment mit AHK5_C7.....	67
Abbildung 22: Suche nach Phosphorylierungsstellen in AHK5_C8 und AHP1	68
Abbildung 23: H ₂ O ₂ - bzw. redoxabhängige Aggregation der Input-Domäne von AHK5.....	70
Abbildung 24: H ₂ O ₂ -abhängige Aktivität von AHK5	71
Abbildung 25: Model der H ₂ O ₂ -Perzeption und Signalweiterleitung durch AHK5	91

Abbildung A 1: Subzelluläre Lokalisation versch. mutanter Varianten von AHK5_C9.....	107
Abbildung A 2: Western Blot und spezifischer Nachweis der GFP-, bzw- mCherry Fusionsproteine	108
Abbildung A 3: Vektorkarten der verwendeten Expressionsvektoren	108
Abbildung A 4: Vektorkarten der verwendeten Entry-Vektoren.....	109

Abkürzungsverzeichnis

³³ P	Adenosintriphosphat (ATP)-Gamma ³³ P
4-MU	4-Methylumbelliferon
(v/v)	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
(w/v)	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
ABA	<i>abscisic acid</i> (Abscisinsäure)
Abs	Absorbtion
AHK	<i>Arabidopsis</i> Histidin Kinase
AHP	<i>Arabidopsis</i> Histidin-Phosphotransferprotein
AMP	Ampicillin
ARR	Arabidopsis Response Regulator
AtRboh	<i>Arabidopsis thaliana respiratory oxidase homolog</i>
bp	Basenpaare
BR	Brassinosteroid
CK	Cytokinin
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
Cm	Chloramphenicol
Col-0	Columbia 0 (Arabidopsis Ökotyp)
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DTT	1,4-Dithiotreitol
ET	Ethylen
ETR1	<i>Ethylen Responsive 1</i>
FRET/FLIM	<i>Förster resonance energy transfer fluoeresescence lifetime imaging microscopy</i>
flg22	Flagellin
FLS2	<i>Flagellin sensing 2</i>
G418	Geneticin
Gent	Gentamycin
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HK	Histidinkinase

HPT	Histidin-Phosphotransferprotein
Hyg	Hygromycin
IAA	<i>Indol acetic acid</i> (Auxin)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JA	<i>Jasmonic acid</i> (Jasmonsäure)
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
lacZ	Gen codierend für β -Galactosidase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDA	Malondialdehyd
min	Minute
N ₂ (l)	flüssiger Stickstoff
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogenphosphat
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
Rif	Rifampicin
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RR	Responseregulator
s	Sekunde
SA	Salicylsäure
SPAD	<i>single-photon avalanched diode</i>
Spec	Spectinomycin
TBA	Thiobarbitursäure
TCA	Tricarbonsäure

1 Einleitung

Die Wahrnehmung und Integration von endogenen und exogenen Einflüssen ist für alle auf der Erde lebenden Organismen von essentieller Bedeutung. Für Pflanzen besteht hierfür eine besondere Notwendigkeit, da sie sich als sessile Lebewesen ihren Umwelteinflüssen nicht entziehen können. Im komplexen Zusammenwirken der Phytohormone Cytokinin (CK), Ethylen (ET), Auxin (IAA), Abscisinsäure (ABA) und Giberelline (GA), sowie Brassinosteroide (BR), Jasmonsäure (JA), Salicylsäure (SA) und Strigolactone werden adaptive Entwicklungsprozesse gesteuert. Neben den Phytohormonen spielen jedoch noch weitere Signalmoleküle, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffmonoxid (NO), Inositoltriphosphate oder Calcium (Ca^{2+}) eine entscheidende Rolle. Deren Perzeption und Signaltransduktion ermöglicht über stark verflochtene Systeme ein Überleben unter sich ständig ändernden Umweltbedingungen.

1.1 Wasserstoffperoxid als Signalmolekül

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) nimmt als Signalmolekül eine besondere Rolle ein, da es eng mit dem Redoxstatus sowie dem Metabolismus der Zelle verknüpft ist. Genau wie andere reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) kann H_2O_2 oxidative Schädigungen zellulärer Bestandteile, wie beispielsweise Proteinen oder Membranen hervorrufen. Die Bildung von ROS durch nicht vollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff ist ein unabdingbarer Nebeneffekt in allen aerob lebenden Organismen. ROS entstehen bei metabolischen Prozessen in Peroxisomen und Glyoxisomen, sowie bei Energieüberschuss in den Elektronentransportketten der Chloroplasten und Mitochondrien (Gechev et al., 2006, Halliwell, 2006, Kim et al., 2008, Krieger-Liszkay, 2005). Zu den ROS zählen unter anderem hochreaktive und kurzlebige Radikale, wie zum Beispiel das Hydroxid-Anion (O_2^-), das Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot) oder aber auch stabilere Formen wie Ozon (O_3) und das oben genannte Wasserstoffperoxid (H_2O_2). H_2O_2 hat im Vergleich zu den kurzlebigen Radikalen eine relativ lange Halbwertszeit von etwa 1 ms und besitzt die Fähigkeit, Membranen passiv oder aber auch aktiv über Wasserkanäle (Aquaporine) zu überwinden (Bienert et al., 2006, Miller et al., 2010).

Ein Ungleichgewicht zwischen Entstehung und Abbau von ROS führt zu oxidativem Stress, was wiederum zu einer zusätzlichen Produktion von ROS führt (*positiver Feedback Loop*) (Finkel and Holbrook, 2000). So führen beispielsweise extreme Temperaturen, UV-Strahlung, Trockenheit, Verletzung, Pathogenbefall und bestimmte Phytohormone zur endogenen Produktion von ROS und somit zu oxidativem Stress (Apel and Hirt, 2004, Neill et al., 2002a). Auf der anderen Seite hat exogen appliziertes H_2O_2 eine Erhöhung der Toleranz auf Kälte oder Hitze, sowie abiotischen Stress zur Folge

1. Einleitung

(Vanacker et al., 2000, Prasad et al., 1994, Desikan et al., 2000). ROS-abhängige Signalwege sind äußerst dynamisch und ihre Regulation und Signalweiterleitung werden durch eine ständige Produktion, bzw. den Abbau von ROS geregelt (Mittler et al., 2004, Mittler et al., 2011).

Eine aktive Produktion von H_2O_2 geschieht hauptsächlich im Apoplast, was beispielsweise bei der pflanzlichen Immunantwort den oxidativen *Burst* auslöst. Hierbei kommt es zur lokalen, enzymatischen Freisetzung von ROS, was oxidative Schädigungen bei den betroffenen Pflanzenzellen und insbesondere beim Pathogen hervorruft. Diese apoplastische H_2O_2 -Produktion ist jedoch auch für das normale Wachstum, adaptive Entwicklungsprozesse und die Zellwandsynthese von Bedeutung. Hier spielen besonders die durch Rho-ähnliche Proteine (*Rho-related GTPases*, ROPs) regulierten, membrangebundenen NADPH-abhängigen Oxidasen (*NADPH-dependent oxidase like respiratory oxidase homologs*, Rboh), sowie die zellwandassoziierten Peroxidasen eine entscheidende Rolle (Miller et al., 2010). Die ROS produzierenden Enzyme werden dabei durch verschiedene Stimuli aktiviert (Bolwell et al., 2002). Beispielsweise sorgt die Phosphorylierung von AtRbohF durch die Kinase OST1 (*Open stomata 1*) zu deren Aktivierung, was zur H_2O_2 -Produktion und anschließendem Stomataschluss führt (Desikan et al., 2006, Sirichandra et al., 2009).

Zu hohe Konzentrationen an H_2O_2 führen zum programmierten Zelltod. Dabei ist der H_2O_2 -induzierte Zelltod bei bestimmten Entwicklungsprozessen wie beispielsweise der Seneszenz (Gechev and Hille, 2005, Gechev et al., 2005), aber auch bei der Pathogenabwehr (Bolwell et al., 2002, Petrov and Van Breusegem, 2012) von besonderer Bedeutung.

Zur Kontrolle der zellulären ROS-Konzentration besitzen Pflanzen ein vielfältiges Repertoire an enzymatischen und nichtenzymatischen Antioxidantien. Beispiele für reduktive Enzyme, die H_2O_2 in Wasser umwandeln und somit unschädlich machen, sind die Catalasen (CAT), die Ascorbatperoxidasen (APX), die sekretorischen Peroxidasen (POX), die Gluthationreduktase (GR) und Peroxiredoxine (Mittler et al., 2011, Noctor and Foyer, 1998). Tocopherole, Ascorbinsäure und Flavonoide stellen auf der anderen Seite nichtenzymatische Antioxidantien dar (Mittler et al., 2011, Noctor and Foyer, 1998, Miller et al., 2010, Petrov and Van Breusegem, 2012).

1.1.1 Perzeption von H₂O₂

H₂O₂ ist als Signalmolekül bei zahlreichen Prozessen beteiligt und kann hierfür gezielt von der Pflanze produziert, sowie kontrolliert abgebaut werden (Bailey-Serres and Mittler, 2006). Des Weiteren haben Transkriptomanalysen gezeigt, dass hunderte von Genen in ihrer Expression durch H₂O₂ reguliert werden (Vanderauwera et al., 2005, Desikan et al., 2001b). Es ist daher offensichtlich, dass die zelluläre H₂O₂-Konzentration ständig wahrgenommen und diese Information für eine entsprechende Antwort in den Zellkern weitergeleitet wird. Obwohl H₂O₂ eine entscheidende Rolle bei pflanzlichen Entwicklungsprozessen spielt, ist bis heute kein pflanzlicher Rezeptor für H₂O₂ bekannt.

Für die direkte Wahrnehmung von H₂O₂ oder dem damit verbundenen Redoxstatus gibt es verschiedene Möglichkeiten. Dabei können H₂O₂- oder redoxensitive Thiolreste von Proteinen oder entsprechende Cofaktoren, wie beispielsweise Eisen-Schwefel-*cluster*, Häm-Cofaktoren oder Flavine eine wichtige Rolle spielen (Green et al., 2009). Theoretisch könnte in Pflanzen eine erhöhte Konzentration an H₂O₂ über redoxensitive Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise den Hsfs (*heat shock factors*) perzipiert werden (Kotak et al., 2007, Miller and Mittler, 2006). So wird zum Beispiel H₂O₂ in Säugetieren und *Drosophila melanogaster* durch direkte Bindung an Hsfs erkannt, welche anschließend als Homotrimer mit der DNA interagieren können (Zhong et al., 1998, Ahn and Thiele, 2003). Des Weiteren führt die H₂O₂-induzierte Oxidation zweier Cysteinreste des Peroxidsensors OxyR in *E. coli* zur Bildung einer Disulfidbrückenbindung, was eine strukturelle Veränderung des Proteins zur Folge hat. OxyR wird damit aktiviert und bindet als Transkriptionsfaktor an die DNA und führt zur Expression von Genen, die der antioxidativen Antwort dienen (Green and Paget, 2004, Imlay, 2008, Knapp et al., 2009). In *Saccharomyces* erfolgt die Toleranz gegenüber oxidativem Stress, sowie die dazugehörige transkriptionelle Regulation über einen Histidinkinase-Signalweg. Dabei wird die Histidinkinase SLN1 als H₂O₂-Rezeptor vermutet (Singh, 2000, Buck et al., 2001). Auch in *Arabidopsis* sind H₂O₂-abhängige Signalwege bekannt, die über Histinkinasen verlaufen. So ist beispielsweise der H₂O₂-induzierte Stomataschluss vom Ethylenrezeptor ETR1 (*Ethylen responsive 1*) abhängig (Desikan et al., 2005, Desikan et al., 2006). Interessanterweise kann ETR1 das Fehlen von SLN1 in *Saccharomyces* durch Aktivierung eines H₂O₂-abhängigen Signalweges komplementieren. Dabei wird jedoch die Histinkinaseaktivität von ETR1 nicht benötigt, wohingegen das Cystein an Position 65 von ETR1 hierfür unverzichtbar ist (Desikan et al., 2005).

1. Einleitung

Zusätzlich existieren in *Arabidopsis thaliana* weitere Proteinkinasen, deren Aktivität durch Applikation von H_2O_2 induziert wird (Desikan et al., 2001b). Beispiele hierfür sind die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) AtMPK3 und AtMPK6 (Kovtun et al., 2000, Desikan et al., 2001a). Die AtMPK3 und 6 vorgeschaltete Kinase OXI1 (*Oxidative signal-inducible 1*) wurde bereits als möglicher Redoxsensor diskutiert, weil sie durch oxidativen Stress aktiviert wird (Kovtun et al., 2000, Nakagami et al., 2004). Da eine Regulation der Aktivität von MAPKs durch die durch H_2O_2 inaktivierbare Thyrosinphosphatase AtPTP1 erfolgt, ist eine enge Vernetzung zwischen H_2O_2 -abhängigen Phosphatasen und Kinasen ersichtlich (Gupta and Luan, 2003).

Des Weiteren ist der intrazelluläre Redoxstatus bei der Perzeption und Signalweiterleitung von H_2O_2 von Bedeutung (Foyer and Noctor, 2009, Jaspers and Kangasjarvi, 2010, Miller et al., 2008). Der Redoxstatus der Zelle beschreibt das Gleichgewicht zwischen oxidativen Substanzen (wie beispielsweise freie Radikale und andere ROS) und Antioxidantien. Das Redoxsystem wird unter anderem durch Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-L-glycin) gepuffert, welches sowohl in reduzierter Form (GSH) als auch in oxidiert Form (GSSG) vorliegen kann. In Pflanzenzellen erfüllt GSH verschiedene anti-oxidative Funktionen, wie beispielsweise die Regeneration von reduziertem Ascorbat während des Ascorbat/Glutathion-Zyklus oder bei der Entgiftung von Xenobiotika bzw. Schwermetallen (Foyer and Noctor, 2009, Board and Menon, 2013, Cobbett, 2000). Nach Oxidation von GSH zu GSSG durch ROS wird dieses sehr rasch durch die Glutathionreduktase zu GSH reduziert und damit regeneriert (Halliwell and Foyer, 1978). GSH besitzt eine zelluläre Konzentration von 1-10-mM und im nicht gestressten Zustand ist das Verhältnis von GSH zu GSSG im Blatt bei etwa 20 zu 1 (Mhamdi et al., 2010). Dieses Verhältnis kann jedoch subzellulär variieren, sowie im Zytoplasma größer als in der Vakuole sein (Meyer et al., 2007, Queval et al., 2011). Die Oxidation von GSH kann auch zu gemischten Disulfiden mit anderen Proteinen führen (Dixon et al., 2005). Die daraus resultierende Glutathionylation oder sogar ein direktes Binden von Glutathion könnte ebenfalls eine Rolle in der H_2O_2 -Signaltransduktion spielen. Anhand der Vielzahl an Möglichkeiten wie Pflanzen auf H_2O_2 reagieren können und wie eine Perzeption dieses Moleküls erfolgen könnte, wird ersichtlich, dass hierfür ein komplexes und stark vernetztes System von Signaltransduktionskaskaden existieren muss.

1.1.2 ROS und Phytohormone

ROS-abhängige Signalwege sind eng mit phytohormongesteuerten Signalwegen verknüpft, die der Regulation von adaptiven Prozessen und der pflanzlichen Entwicklung dienen. So sind beispielsweise ROS und SA in Abwehrreaktionen und Prozessen, die zum Zelltod führen beteiligt (Vlot et al., 2009). Dabei hat eine erhöhte ROS-Konzentration die verstärkte Produktion von SA zur Folge (Chamnongpol et al., 1998), wohingegen ROS-induzierte Antworten bezüglich der Abwehrreaktion und dem Zelltod

durch Unterdrückung der SA-Biosynthese inhibiert werden (Chaouch and Noctor, 2010). Auch spielt beim SA-abhängigen Schließen der Stomata die Produktion von ROS eine entscheidende Rolle (Khokon et al., 2011). Des Weiteren steht auch der Signalweg von GA mit ROS im Zusammenhang. Durch GA-induzierte Degradation von DELLA-Repressorproteinen, welche die Expression von antioxidativen Enzymen regulieren, kann die ROS-Konzentration beeinflusst werden (Achard et al., 2008). Andererseits wird bei Betrachtung des Stomataschluss ebenfalls eine Verknüpfung zwischen ABA und H_2O_2 deutlich. So aktiviert ABA die Produktion von H_2O_2 , wohingegen H_2O_2 im Gegenzug zum ABA-abhängigen Schließen der Stomata führt (Pei et al., 2000, Murata et al., 2001). Auch ET löst einen H_2O_2 -abhängigen Stomataschluss aus (Desikan et al., 2006). Umgekehrt führt die apoplastische H_2O_2 -Produktion zur Akkumulation von ET (Schraudner et al., 1998). Schließlich wird das IAA-regulierte Wurzelwachstum beim Gravitropismus auch von H_2O_2 beeinflusst (Joo et al., 2001).

1.2 Das Zweikomponentensystem

Das Zweikomponentensystem (*Two Component System*, TCS) stellt ein komplexes System dar, um bestimmte Stimuli wahrzunehmen und eine entsprechende zelluläre Reaktion einzuleiten. Dieser Signalweg wurde ursprünglich in Prokaryoten entdeckt, wo er beispielsweise bei der Chemotaxis oder der Antwort auf osmotischen Stress eine entscheidende Rolle spielt (Mizuno and Mizushima, 1990, Parkinson and Kofoid, 1992). Kurze Zeit später wurde dessen Existenz durch Entdeckung des Osmosensors SLN1 in *Saccharomyces cerevisiae* (Maeda et al., 1994, Ota and Varshavsky, 1993) und des Ethylenrezeptors ETR1 in *Arabidopsis thaliana* (Chang et al., 1993) auch in Eukaryoten nachgewiesen.

Das TCS besteht – in seiner ursprünglichen Form – aus zwei Elementen: Einer Histidinkinase (HK) als Rezeptor und einem Responseregulator (RR), der die zelluläre Antwort auslöst. Dabei erfolgt die Signalübertragung über einen sog. *Phosphorelay* zwischen Histidin (H) und Aspartat (D) (Stock et al., 2000). Nach Signalperzeption in der *Input*-Domäne der HK erfolgt die Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes (H) in der *Transmitter*-Domäne. Durch einen Histidin-Aspartat *Phosphorelay* wird das Phosphat auf einen konservierten Aspartatrest (D) in der *Receiver*-Domäne des RRs übertragen. Die Phosphorylierung des RRs führt zu dessen Aktivierung. Hierdurch kann der RR direkt als Transkriptionsfaktor oder mittels Protein-Protein-Interaktion eine zelluläre Antwort auslösen. Durch Dephosphorylierung und somit Deaktivierung des RRs wird ein Abschwächen der Signalantwort erreicht (Schaller et al., 2008, Stock et al., 2000, Casino et al., 2009).

1. Einleitung

Im Laufe der Evolution wurde das klassische TCS zu einem *Multi-Step Phosphorelay* (MSP) weiterentwickelt (Abbildung 1). Im Unterschied zum klassischen TCS sind im MSP Histidin-Phosphotransferproteine (HPT) als zusätzliche Elemente vorhanden. Diese sind zwischen Histidinkinase (HK) und Responseregulator (RR) geschaltet. Um den *Phosphorelay* zwischen H und D zu gewährleisten, besitzen die sog. Hybrid-Histidinkinasen hierfür eine weitere Domäne (*Receiver-Domäne*) mit phosphorylierbarem Aspartatrest (Hass et al., 2004, Lohrmann and Harter, 2002, Oka et al., 2002, Stock et al., 2000, West and Stock, 2001, Horak et al., 2011).

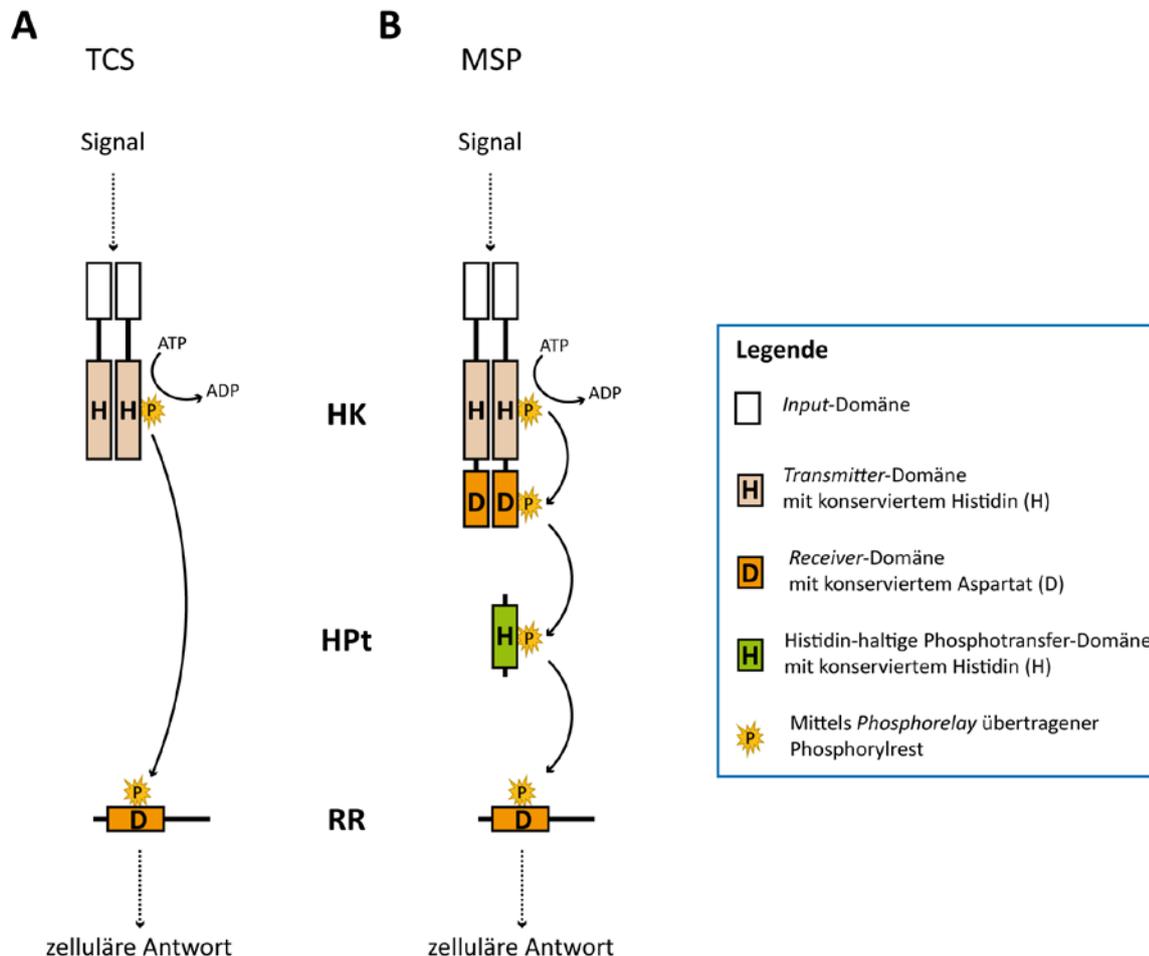


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalwege TCS und MSP. (A) Die Signalperzeption in der Input-Domäne der Histidinkinase (HK) führt zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrests (H) in der Transmitter-Domäne. Der anschließende Phosphotransfer auf den konservierten Aspartatrest (D) des Responseregulators (RR) führt zu dessen Aktivierung und der zellulären Antwort. (B) Nach Signal-abhängiger Phosphorylierung des konservierten Histidinrests (H) in der Transmitter-Domäne erfolgt ein intramolekularer Transfer des Phosphorylrests (P) auf ein Aspartat (D) in der Receiver-Domäne. Das Histidin-Phosphotransferprotein (HPT) übernimmt den Phosphorylrest von der HK und überträgt diesen auf einen Responseregulator (RR), was zu dessen Aktivierung und der anschließenden zellulären Antwort führt.

Die Elemente des MSPs sind in *Arabidopsis thaliana* als Multigenfamilien kodiert: Elf Hybrid-Histidinkinasen, sechs Histidin-Phosphotransferproteine und 32 Responseregulatoren (Hwang et al., 2002, Lohrmann and Harter, 2002, Schaller et al., 2008, To and Kieber, 2008).

Die wohl am besten untersuchte Genfamilie der Hybrid-Histidinkinasen sind die Cytokininrezeptoren: *Arabidopsis* Histidinkinase 2 (AHK2), AHK3 und AHK4 (Higuchi et al., 2004, Nishimura et al., 2004, Riefler et al., 2006, Romanov et al., 2006). Deren *Input*-Domäne wird als CHASE-Domäne (*Cyclase/Histidine kinase-associated sensing extracellular*) bezeichnet, welche das Phytohormon Cytokinin (CK) direkt bindet (Hothorn et al., 2011, Heyl et al., 2007). Anschließend erfolgt eine CK-abhängige Signalweiterleitung innerhalb eines MSP, die eine entsprechende zelluläre Antwort zur Folge hat (Inoue et al., 2001, Suzuki et al., 2001, Ueguchi et al., 2001, Wulfetange et al., 2011). CKs besitzen Funktionen in verschiedenen Bereichen des Wachstums und der Entwicklung der Pflanze, wie beispielsweise bei der Kontrolle der Zellteilung, der Seneszenz oder der Regulation und Anpassung an biotischen und abiotischen Stress (Kieber and Schaller, 2014, Zwack and Rashotte, 2015, Shanks et al., 2016, Amasino, 2005). Die CK-Rezeptoren sind Transmembranproteine, die hauptsächlich am Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind, wobei die CHASE-Domäne ins ER-Lumen zeigt. Darüber hinaus kann eine Lokalisation an der Plasmamembran nicht ausgeschlossen werden (Caesar et al., 2011, Lomin et al., 2011, Wulfetange et al., 2011). AHK4 besitzt zusätzlich zur Histidinkinaseaktivität eine Phosphataseaktivität. Bei Abwesenheit von CK können nachgeschaltete Elemente (*Arabidopsis* Histidin-Phosphotransferproteine, AHPs) durch AHK4 dephosphoryliert werden, was wiederum zur Inaktivierung des Signalweges führt. Dies zeigt die Möglichkeit eines bidirektionalen *Phosphorelays* (Mahonen et al., 2006b).

Eine weitere Histidinkinase, die sog. *Cytokinin-Insensitive 1* (CKI1) wurde ursprünglich auch als ein Bestandteil im CK-Signalweg vermutet (Kakimoto, 1996). Sie ist jedoch nicht in der Lage, CK *in vitro* zu binden und ihr fehlt auch die hierfür notwendige CHASE-Domäne (Yamada et al., 2001). Der Signalweg von CKI1 verläuft jedoch ebenfalls über ein MSP und spielt eine Rolle bei der Entwicklung des weiblichen Gametophyten, sowie der Differenzierung des Leitgewebes (Deng et al., 2010, Hejatko et al., 2003, Hejatko et al., 2009).

Eine andere Gruppe der *Arabidopsis* Histidinkinasen sind die Rezeptoren für Ethylen (ET). Genau wie CK besitzt ET ein breites Wirkungsspektrum. Dieses reicht von der Regulation von Entwicklungsprozessen wie beispielsweise der Keimung bis hin zur Seneszenz, sowie adaptiven Antworten auf Stress (Bleecker and Kende, 2000, Merchante et al., 2013). Die Familie der membrangebundenen ET-Rezeptoren besteht aus: ETR1 (*Ethylen responsive 1*), ERS1 (*Ethylen response sensor 1*), ETR2, ERS2 und EIN4 (*Ethylen insensitive 4*) (Grefen and Harter, 2004, Guo and Ecker, 2004, Hwang et al., 2002). Alle Mitglieder dieser Familie sind hauptsächlich an der ER-Membran lokalisiert (Grefen et al., 2008), wobei sowohl der N-terminale ET-bindende als auch der C-terminale Bereich mit *Transmitter*- und *Receiver*-Domäne zum Cytoplasma orientiert sind. Alle ET-Rezeptoren sind negative Regulatoren der Ethylenantwort und aktivieren bei Abwesenheit von ET die Serin/Threonin Kinase CTR1

1. Einleitung

(*Constitutive triple response 1*), deren Aktivität zur Unterdrückung der Expression von ET-induzierten Genen führt (Kieber et al., 1993, Ju et al., 2012). Von besonderer Bedeutung für die ET-Perzeption sind ETR1 und ERS1 (Qu et al., 2007), welche die einzigen Mitglieder der ET-Rezeptorfamilie sind, die Histidinkinaseaktivität aufweisen (Hall and Bleecker, 2003, Moussatche and Klee, 2004). Der ET-Signalweg verläuft größtenteils über eine klassische MAP Kinase-Kaskade (Gao et al., 2003). Es wurde jedoch gezeigt, dass eine ET-abhängige Regulation der Genexpression auch über ein MSP mit Phosphorylierung der *Arabidopsis* Responseregulatoren ARR1 und ARR2 durch ETR1 erfolgt (Hass et al., 2004, Street et al., 2015). Ferner wird die Autophosphorylierung von ETR1 durch ET reguliert, was eine phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen ETR1 und AHP1 zur Folge hat (Scharein and Groth, 2011). AHP1, ARR1 und ARR2 besitzen ebenfalls Funktionen in der CK-Signaltransduktion, was einen Zusammenhang der ET-abhängigen zellulären Antwort und dem CK-Signalweg zeigt (Zdarska et al., 2015).

Die *Arabidopsis* Histidinkinase 1 (AHK1) ist ein positiver Regulator in der Antwort auf Salz- bzw. Trockenstress und wird als Osmosensor vermutet (Tran et al., 2007, Urao et al., 1999, Wohlbach et al., 2008). Jüngste Erkenntnisse zeigen Funktionen von AHK1 bei der Skotomorphogenese von *Arabidopsis* (Dautel R. et al., unveröffentlicht).

Die Bindeglieder zwischen den Histidinkinasen und den Responseregulatoren stellen die bereits erwähnten *Arabidopsis* Histidin-Phosphotransferproteine (AHPs) dar. AHP1-5 besitzen den hierfür benötigten konservierten Histidinrest in der Histidin-Phosphotransferdomäne (HPt-Domäne) und sind positive Regulatoren der CK-Antwort (Hutchison et al., 2006). In der HPt-Domäne von AHP6 ist das für den *Phosphorelay* notwendige Histidin durch ein Asparagin ersetzt, was eine Phosphorylierung unmöglich macht. AHP6 wird somit als pseudo AHP bezeichnet, ist ein negativer Regulator der CK-Antwort und besitzt Funktionen bei der Entwicklung des Leitgewebes (Mahonen et al., 2006a). Die AHPs sind sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert und vermitteln den Signaltransfer vom Zytoplasma in den Zellkern. Ursprünglich wurde eine Akkumulation der AHPs im Zellkern, als Antwort auf CK angenommen (Hwang and Sheen, 2001). Dagegen postulieren neuere Studien, dass eine CK-unabhängige und konstant aufrechterhaltene Verteilung der AHPs zwischen Zellkern und Zytoplasma stattfindet (Punwani et al., 2010).

Die *Arabidopsis* Responseregulatoren (ARRs) stellen die *Output*-Elemente des MSPs dar und lassen sich in vier Gruppen einteilen: A-Typ ARR (ARR3-9, 15-17), B-Typ ARR (ARR1, 2, 10-14, 18-21), C-Typ ARR (ARR22 und 24), sowie Pseudo-ARRs (APRR1-9) (Mason et al., 2004, Schaller et al., 2007, To and Kieber, 2008).

A-Typ ARR_s sind negative Regulatoren der CK-Antwort, agieren dabei synergistisch und zeigen funktionelle Redundanz (D'Agostino et al., 2000, Ren et al., 2009, Stock and Guhaniyogi, 2006, To et al., 2007, To et al., 2004). Sie haben neben der *Receiver*-Domäne eine nur sehr kurze C-terminale Domäne, welche zumindest bei ARR₃, 4, 7 und 15 ein Kernlokalisierungssignal (*Nuclear localization signal*, NLS) enthält (Heunemann et al., unveröffentlicht). A-Typ ARR_s sind sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden (Sweere et al., 2001), akkumulieren jedoch hauptsächlich im Zellkern (Imamura et al., 2001). Ursprünglich wurden sie als Gene der primären CK-Antwort entdeckt, da ihre Transkription direkt durch CK induziert wird (Hwang and Sheen, 2001, Sakai et al., 2001). Die Aktivität und die Stabilität der A-Typ ARR_s hängt von deren Phosphorylierungsstatus ab. So folgt nach CK-induzierter Phosphorylierung eine gesteigerte Proteinhalbwertszeit der A-Typ ARR_s (To et al., 2007, Leibfried et al., 2005). Sie sind jedoch auch an anderen Entwicklungs- und Wachstumsprozessen beteiligt, was beispielsweise durch erhöhte Expression der A-Typ ARR_s bei extremen Temperaturen, Trocken- oder Salzstress zu beobachten ist (Urao et al., 1998). Des Weiteren ist eine Auxin (IAA)-induzierte Unterdrückung der Expression von ARR₇ und ARR₁₅ im Sprossmeristem zu beobachten (Zhao et al., 2010). Zusätzlich ist phosphoryliertes und somit aktives ARR₄ in der Lage, die Signalwege der Licht- und CK-Antwort zu verknüpfen, indem es mit Phytochrom B interagiert und den Photorezeptor in seiner aktiven Form stabilisiert (Mira-Rodado et al., 2007, Sweere et al., 2001). Auch für ARR₃, 4 und 9 sind CK-unabhängige Funktionen in der circadianen Rhythmik bekannt (Ishida et al., 2008, Salome et al., 2006). ARR₅, 6, 7 und 15 spielen bei der Entwicklung des Meristems (Leibfried et al., 2005), sowie in der Embryogenese eine entscheidende Rolle (Muller and Sheen, 2008), wobei ARR₇ zusätzlich einen negativen Regulator im Kältestress darstellt (Jeon et al., 2010).

Die B-Typ ARR_s sind positive Regulatoren der CK-Antwort (Hill et al., 2013) und besitzen neben der *Receiver*-Domäne ein GARP DNA-Binde-Motiv, sowie mindestens ein NLS in ihrer C-terminalen *Output*-Domäne (Grefen and Harter, 2004, Riechmann et al., 2000). Sie sind überwiegend im Zellkern lokalisiert und agieren als Transkriptionsfaktoren, wobei sie die Transkription von CK-regulierten Genen, wie beispielsweise den A-Typ ARR_s steuern (Hwang and Sheen, 2001, Imamura et al., 2003, Imamura et al., 2001, Lohrmann et al., 2001, Sakai et al., 2000, Sakai et al., 2001, Veerabagu et al., 2012). Dies korreliert ebenfalls mit den Expressionsmustern der B-Typ ARR_s. Sie sind hauptsächlich in Reproduktionsorganen, also Orten mit erhöhter CK-Konzentration und hohen Zellteilungsraten bzw. teilweise ubiquitär (z.B. ARR₁, 2, 10-12) exprimiert (Mason et al., 2004, Tajima et al., 2004). Die besondere Rolle der B-Typ ARR_s im CK-Signalweg zeigt sich auch im Verhalten verschiedener *arr*-Mutanten. Beispielsweise zeigt *arr1* eine nur leicht reduzierte Cytokininantwort, was die funktionelle Redundanz der B-Typ ARR_s widerspiegelt (Sakai et al., 2001). Dagegen ist die Dreifachmutante *arr1,10,12* nahezu insensitiv für CK (Mason et al., 2005) und es findet eine zusätzliche reduzierte Transkription von CK-regulierten Genen statt (Argyros et al., 2008).

1. Einleitung

Die C-Typ ARR's besitzen keine *Output*-Domäne wie sie in B-Typ ARR's zu finden ist und ihre transkriptionelle Regulation ist CK-unabhängig (Kiba et al., 2002, Schaller et al., 2007, To et al., 2007). Es ist bekannt, dass ARR22 mit Komponenten des MSPs (AHP2, 3 und 5) interagieren kann (Horak et al., 2008) und anhand des zwerghaften Phänotyps bei dessen Überexpression ist ein Zusammenhang mit der CK-Signaltransduktion zu vermuten (Gattolin et al., 2006, Horak et al., 2008).

Die Pseudo-ARR's haben eine Funktion bei der Modulation der circadianen Rhythmik, ihnen fehlt jedoch der phosphorylierbare, konservierte Aspartatrest (McClung, 2006, Mizuno and Nakamichi, 2005).

1.2.1 Die *Arabidopsis* Histidinkinase 5 (AHK5)

Ein weiteres Mitglied der HK-Multigenfamilie ist die in dieser Arbeit näher charakterisierte *Arabidopsis* Histidinkinase 5 (AHK5). AHK5 besitzt als einzige unter den Histidinkinasen keine Transmembrandomäne, weshalb eine zytoplasmatische Lokalisation angenommen wurde (Grefen and Harter, 2004). Anfangs wurde gezeigt, dass AHK5 ein negativer Regulator der durch ET- und ABA- ausgelösten Hemmung des Wurzelwachstums ist (Iwama et al., 2007). Dabei führt die Behandlung einer *ahk5*-Mutante mit ET oder ABA zu einem reduzierteren Wurzelwachstum als bei wildtypischen Pflanzen.

Das Schließen der Stomata als Reaktion auf H₂O₂, welches aufgrund von exogenen oder endogenen Auslösern gebildet wird, ist ebenfalls von AHK5 abhängig. Die Applikation von exogenem H₂O₂ oder Faktoren, die eine endogene H₂O₂-Produktion auslösen (Ethlyen, Stickstoffmonoxid, Dunkelheit, Flagellin 22), führt in der *ahk5*-Mutante – im Gegensatz zum Wildtyp – nicht zum Schließen der Stomata (Desikan et al., 2008). Es ist bekannt, dass AHK5 Histinkinaseaktivität besitzt (Iwama et al., 2007) und in der Lage ist, die SLN1-Mutante in Hefe zu komplementieren (Tran et al., 2007). Des Weiteren interagiert AHK5 *in planta* mit den Histidintransferproteinen AHP1, 2 und 5, welche wiederum mit den Responseregulatoren ARR4 und ARR7 interagieren und zum H₂O₂- und ET-induzierten Stomataschluss führen können (Mira-Rodado et al., 2012). Diese Daten zeigen, dass die AHK5-Signaltransduktion über ein MSP erfolgt.

AHK5 ist jedoch nicht nur bei der Integration von biotischen und abiotischen Stimuli zur Regulation des H₂O₂-induzierten Stomataschlusses von Bedeutung. Auch bei der pflanzlichen Immunantwort und der Antwort auf Salzstress spielt AHK5 eine Rolle (Pham et al., 2012, Pham and Desikan, 2012). So zeigen *Arabidopsis ahk5*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Anfälligkeit auf das bakterielle Pathogen *PstDC3000 (avrRpm1)* und gegenüber dem necrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* (Pham and Desikan, 2012). Es wird daher angenommen, dass AHK5 für eine vollständige Immunität von *A. thaliana* gegenüber dieser Pathogenen nötig ist.

Des Weiteren scheint AHK5 Funktionen bei der Salztoleranz zu haben. Das Wurzelwachstum von *ahk5*-Pflanzen wird weniger stark durch NaCl gehemmt, als das von wildtypischen Pflanzen. AHK5 sorgt somit für eine Integration von multiplen Signalwegen, welche durch abiotische und biotische Faktoren ausgelöst werden.

1.3 Seneszenz

Pflanzen durchlaufen verschiedene Entwicklungsphasen. Der Prozess der Seneszenz beschreibt das kontrollierte Altern der Pflanze, welches mit weitreichenden Veränderungen auf biochemischer und physiologischer Ebene einhergeht. Dies kann zellulär, gewebe- oder organspezifisch bzw. auf der Ebene des gesamten Organismus erfolgen.

Die Blattseneszenz stellt die letzte Phase der Blattentwicklung dar, welche nach Initiation, Wachstum und produktiver Phase zum Tod des Blattes führt. Dabei erfolgen komplexe, genetisch programmierte Abfolgen, die nach Abbau von Makromolekülen (Chlorophyll, Proteine, Lipide, usw.), sowie deren Mobilisation und Abtransport zu reproduktiven Geweben oder Speicherorganen, letztendlich zum programmierten Zelltod führen (He et al., 2001). Meist erfolgt mit der Alterung der Blätter auch das Einsetzen der Seneszenz der gesamten Pflanze.

Die Initiation sowie die Progression der Seneszenz erfolgen durch Integration vieler Faktoren. Dabei spielen endogene Faktoren, wie der Entwicklungsstatus, sowie das Zusammenspiel verschiedener Phytohormone eine entscheidende Rolle. Beispielsweise wirken ET, ABA, SA und JA seneszenzfördernd, wohingegen CK und IAA diese negativ beeinflussen (Kim et al., 2011, Li et al., 2012). Wie die Wahrnehmung des zellulären Entwicklungsstatus erfolgt ist noch unklar. Es wird jedoch vermutet, dass neben dem Einfluss der Phytohormone eine erhöhte zelluläre Zuckerkonzentrationen zur Reduktion der Photosyntheseleistung führt, wodurch die Blattseneszenz ausgelöst wird (Dai et al., 1999, Jang et al., 1997, Moore et al., 2003, Quirino et al., 2000, Lim et al., 2007).

Auch exogene Umwelteinflüsse besitzen einen starken Einfluss auf die Seneszenz. Abiotische Faktoren wie beispielsweise Trockenheit, extreme Temperaturen, Nährstoffmangel, UV-B Strahlung und Ozon, sowie biotische Faktoren, wie Pathogenbefall oder Beschattung durch andere Pflanzen, fördern die Blattseneszenz (Lim et al., 2003).

1. Einleitung

Während der frühen Phase der Blütenstandentwicklung von *Arabidopsis* kommt es zur transkriptionellen Herabregulierung des H₂O₂-Entgiftungsenzyms Catalase (CAT2) (Smykowski et al., 2010). Der darauffolgende H₂O₂-Konzentrationsanstieg wird durch eine H₂O₂-abhängige, posttranslationale Hemmung der Ascorbatperoxidase (APX1) – einem weiteren ROS-Entgiftungsenzym – verstärkt (Ye et al., 2000, Zimmermann et al., 2006, Panchuk et al., 2005). Dieser temporäre H₂O₂-Konzentrationsanstieg dient anschließend als Auslöser der Blattseneszenz (Bieker et al., 2012, Smykowski et al., 2010). Dabei erfolgt unter anderem die Expression von sog. Seneszenz-assoziierten Genen (*senescence associated genes*, SAGs). Dazu gehören beispielsweise Gene aus der Familie der NAC und WRKY Transkriptionsfaktoren, die für die notwendigen und weitreichenden Veränderungen in der Genexpression verantwortlich sind (Miao and Zentgraf, 2010, Balazadeh et al., 2010, Balazadeh et al., 2011). In *Arabidopsis* erfolgt während der Initiation und Progression der Seneszenz eine Expressionsänderung von etwa 20 % aller Gene (Xie et al., 2014). Bestimmte Mutanten zeigen eine verzögerte oder verfrühte Initiation bzw. eine verlangsamte oder beschleunigte Progression der Seneszenz. Beispielsweise zeigt die Mutante *oresara 4-1* eine Verzögerung in der Blattseneszenz, da diese durch eine gestörte Funktion der Chloroplasten einen verlangsamten Metabolismus besitzt, was wiederum zu weniger oxidativem Stress führt (Woo et al., 2002).

1.3.1 Seneszenz und Phytohormone

Wie oben erwähnt beeinflussen Phytohormone die Seneszenz. Es ist bekannt, dass CK eine seneszenzverzögernde Wirkung besitzt (Back and Richmond, 1969), da sich während der Seneszenz die endogene CK-Konzentration verringert bzw. exogen appliziertes oder transgen erzeugtes CK eine Verzögerung der Seneszenz zur Folge hat (Gan and Amasino, 1995, McCabe et al., 2001, Ori et al., 1999). Hierbei spielt beispielsweise der CK-Rezeptor AHK3 eine entscheidende Rolle. Eine erhöhte Aktivität von AHK3 führt zu einer Verzögerung der Seneszenz. Andererseits erfolgt bei *ahk3*-Pflanzen eine reduzierte CK-induzierte Verzögerung der Seneszenz (Kim et al., 2006).

Die ET-Konzentration nimmt während der Seneszenz zu, was auf die Hochregulation der entsprechenden Biosynthesegene 1-Aminocyclopropan-carbonsäure-Synthase (ACC-Synthase), ACC-Oxidase und der Nitrilase zurück zu führen ist (van der Graaff et al., 2006, Abeles et al., 1988). Eine Mutation des Ethylenrezeptors ETR1 führt in *Arabidopsis* zu einer drastischen Verzögerung der Seneszenz. Dies ist ebenfalls nach Mutation des für die ET-Signaltransduktion erforderlichen Proteins EIN2 (*Ethylene-Insensitive 2*) zu beobachten (Oh et al., 1997, van der Graaff et al., 2006). Ethylen stellt demnach einen positiven Regulator der Seneszenz dar.

Auch die ABA-Produktion und -Konzentration steigt im Verlauf der Seneszenz an und bewirkt die Expression von SAGs (Weaver *et al.*, 1998). Des Weiteren hat die ABA induzierte H₂O₂-Produktion einen zusätzlichen positiven Einfluss auf die Seneszenz (Hung and Kao, 2004). Im Gegensatz dazu aktiviert ABA auch zelluläre Schutzmechanismen. So bewirkt ABA beispielsweise die Expression von antioxidativen Enzymen wie der Superoxiddismutase (SOD), APX und CAT (Hung and Kao, 2003). Anhand der seneszenzfördernden sowie –verzögernden Wirkung ist ABA für die Regulation der Progression der Seneszenz von Bedeutung (Lim *et al.*, 2007).

Die endogene Konzentration von Auxin (IAA) steigt durch Hochregulation von IAA-Biosynthesegenen ebenfalls während der Seneszenz an (van der Graaff *et al.*, 2006). Jedoch führt der IAA-Konzentrationsanstieg durch Repression der Expression von SAGs zu einer Seneszenzverzögerung (Hong *et al.*, 2000, Noh and Amasino, 1999).

Andererseits ist das Phytohormon JA ein weiterer positiver Regulator der Seneszenz, der zum Abbau von Chlorophyll und Reduktion der Photosyntheseleistung führt (Ueda and Kato, 1980). So ist beispielsweise die JA-insensitive *coi1*-Mutante (*Coronatine insensitive 1*) nicht in der Lage eine JA-abhängige Seneszenz zu initiieren (He *et al.*, 2002).

SA spielt eine Rolle beim Seneszenz-induzierten Zelltod. Beispielsweise zeigt die *Arabidopsis pad4*-Mutante, welche einen Defekt im SA-Signalweg aufweist, einen verzögerten Seneszenz-induzierten Zelltod, der mit längerem Gelbbleiben der Blätter einhergeht (Rao and Davis, 2001, Rao *et al.*, 2002). SA hat außerdem bei der Abwehrreaktionen der Pflanze gegen Krankheitserreger und dem durch diese ausgelöstem Zelltod wichtige Funktionen.

1.4 Die pflanzliche Immunantwort

Wie bereits erwähnt können Pflanzen nicht vor äußeren Einflüssen fliehen. Sie sind somit darauf angewiesen, sich gegen pathogene Organismen, wie beispielsweise Viren, Bakterien oder Pilze erfolgreich zu verteidigen und gleichzeitig ihre metabolischen Prozesse aufrecht zu erhalten. Werden die primären Barrieren der Pflanzen, wie zum Beispiel die der Epidermis aufliegenden Kutikula durchbrochen, kommt es zu einer Interaktion zwischen Pflanze und dem entsprechendem Pathogen (Nurnberger and Lipka, 2005). Zur Erkennung von Pathogenen besitzen Pflanzen Rezeptoren, die sog. *Pathogen recognition receptors* (PRRs). Diese gehören zur großen Genfamilie der RLKs (*Receptor-like kinases*) und erkennen fremde Bestandteile von Mikroorganismen über ihre leucinreiche Domäne. Daher werden sie auch als LRR-RKs (*Leucine-rich repeat receptor like kinases*) bezeichnet (Shiu and Blecker, 2003). Die durch PRRs erkannten Bestandteile sind hochkonservierte und molekulare Strukturen wie beispielsweise Oligosaccharide, Glycoproteine, Polypeptide, methylierte bakterielle

1. Einleitung

DNA, sowie Lipide, welche als *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden (Nurnberger and Brunner, 2002). PAMPs können nicht nur vom Pathogen selbst entspringen, sondern auch durch dessen in der Pflanze hervorgerufene Zerstörung stammen (*Damage-associated molecular patterns*, DAMPs). Daher werden PAMPs und DAMPs allgemein als MAMPs (*Microbe-associated molecular pattern*) bezeichnet (Boller and Felix, 2009).

Pflanzen besitzen zwei verschiedene Ebenen der Immunantwort: die sog. *PAMP-triggered immunity* (PTI) und die *Effector-triggered immunity* (ETI).

Die PTI stellt die basale Resistenz gegen alle diejenigen Krankheitserreger dar, die nicht an die Pflanze (Wirt) angepasst sind. Hierbei werden MAMPs von PRRs erkannt und eine entsprechende Abwehrreaktion eingeleitet. Beispielsweise wird das MAMP flg22, welches ein hoch konserviertes N-terminales Fragment von Flagellin aus der bakteriellen Flagelle ist, durch die LRR-RK FLS2 (*Flagellin-sensing 2*) erkannt und eine PTI ausgelöst (Felix et al., 1999, Gomez-Gomez and Boller, 2000). Ein weiteres bekanntes MAMP ist das Peptid elf, das aus dem N-terminalen Bereich des bakteriellen *Elongation factors* EF-Tu stammt (bestehend aus 18 Aminosäuren: elf18, bzw. 26 Aminosäuren: elf26) (Kunze et al., 2004). Dieses wird durch den zugehörigen PRR EFR (*Elongation factor receptor*) perzipiert (Zipfel et al., 2006).

Ein auf die Wirtspflanze angepasstes Pathogen hat sog. Effektoren entwickelt, die zu einer Unterdrückung der PTI führen. Im Gegenzug besitzen Pflanzen Proteine, die durch sog. R-Gene (*Resistance genes*) codiert sind. Diese erkennen und interagieren direkt oder indirekt mit den Effektoren des Pathogens und lösen anschließend heftige Abwehrreaktionen aus. Meist führt dies zu apoptotischem Zelltod sowie lokalen Nekrosen und wird als HR (*Hypersensitive response*) bezeichnet (Martin et al., 2003, Melotto et al., 2006).

Die Perzeption von MAMPs an den Orten der Verletzung, bzw. des Eindringens der Pathogene führt nicht nur zu lokalen Abwehrreaktionen, sondern kann sich ebenfalls systemisch über die gesamte Pflanze ausbreiten. Dies wird als *Systemic acquired resistance* (SAR), bzw. *Induced systemic Resistance* (ISR) bezeichnet und sorgt dafür, dass die gesamte Pflanze eine Pathogenantwort einleitet (Pieterse and Dicke, 2007, Prime et al., 2006).

Der Ablauf einer pflanzlichen Immunantwort beinhaltet verschiedene zeitlich getrennte physiologische Antworten. So kommt es innerhalb der ersten fünf Minuten nach erfolgter Perzeption von MAMPs zu verändertem Ionentransport. Diese sehr frühe Antwort hat einen erhöhten Einstrom von Ca^{2+} und H^+ in die Zelle zur Folge, was zur Depolarisation der Zellmembran führt. Die dadurch in der Zelle erhöhte Ca^{2+} -Konzentration dient als *second messenger*, wodurch unter anderem Calcium-abhängige

Proteinkinasen aktiviert werden (Ludwig et al., 2005), bzw. das Öffnen weiterer Membrankanäle stimuliert wird (Lecourieux et al., 2002, Ranf et al., 2008, Blume et al., 2000, Brunner et al., 2002).

Weiterhin kommt es innerhalb der ersten Minuten der MAMP-induzierten Antwort zur erhöhten Produktion von ROS, was den oxidativen Burst zur Folge hat. Dies dient der direkten Bekämpfung des Pathogens durch oxidative Schädigung. Weiter sorgt diese ROS-Produktion im apoplastischen Raum durch oxidative Modifikation der Zellwandbestandteile zu deren Verstärkung, was eine Erhöhung der physikalischen Barriere gegenüber dem Pathogen dient. Zusätzlich führt die MAMP-induzierte Produktion von ROS – wie bereits erwähnt – zur Regulation von Signalwegen, die der Abwehrreaktion dienen (Apel and Hirt, 2004).

Auf Proteinebene erfolgt die MAMP-induzierte Aktivierung von MAPK-Kaskaden, was Veränderungen von Phosphorylierungen sowie der Aktivität weiterer Proteinen zur Folge hat. Beispielsweise induziert die flg22-Perzeption in *Arabidopsis* zwei MAPK-Kaskaden, die zur Aktivierung von MPK3 und MPK6 und schließlich zur Aktivierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren führen (Nuhse et al., 2007, Asai et al., 2002). Auch die Phosphorylierung einer NADPH Oxidase (AtRbohD), deren ROS-Produktion zum oxidativen *Burst* führt, erfolgt flg22-abhängig (Benschop et al., 2007, Nuhse et al., 2007).

Auch erfolgt die MAMP-abhängige Regulation zahlreicher Gene. So kommt es beispielsweise nach Behandlung von *Arabidopsis* Pflanzen mit flg22 und elf26 innerhalb von 30 Minuten zur Induktion von ca. 1000 Genen, unter denen sich neben den Rezeptoren FLS2 und EFR noch weitere RLKs befinden. Die Induktion der Expression dieser RLKs sorgt für eine Erhöhung der PRR-Kapazität und stellt einen positiven *Feedback Loop* dar (Zipfel et al., 2006, Zipfel et al., 2004).

Zu den späten Antworten der Immunantwort gehört die Calloseablagerung in der Zellwand (Gomez-Gomez et al., 1999), sowie das Hemmen des Wachstums und das physiologische Umschalten auf Abwehrreaktion (Navarro et al., 2006, Pearce et al., 2001). Eine temporäre Wachstumshemmung ist für eine erfolgreiche Abwehrreaktion zwingend erforderlich, da Pflanzen im Falle eines Pathogenbefalls energieaufwendige Abwehrmechanismen in Gang setzen müssen, welche einen Nachschub von wichtigen Nährstoffen für das Wachstum reduzieren. Das Umschalten von Wachstum auf Abwehrreaktion wird dabei durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk erreicht, an welchem unter anderem die Phytohormone JA, SA, GA, BR, IAA und CK beteiligt sind (Naseem et al., 2015).

1. Einleitung

1.5 Zielsetzung

Seitdem bekannt wurde, dass Wasserstoffperoxid (H_2O_2) nicht nur oxidative Schädigungen in Zellen hervorrufen kann, sondern auch als Signalmolekül dient, wurden H_2O_2 -abhängige Signalwege intensiv erforscht. Dabei konnte jedoch nicht umfassend geklärt werden, wie H_2O_2 von der Pflanze wahrgenommen wird und wie die entsprechende Signaltransduktion erfolgt.

Die noch wenig untersuchte *Arabidopsis* Histidinkinase 5 (AHK5) ist bei H_2O_2 -abhängigen Prozessen beteiligt. So ist beispielsweise bekannt, dass die AHK5-Funktion für das Schließen der Stomata als Antwort auf H_2O_2 notwendig ist (Desikan et al., 2008). AHK5 ist zudem ein negativer Regulator des Signalwegs, in dem die Phytohormone ABA und Ethylen – welche ebenfalls zu einer zellulären H_2O_2 -Produktion führen – das Wurzelwachstum hemmen (Iwama et al., 2007). Es wurde daher vermutet, dass AHK5 Funktionen bei der Perzeption und Signaltransduktion von H_2O_2 hat.

Im Rahmen dieser Arbeit galt zu prüfen, ob AHK5 spezifisch an H_2O_2 -abhängigen Prozessen beteiligt ist. Hierzu sollten Versuche zu verschiedenen H_2O_2 -regulierten Prozessen mit der AHK5-Mutante *ahk5-1* verglichen mit dem Wildtyp durchgeführt werden. Darüber hinaus lag der Schwerpunkt darauf, herauszufinden wie AHK5 solche H_2O_2 -abhängigen Prozesse und Reaktionswege reguliert und welche Rolle AHK5 bei der Perzeption und Signaltransduktion von H_2O_2 besitzt.

Neben physiologischen Untersuchungen sollten dabei auch zellbiologische, sowie biochemische Analysen dazu beitragen, ein näheres Verständnis über H_2O_2 -abhängige Signalwege, am Beispiel von AHK5 zu erhalten. Hierzu sollten mit Hilfe von Studien zur subzellulären Lokalisation von AHK5, Interaktionspartner gefunden werden, mit denen AHK5 in der Lage sein könnte, H_2O_2 -abhängige Prozesse spezifisch zu kontrollieren.

Ebenfalls war es von großer Bedeutung, Einblicke in die molekularen Eigenschaften der Signalperzeption und Signalweiterleitung von AHK5 zu erhalten. Dabei sollte mittels biochemischer Versuche überprüft werden, durch welche funktionellen Eigenschaften AHK5 als möglicher Rezeptor für H_2O_2 dienen kann. Hierbei galt es die Frage zu klären, welche Proteindomänen von AHK5 oder sogar Aminosäuren bei der Funktionalität von AHK5 bedeutend sind. Zusätzlich bestand das Interesse zu überprüfen, ob AHK5 innerhalb eines klassischen *Phosphorelays* als spezifische H_2O_2 - bzw. redoxregulierte Sensor-Histidinkinase agiert.

Des Weiteren zielte die Arbeit darauf ab, Methoden für eine AHK5-Proteinexpression zu etablieren, mit denen eine Proteinexpression für spätere Kristallstrukturanalysen ermöglicht werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von AppliChem (Darmstadt, D), Biorad (München, D), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Genaxxon (Ulm, D), Invitrogen (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Sigma (Steinheim, D), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und Wako Chemicals (Neuss, D) bezogen.

2.1.2 Antibiotika

Die benutzten Antibiotika wurden bei den Herstellern AppliChem (D), Roth (D), Sigma (D) oder Duchefa (NL) bestellt und in den folgenden Konzentrationen für die Selektion eingesetzt.

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stock</u> [mg/ml]	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Selektion [µg/ml]</u>		
			<u><i>E. coli</i></u>	<u><i>A. tumefaciens</i></u>	<u>HEK</u>
Ampicillin	100	70 % EtOH	80	-	-
Gentamycin	40	H ₂ O	10	40	-
Kanamycin	50	H ₂ O	50	50	-
Spectinomycin	100	H ₂ O	50	100	-
Rifampicin	50	DMSO	-	100	-
Geneticin	50	100 mM HEPES, pH 7.3	-	-	500

2.1.3 Enzyme und kommerzielle Kits

Folgende Enzyme bzw. kommerzielle Kits fanden bei PCR-Reaktionen, Klonierungen, präparativen Spaltungen oder Modifikationen von Nukleinsäuren, bzw. Aufreinigung von Proteinen und weiteren molekularbiologischen Arbeiten Verwendung.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Phusion™ High Fidelity</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs© Inc., USA
<i>KOD Hotstart</i> DNA-Polymerase	Merck, D
<i>Gateway® LR Clonase™</i> Enzymmix	Invitrogen™, USA
<i>Gateway® BP Clonase™</i> Enzymmix	Invitrogen™, USA
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, D
T4 DNA-Ligase	Fermentas, D
T4 Polynukleotid Kinase (PNK)	Fermentas, D
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)</i>	Fermentas, D
Meerrettichperoxidase	Lei Wang (AG Felix)
<i>NucleoBond® Xtra Midi / Maxi Kit</i>	Macherey-Nagel, D
<i>PureLink™ Quick Gel Extraction Kit</i>	Invitrogen™, USA
<i>cComplete™ protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche, CH
<i>Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device</i>	Thermo Fischer Scientific Inc, USA

2. Material und Methoden

2.1.4 Größenmarker

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verwendungszweck</u>
λ -PstI Marker	Eigenherstellung	DNA-Größenstandard
GenLadder 1kb	Genaxxon, D	DNA-Größenstandard
GenLadder 100bp	Genaxxon, D	DNA-Größenstandard
<i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas, D	Protein-Größenstandard

2.1.5 Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Klonalität</u>	<u>Organismus</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
α -GFP	Monoklonal (Mix)	Maus	1 : 1.000	Roche, CH
α -c-myc	Monoklonal	Maus	1 : 1.000	Roche, CH
α -RFP [5F8]	Monoklonal	Ratte	1 : 1.000	ChromoTek, D
α -GST	Monoklonal	Maus	1 : 1.000	Sigma, D
α -His-AP	Monoklonal	Maus	1 : 3.000	antibodies-online
α -Maus-AP	Polyklonal	Ziege	1 : 3.000	Bio-Rad, D
α -Ratte-AP	Polyklonal	Ziege	1 : 5.000	Sigma, D

2.1.6 Synthetische Gene, Peptide, Proteine und Radioaktivität

Die folgende Aufstellung enthält alle verwendeten, jedoch nicht selbst hergestellten Materialien und Substanzen inklusive deren Verwendungszweck und Quellen.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Quelle</u>
Codonoptimierte DNA-Konstrukte - AHK5_C9 - AHK5_C7 - ARR4	heterologe Expression in E. coli	GenScript®, USA
Gereinigtes AHK5_C9	Biochemische Charakterisierung	GeneCust, L
Gereinigtes ARR4	Protein-Protein-Phosphorylierung	GeneCust, L
Gereinigtes AHK5_C7	Protein-Protein-Phosphorylierung	GeneCust, L
Flagellin flg22	"ROS-burst" Experiment	Lei Wang (AG Felix)
Luminol L-012	"ROS-burst" Experiment	Lei Wang (AG Felix)
Adenosintriphosphat Gamma ³³ P	Protein-Protein-Phosphorylierung	Hartmann Analytik, D

2.1.7 Primer

Tabelle 1: Überblick über verwendete Primer zu Herstellung verschiedener Entry-Klone. Die attB Attachment-Regionen sind fett gedruckt.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
2546	AHK5-C8-FP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GTATGGATAACGCTGTGAGAAAGGC
2547	AHK5-C8-RP	GGGGACGACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TGTGCAAATACTGTTGCAAACACTC
2563	AHK5_343-fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CTATGGATAACGCTGTGAGAAAGGCG
2564	AHK5_208-fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CTATGCAAGAGCTTACTCAGAATC
2565	AHK5_1-fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CTATGGTCTGTGAAATGGAGAC
2566	AHK5_774-fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CTATGGAAACATCAAAGCCAAAGATTTTGC
2567	AHK5_616-rev	GGGGACGACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTTCCAACCTTTGTAGGG
2568	AHK5_690-rev	GGGGACGACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGTTATTAGAGGGATCAGCG
2569	AHK5_922-rev	GGGGACGACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGTGCAAATACTGTTGCAAACACTC
3178	attB-AHK5-iD-FP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGGTCTGTGAAATGGAGA
3179	attB-AHK5-iD-RP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTTCTCTAAGTTTCGCCATT
3213	AHK5-P3P2-FW	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTAAT GGTCTGTGAAATGGAGAC
3214	AHK5-P3P2-REV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TTGCAAATACTGTTGCAAACAC
3215	ETR1-P1P4-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGGAAGTCTGCAATTGTATTG
3216	ETR1-P1P4-REV	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT GCATGCCCTCGTACAGTAC
3223	RbohC-P1P4-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGTCTAGAGTGAGTTTTGAAG
3224	RbohC-P1P4-REV	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT GGAATTCTCTTTGTGGAAGGAG
3225	RbohD-P1P4-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGAAAATGAGACGAGGCAATT
3226	RbohD-P1P4-REV	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT GGAAGTTCTCTTTGTGGAAGTC
3227	RbohF-P1P4-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGAAACCGTTCTCAAAGAACG
3228	RbohF-P1P4-REV	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT GGAATGCTCCTTGTGAAATTCAAAC
3233	FLS2-P1P4-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGAAGTACTCTCAAAGACC
3234	FLS2-P1P4-REV	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT GAACTTCTCGATCCTCGTTAC
3284	ARR2-co_FP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGGTAAATCCGGGTCATGG
3285	ARR2-co_RP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GAACTTGGATATTGTCGATAC
3286	ARR4-co_FP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGGCCCGTGATGGTGGTG
3287	ARR4-co_RP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GATCCAGACCCGGCGAACG
3288	AHK5-co_FP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGGTCTGTGAAATGGAAAC
3289	AHK5-co_RP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GATGCAGGTATTGTTGCAG
3465	AHK5_C8-P3P2-FW	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTAAT GGATAACGCTGTGAGA
3466	AHK5_C8-P3P2-RP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TTGCAAATACTGTTGCAAACAC
3467	AHK5_C8-P1P4-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAAATGGATAACGCTGTGAGA
3468	AHK5_C8-P1P4-RP	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT GTTGCAAATACTGTTGCAAACAC

2. Material und Methoden

Tabelle 2: Primer für ortsspezifische Mutagenese-PCR. Ausgetauschte Basen und Schnittstellen sind fett gedruckt.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle
3119	MH_AHK5-K154A-FP	GTCGATAGCG CGA AAGATTGAAATCTATG	(-) Bgl II
3120	MH_AHK5-K154A-RP	CATAGATTTCAATCTT CGC GCTATCGAC	(-) Bgl II
3121	MH_AHK5-K145A-FP	CAGGTTTAGGCAG GCA AAACGAGATGC	-
3122	MH_AHK5-K145A-RP	GCATCTCGTTTT GC CTGCCTAAACCTG	-
3290	MH_3515_C3A-FP	GGTGCCATGGT GG CTGAAATGGAAACG	-
3291	MH_3515_C3A-RP	CGTTTCCATTT CAG CCACCATGGCACC	-
3488	MH_Cold-C3S FP	CAAGATCACATGGTCT GT GAAATGGAAAC	(-) NdeI
3489	MH_Cold-C3S RP	CCATTT CAG AGACCAT GT GATCTTGGTAT	(-) NdeI
3490	MH_Cold-C3A FP	CAAGATCACATGGT CG CTGAAATGGAAAC	(-) NdeI
3491	MH_Cold-C3A RP	CCATTT CAG CGACCAT GT GATCTTGGTAT	(-) NdeI
3492	MH_Cold-H376N FP	CGATGTCT AA CGAAAT CCG GAGTCCGCTGTCC	(+) BspEI
3493	MH_Cold-H376N RP	AGCGGACT CCG GATTCGTTAGACATCGTTGC	(+) BspEI
3496	MH_K169A-FP	CATATTGG GCC CAGAAGGCGTTG	(+) Apal site
3497	MH_K169A-RP	GCCTTCT GG GCCAATATGCAAC	(+) Apal site

Tabelle 3: Primer für die Herstellung von Expressionskonstrukten für Bakterien und HEK-Zellen mittels klassischer Klonierung.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle im Überhang
2731	MH_pEF_C1/8-fwd	ATACTCTAGAATGGATAACGCTGTGAGAAAGGCG	XbaI
2732	MH_pEF_C1/C6-rev	TATCTCTAGATCTTCCAACCTTTGTAGGG	XbaI
2733	MH_pEF_C2-fwd	ATACTCTAGAATGGAAACATCAAAGCCAAAG	XbaI
2734	MH_pEF_C2/C7/C8-rev	TATCTCTAGAGTGCAAATACTGTTGCAAACACTCTCTCAG	XbaI
2735	MH_pEF_C6/C7-fwd	ATACTCTAGAATGGTCTGTGAAATGGAGAC	XbaI
2736	MH_pEF_AHP1-fwd	ATACTCTAGAATGGATTTGGTTCAGAAGC	XbaI
2737	MH_pEF_AHP1-rev	TATCTCTAGAAAATCCGAGTTCGACGGCCG	XbaI
2738	MH_pEF_ARR2-fwd	ATACTCTAGAATGGTAAATCCGGGTCACG	XbaI
2739	MH_pEF_ARR2-rev	TATCTCTAGAGACCTGGATATTATCGATGGAG	XbaI
2740	MH_pEF_ARR4-fwd	ATACTCTAGAATGGCCAGAGACGGTGGTG	XbaI
2741	MH_pEF_ARR4-rev	TATCTCTAGAATCTAATCCGGGACTCCTCATC	XbaI
2742	MH_pEF_C7-rev	TATCTCTAGAGTGCAAATACTGTTGCAAACACT	XbaI
3340	MH_AHK5pCOLD-FP	AGATCATATGGTCTGTGAAATGGAAACC	NdeI site
3341	MH_AHK5pCOLD-RP	ATATGGATCTCATCAATGCAGGTATTGTTGC	BamHI site

2.1.8 Vektoren

Tabelle 4: Überblick über verwendete Vektoren und kommerziell bezogene Konstrukte.

Nr.	Bezeichnung	Quelle	Resistenz		
			<i>E. coli</i>	<i>Arabidopsis</i>	HEK
0606	pET-Dest42		Amp, Cm	-	-
0655	pDONR207	Invitrogen™	Gent	-	-
1082	pH7FWG2	(Karimi et al., 2002)	Spec	Hyg	-
1757	pUBQ10-DEST	Achim Hahn	Spec, Cm	Hyg	-
1875	pB7-ABAspro-mCherryNLS	Katharina Caesar	Spec	Basta	-
2696	pCOLDIV-AHK4	(Suzuki et al., 2001)	Amp	-	-
3061	pDONR221-P3P2	Invitrogen™	Kan, Cm	-	-
3062	pDONR221-P1P4	Invitrogen™	Kan, Cm	-	-
3063	pFRETgc-2in1-CC	(Hecker et al., 2015)	Spec, Cm	Basta	-
3090	pEF1-myc-His-A	Sacchie Kimura	Amp, Kan	-	G418
3152	pENTR/TEV/D-TOPO_FLS2	(Mueller et al., 2012)	Kan	-	-
3504	pUC57-AHK5c.o._iD	GenScript®	Amp	-	-
3505	pMH-Hssumo-AHK4	(Hothorn et al., 2011)	Kan	-	-
3522	pGEX-6P-1-AHP1	(Bauer et al., 2013)	Amp	-	-
3558	pUC57-AHK5c.o.	GenScript®	Amp	-	-
3559	pUC57-ARR2c.o.	GenScript®	Amp	-	-
3560	pUC57-ARR4c.o.	GenScript®	Amp	-	-

2.1.9 DNA-Konstrukte

Tabelle 5: Auflistung der im Rahmen der Dissertation angefertigten Entry-Klone.

Nr.	Bezeichnung	Vektor	Resistenz
2677	AHK5_C7	pDONR207	Gent
2678	AHK5_C8	pDONR207	Gent
3528	AHK5_C9	pDONR207	Gent
3532	AHK5_C9-K145A	pDONR207	Gent
3533	AHK5_C9-K154A	pDONR207	Gent
3539	AHK5_C9-K145/154A	pDONR207	Gent
3552	pDONR221-P1P4_AtRbohC	pDONR221-P1P4	Kan
3553	pDONR221-P1P4_AtRbohD	pDONR221-P1P4	Kan
3554	pDONR221-P1P4_AtRbohF	pDONR221-P1P4	Kan
3572	AHK5_C9-K146A	pDONR207	Gent
3573	AHK5_C9-K145/146/154A	pDONR207	Gent
3721	pDONR207_ARR4c.o.	pDONR207	Gent
3722	pDONR207_AHK5c.o.	pDONR207	Gent
3723	pDONR207_ARR2c.o.	pDONR207	Gent
3771	pDONR221-P1P4_ETR1	pDONR221-P1P4	Kan
3774	pDONR221-P1P4_FLS2	pDONR221-P1P4	Kan
4075	pDONR221-P1P4_AHK5_C8	pDONR221-P1P4	Kan
4076	pDONR221-P3P2_AHK5_C8	pDONR221-P3P2	Kan
4110	AHK5_C9-K169A	pDONR207	Gent
4111	AHK5_C9-K146/169A	pDONR207	Gent
4112	AHK5_C9-K145/146/154/169A	pDONR207	Gent

2. Material und Methoden

Tabelle 6: Auflistung der im Rahmen der Dissertation hergestellten Expressionskonstrukte.

Nr.	Bezeichnung	Vektor	Resistenz	
			<i>E. coli</i>	<i>Arabidopsis</i>
3503	p35S::AHK5-GFP	pH7FWG2	Spec	Hyg
3534	AHK5_C9-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	Hyg
3537	AHK5_C9-K145A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	Hyg
3538	AHK5_C9-K154A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	Hyg
3540	AHK5_C9-K145/154A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	Hyg
3574	AHK5_C9-K146A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	Hyg
3575	AHK5_C9-K145/146/154A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	Hyg
4084	AHK5_C8-GFP.vs.GentDummy	pFRETgc-2in1-CC	Spec	Basta
4085	AHK5_C8-GFP.vs.AHK5_C8-mCherry	pFRETgc-2in1-CC	Spec	Basta
4086	AHK5_C8-GFP.vs.ETR1-mCherry	pFRETgc-2in1-CC	Spec	Basta
4087	AHK5_C8-GFP.vs.FLS2-mCherry	pFRETgc-2in1-CC	Spec	Basta
4088	AHK5_C8-GFP.vs.AtRbohC-mCherry	pFRETgc-2in1-CC	Spec	Basta
4089	AHK5_C8-GFP.vs.AtRbohD-mCherry	pFRETgc-2in1-CC	Spec	Basta
4090	AHK5_C8-GFP.vs.AtRbohF-mCherry	pFRETgc-2in1-CC	Spec	Basta
4113	AHK5_C9-K169A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	
4114	AHK5_C9-K1146/69A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	
4115	AHK5_C9-K145/146/154/169A-GFP	pUBQ10-DEST	Spec	

Tabelle 7: Auflistung der hergestellten Expressionskonstrukte für die Arbeit in Bakterien.

Nr.	Bezeichnung	Vektor	Resistenz
2640	AHK5_C8-6xHis	pET-Dest42	Amp
3515	pMH-Hsumo-AHK5-iD	pMH-Hsumo-AHK4	Amp
3724	ARR4c.o.-6xHis	pET-Dest42	Amp
3725	AHK5c.o.-6xHis	pET-Dest42	Amp
3772	pCOLDIV-AHK5 c.o.	pCOLDIV-AHK4	Amp
4104	pCOLDIV-AHK5-H376N c.o.	pCOLDIV-AHK4	Amp
4105	pCOLDIV-AHK5-C3A c.o.	pCOLDIV-AHK4	Amp

Tabelle 8: Überblick über die Konstrukte für HEK-Zellen.

Nr.	Bezeichnung	Vektor	Resistenz	
			<i>E. coli</i>	HEK
3107	pEF1-AHP1-myc-His	pEF1-myc-His	Amp	G418
3108	pEF1-ARR2-myc-His	pEF1-myc-His	Amp	G418
3109	pEF1-ARR4-myc-His	pEF1-myc-His	Amp	G418
3110	pEF1-AHK5_C2-myc-His	pEF1-myc-His	Amp	G418
3111	pEF1-AHK5_C8-myc-His	pEF1-myc-His	Amp	G418
-	3Myc-GFP	pEF1-myc-His	Amp	G418

2.1.10 Verwendete Organismen

Bakterienstämme

Escherichia coli

Tabelle 9: Auflistung der für Transformation oder Expression verwendeten Bakterienstämme.

Bezeichnung	Quelle	Genotyp
One Shot® TOP10	Invitrogen, USA	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL (Str^R) endA1 λ⁻</i>
NEB®5α	NEB, USA	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA- relA1 endA1 thi-1 hsdRR17</i>
CoppyCutter™ EPI400™	Epicentre, USA	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80Δ(lacZ)M15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL (Str^R) nupG</i>
Origami-2 (DE3)	Merck, D	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' [lac⁺ lacI^q pro] (DE3) gor 522::Tn 10 trxB (Str^R, Tet^R)</i>
Rosetta-2	Merck, D	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)</i>
KMI001	(Suzuki et al., 2001)	<i>(ΔrcsC, cps::lacZ)</i>
BL21 (DE-3) RIL	Invitrogen, USA	<i>F ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 in1 sam7 nin5])</i>
M15	Qiagen, D	<i>F, Φ80ΔlacM15, thi⁻, mtl⁻, recA⁺, Km^R</i>

Agrobacterium tumefaciens

Es wurde ausschließlich mit dem Stamm GV3101 pMP90 (Koncz, 1986) gearbeitet, welcher zur transienten Transformation von *Nicotiana benthamiana* verwendet wurde.

Pflanzen

Arabidopsis thaliana-Linien

Tabelle 10: Überblick über verwendetes Saatgut.

Bezeichnung	Bemerkung	Hintergrund	Quelle
Col-0	Wildtyp	-	ZMBP (Gärtnerei)
<i>ahk5-1</i>	T-DNA Insertion in der Receiver-Domäne	Col-0	SAIL 50_H11 (Syngenta)

Nicotiana benthamiana

Für transiente Expressionsanalysen wurde ausschließlich mit *Nicotiana benthamiana* gearbeitet.

Humane Zellen

Es wurde ausschließlich mit HEK-Zellen (*human embryonic kidney cells*) gearbeitet.

2. Material und Methoden

2.1.11 Medien

Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Bakterien

LB Medium	1 % (w/v)	Bacto-Pepton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl

Für LB-Platten wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) g Agar hinzugefügt.

TB Medium	1,2 % (w/v)	Trypton
	2,4 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,4 % (v/v)	Glycerin

1x ZY Medium	1 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt

25x 5052	12,5 % (w/v)	Glycerin
	1,25 % (w/v)	Glucose
	5 % (w/v)	Lactose

25x M	8,9 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄
	8,5 % (w/v)	KH ₂ PO ₄
	6,7 % (w/v)	Na ₂ SO ₄ * 10 H ₂ O

Zur Herstellung des Autoinduktionsmediums wurden nach Autoklavieren 920 ml ZY Medium mit 40 ml 25x M und 40 ml 25x 5052 versetzt, sowie 1 ml steril filtriertes MgSO₄ (1 M) dazugegeben. Anschließend wurden entsprechende Antibiotika zugegeben und die Lösung bei 4 °C gelagert.

5x M9 Salze	3,2 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄ *7 H ₂ O
	0,75 % (w/v)	KH ₂ PO ₄
	0,125 % (w/v)	NaCl
	0,25 % (w/v)	NH ₄ Cl

M9 minimal Medium	20 % (v/v)	5x M9 Salze
	0,4 % (w/v)	Glucose
	0,02 % (w/v)	MgSO ₄
	0,001 % (w/v)	CaCl ₂
	0,1 % (w/v)	Casaminohydrolysat

Nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

Zur Herstellung von M9-Platten wurden die Substanzen, statt in Milli-Q Wasser, in ca. 60 °C warmer, autoklavierter Agarlösung (1,5 % (w/v)) gelöst.

YEB-Medium	0,5 % (w/v)	Rinderextrakt
	0,1 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	Pepton (Casein Hydrolysat)
	0,5 % (w/v)	Saccharose
	0,03 % (w/v)	MgSO ₄

Für YEB-Platten wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt.

AS-Medium	0,98 % (w/v)	MgCl ₂
	0,2 % (w/v)	MES-KOH Puffer (pH 5,6)
	0,003 % (w/v)	Acetosyringon

Das Medium wurde vor jeder Infiltration frisch hergestellt werden.

2. Material und Methoden

Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

Proteinextraktion und -Aufreinigung

Harnstoffpuffer	50 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	7 M	Harnstoff
	0,1 M	DTT
	(5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol)
	2 % (w/v)	SDS
	30 % (w/v)	Glycerin
	0,03 % (w/v)	Bromphenolblau
2x Probenpuffer	0,125 M	Tris/HCl (pH 6,8)
	10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	4 % (w/v)	SDS
	10 % (w/v)	Saccharose
	0,025 % (w/v)	Bromphenolblau
Lysepuffer	50 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
5 x Probenpuffer	0,25 M	Tris/HCl (pH 6,8)
	0,5 M	DTT
	10 % (w/v)	SDS
	50 % (v/v)	Glycerin
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
NP-5 (Extraktionspuffer)	15 mM	NaCl
	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	5 mM	Imidazol
	0,1 % (v/v)	Triton X-100
	pH 8,0	NaOH
NP-10 (Waschpuffer)	15 mM	NaCl
	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	Imidazol
	pH 8,0	NaOH
NP-100 (Elutionspuffer)	15 mM	NaCl
	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	100 mM	Imidazol
	pH 8,0	NaOH

Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Amidoschwarzlösung	10 % (v/v)	Essigsäure
	90 % (v/v)	Methanol
	0,05 % (w/v)	Amidoschwarz
Entfärbelösung	10 % (v/v)	Essigsäure
	90 % (v/v)	Methanol

SDS-PAGE

Trenngelpuffer	1 M 0,27 % (w/v)	Tris/HCl (pH 8,8) SDS
Sammelgelpuffer	0,25 M 0,2 % (w/v)	Tris/HCl (pH 6,8) SDS

Trenn- und Sammelgelpuffer wurden steril filtriert (0,45 µm Filter).

Zusammensetzung für ein 12,5 % Acrylamid-Trenngel

3 ml	30 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)
1,7 ml	H ₂ O (Milli-Q)
2,25 ml	Trenngelpuffer
50 µl	10 % APS
4 µl	TEMED

Zusammensetzung für ein 4,5 % Acrylamid-Sammelgel

0,3 ml	30 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)
0,7 ml	H ₂ O (Milli-Q)
1 ml	Sammelgelpuffer
10 µl	10 % APS
2 µl	TEMED

10x SDS Laufpuffer	3 % (w/v) 14,4 % (v/v) 1,5 % (w/v)	Tris Glycerin SDS
Coomassie-Färbelösung	0,05 % (w/v) 25 % (v/v) 10 % (v/v) 65 % (v/v)	Coomassie R-250 Isopropanol Essigsäure H ₂ O (Milli-Q)
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) 90 % (v/v)	Essigsäure H ₂ O (Milli-Q)

Western Blot und Immunodetektion

Transferpuffer	1,43 % (w/v) 0,31 % (w/v) 20 % (v/v)	Glycin Tris Ethanol
10x TBS-Puffer	5 mM 1,5 M	Tris/HCl (pH 7,4) NaCl
TBS-Tween	1x 0,1 % (v/v)	TBS-Puffer Tween20
Blockierlösung	5 % (w/v)	Milchpulver in TBS-Tween
Färbepuffer	100 mM 100 mM 5 mM	Tris/HCl (pH 9,5) NaCl MgCl ₂
NBT-Stammlösung	5 % (w/v)	NBT in 70 % (v/v) Dimethylformamid

2. Material und Methoden

BCIP-Stammlösung	5 % (w/v)	BCIP in 100 % (v/v) Dimethylformamid
Die Lagerung der NBT- und BCIP-Aliquots erfolgte bei -20 °C		
Färbelösung (pro Membran)	10 ml 33 µl 66 µl	Färbelösung BCIP-Stammlösung NBT-Stammlösung

Die Färbelösung wurde vor Verwendung frisch hergestellt.

Phosphorylierungsexperimente

10x TEDG	0,5 M 5 mM 20 mM 0,5 M 50 mM	Tris/HCl (pH 8,0) EDTA DTT KCl MgCl ₂
1x TEDG (1.000 ml)	10 % (v/v) 10 % (v/v)	10x TEDG Glycerin

Die Lösung wurde vor jeder Verwendung frisch hergestellt und mit *cOmplete™ protease inhibitor* (Roche, CH), entsprechend der Herstellerangabe versetzt.

Medien und Substrate für Arbeiten mit Pflanzen

Oberflächensterilisation der Samen von Arabidopsis thaliana

Sterilisationslösung 1	70 % (v/v) 0,001 % (v/v)	Ethanol Triton X-100
Sterilisationslösung 2	96 % (v/v)	Ethanol

ROS-Messung nach flg22-Behandlung

Luminol-Mastermix (1 ml)	4 µl 10 µl 986 µl	Meerrettichperoxidase Luminol L-012 (20 mM) H ₂ O (Milli-Q)
--------------------------	-------------------------	--

Seneszenz-Experimente

MS-Medium	4,3 g/l 30 g/l pH 5,7	Murashige & Skoog-Salz Saccharose KOH
H ₂ DCFDA Standardlösung	0,4 mg In 400 µl DMSO lösen und 1 : 1 mit H ₂ O (Milli-Q) verdünnen	Carboxy-H ₂ DCFDA
Arbeitslösung	800 µl 79,2 ml	H ₂ DCFDA Standardlösung MS-Medium
Extraktionspuffer	0,1 % (w/v)	Tricarbonsäure (TCA)
Reaktionspuffer 1	20 % (w/v) 0,01 % (w/v)	TCA Buthylhydroxytoluol (BHT)
Reaktionspuffer 2	20 % (w/v) 0,5 % (w/v)	TCA Thiobarbitursäure (TBA)

Substrate zur Pflanzenanzucht

½ MS-Agar (für <i>A. thaliana</i>)	0,215 % (w/v)	Murashige & Skoog-Salz
	0,05 % (w/v)	MES
	pH 5,7	(KOH)
	1,5 % (w/v)	Phytoagar

½ MS-Agar wurde nach der Herstellung autoklaviert.

Einheitserde Typ P und T (Patzer, Sinntal-Jossa, D)

Die Einheitserden wurden im Mischungsverhältnis 1:1:1 mit Sand für die Anzucht von *A. thaliana* und *N. benthamiana* verwendet.

2.1.12 Geräte, Computerprogramme und Onlineressourcen

Verwendete Geräte

Fluoroskan Ascent™	(Thermo Scientific)
Fluorescent Image Analyzer FLA-3000	(Fujifilm)
Leica SP8 Konfokal Mikroskop	(Leica Microsystems GmbH)
Tekan Safire™	(Tecan Trading AG)

Verwendete Software

Aida Image Analyzer v.3.44	(Raytest Isotopenmessgeräte GmbH)
Adobe Reader XI	(Adobe Systems Software Ireland Limited)
Adobe Illustrator CS2	(Adobe Systems Software Ireland Limited)
ApE	(by M. Wayne Davis)
CLC Main Workbench 7	(CLC bio, a QIAGEN Company)
EndnoteX10	(Thomson Reuters)
FLA-3000	(Fujifilm)
Gimp 2	(The Gimp Team)
ImageJ	(Wayne Rasband, National Institutes of Health)
JASCO	(JASCO Analytical Instruments)
JMP11	(SAS Institute Inc.)
LAS X	(Leica Microsystems GmbH)
LAS AF Lite	(Leica Microsystems GmbH)
Microsoft Office 2013	(Microsoft Corporation)
SDM-Assist v0.36	((Karnik et al., 2013))

Verwendete Onlineressourcen

Araport	http://www.araport.org
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
cNLS Mapper	http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp
DomPred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/dompred
DiANNA 1.1 web server	http://bioinformatics.bc.edu/clotelab/DiANNA
ExpASY Translate Tool	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
FoldIndex	http://biportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex
Oligo Calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools
Protparam	http://web.expasy.org/protparam
Pub Med	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
WatCut	http://watcut.uwaterloo.ca

2. Material und Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeit mit Bakterien

*Arbeiten mit *Escherichia coli**

Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Ein 50 µl Aliquot chemisch kompetenter Bakterienzellen (TOP10, DH5α, KMI001) wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 0,5-1 µg Plasmid DNA oder 3,5 µl einer BP- oder LR-Reaktion bzw. eines Ligationsansatzes hinzugegeben, vorsichtig mit den Zellen gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 30 s bei 43°C und anschließender Inkubation von 5 min auf Eis wurde 1 ml LB Flüssigmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde 60 min bei 37°C geschüttelt. Die mittels Zentrifugation (4.000 rpm, 3 min) sedimentierten Zellen wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation elektrokompetenter Bakterien

Ein 50 µl Aliquot elektrokompetenter Bateriazellen (*CoppyCutter*TM-Zellen) wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 0,5-1 µg zuvor entsalzter Plasmid-DNA oder 3,5 µl einer BP- oder LR-Reaktion hinzugegeben, vorsichtig mit den Zellen gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Überführen des Transformationsansatzes in kalte Elektroporationsküvetten (2 mm) wurde die Elektroporation mit einer angelegten Spannung von 1.800 Volt durchgeführt, die Zellsuspension mit 1 ml LB Flüssigmedium aus der Küvette gespült und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden 60 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend mittels Zentrifugation (4.000 rpm, 3 min) sedimentiert, auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Lagerung der Bakterien

Zur langfristigen Lagerung der transformierten *E. coli* Bakterien wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden 800 µl einer Über-Nacht-Kultur mit 800 µl autoklaviertem Glycerin gemischt. Nach sofortigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff (N₂(l)) erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Analytische Präparation von Plasmid-DNA ("Mini Präp")

4,5 ml selektives LB Flüssigmedium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Für die Gewinnung der Plasmide wurde die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse nach (Sambrook ER, 2001) isoliert. Es wurden zwei mal 2 ml einer Übernachtskultur 30 s bei 14.000 rpm abzentrifugiert und das Sediment in 400 µl Mini-Lösung I resuspendiert. Im Anschluss wurden je 400 µl Mini-Lösung II und III zugegeben. Durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 14.000 rpm wurden die Zellrückstände entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde dieser 1:1 mit Isopropanol gemischt, für mindestens 20 min bei -20 °C inkubiert und 20 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend in der *Speedvac* getrocknet und danach in 35-µl H₂O (Milli-Q) gelöst. Zur Inaktivierung von DNAsen wurden die Proben für 10 min auf 72 °C erhitzt.

Heterologe Proteinexpression in Bakterien

Zur Expression der *Input*-Domäne von AHK5 (AHK5_C9) wurde der Stamm Origami-2 (DE3) von Novagen® benutzt. Die Expression des sog. C8-Fragments (AHK5_C8) erfolgte mit BL21 (DE-3) RIL-Zellen und für das Volllängenkonstrukt (AHK5_C7) wurden Rosetta 2-Zellen (Novagen®) verwendet.

Die Expression der *Input*-Domäne von AHK5 (AHK5_C9) wurde nach dem Protokoll zur Expression der CHASE-Domäne von AHK4 durchgeführt (Hothorn et al., 2011). Zur Herstellung einer Vorkultur wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 5 ml LB Medium (mit entsprechenden Antibiotika) angeimpft und bei 37 °C über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 geschüttelt. Anschließend wurde die Vorkultur mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 300 μM) induziert und für 22 h bei 16 °C geschüttelt. Danach wurde die Kultur (14.000 rpm, 15 sec) abzentrifugiert und das Pellet in 800 μl Harnstoffpuffer aufgenommen.

Zur Expression des C8-Fragments (AHK5_C8) wurde ebenfalls eine Vorkultur hergestellt (s.o.). Diese wurde in 5 ml TB Medium (mit entsprechenden Antibiotika) auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,1 eingestellt und bei 37 °C für weitere 4 h geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 500 μM IPTG auf Eis induziert und für 20 h bei 18 °C geschüttelt. Danach wurde die Kultur bei 4 °C für 15 min und 4.000 rpm abzentrifugiert und für die native Extraktion (siehe Abschnitt: Extraktion und Reinigung von Proteinen aus *E. coli* unter nativen Bedingungen, Seite 31) herangezogen.

Extraktion von Proteinen aus E. coli unter denaturierenden Bedingungen

Für alle Testexpressionen wurden 2 ml der entsprechenden Bakterienkultur 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 800 μl Harnstoffpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min und 14.000 rpm wurden 15 μl des Überstands für die SDS-PAGE verwendet.

Extraktion und Reinigung von Proteinen aus E. coli unter nativen Bedingungen

Die Extraktion und Reinigung von Proteinen aus *E. coli* unter nativen Bedingungen wurde von dem Masterstudenten Thomas Drechsler durchgeführt (siehe Masterthesis Thomas Drechsler 2015).

Fluoreszenz β-Galactosidase Versuch (nach Spichal, 2011)

Dieser auf Fluoreszenz basierende β-Galactosidase Versuch dient dazu, Sensor Histidinkinasen im bakteriellen System zu untersuchen (Spichal, 2011). Hierbei macht man sich den *E. coli* Stamm KMI001 zu Nutze, welcher keine endogene Histidinkinase für den Signalweg der Erkennung und Synthese von kapsulären Polysacchariden besitzt. Durch Komplementierung mit einer anderen Histidinkinase (in diesem Fall AHK5) lässt sich mittels β-Galactosidase-Nachweis deren Aktivität untersuchen.

KMI001 Zellen wurden nach der Transformation auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert. Als Signalmolekül für die AHK5 wurden verschiedene H₂O₂-Konzentrationen verwendet. Zur visuellen Überprüfung, ob bei Signalgabe eine Expression der β-Galactosidase erfolgte, wurden transformierte und nichttransformierte (Negativkontrolle) KMI001 Zellen in Petrischalen auf selektivem M9 Minimalmedium (Sambrook ER, 2001) ausgestrichen, welche zuvor mit 20 μg/ml 5-Brom-4chlor-3-indoxyl-β-galactosid (X-Gal) versetzt wurden. X-Gal dient als Substrat für die β-Galactosidase und wird nach enzymatischer Spaltung und Oxidation an der Luft als blauer Farbstoff sichtbar. Die Blaufärbung der Kolonien diente somit als Nachweis für die Aktivität der AHK5.

2. Material und Methoden

Für die Durchführung des Fluoreszenz β -Galactosidase (MUG)-Versuches wurden die transformierten KMI001-Zellen in selektivem M9 Minimalmedium inokuliert und über Nacht in einem Inkubator bei 25-°C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von etwa 1 geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde mit selektivem M9 Minimalmedium auf eine OD_{600} von etwa $1,6 \cdot 10^{-3}$ verdünnt und anschließend wurden je 200 μ l der Verdünnung in ein Well einer transparenten Mikrotiterplatte (96-Well) pipettiert. Zusätzlich wurde jeweils 1 μ l H_2O_2 -Lösung (in verschiedenen Konzentrationen) bzw. 1 μ l Kontrolllösung (Milli-Q Wasser) hinzugegeben und die Platte im Inkubator für 17 h bei 25 °C und 180 rpm geschüttelt. Nach der Inkubation wurden jeweils 50 μ l in eine weiße Mikrotiterplatte (96-Well) überführt, in welche zuvor 2 μ l 25 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactosid (MUG) vorgelegt wurden. MUG dient als Substrat für die β -Galactosidase und wird zu 4-Methylumbelliferon (4-MU) und Galactose umgesetzt. Da das 4-MU lichtlabil ist, wurde die Mikrotiterplatte während der gesamten Reaktion mit einem lichtundurchlässigen Deckel abgedeckt. Die Reaktion fand im Inkubator für 30 min bei 37 °C und 180-rpm statt und wurde durch Zugabe von 100 μ l Carbonat Stopp-Puffer beendet. Anschließend wurde die Fluoreszenz im Plattenlesegerät mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm bei einer Emission von 460 nm gemessen. Die spezifische β -Galactosidaseaktivität ergibt sich aus $\left(\frac{\text{rel. Fluoreszenz}}{OD_{600} \cdot 0,5 \text{ h}}\right) \cdot 10^{-3}$.

Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens*

Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien mit Plasmid-DNA

Ein 100 μ l Aliquot chemisch kompetenter Agrobakterien wurde auf Eis aufgetaut. 5 μ l Plasmid-DNA wurden hinzugegeben und das Ganze 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min in $N_2(l)$ eingefroren und anschließend für 5 min auf 37 °C erhitzt. Danach wurde 1 ml YEB-Flüssigmedium zugegeben und der Transformationsansatz bei 28 °C für 2-4 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 4.000 rpm zentrifugiert, auf YEB-Platten mit Antibiotika ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Für Über-Nacht-Kulturen transformierter Bakterien wurden 4,5 ml YEB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C geschüttelt.

Lagerung der Bakterien

Zur langfristigen Lagerung der Agrobakterien wurden DMSO Stocks angelegt, indem 930 μ l einer Über-Nacht-Kultur zu 70 μ l DMSO gegeben und gut gemischt wurden. Nach sofortigem Einfrieren in $N_2(l)$ erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

„Plasmidrescue“

Um zu prüfen, ob das eingebrachte Konstrukt korrekt in Agrobakterien transformiert wurde, wurde ein sogenannter Plasmidrescue durchgeführt. Hier wurde genau wie bei der „Mini-Präp“ (Seite 30) vorgegangen und die erhaltene DNA in *E. coli* retransformiert. 70 μ l dieses Transformationsansatzes wurden in 4,5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte erneut die analytische Präparation der Plasmid-DNA (Seite 30) und deren Restriktionsanalyse (Seite 34).

2.2.2 Arbeiten mit Proteinen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-PAGE verwendet. Entweder diente der Harnstoffpuffer, mit dem die Proteine extrahiert wurden, gleichzeitig als Ladepuffer oder es wurde eine entsprechende Menge an Probenpuffer zugesetzt. Es wurde eine Spannung von 120 V und eine Stromstärke von 10-15 mA pro Gel bei einer Leistung von 50 W angelegt. Nach Ende der SDS-PAGE wurden die Gele für den Western Blot bzw. die Coomassie-Färbung benutzt.

Coomassie-Färbung: Proteinfärbung in SDS-Gelen

Um Proteine im SDS-PAGE anzufärben, wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung über Nacht leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Gele in Entfärbelösung inkubiert, bis die einzelnen Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Dokumentation wurden die entfärbten Gele mit Folie umhüllt und durch Scannen digitalisiert.

Silberfärbung: Proteinfärbung in SDS-Gelen

Die Silberfärbung der SDS-Gele bei der Analyse von Phosphopeptiden bzw. dem Redoxversuch der *Input*-Domäne von AHK5 wurde von Dr. Mirita Franz am Proteom Center Tübingen bzw. von Matthias Vorländer (ehemals AG Stehle) am IFIB-Tübingen durchgeführt.

Western Blot

Mittels *wet blot* wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, auf eine immobilisierende PVDF-Membran (Millipore, USA) übertragen. Die PVDF-Membran wurde vor Aufbau des *wet blots* (in folgender Reihenfolge: Anode, Schwamm, Whatman-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Whatman-Papier, Schwamm, Kathode) etwa 10 min in 100 % Methanol äquilibriert. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA über Nacht bzw. 300 mA für 1,5 h im Kühlraum durchgeführt.

Immunodetektion

Die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Nach Ende des Western-Blots wurde die PVDF-Membran für 10 min mit 1 x TBS gewaschen und anschließend in Blockierlösung für mindestens 1 h bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem ersten Antikörper (in TBS-Tween) über Nacht bei 4 °C bzw. für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser bindet spezifisch an das zu detektierende Protein. Überschüssige Antikörper wurden durch drei zehnteilige Waschschriffe mit TBS-Tween entfernt. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1-h mit dem sekundären Antikörper (in TBS-Tween) inkubiert, welcher den primären Antikörper bindet, und zusätzlich an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Alternativ wurde bei gekoppelten primären Antikörpern (anti-His-AP) nur ein Antikörper benutzt, da hier bereits die Alkalische Phosphatase am Primärantikörper fusioniert ist. Es folgten wiederum drei zehnteilige Waschschriffe mit TBS-Tween, wodurch überschüssige Antikörper entfernt wurden und somit Hintergrundfärbung vermieden wird. Die Membran wurde anschließend für 5 min in Färbepuffer äquilibriert, welcher daraufhin gegen die Färbelösung ausgetauscht wurde. Diese enthält die Substrate NBT und BCIP, die von der an den sekundären Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase in einen blauen Farbstoff umgesetzt werden. Sobald klare Banden zu erkennen waren, wurde die Reaktion durch Spülen mit H₂O abgestoppt. Zur Dokumentation wurde die Membran getrocknet und anschließend durch Scannen digitalisiert.

2. Material und Methoden

Phosphorylierungsversuche unter Verwendung des radioaktiven Phosphor-Isotops ^{33}P (nach Mirarodado et al., 2007)

Mit den nativ gereinigten Proteinen aus *E. coli* Extrakten AHK5_C8 (Kinase) und AHP1 (Substrat), sowie den kommerziell erworbenen Proteinen AHK5_C7 (codonoptimierte Kinase) und ARR4 (codonoptimiert) wurden Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente mittels Radioaktivität durchgeführt. Vor Verwendung wurden jeweils 100 μl der kommerziell erworbenen Proteinlösungen von ARR4 und AHK5_C7, zweimal für 30 min gegen 1x TEDG Puffer im Kühlraum dialysiert.

Protein-Protein-Phosphorylierung

Um zu testen, ob die Kinasen (AHK5_C8 und AHK5_C7) sich selbst, ihr Substrat (AHP1), sowie ein weiteres nachgeschaltetes Element (ARR4) phosphorylieren können, wurden jeweils 5 μg Protein in verschiedenen Kombinationen mit 370 kBq von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP, in einem 30 μl 1x TEDG gepufferten Ansatz eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und für 15-60 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl Probenpuffer und anschließender Denaturierung bei 42 °C für 5 min gestoppt. 20 μl der Reaktionsansätze wurden anschließend auf ein 12,5 % denaturierendes Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Analyse der in den Proben vorhandenen Radioaktivität wurde das Gel in 10 % Glycerin gewaschen, in eine Klarsichtfolie eingepackt auf einer radiosensitiven Röntgenspeicherfolie (*Phosphor Imaging Plate*, IP) in einer Kassette über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die IP mittels eines Lesegerätes (*Fluorescent Image Analyzer FLA-3000*, Fujifilm, JP) pixelweise ausgelesen.

Pulse-Chase-Experiment

Zur genaueren Analyse des Phosphorelays an den untersuchten Elementen des *Multi-Step-Phosphorelays* (MSPs) wurde ein *Pulse-Chase*-Experiment durchgeführt. Hierbei wurde wie bei der oben beschriebenen Protein-Protein-Phosphorylierung vorgegangen, jedoch ein 60 μl Ansatz pipettiert. Von diesem wurden im 15 Minutentakt jeweils 10 μl entnommen und mit 10 μl 2x Probenpuffer versetzt und durch Denaturierung für 5 min bei 42 °C gestoppt. Nach der zweiten Probenahme bei 30 min wurde nichtradioaktives ATP mit einer Endkonzentration von 10 μM hinzugegeben. Anhand der folgenden Probenentnahmen bei 45 und 60 min und Analyse der Radioaktivitätssignale aller Proben nach SDS-PAGE konnte der Phosphattransfer verfolgt werden.

Massenspektrometrische Analysen

Qualitative Analysen der Proteinidentität wurden freundlicherweise von Dr. Edda von Roepenack - Lahaye in den zentralen Bereichen am ZMBP durchgeführt.

Das Proteom Center Tübingen untersuchte in Phosphorylierungsansätzen mit und ohne ATP, mit massenspektrometrischen Methoden, Kinase- und Substrat- Peptide auf Phosphorylierungsstellen.

2.2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Analytische Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme

Bei einem Restriktionsverdau wurden 1 μl Plasmid-DNA, 0,5 μl des gewünschten Enzyms sowie 2 μl des dazugehörigen Puffers eingesetzt und mit ddH₂O auf 20 μl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für mindestens eine Stunde, bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur. Zur Überprüfung der Fragmentgrößen wurde der Ansatz anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird mit Hilfe eines elektrischen Feldes DNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde je nach Größe der erwarteten Fragmente eine Agarosekonzentration von 0,8-3 % (w/v) gewählt. Diese wurde in 1 x TBE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,5-µg/ml) zugegeben, alles in die Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit 1 x TBE überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA α -Helix und wird durch Bestrahlung mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt, so dass DNA-Banden sichtbar werden.

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *Quick Gel Extraction Kits* von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

Polymerase Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)

Ortsspezifische Mutagenese:

Die ortsspezifische Mutagenese ist eine molekularbiologische Methode, um gezielt Basenpaare in einem Plasmid auszutauschen. Hierfür wird je ein Primer in *sense* und *antisense* Richtung entworfen, der die mutierte Basenabfolge enthält. Dabei ist der *antisense* Primer genau revers komplementär zum *sense* Primer. Für jede Mutagenese wurden zwei PCRs mit jeweils nur einem der beiden Primer angesetzt.

<u>PCR-Ansätze</u>	<u>Reaktionsbedingungen (1. Durchlauf)</u>
1,5 µl Template (150 ng/µl)	- 98 °C für 30 s
1,5 µl Primer (10 µM; <i>sense</i> ODER <i>antisense</i>)	- 5x
5,0 µl 5x HF Puffer	98 °C für 10 s
0,65 µl dNTPs (10 mM)	55-65 °C für 30 s
1,0 µl DMSO	72 °C für 15-30 sec / kbp
0,2 µl Phusion Polymerase	
16 µl H ₂ O	

Anschließend wurden beide PCR-Ansätze vereinigt und folgendes PCR-Programm durchlaufen.

Reaktionsbedingungen (2. Durchlauf)

- 98 °C für 30 s
- 15x
 - 98 °C für 10 s
 - 72 °C für 1 min 20 s
- 72 °C für 8 min

Danach wurden 3 µl DpnI zum PCR-Ansatz gegeben und alles für 3 h bei 37 °C inkubiert mit anschließender Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 80 °C. Nach Transformation in *E. coli* und anschließender Plasmidisolierung mit Überprüfung durch Restriktionsanalyse wurde die Probe sequenziert (GATC Biotech, Konstanz, D).

2. Material und Methoden

Amplifikation von Gensequenzen und Herstellung von Expressionskonstrukten:

Die zu klonierende Gensequenz wurde zunächst mittels PCR amplifiziert.

PCR-Ansatz

1,5 µl Template (150 ng/µl)
 0,5 µl *sense* Primer (10 µM)
 0,5 µl *antisense* Primer (10 µM)
 0,5 µl dNTPs (10 mM)
 0,2 µl Phusion Polymerase
 16,8 µl H₂O

Reaktionsbedingungen

- 98 °C für 30 s
 - Zyklus mit 30 Wiederholungen
 98 °C für 8 s
 60 °C für 20 s
 72 °C für 15-30 s pro kbp
 - 72 °C für 8 min

Je nach Klonierungsstrategie wurde das aus dem Agarosegel isolierte DNA-Fragment mittels klassischer Klonierung (nach Sambrook und Russel 2001(Sambrook ER, 2001)) oder über die sog. Gateway® Rekombination (nach Herstellerangaben, Invitrogen) in den entsprechenden Vektor kloniert (Abbildung 1).

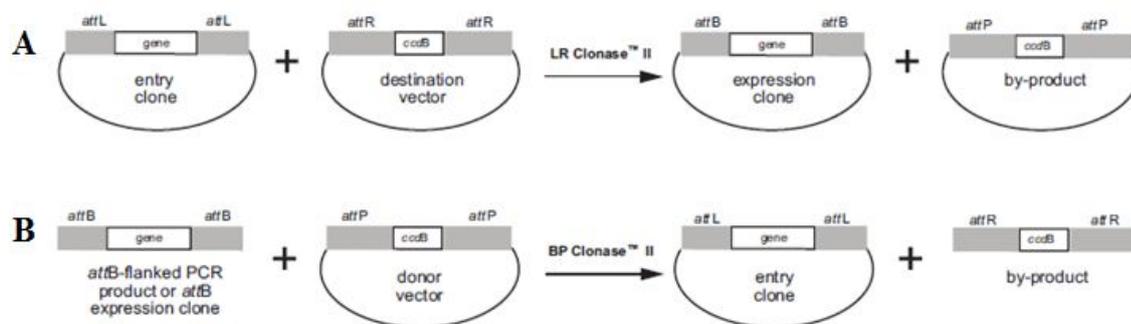


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gateway-Rekombinierungsreaktion. Die LR-Reaktion (A) dient der Rekombination eines DNA-Fragments aus dem Entry-Klon in einen Destination-Vektor zur Herstellung eines Destination-Klons. Die BP-Reaktion (B) wird angewendet, um ein PCR-Produkt in einen Donor-Vektor zur Herstellung eines Entry-Klons zu rekombinieren (<http://www.invitrogen.com>).

Die im Gateway-System verwendeten Vektoren weisen zwischen den *Attachment*-Regionen in der sogenannten Gateway Kasette ein zusätzliches Resistenzgen für Chloramphenicol (Cm^R) und das *ccdB*-Gen auf.

LR-Reaktion:

<i>Entry</i> -Klon (150 ng/µl)	0,75 µl
<i>Destination</i> -Vektor (150 ng/µl)	0,75 µl
5 x LR Clonase-Puffer	0,5 µl
LR Clonase™ Enzymmix	0,5 µl

BP-Reaktion:

PCR-Produkt	2 µl
Donor-Klon (150 ng/µl)	1 µl
5 x BP Clonase-Puffer	1 µl
BP Clonase™ Enzymmix	1 µl

Bei der Verwendung des 2in1 Vektor Systems (Hecker et al., 2015), bei dem DNA-Fragmente aus zwei *Entry*-Klonen inseriert werden, wurde entsprechend die doppelte Menge an *Destination*-Vektor für die LR Reaktion eingesetzt.

Alle Reaktionen wurden mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend *E. coli* transformiert.

2.2.4 Arbeiten mit Pflanzen

Arabidopsis thaliana

Oberflächensterilisation der Samen

Hier wurde auf zwei verschiedene Methoden zurückgegriffen.

- a) Samen von *A. thaliana* wurden erst für 10 min in Sterilisationslösung 1, dann für 10 min in Sterilisationslösung 2 über Kopf geschüttelt. Nach der Oberflächensterilisation wurden die Samen auf Filterpapier unter sterilen Bedingungen getrocknet.
- b) Die Samen wurden in offenen Gefäßen zusammen mit einem Becherglas, welches eine Mischung aus 7 ml Natriumhypochlorid und 7 ml Salzsäure (37 %) enthielt, in einen Exsikkator gestellt. Nach Schließen des Exsikkatordeckels wurden die Samen über Nacht in der Chlorgasatmosphäre inkubiert und anschließend nach langsamen Belüften des Exsikkators unter sterilen Bedingungen zur kompletten Ausgasung inkubiert.

Anzucht von A. thaliana auf Erde

Zur Brechung der Dormanz wurden die Samen von *A. thaliana* mindestens 24 h bei 4 °C in 0,1 % (w/v) Agar inkubiert. Danach wurden die Samen mittels 1 ml Pipette auf Erde ausgelegt. In der ersten Woche blieben die Töpfe mit einer Kunststoffhaube bedeckt. Je nach Verwendung wurden die Pflanzen im Gewächshaus, der Phytokammer oder im Percival angezogen.

Anzucht von A. thaliana auf ½ MS-Agar

Zuvor oberflächensterilisierte *A. thaliana* Samen wurden in Petrischalen auf ½ MS-Agar ausgelegt. Nach Stratifikation bei 4°C für mindestens 24 h wurden die Pflanzen bis zur Keimung in der Klimakammer gelassen und je nach Fragestellung entsprechend weiter behandelt.

Messung von Reaktiven Sauerstoffspezies mittels Chemolumineszenz nach flg22-Behandlung („ROS burst“)

Die zu untersuchenden *Arabidopsis thaliana* Linien wurden auf Erde angezogen und in der Klimakammer unter Kurztagbedingungen (8h Licht, 25 °C) kultiviert. Nach sechs Wochen wurden die Blätter mit einer scharfen Klinge in gleich große quadratische Stücke geschnitten und diese über Nacht (16 h) in Wasser äquilibriert, um ein Verfälschen der Messung durch z.B. beim Schneiden gebildete ROS (*reactive oxygen species*) zu verhindern. Anschließend wurde jeweils ein Blattstück in ein Well einer Mikrotiterplatte (96-Well) platziert, in welche zuvor 90 µl H₂O (Milli-Q) vorgelegt wurden. Nach Zugabe von 10 µl Luminol-Mastermix pro Well wurde die Lumineszenz der Proben in der Mikrotiterplatte über 10-15 min im Plattenlesegerät (Fluoroskan Ascent™, Thermo Scientific) beobachtet, bis die Lumineszenzwerte konstant blieben. Nach Erreichen konstanter Werte wurden je 1 µl Flagellin (flg22 in 0.1 M NaCl, 10 mg/ml BSA) in verschiedenen Konzentration oder 1 µl der Referenzlösung (0.1 M NaCl, 10 mg/ml BSA) pro Well zugegeben und die Lumineszenz über 45 min gemessen. Flg22 induziert unter Normalbedingungen die Bildung von H₂O₂. Dieses dient als Ko-substrat für die im Luminol-Mastermix enthaltene Meerrettichperoxidase, welche ihr Substrat Luminol umsetzt und Photonen im sichtbaren Spektrum emittiert. Diese Emission bei 428 nm kann luminometrisch gemessen werden und diente als Maß für die H₂O₂ Produktion nach flg22-Behandlung.

2. Material und Methoden

Seneszenzversuch mit A. thaliana

Die Anzucht aller Pflanzenlinien erfolgte simultan und auf Erde unter kontrollierten Wachstumsbedingungen im Percival (16 h Licht und 22 °C, 8 h Dunkelheit und 18 °C, 90-110 µE). Nach Blühinduktion wurde wöchentlich der Chlorophyllgehalt, die Blattfarbe, die Lipidperoxidation, sowie der H₂O₂ Gehalt bestimmt. Hierbei war darauf zu achten, dass immer Blätter bestimmter Position zur Messung herangezogen wurden. Hierfür wurden die entsprechenden Rosettenblätter jeder Pflanze mit farbigen Fäden versehen (z.B. Blatt 3 = rot, Blatt 5 = blau, Blatt 7 = grün, usw.).

Messung des Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung des relativen Chlorophyllgehalts wurde mit Hilfe des „*atLEAF+ chlorophyll meter*“ (FT Green LCC, Willmington, DE, USA) durchgeführt, einer nichtinvasiven Messmethode, die auf der Messung der Lichtdurchlässigkeit des Blattes beruht. Hierbei wird als Wert (der sog. „*atLEAF+ value*“) die Differenz der optischen Dichte bei Beleuchtung mit 660 nm und 940 nm herangezogen. Es war darauf zu achten, dass die Blätter immer in der gleichen Orientierung im Gerät liegen. Um Positionseffekte zu vermeiden, wurden jeweils Mehrpunktmessungen in der gesamten Blattfläche durchgeführt.

Lipidperoxidation

Lipidperoxidation ist ein Zeichen von Membranalterung und verstärkt sich mit fortschreitender Seneszenz. Zur Bestimmung der Lipidperoxidation wurde entsprechend des Protokolls von (Hodges et al., 1999) vorgegangen. Hierbei wird die Bildung von Malondialdehyd (MDA) als Marker für die Lipidperoxidation herangezogen. MDA wird bei Auto-oxidation und enzymatischer Degradation von mehrfach gesättigten Fettsäuren gebildet und reagiert mit Thiobarbitursäure (TBA) zu einem rosaroten Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 532 nm. Da auch andere nicht TBA-Komplexe bei 532-nm absorbieren, müssen Kontrollen ohne TBA zur Differenzbildung gemessen werden. Neben Fettsäuren kann TBA ebenfalls einen Komplex mit Zuckern bilden, welche ihr Absorptionsmaximum bei 440 nm haben. Um solche falsch-positiven Messungen auszuschließen, werden ebenfalls Messungen bei 440-nm durchgeführt. Die molare Absorption von Zucker bei 532 nm beträgt 8,4 und 147 bei 440 nm. Dieses Verhältnis von 0,0571 muss in der Folgerechnung berücksichtigt werden.

Das Pflanzenmaterial wurde zuerst gewogen, dann in N₂(l) eingefroren und mittels Glaskügelchen in einem Universalmischgerät für Amalgam (Silamat S6, Ivoclar Vivadent GmbH, Ellwangen, D) unter ständiger Stickstoffkühlung homogenisiert. Anschließend wurden alle Proben mit 500 µl Extraktionspuffer versetzt, gut gemischt und für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden entweder zur Bestimmung der nicht-TBA-Komplexe zu 800 µl Reaktionspuffer 1 oder zur Messung der TBA-Komplexe zu 800 µl Reaktionspuffer 2 gegeben. Nach Vortexen wurden alle Proben für 30 Min bei 95 °C im Heizblock inkubiert und im Anschluss mit Eis auf Raumtemperatur abgekühlt. Um eventuelle Pflanzenreste für weitere Schritte zu eliminieren, wurden die Proben erneut 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Absorptionsbestimmung erfolgte im Plattenlesegerät (Tekan Safire™, Tecan Trading AG, CH) bei 440, 532 und 600 nm. Die MDA-Konzentration wurde anschließend wie folgt berechnet.

1. $A = [(Abs_{532\text{ nm} - TBA} - Abs_{600\text{ nm} + TBA}) - (Abs_{532\text{ nm} - TBA} - Abs_{600\text{ nm} - TBA})]$
2. $B = [(Abs_{440\text{ nm} + TBA} - Abs_{600\text{ nm} + TBA}) * 0,0571]$
3. $MDA \text{ Äquivalente} = \left(\frac{A-B}{157000}\right) * 10^6 \text{ [nmol/ml]}$

Die errechneten Werte wurden anschließend durch das zu Beginn gemessene Frischgewicht geteilt, um die Bildung der MDA Äquivalente pro mg eingesetzten Blattmaterial zu erhalten.

Bestimmung des *in planta* Wasserstoffperoxidgehalts

Die Bestimmung des Wasserstoffperoxidgehaltes erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes H₂DCFDA (Keller et al., 2004). Dieser ist ein Indikator für alle reaktiven Sauerstoffspezies. Das zu untersuchende Blatt wurde für 45 min in der Arbeitslösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Wasser und zügigem Trocknen wurde dieses in N₂(l) eingefroren, maximal sieben Tage bei -80 °C gelagert und anschließend mittels Glaskügelchen und dem Universalmischgerät Silamat S6 unter ständiger Stickstoffkühlung homogenisiert und danach mit 500 µl 40 mM Tris pH 7 versetzt und gut gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 4 °C mit 12.000 g zentrifugiert und deren Fluoreszenz in einer Mikrotiterplatte (96-Well) im Plattenlesegerät (Tekan Safire™, Tecan Trading AG, CH) gemessen (Anregungswellenlänge = 480 nm und Emissionswellenlänge = 520 nm).

Behandlung von *A. thaliana* mit abiotischem Stress

Die zu untersuchenden *Arabidopsis thaliana* Linien wurden auf Erde angezogen und in der Klimakammer unter Kurztagbedingungen (8h Licht, 25 °C) kultiviert. Nach sechs Wochen wurden Blätter von Position fünf der Rosette mit einer scharfen Klinge abgeschnitten und in einer 0,1 % Tween 20-Lösung unter entsprechender Behandlung inkubiert: 250 mM NaCl bei Raumtemperatur, 39° C ohne NaCl oder 4 °C ohne NaCl. Die Kontrollbehandlung erfolgte bei Raumtemperatur unter Abwesenheit von NaCl. Die *in planta* H₂O₂-Konzentrationsbestimmung wurde kurz vor, sowie 20, 40, 60 und 120 min nach der jeweiligen Behandlung durchgeführt, wobei entsprechend des vorangegangenen Abschnitts vorgegangen wurde.

Arbeiten mit *Nicotiana benthamiana*

Anzucht von *N. benthamiana*

Die Samen wurden auf angefeuchteter Erde (Einheitserde Typ P) ausgesät und die Tabakpflänzchen nach zwei Wochen in kleine Töpfe (Ø 5 cm; mit Einheitserde Typ P und Einheitserde Typ vermischt mit Sand im Mischungsverhältnis 1:1:1) vereinzelt.

Transiente Transformation von *N. benthamiana*

Für die transiente Transformation von *N. benthamiana* wurden 4-5 Wochen alte Pflanzen verwendet. Hierfür wurden 0,5-1 ml einer 4,5 ml Übernachtskultur von Agrobakterien in 5 ml Selektionsmedium (YEB mit entsprechenden Antibiotika) überimpft und bei 28 °C für etwa 4 h geschüttelt. Danach wurden die Agrobakterien für 15 min bei 4 °C und 4.000 rpm sedimentiert und anschließend in kaltem AS-Medium resuspendiert und mit diesem auf eine OD₆₀₀ von 0,7-0,8 eingestellt. Für die Koinfiltration mit mehreren Konstrukten wurden die entsprechenden Agrobaktériensuspensionen 1:1 gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Um eine hohe Expression der gewünschten Gene zu gewährleisten, wurde der Agrobaktériensuspension das Konstrukt p19 aus dem TBSV (*tomato bushy stunt virus*) beigemischt. Es wird verwendet, um posttranskriptionelles *Gene silencing* in infiltrierten Gewebe zu unterdrücken (Voinnet et al. 2003). Die Tabakpflanzen wurden mindestens 1 h vor der Infiltration gut gewässert und mit einer Plastikhaube bedeckt, damit sich die Stomata weit öffnen, was die Infiltration erleichtert. Mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze (ohne Kanüle) wurde anschließend die Agrobaktériensuspension in die Unterseite der Blätter infiltriert. Danach wurden die Pflanzen mit einer Kunststoffhaube abgedeckt. Drei Tage nach der Infiltration wurde die Expression der Fusionsproteine mittels *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) analysiert.

2. Material und Methoden

Extraktion von Proteinen aus N. benthamiana

Für die Extraktion von Proteinen aus *N. benthamiana* wurde Blattmaterial in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß in N₂(l) eingefroren und mittels Glaskügelchen in einem Universalmischgerät (Silamat S6) unter ständiger Stickstoffkühlung homogenisiert. Anschließend wurde die Probe mit 250 µl Harnstoffpuffer versetzt und für 20 min bei 60 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation für 10 min und 14.000 rpm wurden 10 µl des Überstands für die SDS-PAGE verwendet.

Arbeiten mit humanen Zellen (HEK293T/HEK293)

Es wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet, HEK293 und HEK293T Zellen. HEK293T Zellen stammen von der HEK293 Zelllinie ab, exprimieren jedoch das große T-Antigen SV40. SV40 bindet an Enhancer in Expressionskonstrukten und kann somit die Proteinproduktion erhöhen. Zur stabilen Expression heterologer Proteine wurde der HEK293 Stamm gewählt. Die Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEM F-12 Ham, Cat. No. D8062, Sigma) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10 % (v/v) FBS (*Fötales Bovines Serum*) versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert.

Anzucht von HEK-Zellen

Zur Herstellung einer neuen Zellkultur wurde zunächst ein Aliquot mit gefrorenen Zellen in einem 37-°C Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die aufgetaute Zellsuspension in 5 ml 37 °C warmes DMEM F-12 Ham überführt. Nach Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 100 g und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun durch vorsichtiges Pipettieren in 5 ml 37 °C warmem DMEM F-12 Ham resuspendiert, in eine T75-Zellkulturflasche (Falcon™) überführt und mit 6 ml DMEM F-12 Ham versetzt. Anschließend wurde die 2 bis 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Herstellung einer Subkultur von HEK-Zellen

Da sich HEK293T Zellen innerhalb von 24 Stunden verdoppeln, besteht die Notwendigkeit eine regelmäßige Verdünnung der Zellen, sowie eine Regeneration an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren vorzunehmen. Dazu wurde das verbrauchte Medium mit einer Pipette entfernt, ohne den Zellrasen zu beschädigen. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wurde 1 ml 1x Trypsin-EDTA auf dem Zellrasen verteilt. In der anschließenden Inkubationszeit von 5 min im Brutschrank wurden hiermit Zelladhäsionsmoleküle verdaut, so dass sich die adhärenen Zellen vom Untergrund, sowie aus dem Zellverband lösen. Durch Zugabe von 5 ml frischem DMEM F-12 Ham und vorsichtigem Mischen wurde eine Zellsuspension erzeugt. Von dieser Zellsuspension wurde eine angemessene Menge in der Flasche gelassen (beispielsweise 1,5 ml für eine 2 Tages Subkultur oder 0,75 ml für eine 3 Tages Subkultur) und mit frischem Medium auf ca. 11 ml aufgefüllt. Nach erneutem vorsichtigem Mischen durch Pipettieren wurden die Zellen für 2 bis 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Vorbereitungen für die Transfektion von HEK-Zellen

Für die transiente Expression wurden 130 µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1,3x10⁵ Zellen/ml in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Herstellung von stabil exprimierenden HEK-Zelllinien wurden 3 ml der Zellsuspension in eine 6-Well Gewebekulturplatte vorgelegt. Nach 24 h im Inkubator erfolgte die Transfektion der Zellen.

Transfektion von HEK-Zellen

Die Transfektion der humanen Zellen mit Fremd-DNA mittels *GeneJuice® Transfection Reagent* (Novagen) erfolgte nach Herstellerangaben bei einer Konfluenz von ca. 50-80 %. Für die transiente Expression wurden 100 ng Plasmid-DNA, sowie 0,6 µl *GeneJuice® Transfection Reagent* in 6,3 µl serumfreiem Medium (Opti-MEM) eingesetzt. Zur Herstellung stabil exprimierender HEK-Zellen wurden 2 µg Plasmid-DNA und 6 µl *GeneJuice® Transfection Reagent* in 100 µl Opti-MEM verwendet. Der Transfektionsansatz wurde jeweils direkt in das Nährmedium der Zellen gegeben. Je nach Fragestellung verblieben die Zellen 48 h oder länger im Brutschrank.

Titration der benötigten Menge an Geneticin (G418)

Zur Bestimmung der benötigten Antibiotikakonzentration erfolgte die Anzucht der Zellen in 48-Well Gewebekulturplatten (0,5 ml pro Well) mit ansteigenden Konzentrationen an G418. Für alle Folgeexperimente wurde die niedrigste Konzentration gewählt, welche nach drei Tagen einen massiven Zelltod und nach zwei Wochen den Tod aller Zellen zur Folge hatte. Dies trat bei einer Konzentration von 500 µg/ml auf.

Herstellung stabil exprimierender HEK-Zelllinien

Für die Herstellung von stabil exprimierenden Zellen wurde entsprechend der Abschnitte: Vorbereitungen für die Transfektion von HEK-Zellen, Seite 40 und Transfektion von HEK-Zellen, Seite 41 vorgegangen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:10, 1:20 oder 1:50 (mit Nährmedium) in 6-Well Poly-D-Lysin beschichtete Gewebekulturplatten transferiert und mit einer Endkonzentration von 500 µg/ml G418 versetzt. Das Wachstum der Zellen wurde 2-4 Wochen beobachtet und isolierte Einzelkolonien weiterkultiviert. Hierzu wurde über die zu isolierende Einzelkolonie ein steriler Kunststoffzylinder platziert, das Nährmedium abgenommen und die Kolonie mit 37 °C warmer Agarlösung überschichtet. Der auspolymerisierte Agar wurde anschließend über der Einzelkolonie entfernt. Diese wurde dann mit 100 µl Trypsin für 5 min im Brutschrank inkubiert und so vom Untergrund gelöst und in eine 48-Well Gewebekulturplatte mit frischem selektivem Nährmedium bis zu einer Konfluenz von 80 % weiterkultiviert. Danach wurden „Cryostocks“ zur Lagerung dieser Zellklone hergestellt, sowie deren Expression *via* Fluoreszenzmikroskopie und Immunodetektion analysiert.

Herstellung von Cryostocks

Zur Lagerung von HEK-Zellen wurden sog. *Cryostocks* hergestellt. Hierfür wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS trypsiniert, in 5 ml DMEM F-12 Ham aufgenommen und in einer Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit DMEM F-12 Ham verdünnt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 100 g für 5 min bei RT sedimentiert. Nachfolgend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml Bambanker aufgenommen und in einem sterilen 2 ml Schraubdeckelgefäß in N₂(l) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Proteinextraktion aus HEK-Zellen unter nativen Bedingungen

Bei der Extraktion von Proteinen unter nativen Bedingungen wurde ständig auf Eis und im Kühlraum gearbeitet. Hierfür wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde Lysepuffer (1 ml für $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen) zugegeben und 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Mit einem kleinen Spachtel wurde das Zelllysat anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 12.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, welcher alle löslichen Proteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2. Material und Methoden

Mikroskopisches Arbeiten

Alle mikroskopischen Arbeiten wurden an einem Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop (Leica Microsystems), ausgestattet mit einer FLIM-Einheit (PicoQuant) durchgeführt. Für die Anregung und Emission der Fluorophore wurden folgende Lasereinstellungen gewählt. Anregung von mGFP bei 488 nm und Emission bei 500 bis 520 nm, Anregung von mCherry, sowie RFP bei 561 nm und Emission von 580-530 nm. Mittels *Förster resonanz energie transfer/fluorescence lifetime imaging microscopy* (FRET/FLIM) wurden Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* analysiert (Becker, 2012). Dabei wurde die spezifische Lebensdauer der Fluoreszenz des Donor-Fluorophors (mGFP) gemessen. Bei räumlicher Nähe zu einem Akzeptor-Fluorophor (mCherry), dessen Anregungsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors überlappt, kann FRET erfolgen. Dies hat eine Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors zur Folge, welche mittels FLIM gemessen wurde.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Versuche für eine nähere Charakterisierung der *Arabidopsis* Histidinkinase 5 (AHK5) durchgeführt. AHK5 ist eine pflanzliche Hybrid-Histidinkinase und fungiert als Rezeptorprotein innerhalb eines sog. *Multi-Step Phosphorelays* (MSP). Im Gegensatz zu allen anderen Hybrid-Histidinkinasen in *Arabidopsis*, besitzt die AHK5 keine Transmembrandomäne (Hwang et al., 2002). Das Signal, welches von AHK5 perzipiert wird, ist bis heute nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass AHK5 bei bestimmten Entwicklungsprozessen von Bedeutung ist. So wurde AHK5 anfangs als negativer Regulator der Ethylen- und Abscisinsäure-induzierten Hemmung des Wurzelwachstums vermutet (Iwama et al., 2007). Des Weiteren zeigen *ahk5*-Mutanten keinen offensichtlichen Phänotyp, reagieren jedoch nicht mit Schließen der Stomata auf H₂O₂ (Desikan et al., 2008). Ferner ist bekannt, dass AHK5 auch bei der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress eine Rolle spielt (Pham et al., 2012). Da die genannten Prozesse teilweise H₂O₂ abhängig erfolgen, bzw. H₂O₂ hier als Signalmolekül von Bedeutung ist, stellt sich die Frage, welche Rolle AHK5 bei der Regulation von H₂O₂-abhängigen Prozessen spielt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die verwendeten Pflanzenlinien bezüglich der Seneszenz, bzw. nach Applikation von abiotischem und biotischem Stress untersucht. Außerdem wurden zellbiologische Experimente zur Analyse der subzellulären Lokalisation von AHK5, sowie *in planta* Interaktionsstudien durchgeführt. Nach Expression und Reinigung von AHK5 und weiteren Elementen des MSPs wurden Experimente durchgeführt, um die molekulare Struktur und Funktion von AHK5 biochemisch näher zu untersuchen. Schließlich wurden neben diesen *in vitro* Versuchen auch *in vivo* Versuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob AHK5 eine H₂O₂- bzw. redoxabhängige Sensor-Histidinkinase ist.

3.1 AHK5 ist ein positiver Regulator der Seneszenz in *Arabidopsis thaliana*

Seneszenz wird unter anderem durch H₂O₂ reguliert, weshalb dieser in der AHK5-Mutante (*ahk5-1*) verglichen mit dem Wildtyp (Col-0) näher untersucht wurde. Hierzu wurden die Linien zeitgleich ausgesät und ab Beginn des Blühzeitpunkts im wöchentlichen Rhythmus beprobt. Weder beim Blühzeitpunkt noch beim Frischgewicht der Pflanzen wurden im Verlauf des Experiments Unterschiede zwischen den untersuchten Linien festgestellt (Daten nicht gezeigt). Anhand einer visuellen Untersuchung der Blattfarbe wurden alle Rosettenblätter von Col-0 und *ahk5-1* Pflanzen in eine von vier Farbkategorien (grün, gelbgrün, gelb und braun) eingeteilt (Abbildung 2 A). Wildtypische Pflanzen (Col-0) zeigen 37 Tage nach Keimung das seneszenztypische Verfärben von grünen zu gelben und schließlich braunen Blättern, was zu diesem Zeitpunkt fast 40 % der Blätter betrifft und auf Verlust des

3. Ergebnisse

Chlorophylls zurückgeht. Im Gegensatz dazu sind nach 37 Tagen noch über 90 % der Blätter von *ahk5-1* grün (Abbildung 2 B). Zu einem späteren Zeitpunkt (51 Tage nach Keimung) sind mehr als 80 % der Blätter von Col-0 bereits braun, wohingegen in *ahk5-1* erst etwa die Hälfte braun ist. Im Allgemeinen zeigt *ahk5-1* eine verzögerte Seneszenz, ihre Blätter bleiben länger grün als die von wildtypischen Pflanzen (Col-0).

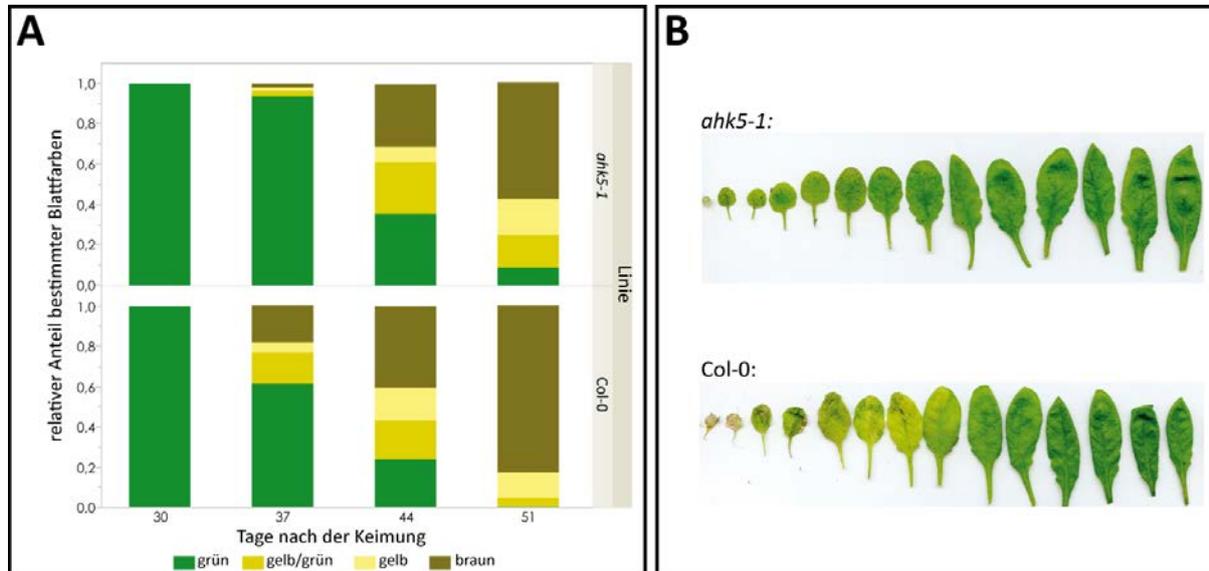


Abbildung 2: Anteil der Blätter einer bestimmten Farbe relativ zur Gesamtblattzahl. (A) Relative Zusammensetzung an grünen, gelb/grünen, gelben und braunen Blättern der Rosettenblätter von *ahk5-1* und Col-0. ($n = 15$) (B) Momentaufnahme aller Rosettenblätter der untersuchten Linien 37 Tage nach Keimung (links: ältestes Blatt, rechts: jüngstes Blatt).

Um diese Beobachtung weiter zu quantifizieren, wurde der Chlorophyllgehalt in Blättern bestimmter Positionen in der untersuchten Linien gemessen. Dabei wurden jüngere Blätter (Blätter 9 und 11), ein Blatt mittleren Alters (Blatt 7), sowie ein älteres Blatt (Blatt 3) zur Messung herangezogen. Pro Pflanzenlinie wurde der relative Chlorophyllgehalt („*atLEAF+ value*“) in 15 biologischen Replikaten mit jeweils drei Messpunkten pro Blatt bestimmt (Abbildung 3). Diese *in planta* Chlorophyllmessungen bestätigen die visuellen Ergebnisse und zeigen den entwicklungsbedingten Abbau von Chlorophyll in den Blättern des Wildtyps (Col-0) während der Seneszenz. Im Gegensatz hierzu ist ein verzögerter Chlorophyllabbau in allen betrachteten Blattpositionen der *ahk5-1* Linie zu beobachten. Besonders bei Blattposition 3, welches ein älteres Blatt repräsentiert, erkennt man bereits nach 37 Tagen einen deutlichen Unterschied im Chlorophyllgehalt zwischen Col-0 und *ahk5-1*. Anhand der visuellen Überprüfung der Blattfarben und der gezeigten *in planta* Chlorophyllgehalte, ist ein verlangsamter Chlorophyllabbau in *ahk5-1* im Vergleich zum Wildtyp ersichtlich. Daher kann auf eine Verzögerung der Seneszenz bei *ahk5-1* Pflanzen geschlossen werden.

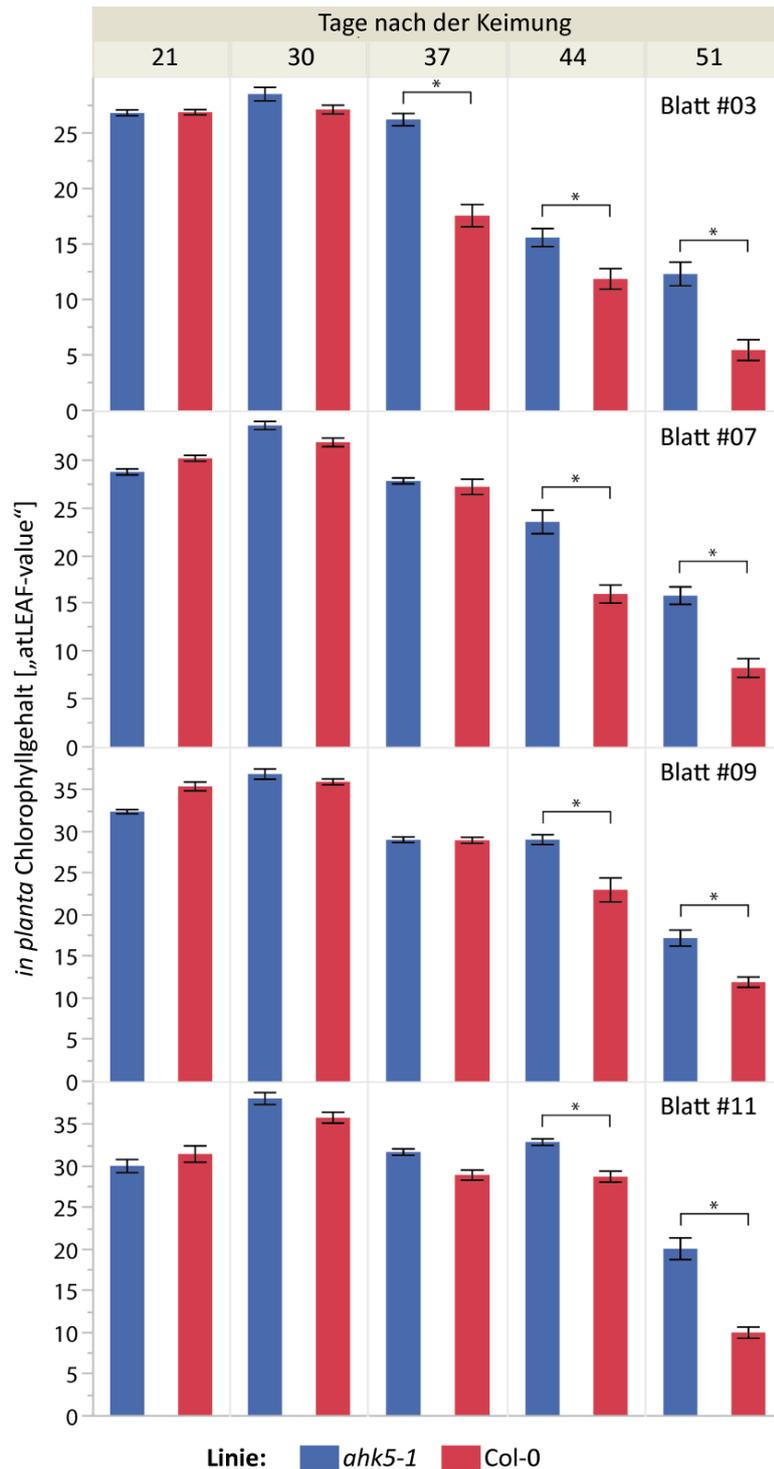


Abbildung 3: Bestimmung des in planta Chlorophyllgehalts. Mittels des „atLEAF+ chlorophyll meter“ wurde wöchentlich der in planta Chlorophyllgehalt der Blätter an den Positionen drei (Blatt #3), sieben (Blatt#7), neun (Blatt#9) und elf (Blatt#11) der verschiedenen Linien (ahk5-1 = blau und Wildtyp Col-0 = rot,) durch Dreipunktmessung bestimmt. Angegeben sind jeweils der Mittelwert aus neun biologischen Replikaten und der Standardfehler ($n = 15$; t-Test $< 0,05$ angegeben durch Stern).

3. Ergebnisse

Neben der Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurde die Lipidperoxidation als Indikator für das Fortschreiten der Seneszenz herangezogen, um die zuvor gezeigten Ergebnisse zu bekräftigen. Hierbei wurde die Konzentration an gebildeten Malondialdehyd (MDA)-Äquivalenten als Marker für die Lipidperoxidation gemessen. Erhöhte Konzentrationen an MDA-Äquivalenten korrelieren mit der Zunahme von Lipidperoxidation, was wiederum auf ein Fortschreiten der Seneszenz schließen lässt. Für die Bestimmung wurde das Blatt in Position sieben von jeweils 15 Pflanzen pro Linie und Zeitpunkt verwendet. Bis 37 Tage nach der Keimung bestehen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Linien. Ab 44 Tagen erkennt man einen Anstieg der Konzentration an MDA-Äquivalenten im Wildtyp (Col-0), der zu diesem Zeitpunkt bereits doppelt so hoch ist wie in *ahk5-1*. In 51 Tage alten Col-0 Pflanzen ist die gemessene MDA-Konzentration ebenfalls doppelt so hoch wie in der Mutante (*ahk5-1*) (Abbildung 4). Auch anhand der gemessenen MDA-Äquivalente lässt sich schlussfolgern, dass *ahk5-1* eine Verzögerung der Seneszenz zeigt.

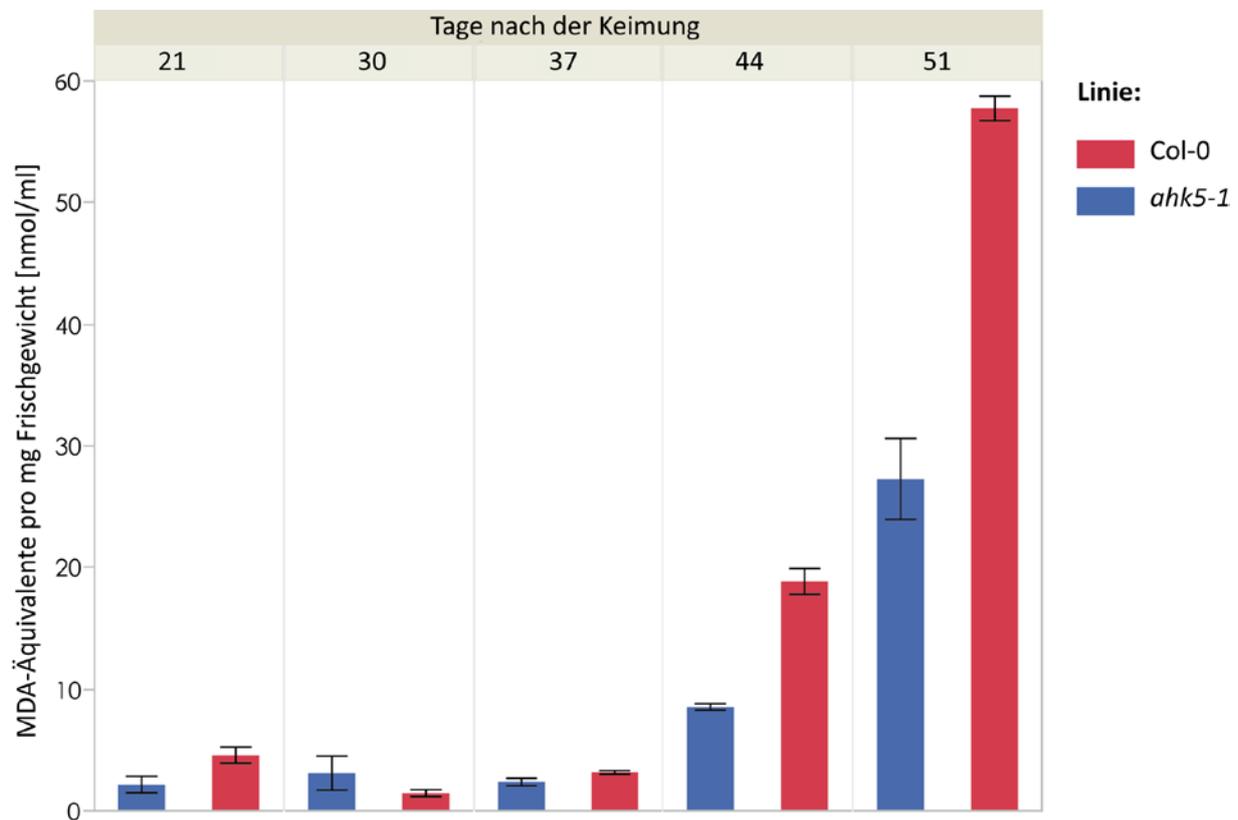


Abbildung 4: Lipidperoxidation während der Seneszenz. Darstellung der gebildeten MDA-Äquivalente (in Blättern in Position 7) als Marker für Lipidperoxidation in Col-0 (rot) und *ahk5-1* (blau) Blättern. Angegeben sind der Mittelwert, sowie der Standardfehler ($n = 5$).

3. Ergebnisse

Die endogene Produktion von H_2O_2 steigt mit fortschreitender Seneszenz an (Smykowski et al., 2010, Bieker et al., 2012). Um zu testen, ob die Verzögerung der Seneszenz in *ahk5-1* eine Folge von verminderter H_2O_2 -Produktion oder -Konzentration ist, wurde der *in planta* Gehalt an H_2O_2 in Blattposition fünf der verschiedenen Linien bestimmt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der *in planta* H_2O_2 -Konzentrationen zwischen den untersuchten Linien im beobachteten Zeitraum festgestellt werden (Abbildung 5). Daher ist die verzögerte Seneszenz nicht auf einen reduzierten H_2O_2 -Gehalt zurückzuführen.

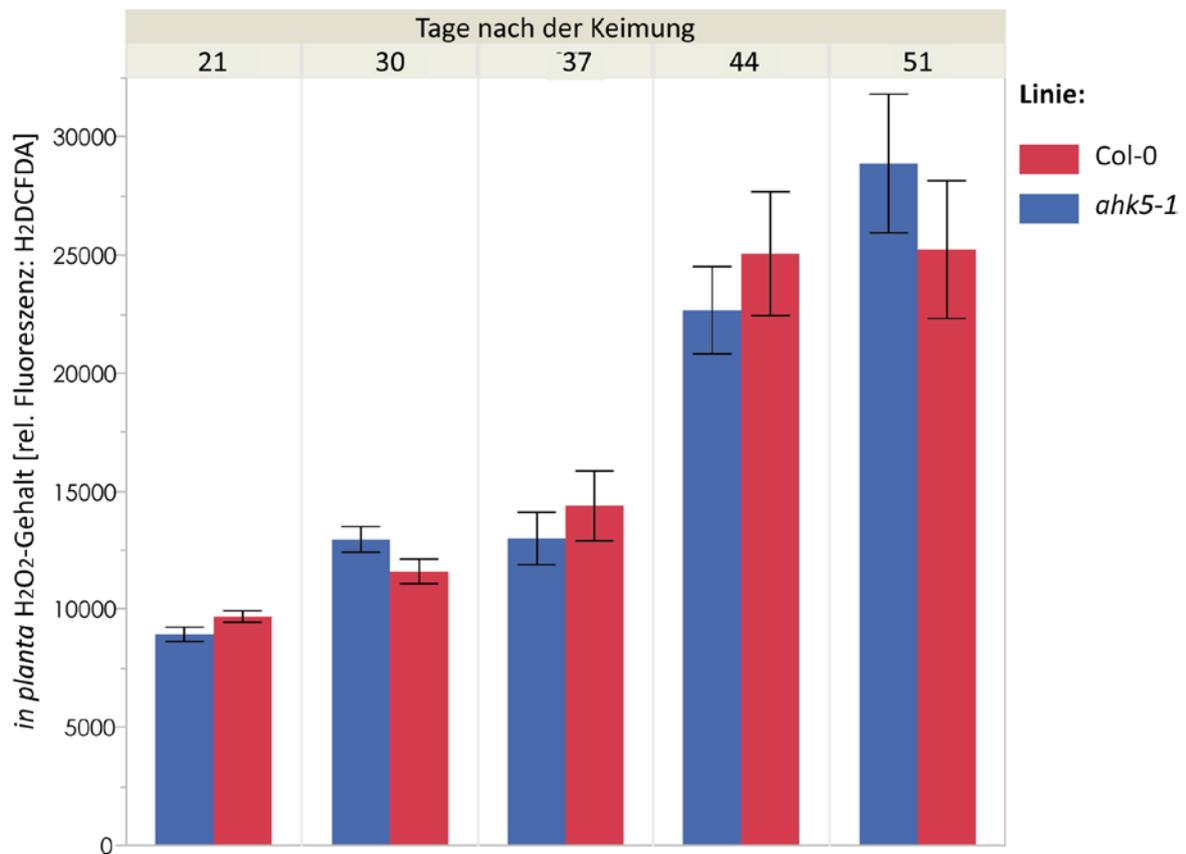


Abbildung 5: *In planta* H_2O_2 -Gehaltsbestimmung mittels H_2DCFDA . Blattposition 5 von Col-0 (rot) und *ahk5-1* (blau) wurde im wöchentlichen Rhythmus beprobt. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 15 Fluoreszenzmessungen (Anregungswellenlänge = 480 nm; Emissionswellenlänge = 520 nm) und deren jeweiliger Standardfehler.

3. Ergebnisse

3.2 Keine Veränderung der H₂O₂-Produktion in *ahk5-1* bei abiotischem, sowie biotischem Stress

3.2.1 ROS (*reactive oxygen species*) *Burst* nach flg22 Behandlung in *ahk5-1* nicht beeinträchtigt

Flagellin flg22 ist ein bakterielles PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*). Dessen Erkennung führt zur ETI (*Effector-triggered immunity*), bei welcher die Bildung von ROS eine der ersten Antworten darstellt (Felix et al., 1999, Gomez-Gomez and Boller, 2000). Da AHK5 beim flg22-abhängigen Schließen der Stomata eine Rolle spielt (Desikan et al., 2008), wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Menge an kurzfristig gebildetem H₂O₂ gibt, welches direkt nach Pathogenbefall während des sog. oxidativen *Bursts* von der Pflanze produziert wird. Hierzu wurden Blattstücke von sechs Wochen alten Pflanzen der untersuchten Linien (Col-0 und *ahk5-1*) mit ansteigenden Konzentrationen an flg22-Peptid behandelt. Dabei diente die Messung der Lumineszenz, welche auf eine H₂O₂-abhängige Umsetzung von Luminol durch die Meerrettichperoxidase zurück zu führen ist, als Indikator für die Bildung von ROS nach flg22-Behandlung.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der ROS-Produktion zwischen Wildtyp (Col-0) und *ahk5-1* festgestellt werden (Abbildung 6). Dies bestätigt die erhaltenen Daten der *in planta* H₂O₂-Messungen während des Seneszenzversuchs (Abbildung 5) und legt nahe, dass *ahk5-1* bei der Antwort auf biotischen Stress keine Veränderung in der H₂O₂-Produktion zeigt.

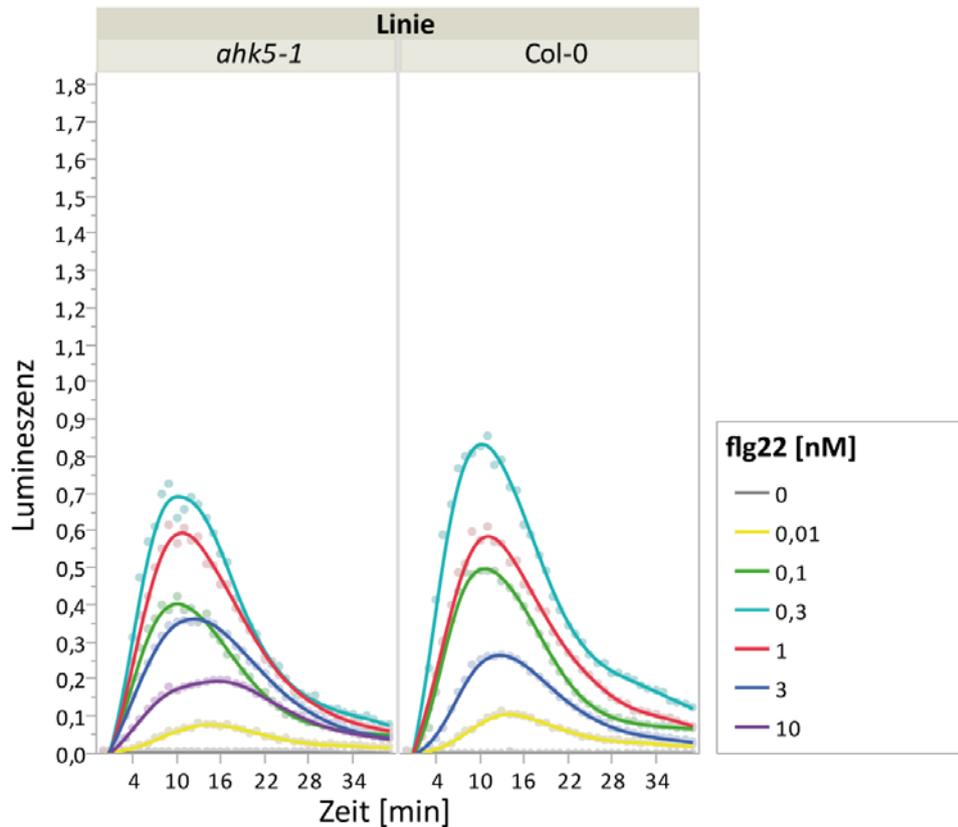


Abbildung 6: ROS-burst nach flg22-Behandlung. Blattstücke von 6 Wochen alten Col-0 und *ahk5-1* Pflanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an flg22-Peptid behandelt und deren Lumineszenz (nach Umsetzung von Luminol durch Meerrettichperoxidase mit H_2O_2 als Oxidationsmittel) bei 428 nm über 40 min gemessen ($n = 12$).

3.2.2 Keine Änderung der H_2O_2 Produktion in *ahk5-1* nach abiotischem Stress

Um zu überprüfen, ob AHK5 eine Funktion bei der H_2O_2 -Produktion bei der Antwort auf abiotischen Stress besitzt, wurden Blätter bestimmter Positionen von sechs Wochen alten *ahk5-1* bzw. Col-0-Pflanzen in einer Lösung mit 250 mM NaCl (bei Raumtemperatur), sowie in Kontrolllösungen ohne NaCl bei 4 °C, 39 °C bzw. Raumtemperatur inkubiert. Deren *in planta* H_2O_2 -Konzentration wurde anschließend direkt vor Behandlung, sowie 20, 40, 60 und 120 min nach der jeweiligen Behandlung bestimmt. Dabei konnten im beobachteten Zeitraum bei keiner Behandlung Veränderungen im *in planta* H_2O_2 -Gehalt zwischen *ahk5-1* und dem Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 7). Somit scheint AHK5 keine Funktion in der H_2O_2 -Produktion während abiotischem Stress zu besitzen.

3. Ergebnisse

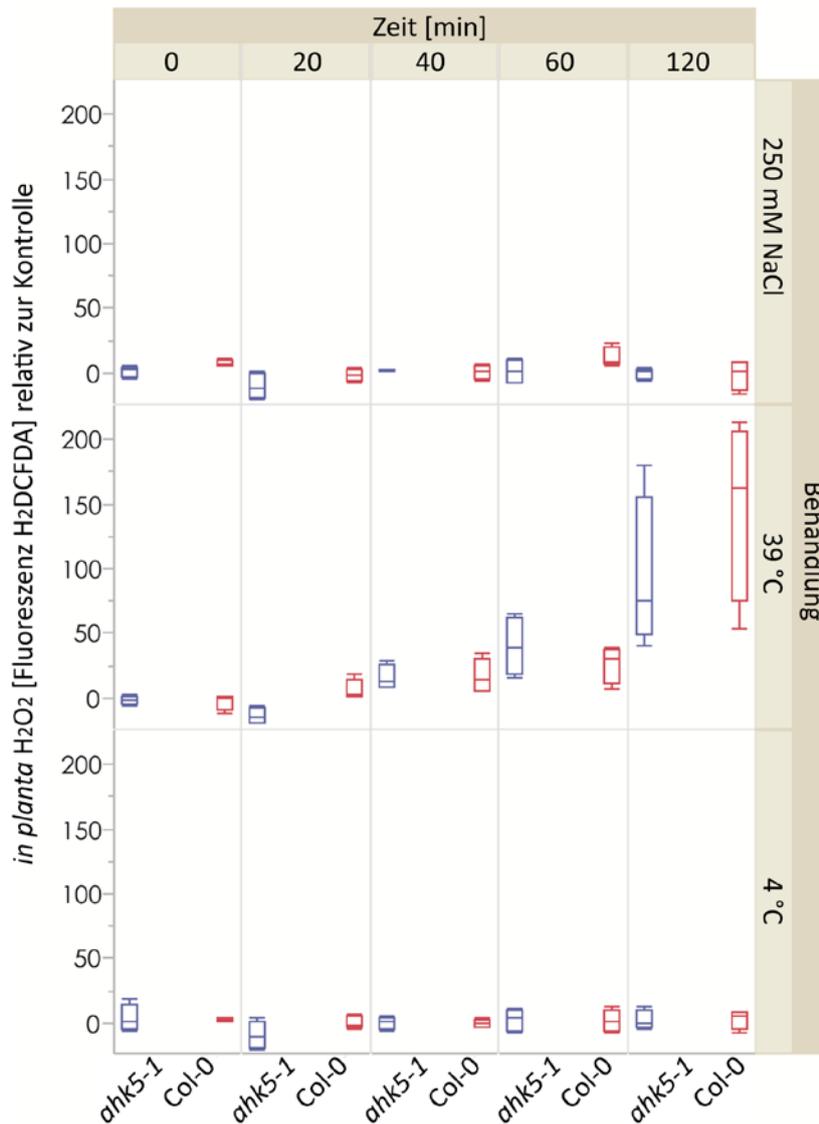


Abbildung 7: In planta H₂O₂-Gehalt nach Behandlung mit abiotischem Stress. Blätter von ahk5-1 (blau) und Col-0 (rot)-Pflanzen wurden vor (0 min) und nach Behandlung (20, 40, 60 und 120 min) mit 250 mM NaCl, sowie ohne NaCl bei 39 °C, bzw. 4 °C beprobt. Angegeben sind die Mittelwerte (abzüglich der entsprechenden Kontrollmessungen bei Raumtemperatur ohne NaCl) der Fluoreszenzmessungen (Anregungswellenlänge = 480 nm; Emissionswellenlänge = 520 nm) von jeweils fünf Replikaten und deren jeweiliger Standardfehler.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann die Funktion von AHK5 bei der H₂O₂-Produktion ausgeschlossen werden. Um AHK5 weiter zu charakterisieren und zu überprüfen, ob AHK5 bei der Perzeption von H₂O₂ eine Rolle spielt, wurden neben den physiologischen Experimenten zusätzlich zellbiologische und biochemische Versuche durchgeführt.

Da AHK5 toxisch für die meisten Organismen ist, wurde mit Fragmenten von AHK5 gearbeitet. Hierdurch konnte die Toxizität umgangen werden, die enorme Probleme bei essentiellen molekularbiologischen Methoden, wie beispielsweise Klonierungen zur Folge hat. Anhand der unterschiedlichen Domänen von AHK5 und deren entsprechenden Funktionen, sowie

Sekundärstrukturvorhersagen wurden verschiedene Fragmente von AHK5 hergestellt (Abbildung 8). Die Faltungsanalyse, die mit dem *Online-Tool FoldIndex®* (Prilusky et al., 2005) durchgeführt wurde, zeigt, dass die *Transmitter*- und die *Receiver*-Domäne geordnete Strukturen aufweisen und als eigenständige stabil gefaltete Domänen angenommen werden können. Im Gegensatz dazu weisen die *Input*-Domäne und der *Linker*-Bereich relativ ungeordnete Strukturen auf. Die definierten Fragmente (AHK5_C7, C8 und C9; Abbildung 8) wurden im Verlauf der Dissertation für verschiedene Experimente, wie beispielsweise GFP-basierte Lokalisationsstudien oder die Proteinexpression verwendet.

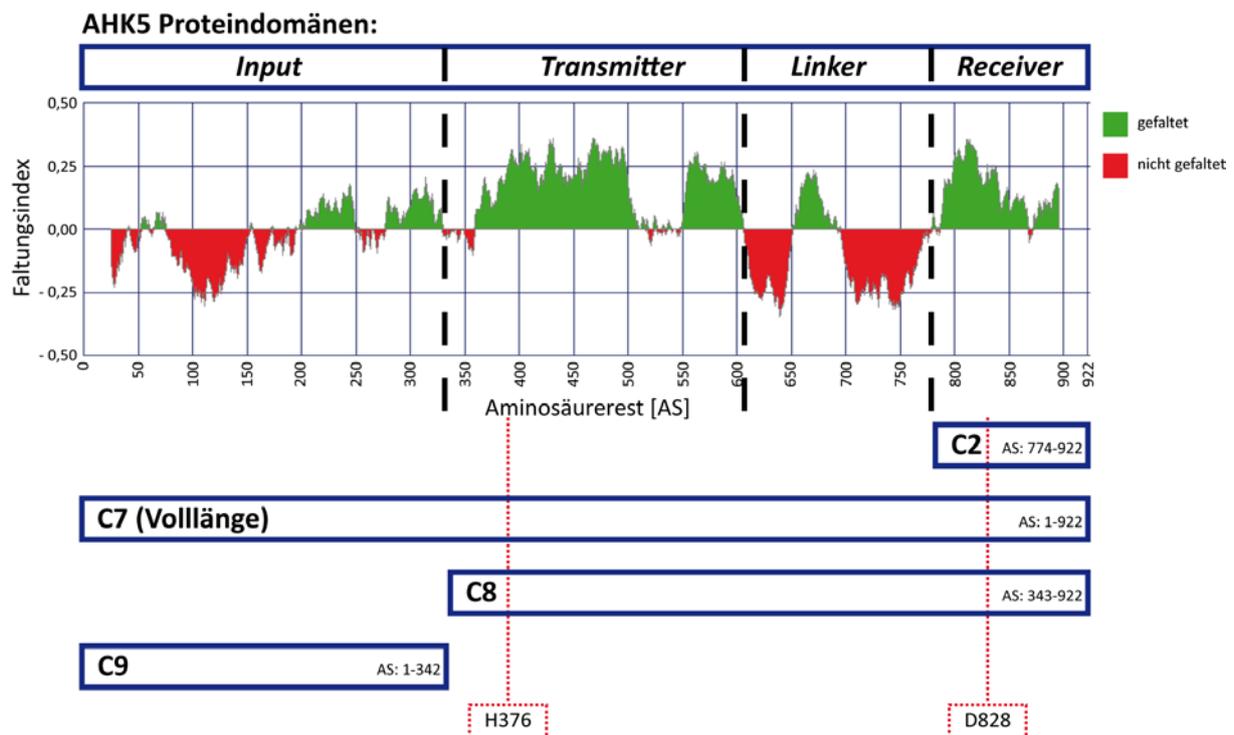


Abbildung 8: Proteindomänen, Faltungsanalyse und schematische Darstellung der AHK5-Fragmente. Die verschiedenen Domänen von AHK5 (*Input*-Domäne, *Transmitter*-Domäne, *Linker* und *Receiver*-Domäne) sind durch gestrichelte Linien abgetrennt und entsprechend gekennzeichnet. Anhand der Faltungsanalyse wurden die schematisch dargestellten Fragmente (C2, C7, C8 und C9) erstellt. Dabei entspricht C2 der *Receiver*-Domäne, C7 dem gesamten Protein, C8 AHK5 ohne *Input*-Domäne und das Fragment C9 nur der *Input*-Domäne von AHK5. Die Positionen der konservierten phosphorylierbaren Aminosäurereste Histidin (H376) und Aspartat (D828) sind mit roter gepunkteter Linie hervorgehoben.

3.3 Subzelluläre Lokalisation verschiedener GFP-Fusionsproteine von AHK5-Fragmenten

Zur genaueren Charakterisierung von AHK5 wurden zellbiologische Studien durchgeführt und die subzelluläre Lokalisation der AHK5-Fragmente C7, C8 und C9 (Abbildung 8) näher untersucht. Hierzu wurden entsprechende GFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des Ubiquitin 10 Promotors (P_{UBQ10}) exprimiert und deren subzelluläre Lokalisation in transient transformierten Blättern von *Nicotiana benthamiana* mittels *Confocal laser scanning microscopy* (CLSM) untersucht (Abbildung 9).

Nach Expression des AHK5-Volllängenkonstrukts unter Kontrolle des Ubiquitin 10-Promotors ($P_{UBQ10}::AHK5_C7-GFP$) ist das Fusionsprotein AHK5_C7-GFP nicht nur im Zytoplasma und an der Zellmembran lokalisiert, sondern auch im Zellkern (Abbildung 9 A). Dies ist ein teilweiser Widerspruch zu der von (Desikan et al., 2008) beschriebenen ausschließlichen subzellulären Lokalisation des AHK5-GFP-Fusionsproteins im Zytoplasma und an der Plasmamembran. Um zu überprüfen, ob die gezeigte Lokalisation der AHK5_C7-GFP Fusion durch Überexpression zu erklären ist, wurde AHK5_C7-GFP ebenfalls unter Kontrolle des nativen Promotors ($P_{AHK5}::AHK5_C7-GFP$) auf dessen subzelluläre Lokalisation untersucht. Auch hier konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden (Abbildung 10). Interessanterweise lässt sich nur noch sehr wenig GFP-Signal im Zellkern detektieren, sobald die *Input*-Domäne von AHK5 fehlt (AHK5_C8, Abbildung 9 B). Im Gegensatz dazu ist das GFP-Fusionsprotein der *Input*-Domäne von AHK5 (AHK5_C9-GFP) neben der zytoplasmatischen Lokalisation verstärkt im Zellkern detektierbar (Abbildung 9 C).

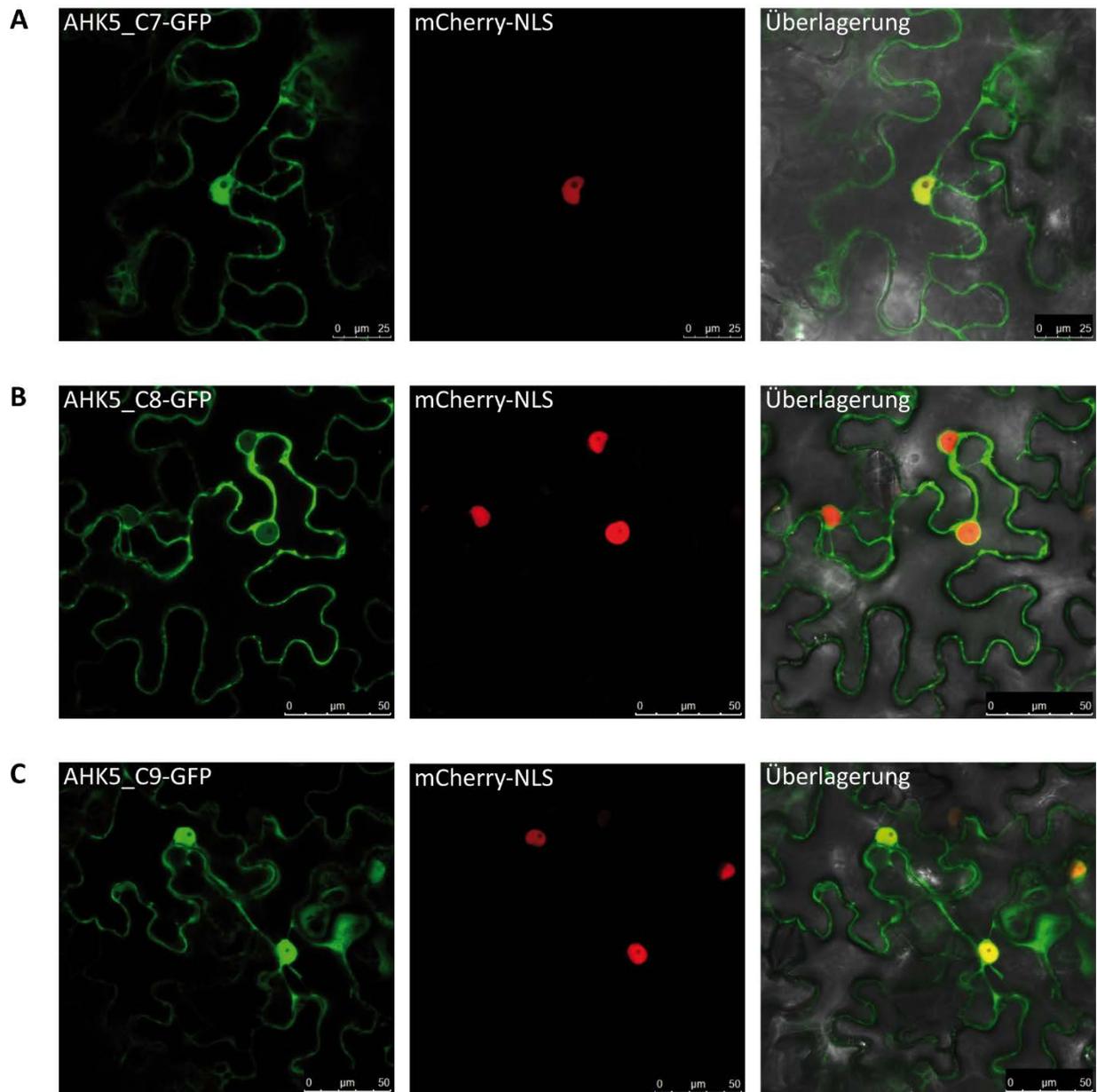


Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine verschiedener AHK5-Fragmente unter Kontrolle des Ubiquitin 10-Promotors in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana*. (A) Vollängenkonstrukt: AHK5_C7-GFP; (B) Konstrukt ohne Input-Domäne: AHK5_C8-GFP; (C) Input-Domäne: AHK5_C9-GFP. Jeweils von links nach rechts: GFP-Signal, mCherry-Signal und die Überlagerung beider Signale.

3. Ergebnisse

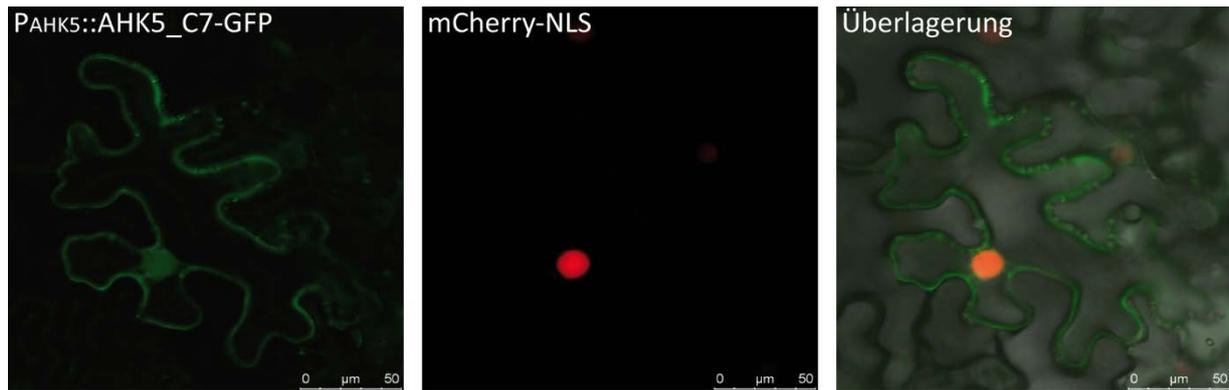


Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation von AHK5_C7-GFP unter Kontrolle des AHK5-Promotors ($P_{AHK5}::AHK5_C7-GFP$). Von links nach rechts: GFP-Signal, mCherry-Signal und die Überlagerung beider Signale.

Zur Überprüfung, ob die Konstrukte in Tabakblättern komplett exprimiert wurden und um auszuschließen, dass die beobachtete Kernlokalisierung auf freies GFP zurückzuführen ist, wurden Expressionsanalysen der entsprechenden Fusionsproteine mittels Western Blot und spezifischer Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, konnten alle Fusionsproteine detektiert werden. Freies GFP, was eine Kernlokalisierung erklären könnte, konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden.

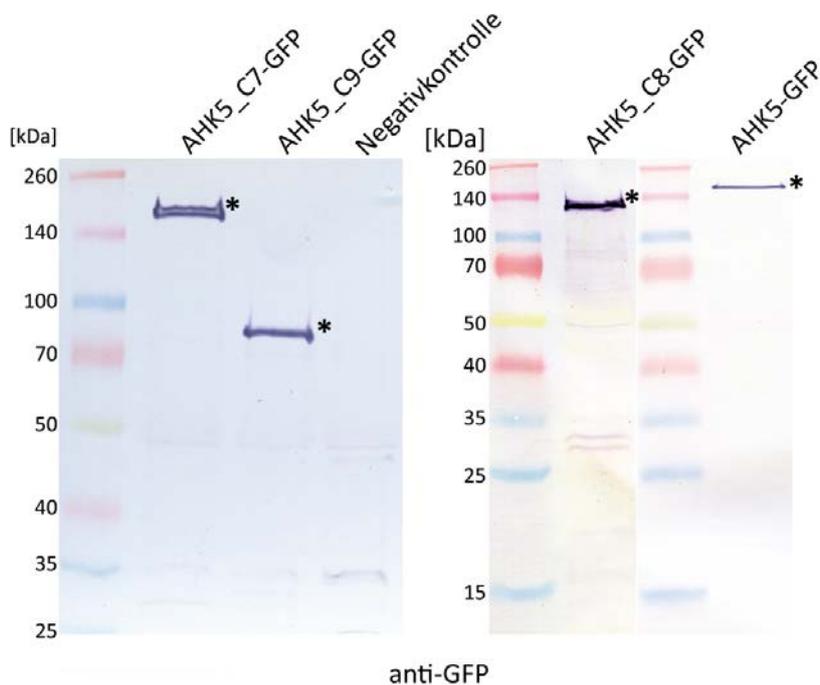


Abbildung 11: Western Blot und spezifischer Nachweis der AHK5-GFP Fusionsproteine aus *N. benthamiana* Blattextrakten mittels GFP-Antikörpern. Die mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase detektierten Fusionsproteine sind mit einem Stern markiert. Als Negativkontrolle wurden mit P19 und mCherry-NLS transient transformierte Blattextrakte von *N. benthamiana* verwendet.

3.3.1 AHK5 besitzt kein Kernlokalisierungssignal

Für eine freie Diffusion über Kernporen in den Zellkern sind die Fusionsproteine (AHK5_C7 und C9) zu groß. Um einen aktiven Kernimport von Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 40 kDa zu ermöglichen, wäre das Vorhandensein eines Kernlokalisierungssignals (*nuclear localization signal*, NLS) nötig (Pawlowski et al., 2010, Wang and Brattain, 2007). Daher wurde die Aminosäuresequenz der *Input*-Domäne von AHK5 auf putative NLS hin analysiert und es konnten Aminosäureabfolgen ermittelt werden, die als Kernlokalisierungssignale fungieren könnten (Abbildung 12 A). Anschließend wurden die für eine NLS essentiellen basischen Lysine (K) in der Aminosäuresequenz der *Input*-Domäne (AHK5_C9) durch ortsspezifische Mutagenese zu Alaninen (A) mutiert, diese Konstrukte C-terminal mit GFP fusioniert und deren subzelluläre Lokalisation in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana* untersucht. Selbst nach Mutation aller in Frage kommenden Lysin-Reste (K145, 146, 154 und 169) konnte keine Veränderung der subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins AHK5_C9^{K145/146/154/169A}-GFP festgestellt werden (Abbildung 12 B). Der Austausch einzelner Aminosäuren bzw. verschiedene Kombinationen liefern das gleiche Ergebnis (Abbildung A 1, Seite 107). Es ist daher davon auszugehen, dass AHK5 nicht mittels eigenem NLS aktiv in den Zellkern transportiert wird.

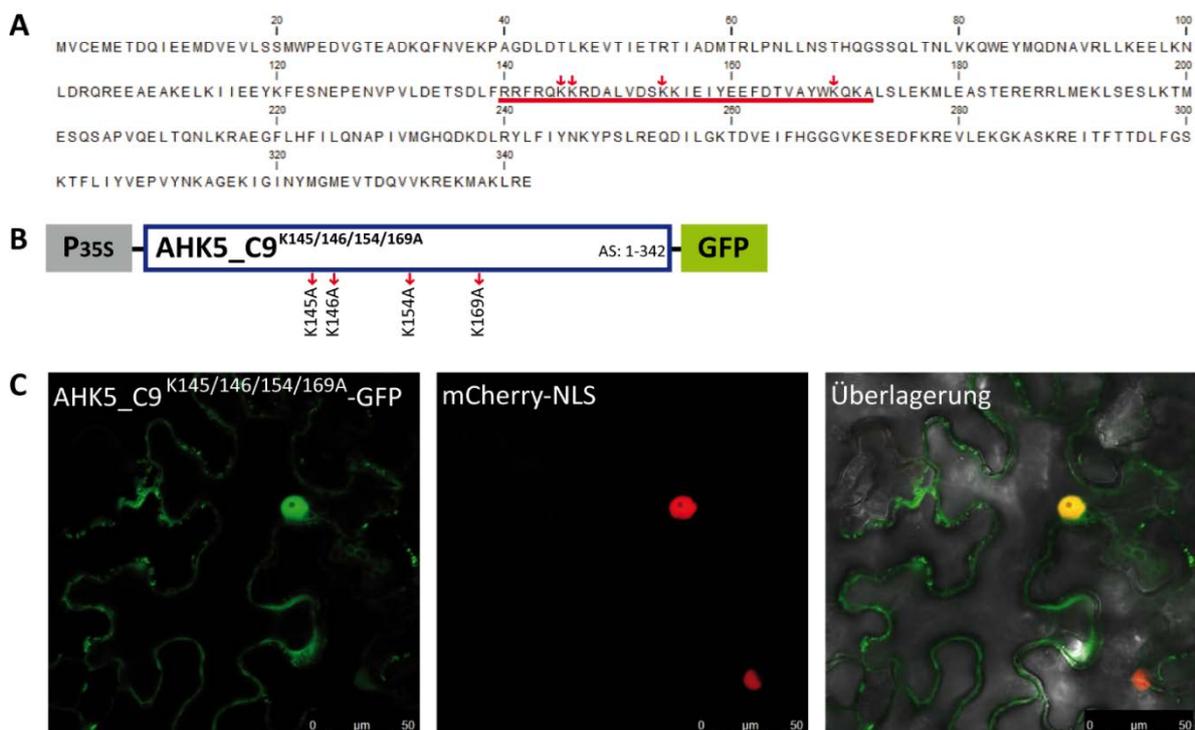


Abbildung 12: Untersuchung der AHK5-Proteinsequenz auf Kernlokalisierungssignale. (A) Aminosäuresequenz der *Input*-Domäne von AHK5. Der für ein NLS in Frage kommende Bereich ist rot unterstrichen und die mutierten Lysine (K) sind mit einem roten Pfeil markiert. (B) Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts: mutante Variante der *Input*-Domäne von AHK5 C-terminal fusioniert mit GFP und unter Kontrolle des 35S-Promotors. Lysine (K) in den angegebenen Positionen (roter Pfeil) wurden durch Alanine (A) ersetzt. (C) Subzelluläre Lokalisation von AHK5_C9^{K145/146/154/169A}-GFP in Epidermiszellen von transient transformierten Blättern von *N. benthamiana*. Von links nach rechts: GFP-Signal, mCherry-Signal und die Überlagerung beider Signale.

3. Ergebnisse

3.4 AHK5 homodimerisiert und interagiert mit ETR1 und NADPH-abhängigen Oxidasen *in planta*

Mittels Zellfraktionierung, anschließendem Western Blot aus Blattextrakten transient transformierter Blättern von *N. benthamiana*, sowie mikroskopischen Fluoreszenzanalysen wurde gezeigt, dass das GFP-AHK5 Fusionsprotein mit der Zellmembran assoziiert ist (Desikan et al., 2008). Neben häufigen posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise Glycosylierung und Phosphorylierung, können Proteine auch mit organischen Lipidgruppen versehen werden. Dies kann eine Verankerung an oder in Membranen zur Folge haben und eine Lokalisation an der Zellmembran auch ohne Vorhandensein einer Transmembrandomäne erklären (Resh, 1999). Vorhersageprogramme für derartige posttranslationale Modifikationen liefern jedoch keine positiven Ergebnisse für AHK5 (Daten nicht gezeigt).

Andererseits sind Histidinkinasen in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden (Horak et al., 2011, Mayerhofer et al., 2015). Eine Interaktion mit membranständigen Proteinen könnte die Assoziation mit der Zellmembran erklären. Da AHK5 zentrale Funktionen bei der Integration verschiedener H₂O₂-vermittelter Prozesse besitzt, wurde AHK5 auf eine mögliche Interaktion mit den membrangebundenen Proteinen ETR1, FLS2, sowie AtRbohC, D und F untersucht. Hierzu wurden *in planta* Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels FRET/FLIM (*Förster resonance energy transfer/fluorescence lifetime imaging microscopy*) durchgeführt (Abbildung 13).

Zwar wurden zuvor FRET/FLIM-Analysen unter Verwendung des Vollängenkonstrukts von AHK5 (AHK5_C7-GFP) durchgeführt, diese lieferten jedoch keine reproduzierbaren und statistisch verwertbaren Ergebnisse (nicht gezeigt). Eine zu geringe Expression des GFP-Fusionsproteins und mangelnde Koexpressionsraten war hierbei die Ursache. Es wurde daher auf das Fragment AHK5-C8 zurückgegriffen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass AHK5_C8 Homodimere bilden kann. Dies wurde durch Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Proteins AHK5_C8-GFP bei Koexpression mit AHK5_C8-mCherry nachgewiesen (Abbildung 13 A).

Der Ethylenrezeptor ETR1 spielt eine entscheidende Rolle beim H₂O₂-vermittelten Schluss der Stomata (Desikan et al., 2005, Desikan et al., 2006), der Wurzelentwicklung (Cancel and Larsen, 2002), sowie der Seneszenz (Oh et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AHK5 mit ETR1 in planta interagiert. Dies ist anhand der reduzierten Fluoreszenzlebenszeit des Fusionsproteins AHK5_C8-GFP bei Koexpression mit ETR1-mCherry zu erkennen (Abbildung 13 A).

Der Rezeptor FLS2 (*Flagellin sensitiv 2*), ist essentiell für die adaptiven Prozesse der pflanzlichen Immunantwort (Felix et al., 1999). Zwischen AHK5 und FLS2 konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 13 A).

Interessanterweise ist bei der Koexpression von AHK5 mit den jeweiligen NADPH-abhängigen Oxidasen AtRbohC, D und F – wichtige Produzenten von H_2O_2 – eine Reduktion der GFP-Fluoreszenzlebensdauer, d.h. eine Interaktion der Proteine mit AHK5 zu beobachten (Abbildung 13 B).

Um die Expression der untersuchten Fusionsproteine zu überprüfen, wurden diese aus den Blattextrakte mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern gegen GFP bzw. mCherry nachgewiesen (Abbildung A 2, Seite 108).

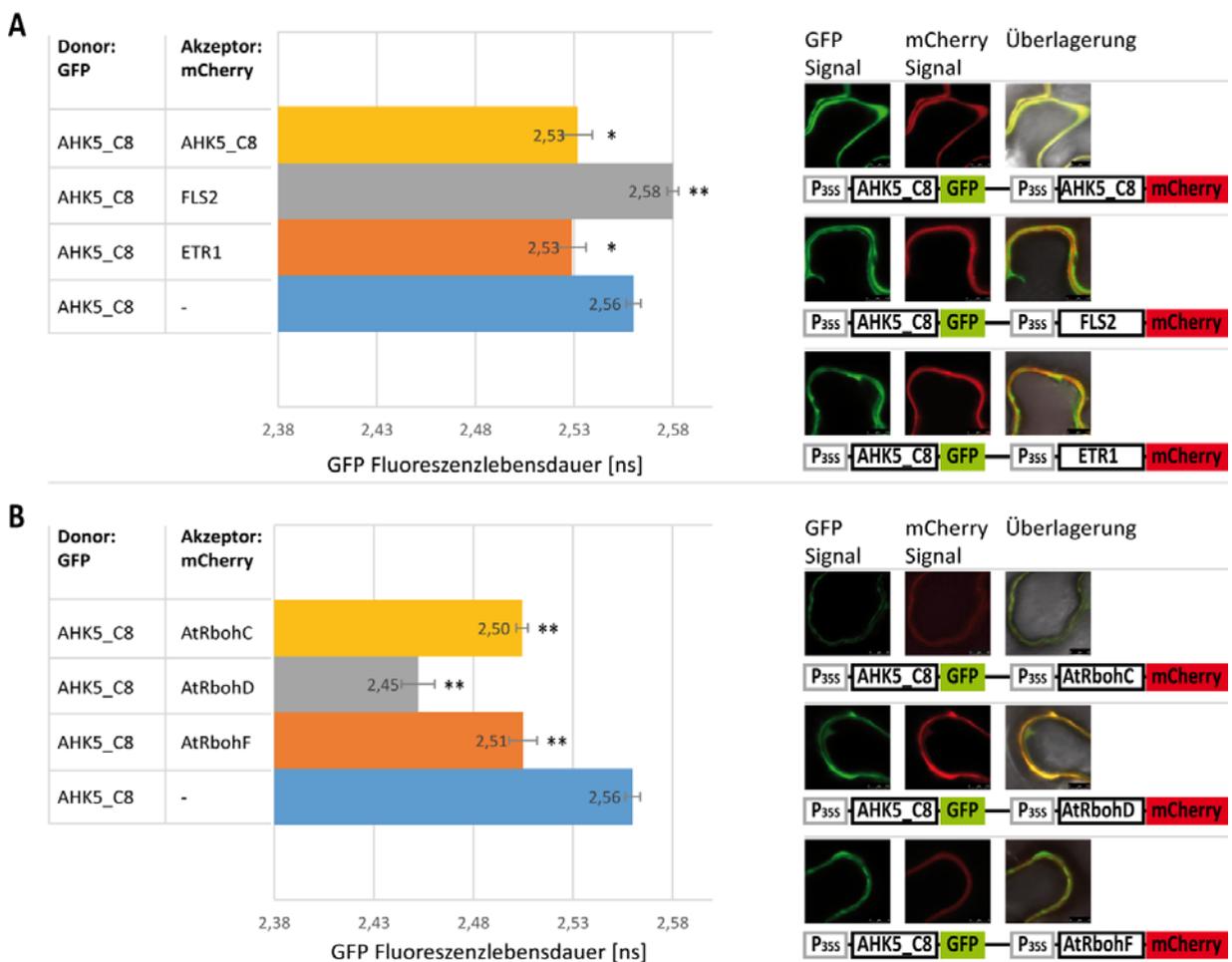


Abbildung 13: in planta Interaktionsanalyse mittels FRET/FLIM in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*. Gezeigt ist die Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors (GFP) fusioniert mit AHK5_C8 unter Abwesenheit, bzw. Anwesenheit von mCherry-Fusionsproteinen AHK5_C8, FLS2, ETR1 in (A), sowie AtRbohC, AtRbohD und AtRbohF in (B). Als Negativkontrolle (-) wurde AHK5_C8-GFP mit freiem mCherry koexprimiert. Gezeigt sind Mittelwerte und deren Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Messungen; t-Test: $t < 0,05$ (*); $t < 0,001$ (**). Rechte Seite: mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen der ko-exprimierten Fusionsproteine (jeweils von links nach rechts: GFP Signal, mCherry Signal und Überlagerung beider), sowie schematische Darstellung der Expressions-Konstrukte.

3.5 Etablierung einer stabilen HEK-Zell Expressionslinie zur Proteinproduktion

AHK5 ist wie bereits erwähnt Teil des MSPs. Dieser Signalmechanismus funktioniert über Phosphorylierungen und Phosphattransfer auf nachgeschaltete Elemente (AHPs und ARR) (Grefen and Harter, 2004, Schaller et al., 2008, Stock et al., 2000). Um eine umfassende biochemische Charakterisierung dieses sog. *Phosphorelays* vorzunehmen, wurde versucht, AHK5 und die nachgeschalteten Elemente AHP1, ARR2 (B-Typ ARR) und ARR4 (A-Typ ARR) in großem Maßstab zu exprimieren. Mit Hilfe dieser Proteine sollte die molekulare Funktion von AHK5 *in vitro* untersucht werden. Da AHK5 für *E. coli* toxisch ist, wurde neben Verwendung von verschiedenen Fragmenten von AHK5 (Abbildung 8), zusätzlich auf menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) zurückgegriffen. In humanen Zellen existiert kein Zweikomponenten Signalweg, daher war davon auszugehen, dass eine Überexpression von AHK5 keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum und somit auf die Proteinproduktion hat. Die hierfür verwendeten Expressionskonstrukte sind in Abbildung 14 A schematisch dargestellt.

Vor der Herstellung von stabil exprimierenden HEK-Zelllinien (HEK293) wurden Testexpressionen durchgeführt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit den Expressionskonstrukten (Abbildung 14 A) transfiziert und anschließend deren Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Dabei konnten die Responseregulatoren ARR2 und ARR4, das Phosphotransferprotein AHP1, die Fragmente AHK5_C2 (*Receiver*-Domäne) und AHK5_C8 (AHK5 ohne *Input*-Domäne), sowie das Vollängenkonstrukt AHK5_C7 transient in HEK293-Zellen exprimiert werden (Abbildung 14 B & C).

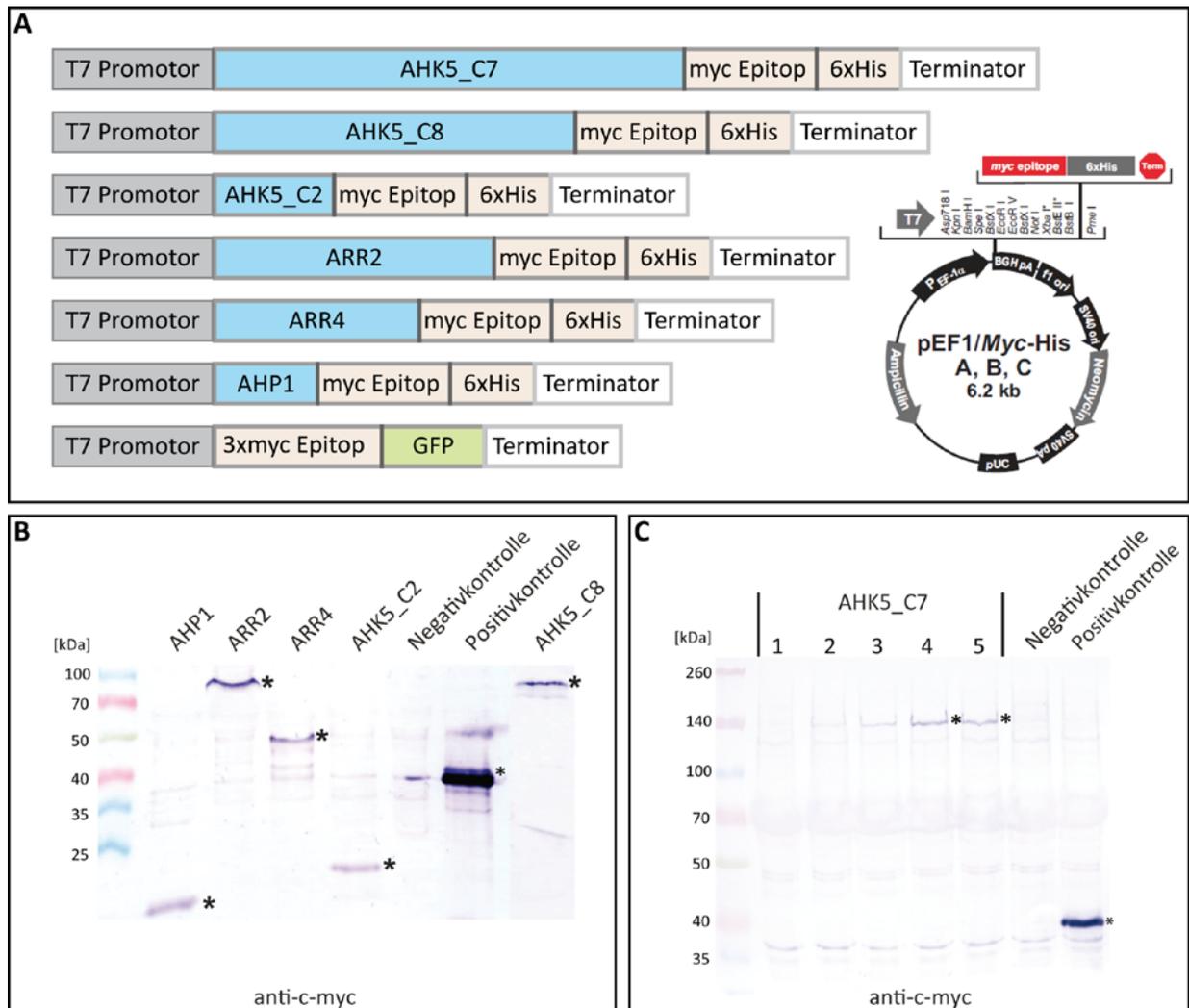


Abbildung 14: Transiente Expression in HEK-Zellen. (A) Schematische Darstellung der für die HEK-Zell Transfektion verwendeten Expressionskonstrukte, sowie der Vektorkarte des benutzten Expressionsvektors¹. (B) Spezifischer Nachweis von c-myc-Fusionsproteinen aus nativen Extrakten von transient transfizierten HEK293T-Zellen (100 ng Plasmid-DNA : 0,6 μ l GeneJuice). (C) Nachweis des c-myc-Fusionskonstrukts von AHK5_C7 bei verschiedenen Plasmid-DNA zu GeneJuice (Transfektionsreagenz) Verhältnissen (Proben 1-5: Plasmid-DNA: 100 ng, GeneJuice: 1: 0,2 μ l; 2:0,3 μ l , 3: 0,4 μ l, 4: 0,5 μ l; 5: 0,6 μ l). Negativkontrolle: Extrakt aus nicht transfizierten Zellen; Positivkontrolle: 3Myc-GFP; * = spezifisch nachgewiesene Proteine. Die Detektion erfolgte mittels Antikörper gegen c-myc und anschließender Färbung durch die Alkalische Phosphatase.

¹ Bild des Expressionsvektors von: <http://biovector.axybio.com/>

3. Ergebnisse

Anhand der in der Testexpression optimierten Parameter zur Erhöhung der Effizienz von Transfektion und Expression wurde versucht, stabil exprimierende HEK293-Zellen herzustellen, um die benötigten Mengen an Protein zu erzeugen. Hierzu wurden Fusionskonstrukte von AHK5_C8, AHK5_C7, ARR2 und ARR4, ohne evtl. störenden Fluorophor verwendet (Abbildung 14 A). Als Positivkontrolle diente 3Myc-GFP, welches gleichzeitig zur visuellen Überprüfung der stabilen Expression diente. In Abbildung 15 A & B sind die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen von HEK293-Zellen gezeigt, die das Fusionsprotein 3Myc-GFP stabil exprimieren.

Für die stabile Expression von AHK5_C8, AHK5_C7, ARR2 und ARR4, wurden zahlreiche Zellklone (AHK5_C8: 19, AHK5_C7: 5, ARR2: 12, sowie ARR4: 12 Zellklone) selektioniert, isoliert und deren Expression *via* Western Bot analysiert. Im Rahmen der Dissertation konnten erfolgreich stabile HEK-Zelllinien für die beiden Konstrukte *AHK5_C8* und *ARR4* hergestellt werden. Ein Nachweis der stabil exprimierten Fusionsproteine ist in Abbildung 15 C dargestellt.

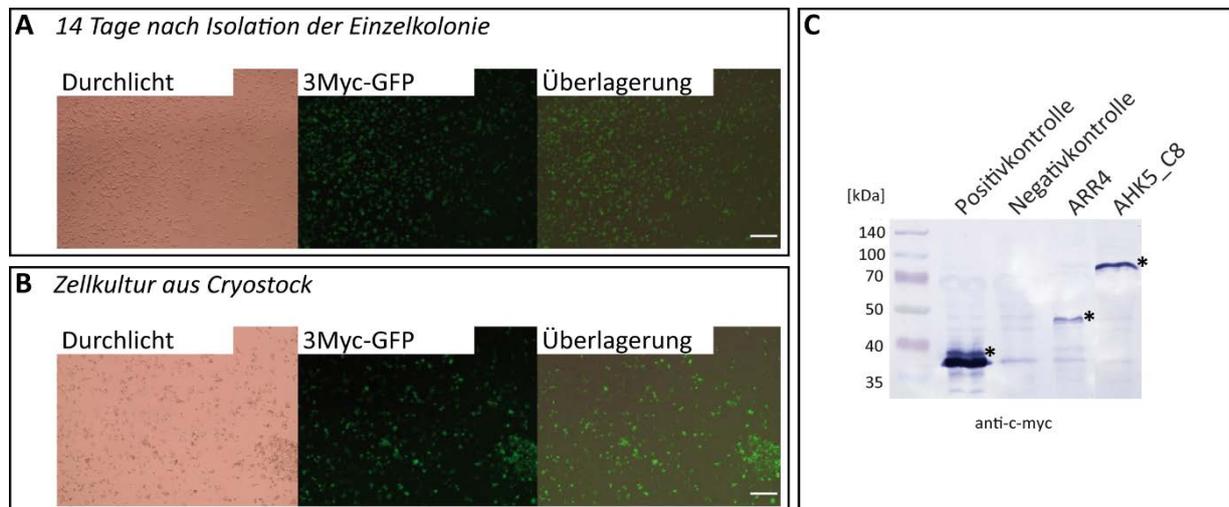


Abbildung 15: Stabile Expression in HEK293-Zellen. (A und B) Mikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen. Von links nach rechts: Durchlichtbild, GFP Signal und Überlagerung dieser. (A) Aufnahmen ca. 14 Tage nach Kultivierung der isolierten Einzelkolonie. (B) Aufnahmen der stabil exprimierenden HEK293-Zellen nach erneutem „in Kulturnehmen“ des entsprechenden Cryostocks. Größenbalken = 200 μ m. (C) Immunodetektion von Fusionsproteinen aus rekultivierten Cryostocks. Spezifischer Nachweis der c-myc-Fusionsproteine von ARR4 und AHK5_C8 aus Extrakten von stabil exprimierenden HEK-Zellen mittels c-myc Antikörper und anschließender Färbung durch Alkalische Phosphatase. Negativkontrolle: Extrakt aus nicht transfizierten Zellen; Positivkontrolle: 3Myc-GFP; *: spezifisch nachgewiesene Proteine.

3.6 Expression von Proteinfragmenten von AHK5 in *E. coli* unter optimierten Bedingungen

Da die stabil transformierten HEK-Zellen nicht die benötigte Ausbeute an Protein hervorbrachten, wurde die Expression der AHK5-Fragmente C8 und C9 (Abbildung 8) für das bakterielle System optimiert. Dabei wurde DNA-Sequenz der *Input*-Domäne von AHK5 (AHK5_C9) für die Expression in *E. coli* codonoptimiert (GenScript®, USA) und unter Kontrolle des IPTG-Induzierbaren T7-Promotors kloniert ($P_{T7}::7xHis-StrepII-SUMO-AHK5_C9$). Für einen späteren Nachweis, sowie der Reinigung des Proteins wurde das Konstrukt zusätzlich mit einem N-terminalen 7xHis-StrepII-Tag versehen. Zur späteren Eliminierung des Tags besitzt das Expressionskonstrukt zusätzlich eine proteolytische Schnittstelle, die als Erkennungssequenz für das sog. SUMO-Protein (*Small ubiquitin-related modifier*) dient. Im Fall des AHK5_C8-Fragments ($P_{T7}::AHK5_C8-V5-6xHis$) war keine Codonoptimierung nötig, da hier keine Toxizitätsprobleme bestehen.

Für beide Expressionskonstrukte wurden Bedingungen gefunden, die die ausreichend hohe Produktion der gewünschten Proteine aus *E. coli* Zellen ermöglichen. In Abbildung 16 sind die immunologischen Nachweise der Fusionsproteine von AHK5_C7 und AHK5_C8 nach IPTG-Induktion gezeigt.

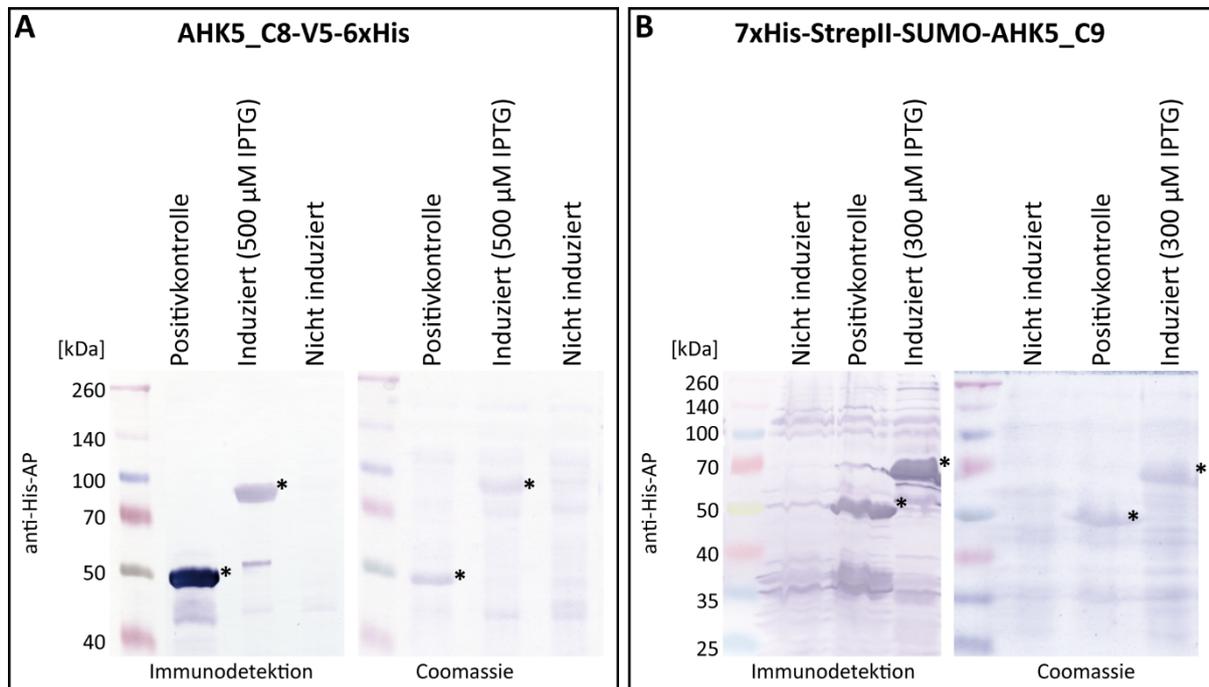


Abbildung 16: Proteinnachweis von (A) AHK5_C8 und (B) AHK5_C9 aus *E. coli* Zellextrakten nach IPTG-Induktion. Jeweils linke Bildhälfte: Immunodetektion mittels anti-His Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP); jeweils rechte Bildhälfte: zugehöriges mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Positivkontrolle: Extrazelluläre Domäne von AHK1 fusioniert mit einem 6xHis-Tag (Proteinlösung von R. Dautel); Negativkontrolle: Extrakte aus nicht induzierten *E. coli* Zellen; spezifische Proteinbanden sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe dieser optimierten Expression des AHK5-Fragments AHK5_C8 bzw. der *Input*-Domäne AHK5_C9 in *E. coli* konnte die gewünschte Menge an Protein hergestellt und nativ gereinigt werden, um Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente (Kapitel 3.7, Seite 63), sowie biochemische Versuche (Kapitel 3.8, Seite 68) zur funktionalen und strukturellen Charakterisierung von AHK5 durchzuführen.

Interessanterweise wurde bei dem Versuch die codonoptimierten Versionen von AHK5_C7, sowie ARR2 in *E. coli* zu exprimieren, eine IPTG-induzierte Expression einer endogenen Histidinkinase nachgewiesen. Obwohl die jeweiligen Proteinextrakte der verschiedenen Proben (AHK5_C7, ARR2, untransformierte Zellen und Leervektor) eine identische Gesamtproteinkonzentration besaßen, konnte in allen entsprechenden IPTG-induzierten Proben eine spezifische Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa im Coomassiegel nachgewiesen werden (Abbildung 17 A). Zusätzlich konnten nach erfolgtem Western Blot keine der Fusionproteine (AHK5_C7-6xHis und ARR2-6xHis) mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 17 B). Nach Ausschneiden der 120 kDa Proteinbande und deren massenspektrometrischer Analyse konnte eine 20 prozentige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von AHK5 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da diese Proteinbande selbst in nicht-transformierten Zellen nach IPTG-Induktion nachzuweisen ist und eine Übereinstimmung der Proteinsequenz mit AHK5 existiert, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine endogene Histidinkinase von *E. coli* handelt, deren Expression durch IPTG induziert wird. Diese Vermutung ließ sich nach einer Analyse der Sequenzähnlichkeit zwischen AHK5 und *E. coli* Proteinen mittels Protein BLAST bestätigen (Daten nicht gezeigt). Anhand dieser könnte es sich bei dem IPTG-Induzierten Protein um die Hybrid-Histidinkansae BarA aus *E. coli* handeln.

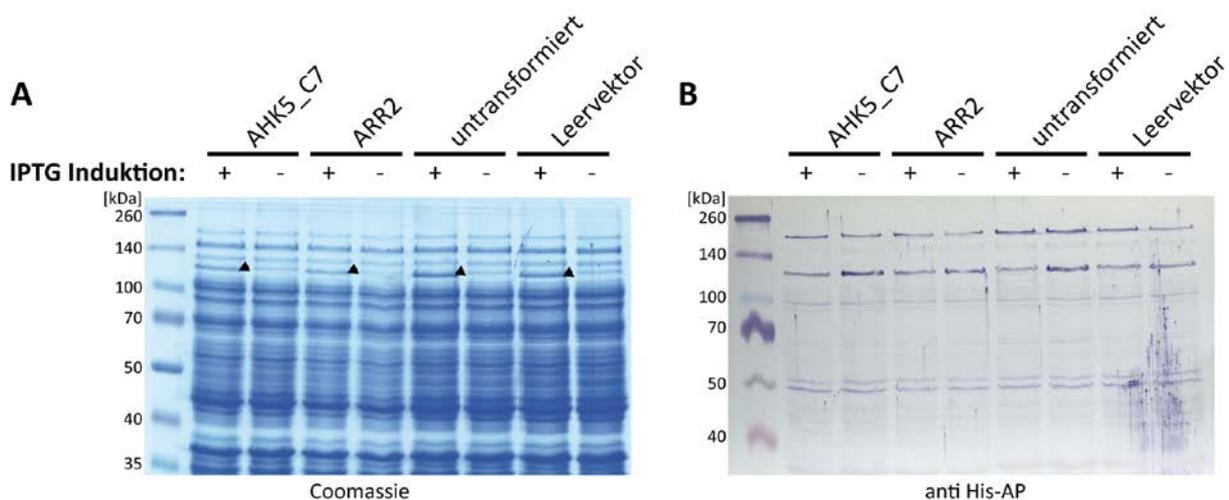


Abbildung 17: IPTG-induzierte Expression einer endogenen Histidinkinase in *E. coli* Zellextrakten. (A) Coomassie gefärbtes SDS-Gel und (B) Immunodetektion mittels anti-His Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP). Jeweils von links nach rechts: Proteinextrakt nach Transformation von AHK5_C7, ARR2, ohne erfolgter Transformation (untransformiert) und Transformation mit leerem Expressionsvektor (Leervektor); + = Induktion mit IPTG; - = keine IPTG-Induktion; Negativkontrollen: untransformiert, bzw. Leervektor; spezifische Proteinbanden mittels Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Ob die gezeigte IPTG-induzierte Expression einer endogenen Histidinkinase in *E. coli* bereits beobachtet wurde, ist nicht bekannt. Interessanterweise ist BarA (*Bacterial adaptive response A*) eine ebenfalls Hybrid-Histidinkinase und besitzt, genau wie AHK5, neben einer *Transmitter*-Domäne auch eine *Receiver*-Domäne. BarA dient als regulatorischer Schalter zwischen adaptiven Entwicklungsprozessen und metabolischen Funktionen und der Antwort auf Stress in *E. coli* (Sahu et al., 2003, Chavez et al., 2010). Ein genauerer Zusammenhang zwischen Transformation von AHK5 und der gezeigten Expression von BarA ist nicht ersichtlich, da die Expression von BarA ebenfalls in nicht transformierten Zellen nach IPTG Induktion nachgewiesen wurde. Da die verwendete IPTG-Konzentration zwischen 300-500 µM betrug, kann eine zu hohe Konzentration an IPTG ausgeschlossen werden, die eine evtl. Stressreaktion zu Folge gehabt haben hätte können. Es ist daher davon auszugehen, dass die IPTG-induzierte Expression von BarA ein auf Rosetta2-Zellen (Invitrogen) beschränktes Phänomen ist. In dieser Arbeit wurden mit anderen Zellen zu keiner Zeit, selbst bei höheren IPTG-Konzentrationen, gleiche Beobachtungen gemacht.

3.7 *In vitro* Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente

Um zu überprüfen, ob AHK5 innerhalb eines MSP in der Lage ist, AHP1 und nachgeschaltetes ARR4 zu phosphorylieren, wurden signalunabhängige *in vitro* Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde radioaktives Phosphat in Form von Adenosintriphosphat (ATP)-Gamma ³³P mit einer Aktivität von 370 MBq/ml verwendet.

3.7.1 Autophosphorylierung von AHK5_C8 und Phosphattransfer auf AHP1

Im Rahmen der Dissertation wurde mit Hilfe der aus Bakterien nativ gereinigten Kinase (AHK5_C8) und des entsprechenden Substrats (AHP1) überprüft, ob AHK5_C8 trotz Fehlen der *Input*-Domäne in der Lage ist, als Kinase zu agieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich AHK5_C8 durch Autophosphorylierung selbst phosphorylieren kann und zusätzlich als Phosphatdonor dient und sein Phosphat auf das Phosphotransferprotein AHP1 überträgt (Abbildung 18 A1). Im Gegensatz dazu ist im Ansatz ohne AHK5_C8 zu erkennen, dass für die Phosphorylierung von AHP1 die Kinase zwingend erforderlich ist und AHP1 keine Möglichkeit zur Autophosphorylierung besitzt. Für einen Nachweis der in den Versuchsansätzen eingesetzten Proteine, wurden Western Blots durchgeführt. Dabei wurden die Fusionsproteine AHK5_C8-6xHis (Kinase), bzw. GST-AHP1 (Substrat) mittels spezifischer Antikörper gegen His-, bzw. GST-Tag nachgewiesen (Abbildung 18 A2).

3. Ergebnisse

Für die genauere Analyse der Phosphorylierungsreaktion und zur Verfolgung der von der Kinase auf das Substrat übertragenen Phosphate, wurden *Pulse-Chase*-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde 30 min nach Reaktionsbeginn nicht radioaktives ATP dem jeweiligen Ansatz (AHK5_C8 allein, bzw. AHK5_C8 zusammen mit AHP1) hinzugefügt. Das nicht radioaktive ATP sollte nun anstatt des, von Beginn an in den Ansätzen vorhandenen radioaktiven Phosphats (^{33}P), von der Kinase verwendet werden. Aus den Ansätzen wurden Proben vor und nach der Zugabe von nicht radioaktivem ATP entnommen, diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und deren radioaktiven Signale entsprechend gemessen (Abbildung 18 B, links). Der Ansatz, welcher ausschließlich die Kinase beinhaltet zeigt ab 45-min ein Verblasen des radioaktiven Signals, was die Abgabe von radioaktiven Phosphaten widerspiegelt. Sind Kinase und Substrat im Ansatz vorhanden, ist nach Zugabe des nicht radioaktiven ATPs ebenfalls eine Abnahme der Radioaktivität von AHK5_C8 zu sehen. Jedoch ist hier während des gesamten Experiments kein Abfall der radioaktiven Signale bei AHP1 erkennbar (Abbildung 18 B, rechts). Die konstanten radioaktiven Signale von AHP1 zwischen 30 und 60 min zeigen, dass hier weder eine Aufnahme von nicht radioaktiven Phosphaten, noch eine Abgabe von radioaktiven Phosphaten erfolgt.

Es ist bekannt, dass Magnesium-Ionen die ATP-Bindestelle von Histidinkinasen stabilisieren können und somit einen späteren Phosphattransfer positiv beeinflussen (Marina et al., 2001). Des Weiteren wurde die bei der Kristallisierung der *Receiver*-Domäne von AHK5 zusammen mit AHP1, ein zusätzlich komplexiertes Magnesium-Ion festgestellt (Bauer et al., 2013). Um zu überprüfen, ob die Kinaseaktivität von AHK5_C8 und der Phosphattransfer auf AHP1 durch die Magnesiumkonzentration beeinflusst werden, wurde die Phosphorylierungsreaktion unter ansteigenden MgCl_2 -Konzentrationen durchgeführt. Es konnte keinerlei Einfluss der MgCl_2 -Konzentration auf die Kinaseaktivität von AHK5_C8, bzw. auf den Phosphattransfer auf AHP1 festgestellt werden (Abbildung 18 C). Dies ist anhand der – unabhängig von von MgCl_2 -Konzentration – identischen radioaktiven Signale von Kinase und Substrat bei allen Proben zu erkennen. Zusätzlich zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Gel, dass hier identische Mengen an Protein eingesetzt wurden.

Um die Geschwindigkeit der Phosphatübertragung von AHK5_C8 auf AHP1 näher zu untersuchen, wurde die Phosphorylierungsreaktion in bestimmten Abständen gestoppt und die Radioaktivität der Proteinbanden von AHK5_C8 und AHP1 analysiert. Dabei ist zu erkennen, dass innerhalb von 60 min mehr und mehr Substrat durch die Kinase phosphoryliert wird, was an den stärker werdenden radioaktiven Signalen von AHP1 ersichtlich ist (Abbildung 18 D). Im Gegensatz dazu hat die Autophosphorylierung von AHK5_C8 bereits nach 15 min ihr Maximum erreicht und die Menge an phosphorylierter Kinase bleibt bis 60 min nach Reaktionsbeginn konstant.

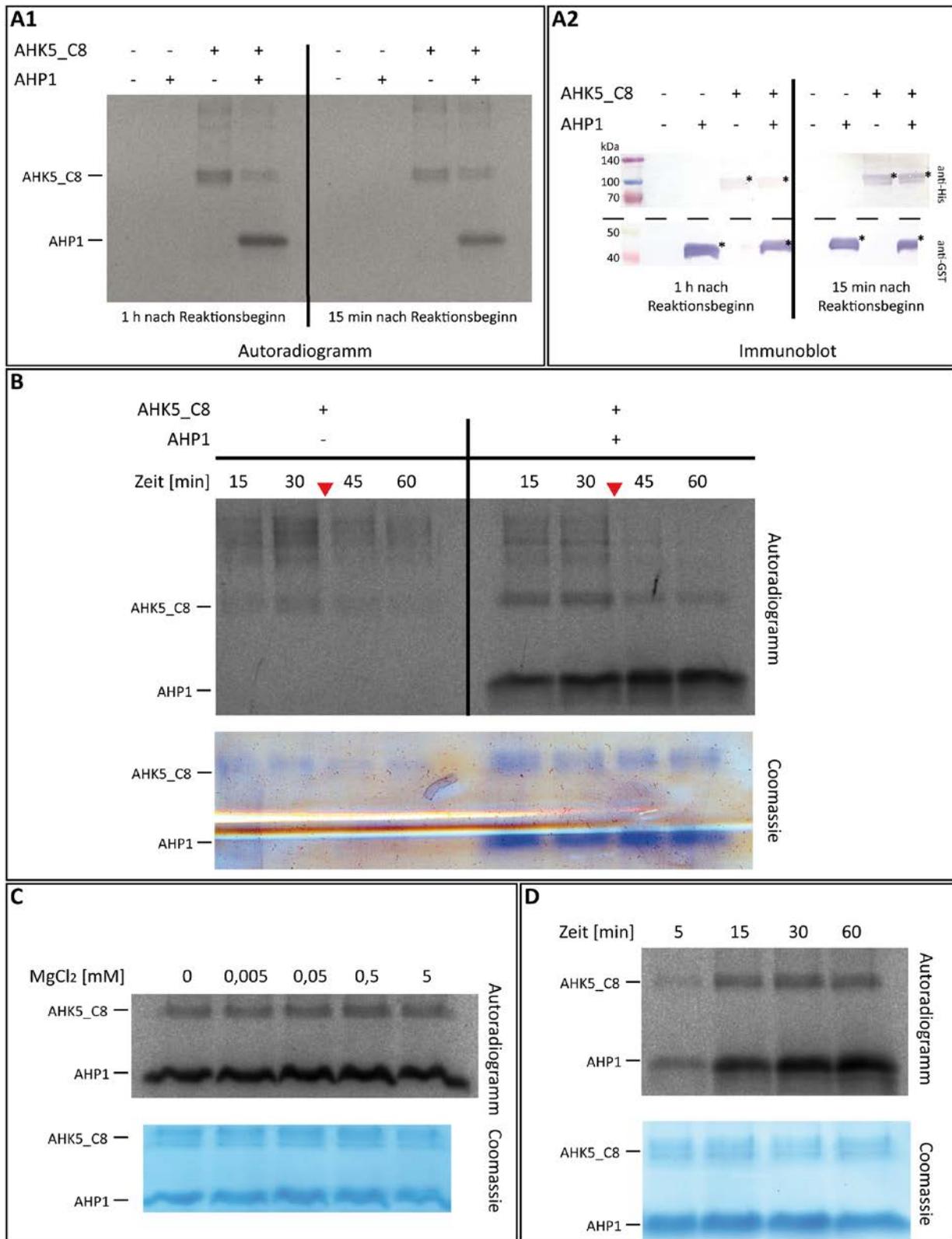


Abbildung 18: Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente mit Adenosintri-phosphat (ATP)-Gamma ³³P. (A1) Autoradiogramm: An- oder Abwesenheit von Kinase (AHK5_C8) und Substrat (AHP1) sind durch + oder - gekennzeichnet. (A2) Spezifischer Nachweis der Fusionsproteine AHK5_C8-6xHis, bzw. GST-AHP1 mit His- bzw. GST-Antikörpern. Die spezifischen Proteinbanden sind mit Sternen markiert. (B) Oben: Pulse-Chase-Experiment mit (rechte Bildhälfte) und ohne Substrat (linke Bildhälfte). Zeitpunkt der Zugabe von nicht radioaktivem ATP durch rote Pfeilspitzen markiert. Unten: Coomassie gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle. (C) Oben: Phosphatübertragung auf AHP1 in Abhängigkeit von der MgCl₂ Konzentration. Unten: Coomassie gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle. (D) Oben: Phosphorylierungskinetik, bei der die Reaktion nach der jeweils angegebenen Zeit gestoppt wurde. Unten: Coomassie gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle.

3. Ergebnisse

3.7.2 ARR4 besitzt Phosphataseaktivität

Zur Analyse eines kompletten MSPs wurde neben AHK5_C8 und AHP1, zusätzlich rekombinant hergestelltes ARR4 (GeneCust, L) als *Output*-Element im Phosphorylierungsversuch mit ^{33}P eingesetzt. Bei Zugabe von ARR4 konnten 30 min nach Reaktionsbeginn keine radioaktiven Signale im SDS-Gel detektiert werden und somit keine Phosphorylierung der Elemente AHK5_C8, AHP1, sowie ARR4 nachgewiesen werden (Abbildung 19 A). Im Gegensatz dazu, sind bei Abwesenheit von ARR4 die Autophosphorylierung der Kinase sowie die Phosphorylierung von AHP1 nachweisbar.

Da die Fusionsproteine ARR4-6xHis und GST-AHP1 ein ähnliches Molekulargewicht besitzen, laufen beide auf einer etwa Gleiche Höhe von ca. 47 kDa. Daher sind diese im gezeigten Coomassiegel schwer zu unterscheiden, weshalb mittels spezifischer Antikörper ARR4 in diesem Ansatz nachgewiesen wurde (Abbildung 19 B).

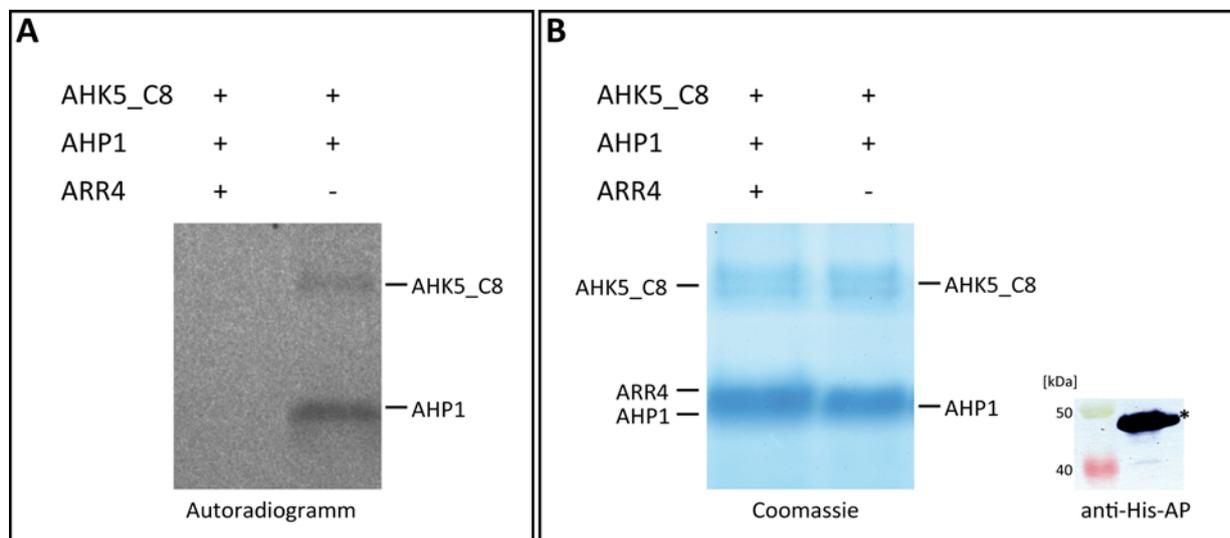


Abbildung 19: Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente mit vollständigem MSP. (A) Autoradiogramm: An- oder Abwesenheit von Kinase (AHK5_C8), Substrat (AHP1) und nachgeschaltetem Element (ARR4) sind durch + oder - gekennzeichnet. (B) Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle. Rechts: Spezifischer Nachweis von ARR4-6xHis (*) mittels anti-His Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP).

3.7.3 AHK5_C7 besitzt keine Autophosphorylierungsaktivität *in vitro*

Wie oben gezeigt, ist AHK5_C8 in der Lage, sich selbst und das nachgeschaltete Element AHP1 *in vitro* zu phosphorylieren. Jedoch fehlt in AHK5_C8 die *Input*-Domäne (Vergleich Abbildung 8, Seite 51), welche eine Signalspezifität vermitteln könnte. Um später eine Signal-abhängige Regulierung des *Phosphorelays* von AHK5 auf AHP1 analysieren zu können, wurde der auf Radioaktivität basierende Phosphorylierungsversuch mit rekombinanten, codonoptimierten AHK5-Volllängenprotein (AHK5_C7) durchgeführt. Da die bakterielle Expression von AHK5_C7 nicht möglich war (Kapitel 3.6, Seite 61), wurde eine kleine Proteinmenge von AHK5_C7 für diesen Versuch kommerziell bezogen (GeneCust, L).

Es konnten auch hier keine radioaktiven Signale und somit keine Proteinphosphorylierungen nachgewiesen werden (Abbildung 20 A), obwohl AHK5_C7 und AHP1 mittels Coomassie-Färbung des SDS-Gels nachgewiesen wurden (Abbildung 20 B). Das AHK5-Volllängenprotein scheint demzufolge ohne Zugabe eines Signals inaktiv zu sein.

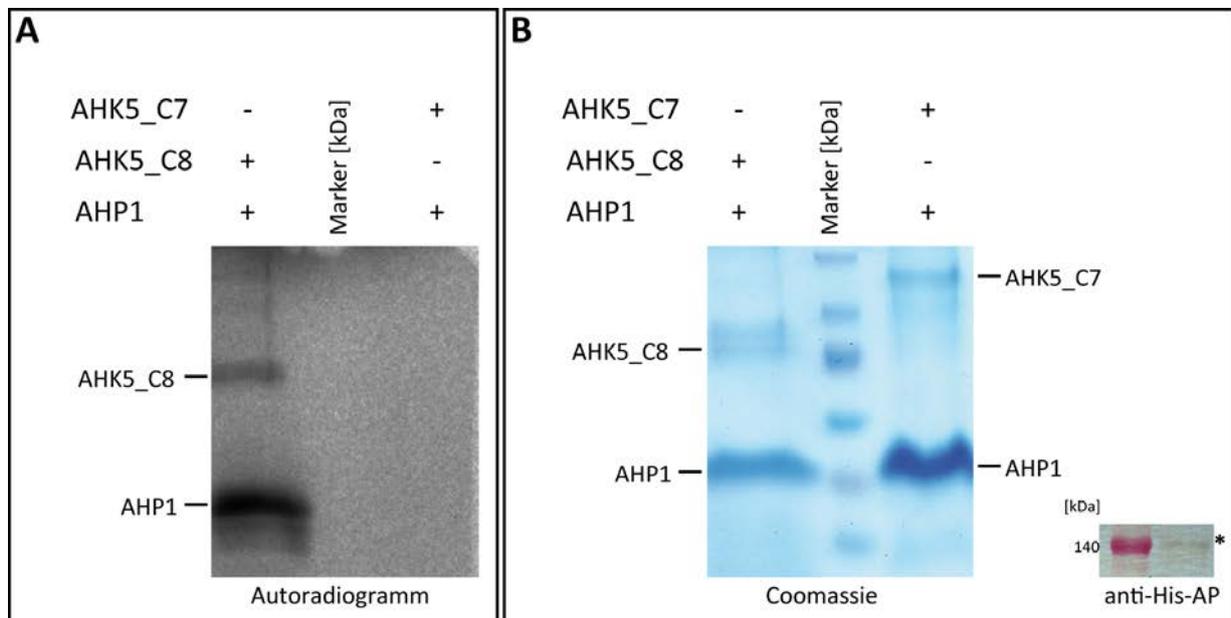


Abbildung 20: Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente AHK5_C7. (A) Autoradiogramm: An- oder Abwesenheit von Kinase (AHK5_C8, bzw. AHK5_C7) und Substrat (AHP1) sind durch + oder - gekennzeichnet. (B) Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle. Rechts: Spezifischer Nachweis von AHK5_C7-6xHis (*) mittels anti-His Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP).

3.7.4 Der Phosphattransfer erfolgt über ein Histidin-Aspartat-*Phosphorelay*

Phosphorylierungen an Histidinresten besitzen eine nur geringe thermodynamische Stabilität und lassen sich damit nur schwer nachweisen (Zu et al., 2007). Um sicherzustellen, dass die in Abbildung 18 gezeigten Phosphorylierungen von AHK5_C8 und AHP1 – wie für Elemente eines MSPs zu erwarten wäre – an einem Histidin- (H), bzw. Aspartatrest (D) erfolgen und nicht an den Aminosäureresten Serin (S), Threonin (T) oder Tyrosin (Y), wurde mittels massenspektrometrischen Analysen nach phosphorylierten S, T oder Y-Resten in der Kinase (AHK5_C8), bzw. im Phosphattransferprotein (AHP1) gesucht. Dabei konnten weder in Peptiden von AHK5_C8, noch in denen von AHP1 phosphorylierte S, T, oder Y-Reste nachgewiesen werden. Die Abdeckungen der analysierten Aminosäuresequenzen mit der Gesamtsequenz betragen ca. 80 % für AHK5_C8 bzw. 52 % für AHP1. In Abbildung 21 sind die zur Analyse verwendeten Proteinbanden, sowie die durch die Analyse abgedeckten Bereiche der jeweiligen Aminosäuresequenzen von AHK5_C8 bzw. AHP1 dargestellt.

3. Ergebnisse

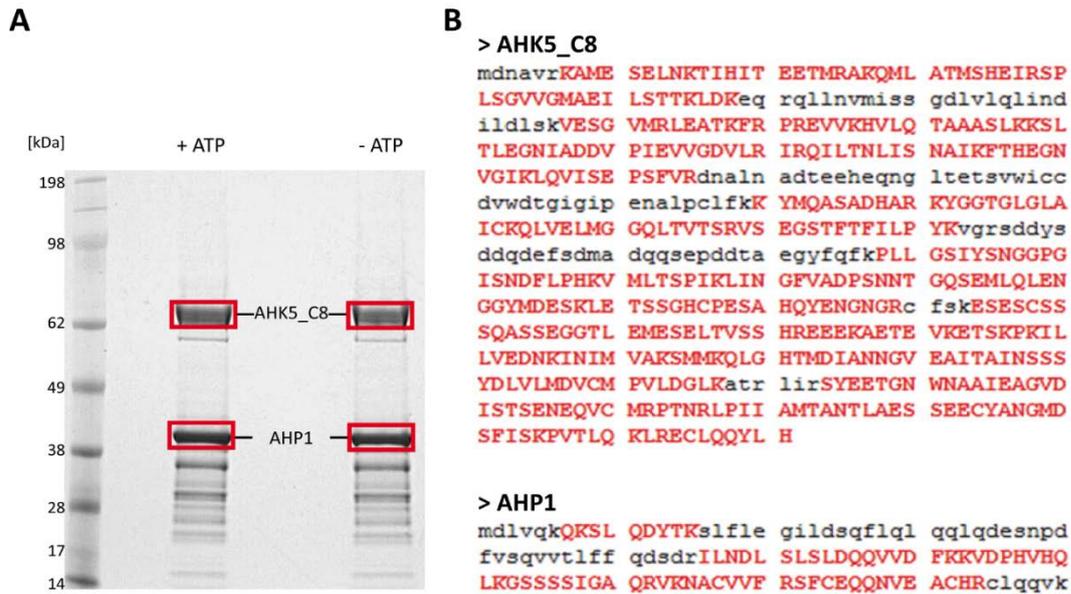


Abbildung 21: Suche nach Phosphorylierungsstellen in AHK5_C8 und AHP1. (A) Silbergefärbtes SDS-Gel mit zwei Reaktionsansätzen: Kinase und Substrat mit ATP-Zugabe (linke Probe) bzw. Kinase und Substrat ohne ATP-Zugabe (rechte Probe). Die zur massenspektrometrischen Analyse verwendeten Proteinbanden sind mit einem roten Rechteck markiert². (B) Darstellung der Sequenzabdeckung (rote Großbuchstaben) der analysierten Phosphopeptide mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen von AHK5_C8 und AHP1.

3.8 H₂O₂- bzw. redoxabhängige Dimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5

Um Einblicke in die molekulare Funktion und Struktur der *Input*-Domäne zu bekommen, wurde die gereinigte *Input*-Domäne von AHK5 biochemisch charakterisiert. Ziel war es, Hinweise über die Signalperzeption, oder sogar mögliche Signalmoleküle zu finden. Wie erwähnt ist das Mitwirken von AHK5 bei H₂O₂-abhängigen Prozessen bekannt. Da H₂O₂ den Redoxstatus in Zellen verändert, wurde das elektrophoretische Laufverhalten der *Input*-Domäne mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen untersucht. Unter nicht reduzierenden Bedingungen bildet das Fusionsprotein 7xHis-StrepII-SUMO-AHK5_C9 hochmolekulare Aggregate (Abbildung 22 A). Diese verschwinden nach Zugabe von 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, welches als starkes Reduktionsmittel selbst Disulfidbrückenbindungen spalten kann. Das berechnete Molekulargewicht des Fusionsproteins (7xHis-StrepII-SUMO-AHK5_C9) beträgt 54 kDa. Die hochmolekularen Aggregate befinden sich im SDS-Gel bei einer Größe von etwa 130 bis 240 kDa, was trimere bzw. tetramere Formen des Fusionsproteins darstellen könnten. Die monomere Form läuft dagegen bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa, was fast 20 kDa mehr als die berechnete Masse sind. Gelfiltrationsanalysen des gereinigten Fusionsproteins lieferten identische Ergebnisse (nicht gezeigt, persönliche Mitteilung von Matthias

² SDS-PAGE und Silberfärbung durchgeführt von Dr. Mirita Franz, Proteome Center Tübingen

Vorländer, ehemals AG Stehle, IFIB Tübingen). Die Aggregatbildung der *Input*-Domäne von AHK5 erfolgt dabei redoxabhängig und könnte somit eine funktionelle Bedeutung haben.

Die in Abbildung 22 A gezeigten hochmolekularen Aggregate des Fusionsproteins 7xHis-StrepII-SUMO-AHK5_C9 könnten durch Di- und Multimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5 entstehen. Um auszuschließen, dass die redoxabhängige Aggregation durch den N-terminalen Tag beeinflusst wird, wurde die bakteriell exprimierte *Input*-Domäne von AHK5 (AHK5_C9) nativ gereinigt, der N-terminale Tag durch proteolytische Spaltung mittels SUMO-Protein entfernt und das Laufverhalten der geschnittenen *Input*-Domäne unter oxidierenden Bedingungen im SDS-Gel analysiert. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen des Oxidationsmittels H₂O₂ verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die geschnittene *Input*-Domäne von AHK5 H₂O₂-abhängig dimerisiert (Abbildung 22 C).

AHK5_C9 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 40 kDa und ist im gefärbten SDS-Gel bei ca. 48-kDa (nicht oxidiert, Monomer) zu sehen. Die oxidierte Form von AHK5_C9 läuft bei etwa dem doppelten Molekulargewicht der nicht oxidierten Form, was auf eine Dimerisierung schließen lässt. Es fällt auf, dass selbst bei der niedrigsten Konzentration an H₂O₂ von 0,3 µM ein Großteil der *Input*-Domäne als Dimer vorliegt. Andererseits befindet sich selbst bei der höchsten H₂O₂-Konzentration nicht alles Protein in der oxidierten Variante. Die Abhängigkeit zwischen H₂O₂-Konzentration und Dimerbildung wurde durch Integration der Proteinbandenflächen mittels ImageJ und anschließender Berechnung des Verhältnisses von reduziert (Monomer) zu oxidiert (Dimer) quantifiziert (Abbildung 22 D). Die Dimerbildung der *Input*-Domäne von AHK5 wird durch steigende H₂O₂-Konzentrationen verstärkt. Eine H₂O₂- bzw redoxabhängige Funktionalität von AHK5 liegt daher nahe.

Um zu überprüfen, ob die rekombinant hergestellte *Input*-Domäne von AHK5 zu einem funktionalen Protein gefaltet wird, wurden Analysen mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) durchgeführt. Anhand dieser Faltungsanalyse des Fusionsproteins ist ersichtlich, dass die *Input*-Domäne in der Lage ist sich zu Falten, sowie Anteile an α -Helices und β -Faltblattstrukturen besitzt (Abbildung 22 B). Der Abgleich mit einer Datenbank von CD-Spektren bekannter Proteine unter Verwendung des JASCO-Auswertungsprogramms, sagt folgende Anteile an Sekundärstrukturen voraus: α -Helix: 13,2 %, β -Faltblatt: 51,2 %, β -Schleife: 5,8 % und Random-Coil: 29,8 %.

3. Ergebnisse

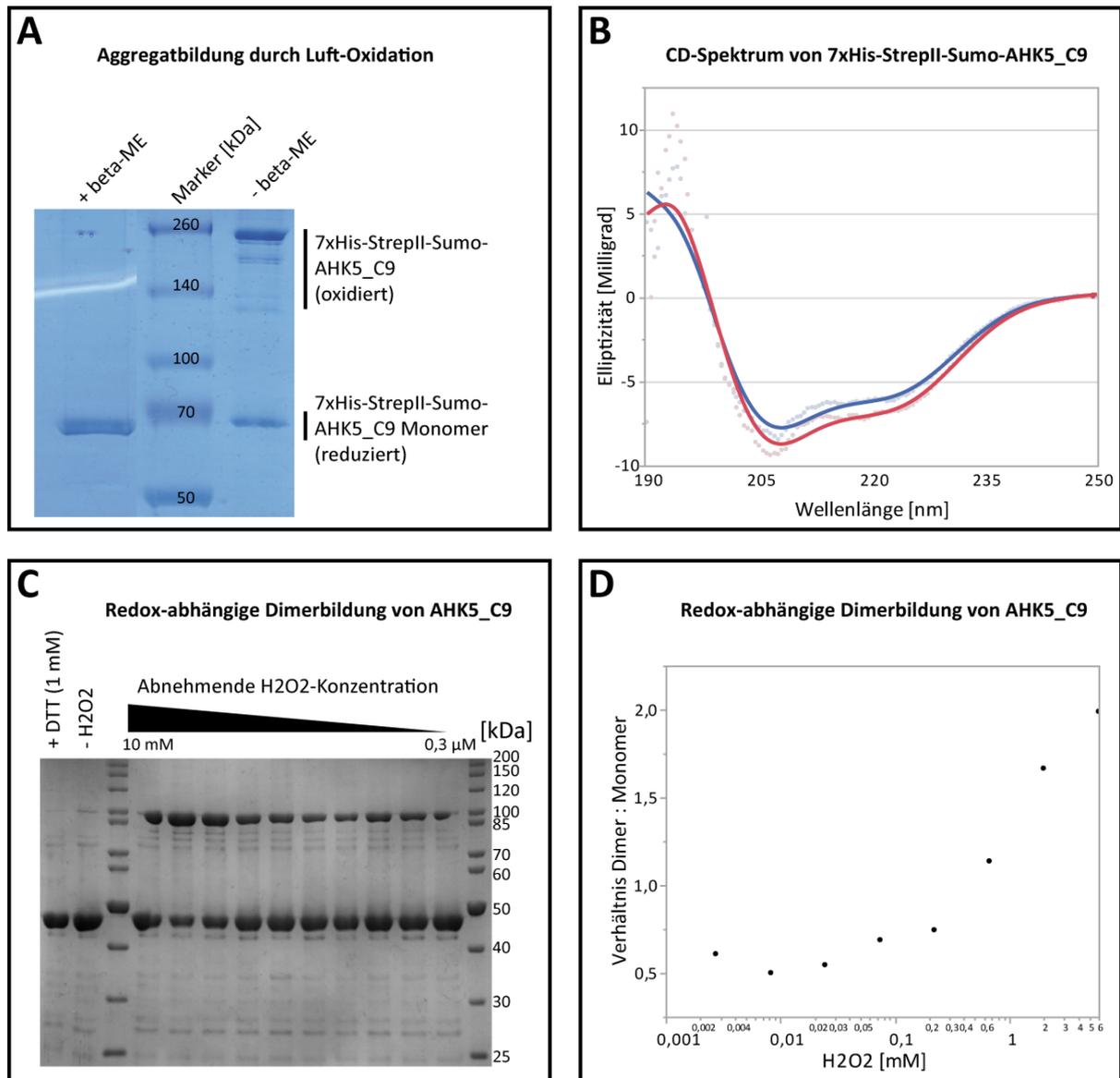


Abbildung 22: H₂O₂ bzw. redoxabhängige Aggregation der Input-Domäne von AHK5. (A) Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit je 600 ng gereinigtem Protein (7xHis-StrepII-Sumo-AHK5_C9). Links: mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (+beta-ME); rechts: ohne beta-ME (B) Faltungsanalyse der nativ gereinigten Input-Domäne von AHK5 (7xHis-StrepII-Sumo-AHK5_C9) mittels Circular dichroismus-Spektroskopie. (blaue Linie (t_0) = CD-Spektrum; rote Linie (t_1) = CD-Spektrum der identischen Probe, nach vier Tagen Lagerung bei 4 °C. (C) Redoxabhängige Dimerisierung der Input-Domäne von AHK5 bei abnehmenden Konzentrationen von H₂O₂. Als Kontrollen wurde das Reduktionsmittel DTT (1 mM Endkonzentration), sowie die Abwesenheit des Oxidationsmittels H₂O₂ verwendet. Die Proteine wurden mittels Silberfärbung im Gel visualisiert.³ (D) Quantifizierung der redoxabhängigen Dimerisierung aus (C) Die Konzentrationen an H₂O₂ sind als logarithmische Werte angegeben.

³ SDS-PAGE und Silberfärbung durchgeführt von Matthias Vorländer, ehemals AG Stehle, IFIB Tübingen

3.9 AHK5 ist eine H₂O₂- bzw. redoxabhängige Sensor-Histidinkinase

Für die Fragestellung, ob die Aktivität von AHK5 durch H₂O₂ reguliert wird, bzw. deren Aktivität H₂O₂-abhängig ist, wurde ein auf Fluoreszenz basierender bakterieller β -Galactosidaseaktivitätsversuch durchgeführt. Hierbei wurde das Fehlen einer endogenen Histidinkinase in *E. coli* durch einbringen von AHK5 (für *E. coli* codonoptimiertes Vollängen-Expressionskonstrukt: AHK5_C7) komplementiert. Bei Komplementierung des Signalweges und dessen Aktivierung kommt es zur Induktion der Expression von β -Galactosidase, deren Aktivität anhand der Umsetzung von MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid) mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Dabei wurden AHK5 sowie zwei mutante Varianten davon (AHK5^{C3A} und AHK5^{H376N}) untersucht. Bei AHK5^{C3A} wurde der vermutlich redoxensitive Cysteinrest (C) an Position 3 in der *Input*-Domäne von AHK5 durch ein Alanin (A) ersetzt. Bei AHK5^{H376N} wurde die für die Signalweiterleitung essentielle Phosphorylierungsstelle mutiert.

Eine basale β -Galactosidaseaktivität des wildtypischen AHK5-Konstrukts ist bereits ohne H₂O₂-Behandlung (0 mM H₂O₂) zu beobachten. Dies bestätigt die Daten von Iwama et al., 2007, die ebenfalls eine basale Aktivität von AHK5 zeigen. Diese war dabei unabhängig von CK und ABA und wurde nicht weiter diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die basale Aktivität des Vollängenproteins von AHK5 durch Applikation von H₂O₂ weiter stimuliert werden. Im Gegensatz dazu steigt die β -Galactosidaseaktivität in der Kontrolle (nicht transformierte *E. coli*) nur unwesentlich an. Die mutanten Varianten AHK5^{C3A} und AHK5^{H376N} zeigen eine der Kontrolle ähnliche Reaktion und sind im Vergleich zum wildtypischen AHK5 deutlich in ihrer Aktivität reduziert. (Abbildung 23).

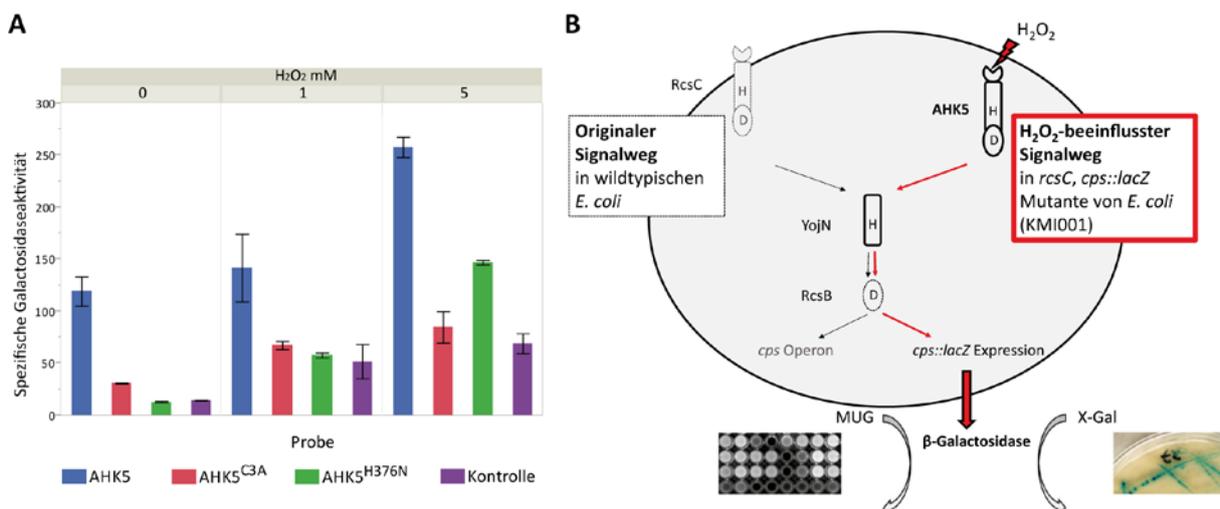


Abbildung 23: H₂O₂ abhängige Aktivität von AHK5. (A) Gezeigt ist die spezifische β -Galactosidaseaktivität in *E. coli* nach Transformation mit AHK5 (blau), AHK5^{C3A} (rot), sowie AHK5^{H376N} (grün) in Abhängigkeit von H₂O₂. Als Kontrolle wurden nicht transformierte KMI001-Zellen verwendet (violett). Angegeben sind der jeweilige Mittelwert von sechs biologischen und drei technischen Replikaten; sowie der Standardfehler. (B) Schematische Übersicht über die Bestimmung der Histidinkinaseaktivität mittels β -Galactosidase-Assay. Links: originaler Signalweg in einer wildtypischen *E. coli*-Zelle (durch gestrichelte Pfeile angegeben). Rechts: H₂O₂-induzierter Signalweg in KMI001-Zellen (rote Pfeile). Hier erfolgt nach Signalperzeption die Expression der β -Galactosidase, deren Aktivität durch den Umsatz der Substrate MUG bzw. X-Gal nachgewiesen und bestimmt werden kann (verändert nach: Spichal, 2011)

4 Diskussion

Das Signalmolekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht als Nebenprodukt bei metabolischen Prozessen. Es wird jedoch auch aktiv für eine Vielzahl von zellulären Antworten, sowie adaptiven Entwicklungsprozessen von der Pflanze hergestellt und spielt besonders bei Antworten von Stressreaktionen eine entscheidende Rolle. Um im jeweiligen Kontext eine spezifische H_2O_2 -induzierte Antwort zu generieren, sind H_2O_2 -abhängige Signalwege mit denen der Phytohormone und weiterer Signalmolekülen in komplexer Art und Weise verbunden. Es kann daher angenommen werden, dass die *Arabidopsis* Histidinkinase 5 (AHK5) bei der Integration dieser H_2O_2 -abhängigen Signalwege eine entscheidende Rolle spielt. AHK5 agiert hierbei als spezifische H_2O_2 - bzw. redoxregulierte Sensor-Histidinkinase innerhalb eines *Multi-Step Phosphorelays* (MSPs) und ermöglicht eine Feinregulation von H_2O_2 -abhängigen Prozessen. Die Konvergenz aller Signalwege, die ebenfalls über die Elemente des MSPs verlaufen, aber auch Interaktionen zwischen AHK5 mit anderen Proteinen könnten dabei entscheidende Funktionen besitzen.

4.1 AHK5 ist ein positiver Regulator der Seneszenz in *Arabidopsis thaliana*

Neben entwicklungsabhängigen Signalen und äußeren Umwelteinflüssen haben die Phytohormone ET, JA, CK, IAA, ABA, sowie H_2O_2 bei der Regulation der Blattseneszenz entscheidende Funktionen (Jaradat et al., 2013, Wu et al., 2012, Yang et al., 2011, Smykowski et al., 2010, Lim et al., 2010, Ellis et al., 2005, Abeles et al., 1988, Dai et al., 1999, Kim et al., 2006). AHK5 spielt bei der Integration verschiedener H_2O_2 -beeinflusster Signalwege, welche durch abiotische und biotische Stimuli ausgelöst werden eine Rolle (Desikan et al., 2008, Iwama et al., 2007, Pham and Desikan, 2012, Pham et al., 2012).

In dieser Arbeit konnte ein weiterer H_2O_2 -abhängiger Prozess gezeigt werden, bei dem AHK5 spezifisch beteiligt ist. So führt das Fehlen von AHK5 zu einer Verzögerung der Blattseneszenz in *A. thaliana*, was sich durch reduzierten Chlorophyllabbau, sowie reduzierte Lipidperoxidation in der *ahk5-1* Mutante verglichen mit dem Wildtyp (Col-0) zeigen ließ. Somit fördert AHK5 die Seneszenz.

Da sowohl das Verfärben der Blätter, als auch der Anstieg der Lipidperoxidation in Col-0 und *ahk5-1* zum selben Zeitpunkt beginnt, lässt sich schließen, dass die Initiation der Seneszenz nicht beeinflusst ist. Andererseits verläuft in den Blättern von *ahk5-1* im Vergleich zum Wildtyp, der Prozess des Verfärbens der Blätter sowie der Lipidperoxidation langsamer. Demzufolge hat AHK5 eine Funktion bei der Progression, jedoch nicht bei der Initiation der Seneszenz.

Auf welcher Ebene, d.h. durch welchen molekularen Auslöser eine Beteiligung von AHK5 bei der Seneszenz stattfindet, konnte nicht geklärt werden. Ein reduzierter zellulärer H_2O_2 -Gehalt könnte die Progression der Seneszenz verlangsamen (Smykowski et al., 2010). Jedoch konnten keine spezifischen Änderungen im *in planta* H_2O_2 -Gehalt zwischen den untersuchten Linien während des betrachteten Zeitraums festgestellt werden. Somit kann eine Störung der H_2O_2 -Produktion in *ahk5-1*-Pflanzen ausgeschlossen werden.

Geht man davon aus, dass AHK5 bei der H_2O_2 -Perzeption beteiligt ist, könnte das Fehlen der AHK5-Funktion in *ahk5-1*, einen Wegfall eines H_2O_2 -ausgelösten Signalwegs zur Folge haben, der die Progression der Seneszenz positiv beeinflusst. Welche Änderungen dieser Wegfall auf genetischer Ebene auslöst, gilt es zu untersuchen.

Eine Analyse der Expression von Markergenen, wie beispielsweise SAGs (*Senescence associated genes*) oder Genen von antioxidativen Enzymen (wie beispielsweise APX oder CAT) mittels RT-PCR (*Reverse transcriptase polymerase chain reaction*) in den untersuchten Linien während der Seneszenz, könnte die Progressionsverzögerung der Seneszenz in *ahk5-1* zusätzlich erklären.

Interessanterweise führt die Aktivität des CK-Rezeptors AHK3 zu einer Verzögerung der Seneszenz (Kim et al., 2006). Signalwege dieser Histidinkinase verlaufen ebenfalls über ein MSP (Kieber and Schaller, 2014). Es wäre daher möglich, dass durch Konkurrenz zwischen AHK5 und AHK3 um die nachgeschalteten AHPs bzw. ARRs eine Integration von CK und H_2O_2 -Signalwegen stattfindet und so die Seneszenz reguliert wird. Somit könnten durch das Fehlen der AHK5-Funktion in *ahk5-1* mehr AHPs, sowie ARRs für die AHK3-abhängigen und CK-induzierten Signalwege zur Verfügung stehen. Demnach sollte nach Überexpression von AHK5 in Wildtyppflanzen und gleichzeitiger Behandlung mit CK, eine weniger starke Verzögerung der Seneszenz, im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen beobachtet werden. Abgesehen davon, sollten die hier gezeigten Experimente zusätzlich mit AHK5-komplementierten Linien bzw. Überexpressionslinien durchgeführt werden, um die hier gezeigte verzögerte Seneszenz in *ahk5-1* zu untermauern.

Im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass AHK5 eine Rolle bei der altersbedingten Blattseneszenz besitzt. Die Blattseneszenz wird jedoch auch durch Integration von anderen Signalwegen ausgelöst. So induzieren Dunkelheit, Hormonapplikation und Pathogenbefall ebenfalls die Blattseneszenz (Lim et al., 2007). Des Weiteren führen Dunkelheit, bestimmte Hormone (wie beispielsweise ET, ABA oder SA) sowie Pathogenbefall zusätzlich zu einer Induktion der zellulären H_2O_2 -Produktion (Foyer and Noctor, 2005, Foyer and Noctor, 2009, Mittler et al., 2011, Noctor and Foyer, 1998). Um auch hier Zusammenhänge zwischen H_2O_2 -abhängigen Prozessen, AHK5 und der Seneszenz herauszuarbeiten, bleibt es zu klären wie stark AHK5 die Seneszenz in diesen Signalwegen beeinflusst.

4. Diskussion

4.2 *In planta* H₂O₂-Gehalt in *ahk5-1* nach biotischem sowie abiotischem Stress

Pflanzen bilden nicht nur entwicklungsabhängig H₂O₂, sondern stellen diesen auch als Antwort auf biotischen und abiotischen Stress her (Desikan et al., 2000, Prasad et al., 1994, Vanacker et al., 2000, Petrov and Van Breusegem, 2012). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass weder bei biotischem, noch abiotischem Stress ein Unterschied in der H₂O₂-Produktion zwischen *ahk5-1* und Col-0 existiert. Obwohl die Schließreaktion der Stomata als Antwort auf flg22 von AHK5 abhängig ist (Desikan et al., 2008), erfolgte in den untersuchten Linien während des beobachteten Zeitraums keine Veränderung in der von flg22 ausgelösten ROS-Produktion. AHK5 scheint demnach keinen direkten Einfluss auf die kurzzeitige ROS-Produktion zu haben. Die flg22 induzierte Antwort von AHK5 könnte somit stomataspezifisch sein.

Andererseits ist eine reduzierte ROS-Produktion in epidermalen *peels* von *ahk5-1* Pflanzen, im Vergleich zum Wildtyp während der Antwort flg22 bekannt (Desikan et al., 2008). Dies scheint widersprüchlich zu den hier gezeigten Daten zu sein. Jedoch wurde dabei die H₂O₂-Konzentration erst drei Stunden nach der flg22-Behandlung gemessen und ausschließlich isolierte Epidermiszellen betrachtet. Solch späte Änderungen der *in planta* H₂O₂ Konzentration könnten durch sekundäre Effekte zustande kommen und sind nicht unbedingt auf eine direkte AHK5-abhängige H₂O₂-Produktion zurückzuführen. Zusätzlich könnten hier fehlende Zell-Zellkommunikationen zwischen Mesophyll- und Epidermiszellen eine Rolle spielen. Da in dieser Arbeit nur die kurzfristige H₂O₂-Produktion nach flg22-Behandlung in *ahk5-1* Blättern untersucht wurde, lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass AHK5 Funktionen in der H₂O₂-Produktion zu späteren Zeitpunkten besitzt.

Auch bei der Antwort von *ahk5-1* und Col-0 auf abiotischen Stress (250 mM NaCl bei Raumtemperatur sowie 39 °C und 4 °C ohne NaCl) konnte kein Unterschied in der ROS-Produktion innerhalb des beobachteten Zeitraums festgestellt werden. Dies bedeutet, dass AHK5 keinen Einfluss auf die Kälte-, Hitze- und salzinduzierte Bildung von H₂O₂ hat. Obwohl ein Anstieg der endogenen H₂O₂-Konzentration zu zellschädigenden Wirkungen und somit zum Zelltod führt (Gechev and Hille, 2005), ist die höhere Salztoleranz von *ahk5-1* gegenüber Wildtyppflanzen (Pham et al., 2012) somit nicht auf eine reduzierte *in planta* H₂O₂-Konzentration zurückzuführen.

4.3 Subzelluläre Lokalisation verschiedener GFP-Fusionsproteine von AHK5-Fragmenten

AHK5 ist nicht nur die einzige Histidinkinase ohne Transmembrandomäne, sondern auch – wie in dieser Arbeit gezeigt wurde – die einzige HK welche im Zellkern lokalisiert ist.

Die gezeigten Lokalisationsstudien des GFP-Fusionsproteins von AHK5 stehen dabei teilweise im Widerspruch zu den von (Desikan et al., 2008) durchgeführten Studien. Desikan et al., 2008 beschrieben dabei eine zytoplasmatische und membranassoziierte Lokalisation einer N-terminalen GFP-Fusion von AHK5 in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana*, sowie Blättern von *Nicotiana benthamiana*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Lokalisation des C-terminalen GFP-Fusionsproteins von AHK5 (AHK5_C7-GFP) in transient transformierten Epidermiszellen aus Blättern von *Nicotiana benthamiana*. Neben der Lokalisation im Zytoplasma, konnte eine Zellkernlokalisierung von AHK5_C7-GFP festgestellt werden. Interessanterweise konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei Fehlen der *Input*-Domäne von AHK5 (AHK5_C8-GFP) keine Zelllokalisierung mehr stattfindet. Dagegen ist die *Input*-Domäne allein (AHK5_C9-GFP) stark zellkernlokalisiert.

Die bei (Desikan et al., 2008) verwendete N-terminale GFP-Fusion von AHK5 könnte ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) bzw. einen Proteininteraktionsbereich maskieren und das dortige Fehlen der Zellkernlokalisierung erklären. Zusammen mit den hier gezeigten Daten liegt die Vermutung nahe, dass funktionelle Bereiche in der *Input*-Domäne von AHK5 die Zellkernlokalisierung verursachen.

Die den Zellkern umgebene Membran enthält Kernporen, die als molekulares Sieb fungieren. Die Diffusionsbarriere der Kernporen liegt für Makromoleküle zwischen 40 und 60 kDa (Elad et al., 2009, Pawlowski et al., 2010, Wang and Brattain, 2007). Freies GFP besitzt ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und ist somit in der Lage durch passive Diffusion in den Zellkern zu gelangen. Die gezeigte Zellkernlokalisierung ist jedoch nicht auf freies GFP zurückzuführen, da bei einem Western Blot die AHK5-Fusionsproteine in voller Größe nachgewiesen wurden und kein freies GFP detektiert werden konnte. Da die untersuchten AHK5-Fusionsproteine für einen passiven Kernimport zu groß sind, kann ihre Kernlokalisierung nur noch durch einen aktiven Transport in den Zellkern erklärt werden. Ein aktiver, d.h. unter Energieverbrauch stattfindender, Kernimport von größeren Proteinen über die Kernporen erfolgt selektiv. Hierbei werden sog. Kerntransportfaktoren (Karyopherine) benötigt, die als Adapterproteine fungieren und nach Erkennung eines NLSs, durch Interaktion mit dem Zielprotein dessen Kerntransport ermöglichen (Elad et al., 2009, Moore, 1998, Pawlowski et al., 2010).

4. Diskussion

Tatsächlich befinden sich bestimmte Aminosäureabfolgen in der *Input*-Domäne von AHK5, welche als NLS fungieren könnten. Nach Mutation aller in Frage kommenden Aminosäurereste in der Proteinsequenz der *Input*-Domäne von AHK5, konnte jedoch keine Änderung der subzellulären Lokalisation im Vergleich zum wildtypischen Konstrukt festgestellt werden. AHK5^{K145/146/154/169A}-GFP sowie auch die Fusionsproteine der entsprechenden mutanten Varianten mit Einzelaminosäureaustausch (AHK5^{K145A}-GFP, AHK5^{K146A}-GFP, AHK5^{K154A}-GFP, AHK5^{K169A}-GFP) waren weiterhin im Zellkern lokalisiert. Daraus ist zu schließen, dass AHK5 kein NLS besitzt. Ein aktiver Kernimport ist somit wahrscheinlich auf Protein-Protein-Interaktion zurückzuführen, bei welcher ein NLS des Interaktionsproteins den aktiven Kernimport von AHK5 vermitteln könnte und die gezeigte Kernlokalisierung erklären würde.

Anhand der gezeigten Kernlokalisierung der AHK5-GFP Fusionsproteine (AHK5_C7 und C8) stellt sich die Frage, ob und welche Funktionen AHK5 im Zellkern erfüllt. Da AHK5 keine DNA-Bindedomäne besitzt und somit nicht als Transkriptionsfaktor agiert (Grefen and Harter, 2004, Horak et al., 2011), kann eine direkte Regulation der Genexpression durch AHK5 ausgeschlossen werden. Eine phosphorylierungsabhängige Regulation weiterer Zielproteine *via* MSP im Zellkern wäre denkbar, da nachgeschaltete Elemente (AHPs und ARRs) ebenfalls im Zellkern lokalisiert sind. Des Weiteren kann H₂O₂ als membrangängiges Molekül in allen zellulären Organellen vorkommen und beispielsweise im Zellkern DNA oxidativ schädigen. AHK5 könnte hier der H₂O₂-Perzeption dienen und eine entsprechende zelluläre Antwort zum Schutz vor DANN-Schädigungen auslösen. Dabei könnten auch Protein-Protein-Interaktionen zwischen AHK5 und anderen Proteinen eine Regulation der Genexpression zur Folge haben. Analysen mittels Ko-Immunopräzipitationen aus angereicherten Zellkernproteinextrakten könnten dabei Hinweise auf mögliche Interaktionspartner von AHK5 geben.

Interessanterweise ist die N-terminale GFP-Fusion von AHK5 in der Lage *ahk5-1* zu komplementieren (Desikan et al., 2008). Das Fehlen der Kernlokalisierung von GFP-AHK5 hat demzufolge keinen Einfluss auf die Komplementation des von Desikan et al., 2008 gezeigten Phänotyps. Demzufolge ist davon auszugehen, dass AHK5 eine Vielzahl an ortsspezifischen Funktionen auf subzellulärer Ebene besitzt, was zur Integration zahlreicher Signalwege führen könnte.

Um alle erhaltenen Ergebnisse der subzellulären Lokalisation der GFP-Fusionsproteine von AHK5 zu verifizieren, sollten diese im homologen Expressionssystem durchgeführt werden. Hierzu bietet sich die transiente Transformation von Keimlingen oder Protoplasten von *A. thaliana* an. Dabei sollten neben den C-terminalen GFP-Fusionen der verschiedenen AHK5-Fragmente (C7, C8 und C9) zusätzlich N-terminale GFP-Fusionen überprüft werden.

4.4 *In planta* Protein-Protein-Interaktionsanalysen mittels FRET/FLIM

Obwohl die gezeigten *in planta* Interaktionsstudien ausschließlich mit dem AHK5-Fragment AHK5_C8 durchgeführt wurden, bei dem die *Input*-Domäne nicht vorhanden ist, konnten neben der Homodimerisierung von AHK5 auch Interaktionen zwischen AHK5 und dem Ethylenrezeptor ETR1, sowie den NADPH-abhängigen Oxidasen AtRbohC, D und F nachgewiesen werden. Keine Interaktion erfolgte dagegen zwischen AHK5 und dem Rezeptor für Flagellin (FLS2).

Da ETR1 hauptsächlich an der ER-Membran lokalisiert ist (Grefen et al., 2008) und die NADPH-abhängigen Oxidasen ebenfalls Membranproteine sind (Torres et al., 2002, Kwak et al., 2003), könnte eine Interaktion von AHK5 mit ETR1, aber auch mit den membranständigen AtRbohC, D und F zu der bereits beschriebenen Membran-assoziierten Lokalisation von AHK5 (Desikan et al., 2008) führen.

Verschiedene Histidinkinasen (HKs) perzipieren unterschiedliche Signale. Daher weisen die *Input*-Domänen der verschiedenen HKs entsprechend starke Sequenzunterschiede auf. Im Gegensatz dazu sind die Proteinsequenzen der *Transmitter*- und *Receiver*-Domäne unter den einzelnen HKs hoch konserviert. Bereiche der *Transmitter*-Domäne dienen hierbei als Interaktionsplattform mit anderen HKs, bzw. Rezeptorproteinen, wohingegen die *Receiver*-Domäne Interaktionen mit den nachgeschalteten Elementen (AHPs) ermöglicht (Pekarova et al., 2016). Da AHK5_C8 sowohl die *Transmitter*-, als auch die *Receiver*-Domäne besitzt, sind die gezeigten *in planta* Interaktionsstudien als repräsentative Ergebnisse für das Volllängenkonstrukt anzusehen.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von AHK5_C8 mit sich selbst gezeigt. AHK5 ist demnach in der Lage Homodimere *in planta* zu bilden. Dies ist für HKs nicht ungewöhnlich, da angenommen wird, dass durch Homo- und Heterodimerisierung von HKs eine Signalspezifität innerhalb des MSPs erreicht wird (Horak et al., 2011).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich auch in der *Input*-Domäne Interaktionsbereiche für andere Proteine befinden. Da hier entsprechende Sekundärstrukturen vorhanden sind und eine Dimerisierung der *Input*-Domäne gezeigt wurde (Kapitel 3.8, Seite 68) lässt sich schließen, dass AHK5 mindestens zwei Bereiche besitzt mit denen eine Interaktion ermöglicht wird. Ein Interaktionsbereich in der *Input*-Domäne von AHK5 könnte der Interaktion von AHK5 mit sich selbst sowie der Kernlokalisation dienen, wohingegen in AHK5_C8 eine Interaktionsplattform für zusätzliche Proteine existiert.

4. Diskussion

4.4.1 AHK5 interagiert mit dem Ethylenrezeptor ETR1

Die gezeigte Interaktion zwischen AHK5 und dem Ethylenrezeptor ETR1 könnte die Integration von Ethylen- und H₂O₂-abhängigen Signalwege vermitteln. Zum einen stellt AHK5 einen negativen Regulator im Signalweg dar, bei dem ET und ABA über ETR1 das Wurzelwachstum inhibieren (Iwama et al., 2007). Hierbei könnte die physikalische Interaktion zwischen AHK5 und ETR1, eine entsprechende Regulation des Wurzelwachstums erklären. ETR1 ist ein negativer Regulator der Ethylenantwort (Kieber et al., 1993) und genau wie AHK5 eine Histidinkinase. Damit könnte ein Heterodimer von AHK5 und ETR1 eine Aktivierung von ETR1 zur Folge haben. Durch Aktivierung von ETR1 entfällt die Inhibierung der Serin/Threonin-Kinase CTR1 (*Constitutive triple response 1*), was zur Unterdrückung der Ethylenantwort führt und demzufolge keine Hemmung des Wurzelwachstums zur Folge hat.

Des Weiteren ist sowohl AHK5 als auch ETR1 für den H₂O₂-induzierten Stomataschluss in *Arabidopsis thaliana* von essentieller Bedeutung (Desikan et al., 2005, Desikan et al., 2008, Desikan et al., 2006). Zusätzlich spielt die ET-induzierte H₂O₂-Produktion durch die NADPH Oxidase AtRbohF für das Schließen der Stomata eine bedeutende Rolle (Desikan et al., 2006). Ein Fehlen von AHK5 geht mit einer Insensitivität des Stomataschlusses gegenüber H₂O₂-Behandlung, sowie Behandlung mit Faktoren die eine endogene H₂O₂-Produktion zur Folge haben (ET, flg22, Dunkelheit) einher. Da in dieser Arbeit ebenfalls eine Interaktion zwischen AHK5 und AtRbohF gezeigt wurde und die AHK5-Funktion für ein H₂O₂- und ET-induziertes Schließen der Stomata unentbehrlich ist, liegt die Vermutung nahe, dass die AHK5-abhängige Regulation des Stomataschlusses durch direkte eine Interaktion mit ETR1, bzw. AtRbohF erfolgt.

4.4.2 AHK5 interagiert nicht mit dem Rezeptor für flg22 (FLS2)

Obwohl *ahk5-1*-Pflazen auf eine flg22-Behandlung nicht mit Schließen der Stomata reagieren (Desikan et al., 2008), konnte keine direkte Interaktion zwischen AHK5 und dem Rezeptor von flg22 (FLS2) nachgewiesen werden. Auch gibt es keine Unterschiede in der kurzfristigen Produktion von H₂O₂ zwischen wildtypischen Pflanzen und *ahk5-1* nach Behandlung mit dem flg22 (Kapitel 3.2.1, Seite 48). AHK5 scheint demnach keine Rolle bei der ETI (*Effector triggered immunity*)-ausgelösten H₂O₂-Produktion nach flg22-Perzeption zu spielen. Es ist daher davon auszugehen, dass AHK5 eine stomataspezifische, flg22-abhängige Funktion besitzt, die dem FLS2-Signalweg nachgeschaltet ist und zum Schließen der Stomata führt. Auch wäre eine Interaktion zwischen FLS2 und AHK5 über Adapterproteine, wie beispielsweise BAK1 (*BRI1-associated kinase 1*) (Chinchilla et al., 2007) denkbar, um so ein flg22-ausgelöstes Schließen der Stomata zu vermitteln. Beispielsweise könnten

Interaktionsstudien zwischen AHK5, BAK1 und FLS2 mittels mbSUS (*mating-based split-ubiquitin system*) (Grefen et al., 2009) hierüber Aufklärung geben.

Bei den Interaktionsstudien mit FLS2-mCherry fiel auf, dass die Fluoreszenzlebenszeit von AHK5_C8-GFP bei Koexpression mit FLS2-mCherry über dem der Negativkontrolle (AHK5_C8-GFP koexprimiert mit freiem mCherry) lag. Diese Tendenz ließ sich ebenfalls bei Koexpression von AHK5_C7-GFP und FLS2-mCherry beobachten (nicht gezeigt). Die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors ist unter anderem vom pH-Wert abhängig. Eine Überexpression von FLS2 könnte zu einem veränderten Redoxverhältnis in der Zelle führen, was Einfluss auf den pH-Wert hat und somit die erhöhte Fluoreszenzlebensdauer erklären.

4.4.3 AHK5 interagiert mit den NADPH-abhängigen Oxidasen AtRbohC, D und F

NADPH-abhängige Oxidasen (Rbohs) sind in der Lage ROS zu produzieren und haben bei pflanzlichen Signalwegen und Entwicklungsprozessen entscheidende Funktionen (Yoshioka et al., 2003, Foreman et al., 2003, Kwak et al., 2003, Sagi et al., 2004, Torres et al., 2002, Desikan et al., 2006, Miller et al., 2009). In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen AHK5 und den AtRbohC, D und F gezeigt. Da AHK5 keinen Einfluss auf die Produktion von H₂O₂ während der Seneszenz sowie bei abiotischem und biotischem Stress hat, könnte die Interaktion zwischen AHK5 und den AtRbohs eine davon unabhängige regulatorische Funktion bei der AtRboh-induzierten ROS-Produktion haben. So könnte beispielsweise die Interaktion zwischen AHK5 und den AtRbohs die oben beschriebene späte H₂O₂-Produktion beeinflussen.

AtRbohC spielt eine entscheidende Rolle beim Wachstum der Wurzelhaarspitzen (Foreman et al., 2003, Takeda et al., 2008). Auch für AHK5 sind Funktionen beim Wurzelwachstum bekannt (Pham et al., 2012, Iwama et al., 2007). Zusätzlich ist AHK5 verstärkt in der Wurzel exprimiert (Desikan et al., 2008, Iwama et al., 2007) und *ahk5-1* Pflanzen haben nach Behandlung mit ABA längere Wurzeln als wildtypische Pflanzen (Iwama et al., 2007). Obwohl keine Änderung der *in planta* H₂O₂-Konzentration auf abiotischen und biotischen Stress in *ahk5-1* festgestellt wurde, könnte eine Interaktion zwischen AHK5 und AtRbohC der stressunabhängigen Feinregulation der H₂O₂-Produktion dienen, welche wiederum das Wurzelwachstum beeinflussen könnte.

AtRbohD und F sind beide bei Signalwegen von Abwehrreaktionen und Phytohormonen, wie beispielsweise ABA, ET und JA beteiligt (Desikan et al., 2006, Kwak et al., 2003, Torres et al., 2002, Suhita et al., 2004), haben jedoch auch spezifische Funktionen. Durch die vergleichsweise höhere H₂O₂-Produktionsrate von AtRbohD, spielt diese beim oxidativen *Burst* eine bedeutende Rolle (Kimura et al., 2012, Torres et al., 2002). Eine weitere wichtige Funktion besitzt die AtRbohD im Langstreckentransport von H₂O₂ (Miller et al., 2009, Suzuki et al., 2013). Hierbei wird eine Zell-Zell-

4. Diskussion

Kommunikation ermöglicht, die der Anpassung der gesamten Pflanze an abiotischen Stress (*systemic acquired acclimation*, SAA) dient. Es ist bekannt, dass H₂O₂ auch bei weiteren systemischen Antworten, wie beispielsweise bei der pflanzlichen Immunantwort, Verletzungsreaktionen, sowie der Anpassung an Hitze oder Starklicht beteiligt ist (Alvarez et al., 1998, Orozco-Cardenas and Ryan, 1999, Karpinski et al., 1999, Suzuki et al., 2013, Suzuki and Mittler, 2012). Daher könnte die gezeigte Interaktion zwischen AHK5 und AtRbohD dazu dienen, den H₂O₂-Langstreckentransport zu regulieren. Dabei könnte AHK5 nach erfolgter H₂O₂-Perzeption mittels Interaktion eine kontextabhängige Aktivierung von AtRbohD auslösen, was wiederum die Produktion von H₂O₂ zur Folge hätte.

Wie die genaue Regulation der AtRbohs auf molekularer Ebene stattfindet ist noch nicht komplett geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass Phosphorylierung und Ca²⁺ synergistisch die ROS-Produktion von AtRbohD und F aktivieren (Ogasawara et al., 2008). Dabei zieht Ca²⁺ eine temporäre Aktivierung von AtRbohF nach sich, wohingegen eine Proteinphosphorylierung zu einer kontinuierlichen Aktivierung führt (Kimura et al., 2012). Da diese Experimente in humanen Zellen durchgeführt wurden in denen kein MSP existiert, ist davon auszugehen eine AHK5-abhängige Phosphorylierung der AtRbohs über ein typisches His-Asp-*Phosphorelay* nicht möglich ist. Zusätzlich hat eine Inhibierung von Serin/Threonin-Proteinphosphatasen eine erhöhte Aktivität von AtRbohD und F zur Folge (Kimura et al., 2012, Ogasawara et al., 2008). Das AHK5 auch als Serin/Threonin-Proteinkinase fungieren könnte ist auszuschließen, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass das Histidin in Position 376 für eine Signalweiterleitung *via* MSP essentiell ist (Kapitel 3.7, Seite 63) und AHK5 keine Phosphorylierungen an Serin-, Threonin-, oder Tyrosinresten aufweist (Kapitel 3.7.4, Seite 67). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Interaktion einer Serin/Threonin-Proteinkinase (*CBL-interacting serine/threonine protein kinase 26*, CIPK26) mit AtRbohF eine verminderte ROS-Produktion zur Folge hat (Kimura et al., 2013). Dies klingt zunächst widersprüchlich, könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass die Regulation der AtRbohs spezifisch vom jeweiligen Interaktionspartner abhängt. Da auch andere pflanzliche Rezeptoren und Enzyme mit mehr als nur einer Funktion bekannt sind (Desikan et al., 2005, Szekeres, 2003, Moore, 2004), wäre demnach auch eine Histidinkinase-unabhängige Regulation der AtRbohs durch AHK5 denkbar. Dabei könnten phosphorylierungsunabhängige Konformationsänderungen oder anderer posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise H₂O₂-abhängige Oxidationen von redoxsensitiven Cysteinen, bei der Interaktion zwischen AHK5 und AtRbohC, D und F eine Rolle spielen und so die Aktivität der AtRbohs beeinflussen. Des Weiteren kann ein AHK5-abhängiger Signalweg, der zur späteren Phosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosin führt und so die AtRbohs regulieren könnte nicht ausgeschlossen werden. So hat beispielsweise auch der Signalweg über die Cytokininrezeptoren AHK2 und 3 Phosphorylierungen von Proteinen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten zur Folge (Dautel et al., 2016).

Es bleibt zu klären, ob AHK5 ebenfalls mit den verbleibenden sieben NADPH Oxidasen (AtRbohA, B, E und G-J) (Torres and Dangl, 2005) aus *Arabidopsis* interagiert. Des Weiteren könnten unterschiedlich starke Affinitäten zwischen AHK5 und AtRboh Signalspezifitäten vermitteln. Mittels SPR (*surface plasmon resonance*)-Analysen ließen sich etwaige Unterschiede zwischen Bindeaffinitäten feststellen.

Da die durchgeführten FRET/FLIM-Messungen im heterologen System *N. benthamiana* durchgeführt wurden, bedarf es der Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse in *Arabidopsis thaliana*. Des Weiteren könnten weitere Methoden, wie beispielsweise BIFC (*bimolekulare fluorescence complementation*), oder Experimente mittels Ko-Immunopräzipitation die erhaltenen Ergebnisse bestätigen.

4.5 Expression von Proteinfragmenten von AHK5 in *E. coli* unter optimierten Bedingungen

Neben der Verwendung der heterolog exprimierten Proteine AHK5_C8, bzw. AHK5_C9 in den Phosphorylierungsversuchen bzw. der biochemischen Charakterisierung der *Input*-Domäne von AHK5, sollte die Proteinexpression späteren Kristallstrukturanalysen von AHK5 dienen. Es existieren nur wenige Kristallstrukturdaten von Histidinkinasen aus *Arabidopsis*: die dreidimensionale Struktur der CHASE-Domäne von AHK4 in Komplexen mit verschiedenen Cytokinen (Hothorn et al., 2011), der zytoplasmatische Teil des Ethylenrezeptors ETR1 (Mayerhofer et al., 2015) und die *Receiver*-Domänen von ETR1 (Muller-Dieckmann et al., 1999), CKI1 (Pekarova et al., 2011) und AHK5 (Bauer et al., 2013). Mit optimierten Bedingungen zur Proteinexpression von AHK5_C8 und AHK5_C9 in *E. coli*, wurde in dieser Arbeit die Grundlage geschaffen eine ausreichende Proteinmenge herzustellen, um eine weitere Strukturaufklärung von AHK5 zu ermöglichen. Mit Hilfe dieser wären genauere Einblicke in die molekulare Funktion der Signalperzeption von AHK5 und darüber ob AHK5 H₂O₂ binden kann möglich.

Die rekombinant hergestellte *Input*-Domäne von AHK5 kann als Antigen verwendet werden, um spezifische Antikörper gegen AHK5 herzustellen, da wie bereits erwähnt, nur in der *Input*-Domäne eine hohe Variabilität der Proteinsequenz zwischen den verschiedenen Histinkinasen existiert. Mittels AHK5-spezifischer Antikörper lässt sich beispielsweise die subzelluläre Lokalisation von AHK5 in wildtypischen Pflanzen präziser bestimmen. Zusätzlich könnten die Antikörper bei Ko-Immunopräzipitationsexperimenten für eine Suche nach Interaktionspartnern von AHK5 verwendet werden oder SPR-spektroskopische Analysen (Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, *surface plasmon resonance spectroscopy*) zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten zu Signalmolekülen oder Interaktionsproteinen, oder einfache Immunodetektionen zum Nachweis von AHK5-Protein ermöglichen.

4.6 *In vitro* Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimente

Bei den durchgeführten *in vitro* Protein-Protein-Phosphorylierungsexperimenten konnte erstmals gezeigt werden, dass eine AHK5 sich selbst phosphoryliert und dieses Phosphat anschließend auf ein nachgeschaltetes Phosphotransferprotein (AHP1) überträgt. Die Tatsache, dass die Reaktion innerhalb von wenigen Minuten sowie auf Eis stattfindet, macht deutlich dass die Phosphorylierungsreaktionen sehr schnell verlaufen. Dies korreliert mit den Eigenschaften des MSPs, mit dem Pflanzen sehr schnell in der Lage sind, flexibel auf Signale zu reagieren (D'Agostino et al., 2000).

Die *in vitro* Autophosphorylierung von AHK5_C8 erfolgt signalunabhängig und in Abwesenheit der *Input*-Domäne. Dies bedeutet, dass AHK5 bei Fehlen der *Input*-Domäne daueraktiv ist. Andererseits konnte bei Verwendung des Volllängenproteins von AHK5 (AHK5_C7) keinerlei Autophosphorylierung nachgewiesen werden. Offensichtlich ist AHK5_C7 nicht in der Lage ohne Signal, eine Phosphorylierungsreaktion zu ermöglichen. Demzufolge besitzt die *Input*-Domäne von AHK5, bei Abwesenheit eines Signals eine negative Wirkung auf die Autophosphorylierungsaktivität von AHK5. Erst nach Signalperzeption in der *Input*-Domäne und / oder einer Änderung der Konformation des Proteins könnte demnach eine Autophosphorylierung sowie Aktivierung von AHK5 erfolgen. Versuche unter Verwendung eines entsprechenden Signals, wie beispielsweise H₂O₂, könnten weiteren Aufschluss über diesen Sachverhalt geben. Da bekannt ist, dass H₂O₂- bzw. redoxabhängige Signalwege über redoxensitive Cysteine erfolgen können (Foyer and Noctor, 2005), könnten Experimente mit Cysteinmutanten von AHK5 weitere Einblicke in die Modulation des MSP geben. Auch könnten Phosphorylierungsversuche bei denen sich AHK5_C8 zusammen mit AHK5_C9 – also der *Input*-Domäne von AHK5 – in einem Ansatz befinden, durchgeführt werden. Dabei würde man durch spontane Assemblierung von AHK5_C9 mit AHK5_C8 eine konzentrationsabhängige Hemmung der Autophosphorylierungsaktivität von AHK5_C8 vermuten.

Des Weiteren stehen Analysen mit mutanten Varianten von AHK5, bei denen der konservierte, phosphorylierbare Histidinrest (H₃₇₆), bzw. Aspartatrest (D₈₂₈) fehlt, noch aus. So sollten bei Verwendung von AHK5_C8^{H376N} keine radioaktiven Signale detektierbar sein. Hier könnte kein MSP ablaufen, da das den Anfang des *Phosphorelays* bildende Histidin fehlt. Im Gegensatz dazu sollte zwar bei Verwendung von AHK5_C8^{D828N} die Autophosphorylierung der Kinase erfolgen, ein Phosphattransfer auf AHP1 jedoch ausbleiben.

Eine Quantifizierung der Ergebnisse, das heißt die Berechnung der Anzahl an übertragenen Phosphaten von AHK5_C8 auf AHP1 ist mit Hilfe des verwendeten Versuchsaufbaus nicht möglich. Hierzu könnte auf einen Lumineszenz basierten Assay zurückgegriffen werden, bei dem das Enzym Luciferase ihr Substrat Luciferin unter Verbrauch von nicht verwendetem ATP spaltet und Licht erzeugt. Anhand der

eingesetzten ATP-Menge und der gemessenen Lumineszenz kann so die Menge an verbrauchtem ATP bestimmt werden.

AHP1 und ARR4 sind innerhalb des MSPs nachgeschaltete Elemente von AHK5 (Mira-Rodado et al., 2012) und AHP1 ist in der Lage ARR4 zu phosphorylieren (Mira-Rodado et al., 2007). Bei zusätzlicher Zugabe von ARR4 konnten hingegen keinerlei radioaktive Signale mehr nachgewiesen werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass ARR4 nach und nach alle Phosphate von AHP1 entgegennimmt und diese anschließend abgibt. Zeitgleich erhält AHP1 kontinuierlich Phosphate von AHK5_C8. Somit liegt das Reaktionsgleichgewicht sehr stark auf der Seite von ARR4, was zu einem „Leerlaufen“ des MSPs führt.

Wie eingangs erwähnt, erfolgt der Phosphattransfer innerhalb des MSPs sehr schnell. Die hier durchgeführte Reaktion wurde 30 min nach Reaktionsbeginn gestoppt. Es ist bekannt, dass 30 min nach Cytokininbehandlung, die – ebenfalls über ein MSP verlaufende – CK-induzierte Expression von B-Typ ARRs wieder auf einem Grundniveau ist (D'Agostino et al., 2000). Hier erfolgt demnach die Abschaltung des MSPs innerhalb von 30 min. Des Weiteren wurde für ARR22 (ein C-Typ ARR) gezeigt, dass dieser Phosphataseaktivität besitzt und die von den AHPs übernommenen Phosphate an die Umgebung abgeben kann (Horak et al., 2008, Kiba et al., 2004). A-Typ ARRs, wie beispielsweise ARR4 und C-Typ ARRs haben strukturelle Gemeinsamkeiten und bestehen beide aus einer *Receiver*-Domäne sowie einer sehr kurzen *Output*-Domäne (Hwang et al., 2002). Anhand der gezeigten Ergebnisse lässt sich somit schließen, dass ARR4 ebenfalls Phosphataseaktivität besitzen könnte.

Um den schnellen Phosphattransfer innerhalb des MSPs näher zu untersuchen sind kürzere Reaktionszeiten bei den Phosphorylierungsversuchen nötig. So müssten beispielsweise mehr radioaktive Signale nachweisbar sein, je kürzer die Reaktion verläuft. Zusätzlich sollte nach Mutation des phosphorylierbaren Aspartats in Position 95 von ARR4 kein Phosphattransfer auf ARR4 erfolgen und nur phosphorylierungsabhängige Signale an AHK5_C8 sowie AHP1 zeigen.

In diesen Zusammenhang könnten auch weitere nachgeschaltete MSP-Elemente von AHK5 getestet und auf eventuelle Unterschiede im Phosphattransferverhalten untersucht werden. Hierdurch ließe sich prüfen, ob die verschiedenen AHPs und ARRs Änderungen im Phosphorylierungsmuster zeigen und damit Unterschiede in deren Affinitäten, bzw. Spezifitäten aufweisen. Damit könnten weitere Einblicke in die Signalweiterleitung von AHK5 innerhalb des MSPs erhalten werden.

Nicht zu vernachlässigen bleibt das Ergebnis des Phosphattransfers von AHP1 auf ARR4 von Mira-Rodado et al., 2007, welches für beide Proteine im Autoradiogramm Signale zeigt. Dies erscheint im Vergleich zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten zunächst kontrovers. Hinzukommt, dass bei Mira-Rodado et al., 2007 mehr AHP1 phosphoryliert zu sein scheint als ARR4, was der oben genannten

4. Diskussion

Hypothese widersprechen würde. Dies lässt sich jedoch damit erklären, dass die längste Reaktionszeit bei Mira-Rodado et al., 2007 fünf min betrug, wohingegen die Reaktion in dieser Arbeit 30 min lang verlief. Damit steht ARR4 genug Zeit zur Verfügung alle Phosphate aufzubrechen, was zu dem hier gezeigten leeren Autoradiogramm führt. Des Weiteren wurde bei Mira-Rodado et al., 2007 *in vitro* translatiertes ARR4 verwendet, wohingegen in dieser Arbeit, das verwendete ARR4 aus bakterieller Expression stammt. *In vitro* existieren weder Chaperone, die eine Faltung unterstützen, noch Abbauprozesse über Proteasomen, die fehlgefaltete Proteine eliminieren (Hartl and Hayer-Hartl, 2009). Es liegt daher nahe, dass *in vivo* gefaltetes ARR4 eine weitaus höhere Aktivität besitzt, als selbstgefaltetes ARR4 aus *in vitro* Herstellung. Eine höhere Aktivität hat einen schnelleren Umsatz von Phosphaten zur Folge und erklärt ebenfalls, die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse.

Weder in der Aminosäuresequenz von AHK5_C8, noch in der von AHP1 wurden phosphorylierte Tyrosine, Threonine oder Serine durch die MS-Analyse nachgewiesen. Obwohl dabei keine vollständige Abdeckung der Aminosäuresequenzen erzielt wurde, ist davon auszugehen dass hier ausschließlich Phosphorylierungen an Histidin und Aspartat erfolgen. Mit Hilfe von nicht-standardisierten und spezialisierten MS-Analysen (Kee and Muir, 2012), unter Verwendung von neutralem oder basischem Puffer, könnte die säurelabile Phosphorylierung am Histidinrest in AHK5 nachgewiesen werden.

4.7 Biochemische Charakterisierung der *Input*-Domäne von AHK5

Anhand der Faltungsanalyse mittels CD-Spektroskopie konnten verschiedene Sekundärstrukturen der *Input*-Domäne festgestellt werden. Demzufolge besteht etwa die Hälfte der *Input*-Domäne aus β -Faltblattstrukturen. β -Faltblätter können miteinander in Wechselwirkung treten, in dem die Carbonyl- und Aminogruppen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Diese strukturellen Bereiche können ebenfalls als mögliche Grundlage der Funktionalität der *Input*-Domäne von AHK5 dienen. Zusätzlich sind anhand von Sekundärvorhersageprogrammen zwei *coiled-coil* Domänen in der *Input*-Domäne von AHK5 vorhergesagt (Daten nicht gezeigt). Diese Bereiche könnten ebenfalls der Proteininteraktion dienen. Des Weiteren besitzt die *Input*-Domäne von AHK5 ein Cystein in Position drei der Aminosäuresequenz, welches sich in exponierter Lage befindet.

Es ist bekannt, dass redoxabhängige posttranslationale Modifikationen von Proteinen zu einer Änderung der Aktivität, Stabilität, Lokalisation oder Struktur eines Proteins führen können (Hancock et al., 2006). Beispielsweise könnte die H₂O₂-Perzeption durch Modifikation von Thiolgruppen bestimmter Aminosäurereste, wie Cystein und Methionin, oder aber auch von Tyrosin, Tryptophan oder Histidin, erfolgen (Hardin et al., 2009, Cooper et al., 2002, Vranova et al., 2002, Foyer and Noctor, 2005, Sadanandom et al., 2000). So würde eine H₂O₂-abhängige Oxidation zweier Cysteinreste zur

Ausbildung einer Disulfidbrückenbindung (S-S) führen, die eine Konformationsänderung zu zur Folge haben und die Aktivität eines Proteins beeinflussen könnte. So ist beispielsweise im SA-abhängigem Signalweg bekannt, dass die redoxabhängige Bildung und Auflösung von Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen, eine Mono-, bzw. Oligomerisierung von NPR1 (*Nonexpressor of PR genes 1*) zur Folge hat und essentiell für die Transkription SA-induzierter Gene ist (Lindermayr et al., 2010, Rochon et al., 2006). Des Weiteren befindet sich in der *Input*-Domäne (CHASE-Domäne) von AHK4 eine strukturgebende Disulfidbrückenbindung zwischen einem Cystein des N-terminalen Bereichs und einem Cystein des C-terminalen Bereichs der CHASE-Domäne. Zusätzlich wurde diese als Dimer kristallisiert (Hothorn et al., 2011).

Die *Input*-Domäne von AHK5 besitzt nur ein einziges Cystein in Position 3 (C₃). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass genau dieses Cystein essentiell für die Aktivität von AHK5 ist (Kapitel 3.9, Seite 71). Es stellt sich daher die Frage, ob die redoxabhängige Dimerisierung von AHK5_C9 auf dieses Cystein zurückzuführen ist. Wäre dies der Fall, so könnte eine H₂O₂-abhängige Oxidation von C₃ eine Disulfidbrückenbindung zwischen zwei AHK5-*Input*-Domänen und somit eine Dimerisierung zur Folge haben. Diese strukturelle Veränderung könnte wiederum zur Autophosphorylierung und damit zur Aktivierung von AHK5 führen. Dies würde ebenfalls erklären, dass bei Fehlen der *Input*-Domäne eine dauerhafte Aktivität von AHK5_C8 zu beobachten ist, wohingegen AHK5_C7 zumindest ohne Signal keine Autophosphorylierung zeigt (Kapitel 3.7.1, Seite 63, sowie Kapitel 3.7.3, Seite 66). Biochemische Versuche zur H₂O₂- bzw. redoxabhängigen Dimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5, bei welchem C₃ mutiert wurde könnten Aufschluss darüber geben, ob C₃ ein redoxsensitives Cystein darstellt. So würde ein Austausch dieses Cysteins die H₂O₂-abhängige Dimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5 verhindern.

Die Thiolgruppe (-SH) eines einzigen Cysteinrestes kann aber auch zur Schwefelsäure (-SOH) und nachfolgend zu Schwefelhaltigen (-SO₂H) und zur Schwefeligen Säure (-SO₃H) weiteroxidiert werden. Mittels der Enzyme Thioredoxin und Glutaredoxin besteht die Möglichkeit diese Modifikationen anschließend wieder rückgängig zu machen (Schurmann and Jacquot, 2000, Hancock et al., 2006, Lemaire, 2004, Collin et al., 2004, Rouhier et al., 2001), um so ein Abschalten des Signalweges und der zellulären Antwort zu erreichen. Geht man davon aus, dass AHK5 eine H₂O₂- bzw. redoxabhängige Sensor-Histidinkinase ist, so könnten solche redoxabhängigen postranslationalen Modifikationen an Thiolgruppen in AHK5 entsprechende Konformationsänderungen auslösen. Diese könnten wiederum die Aktivität von AHK5 beeinflussen und die Perzeption und Signalweiterleitung von H₂O₂ durch AHK5 ermöglichen.

4.8 Untersuchung der Aktivität von AHK5 abhängig von H₂O₂

Die gezeigte basale Aktivität von AHK5 ohne Zugabe von H₂O₂, steht dem *in vitro* Proteinphosphorylierungsexperiment entgegen, bei dem kein Phosphotransfer von AHK5_C7 auf AHP1 nachweisbar war (Abbildung 20, Seite 67) Der β -Galactosidaseaktivitätsversuch wurde jedoch *in vivo* durchgeführt, wodurch Proteine oder Effektormoleküle aus *E. coli* mit dem H₂O₂-abhängigen Signalweg interferieren könnten. Des Weiteren ist AHK5 wie bereits erwähnt toxisch für *E. coli*. Daher könnte selbst die hier verwendete codonoptimierte Version von AHK5, Stressreaktionen in den *E. coli*-Zellen auslösen und so zur gemessenen basalen Aktivität führen könnten. Beispielsweise könnte dabei endogen gebildetes H₂O₂ in *E. coli* (Korshunov and Imlay, 2010) diese basale Aktivität der AHK5 hervorrufen. Denkbar wäre auch eine Interaktion zwischen dem eingebrachten AHK5 und endogenen Enzymen, deren Aktivität eine erhöhte H₂O₂-Produktion zur Folge haben und wiederum zur AHK5-Aktivierung führen könnte.

Mit ansteigender H₂O₂-Konzentration konnte im Gegensatz zur Negativkontrolle ein Anstieg der Galactosidaseaktivität bei AHK5 gemessen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivität von AHK5 durch H₂O₂ erhöht wird. Ob H₂O₂ direkt Einfluss auf die AHK5-Aktivität nimmt, oder durch H₂O₂ ausgelöste sekundäre Effekte dafür verantwortlich sind, ließ sich nicht klären. Da sich in diesem Versuchsaufbau auch weitere Signale testen lassen, wäre unter diesem Aspekt ebenfalls interessant zu überprüfen, ob andere Signale wie beispielsweise Glutathion, Phytohormone oder PAMPs Einfluss auf die AHK5-Aktivität haben.

AHK5^{C3A} und AHK5^{H376N} zeigen bei Abwesenheit von H₂O₂ eine ähnliche Reaktion wie die Negativkontrolle. Somit konnte die für AHK5 gezeigte basale Aktivität durch Mutagenese der beiden Aminosäurereste (C₃ und H₃₇₆) abgeschaltet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass sowohl das Cystein in Position 3 (C₃), als auch das Histidin in Position 376 (H₃₇₆) für die Aktivität von AHK5 entscheidend sind.

Bei AHK5^{C3A} wurde der Cysteinrest der *Input*-Domäne von AHK5 durch ein Alanin (A) ersetzt, was einen Aktivitätsverlust von AHK5 zur Folge hat. Daher könnte die Schwefelwasserstoffgruppe von C₃ als Thiol- bzw. Redoxsensor fungieren. Beispielsweise könnte die direkte Oxidation dieses Cysteins durch H₂O₂ die Perzeption von H₂O₂ ermöglichen. Dabei könnte – wie bereits erwähnt – eine H₂O₂-abhängige Oxidation die Dimerisierung der *Input*-Domäne nach sich ziehen, welche eine Aktivierung von AHK5 zur Folge hätte und einen H₂O₂-induzierten Signalweg auslösen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen sind weitere Experimente, wie beispielsweise H₂O₂-abhängige Protein-Protein-Phosphorylierungsversuche mit dem AHK5-Volllängenprotein (mit und ohne Cysteinmutation), sowie Kristallstrukturanalysen notwendig.

AHK5^{H376N} kann nicht mehr signalabhängig phosphoryliert werden. Ein *Phosphorelay* kann somit nicht gestartet werden und es findet kein Signalweg statt, der zur Aktivierung der β -Galactosidase führt. Dies zeigt, dass der im AHK5-abhängigen Signalweg stattfindende Phosphattransfer eine essentielle Rolle für die Signalweiterleitung besitzt und über innerhalb eines MSPs verläuft. Zur weiteren Bestätigung dieses Ergebnisses könnte auch die Verwendung von AHK5^{D828N} dienen. Hier würde der Austausch des konservierten Aspartats (D₈₂₈) einen Phosphattransfer auf nachgeschaltete Elemente unmöglich machen. Demnach sollte AHK5^{D828N} genau wie AHK5^{H376N} keine Aktivität in diesem Versuch zeigen. Zusätzlich wäre es interessant die mutanten Varianten AHK5^{H376E} und AHK5^{D828E} zu untersuchen. Der Austausch von H₃₇₆ und D₈₂₈ durch ein Glutamin (E) würde eine Dauerphosphorylierung von AHK5 nachahmen, was sich in einer gesteigerten Aktivität widerspiegeln sollte.

Interessant wäre es auch zu überprüfen, ob AHK5 bei Abwesenheit der *Input*-Domäne (AHK5_C8) den Signalweg in KMI001-Zellen komplementieren kann. Dies würde zusammen mit den Studien der Radioaktivitätsversuche (Kapitel 3.7, Seite 63), weitere Einblicke über die funktionelle Aktivität von AHK5 geben.

Außer C₃ sind in AHK5 noch elf weitere Cysteine vorhanden, welche sich teilweise in wichtigen Bereichen (*Transmitter*- und *Receiver*-Domäne) befinden. Anhand von *in silico* Analysen ist bekannt (Daten nicht gezeigt), dass sich einige dieser in exponierten Positionen im Protein befinden und in der Lage sind, Disulfidbrücken auszubilden. Versuche mit mutanten Varianten dieser Cysteine könnten Aufschluss über deren Funktion in AHK5 geben.

5 Ausblick

Obwohl in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass H_2O_2 eine Dimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5 auslöst und ebenfalls die Aktivität von AHK5 positiv beeinflusst, bleibt zu klären, wie die Perzeption von H_2O_2 durch AHK5 im Detail erfolgt. Hierzu sollten weiterführende Arbeiten zur näheren Aufklärung der atomaren Struktur von AHK5 dienen. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Optimierung der Expressionsbedingungen in *E. coli* und der Reinigung an Protein, wurden bereits die Grundlagen gelegt, um Kristallstrukturanalysen durchzuführen. Anhand dieser ließen sich genauere Einblicke in die molekularen Funktionen, sowie die Signalerkennung von AHK5 erhalten.

Des Weiteren wurde die H_2O_2 -abhängige Aktivierung von AHK5 zwar *in vivo* gezeigt, jedoch wurde dies in einem bakteriellem System untersucht. Daher bleibt zu klären, wie sich dies *in planta* verhält. Hierbei wären Transkriptomanalysen der untersuchten Linien bei An- und Abwesenheit von H_2O_2 hilfreich. Auch könnten Lumineszenz basierte Versuche mit Protoplasten Einblicke in die AHK5-abhängige Signalweiterleitung geben.

Da verschiedene Affinitäten zwischen der *Receiver*-Domäne von AHK5 und einiger AHPs bekannt sind (Bauer et al., 2013), wäre es sehr interessant zu erfahren, ob bei den durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungsversuchen ebenfalls verschiedene Affinitäten zwischen AHK5 und den nachgeschalteten AHPs, sowie ARR4 existieren. Hierzu sollten neben den bereits getesteten rekombinanten Proteinen (AHP1 und ARR4) weitere Proteine in die Phosphorylierungsexperimente einbezogen werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Autophosphorylierung von AHK5 und der anschließende Phosphattransfer durch Applikation von H_2O_2 regulierbar ist. Von essentieller Bedeutung wäre zusätzlich die Überprüfung, ob mutante Varianten von ARR4 nach Austausch des phosphorylierbaren Aspartats in Position 95, das hier gezeigte „Leerlaufen“ des MSP verhindern. Dies würde zeigen, dass ARR4 eine Phosphataseaktivität besitzt.

In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich überprüft werden, ob das Cystein in Position 3 (C_3) der *Input*-Domäne von AHK5 für die Autophosphorylierung und den Phosphattransfer nötig ist und ob noch weitere Cysteine die Aktivität von AHK5 beeinflussen. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob nach Mutation von C_3 , weiterhin eine H_2O_2 -abhängige Dimerisierung der *Input*-Domäne stattfindet und ob dieses Cystein auch die Dimerisierung des Volllängenproteins AHK5_C7 hervorrufen kann.

Des Weiteren sollte geklärt werden, welche strukturellen Domänen bzw. Aminosäuren für die Funktion von AHK5 *in planta* notwendig sind. Hierbei sollte u. a. überprüft werden, ob AHK5 nach Aminosäureaustausch von C_3 oder H_{376} (Histidin an Position 376), das Fragment AHK5_C8 den *ahk5-1* Phänotyp komplementieren kann.

Es sind weitaus komplexere massenspektrometrische Analysen zur Bestimmung von phosphorylierten Histinenresten, als für den Nachweis von phosphorylierten Tyrosin, Serin oder Threoninresten in Peptiden notwendig sind. Dennoch wäre es sinnvoll, diese nicht nur im durchgeführten *in vitro* Kinaseversuch, sondern auch *in vivo* durchzuführen. Mittels Phosphoproteomanalysen mit Proteinextrakten aus Pflanzen, könnte somit überprüft werden, ob AHK5 H₂O₂-abhängig autophosphoryliert wird und welche weiteren Proteine AHK5-abhängig phosphoryliert werden.

Neben den bereits bestätigten Interaktionspartnern von AHK5 sollte nach weiteren Kofaktoren, bzw. Interaktionspartnern gesucht werden, mit denen AHK5 eine H₂O₂-spezifische Reaktion auslöst. Um eine Auswahl an möglichen Interaktionspartnern zu bekommen, könnte eine Ko-Immunopräzipitation mittels AHK5-spezifischer Antikörper weiterhelfen. Diese Interaktionen sollten anschließend mittels BiFC bzw. FLIM verifiziert werden.

Schließlich gilt es herauszufinden, bei welchen weiteren H₂O₂-abhängigen Prozessen und Reaktionswegen AHK5 spezifisch beteiligt ist. Jedoch sind H₂O₂-abhängige Signalwege eng mit denen von Stickstoffmonoxid (NO) verknüpft (Neill et al., 2002b) und es ist bekannt, dass Nitrosylierungen von Histidin-Phosphotransferproteinen die Cytokinantwort reprimieren (Feng et al., 2013). Daher sollte ebenfalls untersucht werden, ob AHK5 auch Funktionen bei NO-abhängigen Funktionen besitzt.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden physiologische, zellbiologische und biochemische Studien durchgeführt, die der funktionellen und strukturellen Charakterisierung der noch wenig untersuchten *Arabidopsis* Histidinkinase 5 (AHK5) dienen.

Es ist bekannt, dass AHK5 Funktionen beim H₂O₂-abhängigem Schließen der Stomata (Desikan et al., 2008), dem Wurzelwachstum (Iwama et al., 2007) und der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress (Pham and Desikan, 2012, Pham et al., 2012) besitzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AHK5 eine Rolle bei der Blattseneszenz von *A. thaliana* spielt. Hierbei zeigen *ahk5*-Pflanzen eine Verzögerung bei der Blattseneszenz, was sich im Vergleich zum Wildtyp durch reduzierten Abbau von Chlorophyll, sowie reduzierte Lipidperoxidation nachweisen ließ. H₂O₂ spielt bei der Regulation der Seneszenz eine wichtige Rolle. Interessanterweise wurden keine signifikanten Unterschiede im *in planta* H₂O₂-Gehalt der untersuchten Linien während der Seneszenz nachgewiesen. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass zwischen *ahk5-1* und wildtypischen Pflanzen auch unter abiotischem und biotischem Stress, keine Unterschiede in der H₂O₂-Produktion existieren. Das bedeutet, dass AHK5 während der Seneszenz und der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress, keinen Einfluss auf die *in planta* H₂O₂-Produktion hat, jedoch Funktionen bei der Perzeption von H₂O₂ vermuten lässt.

Anhand von zellbiologischen Analysen konnte die subzelluläre Lokalisation von AHK5 im Zytoplasma und – für eine Histidinkinase einzigartig – im Zellkern nachgewiesen werden. Damit stellt AHK5 die einzige pflanzliche Hybrid-Histidinkinase dar, die auch im Zellkern lokalisiert ist. AHK5 könnte somit eine direkte H₂O₂-Perzeption und Signaltransduktion in den Zellkern ermöglichen. Des Weiteren wurde mittels FRET/FLIM-basierten Interaktionsstudien gezeigt, dass AHK5 in der Lage ist, Homodimere zu bilden. Ebenfalls konnten hierbei Interaktionen von AHK5 mit dem Ethylenrezeptor ETR1, sowie den NADPH-abhängigen Oxidasen AtRbohC, D und F *in planta* nachgewiesen werden. Diese Interaktionen könnten eine kontextabhängige Integration von H₂O₂-abhängigen Entwicklungsprozessen und weiteren Signalwegen, wie beispielsweise der Antwort auf Ethylen oder während der Immunantwort ermöglichen. Dagegen findet zwischen AHK5 und dem flg22 Rezeptor FLS2 keine direkte Interaktion statt.

Mit Hilfe von biochemischen Experimenten mit rekombinantem AHK5-Protein konnte erstmals die *in vitro* Phosphorylierung von AHP1 durch AHK5 gezeigt werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass AHK5 die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt. Dabei scheint diese Fähigkeit von der *Input*-Domäne von AHK5 abzuhängen bzw. signalabhängig zu sein. Des Weiteren wurde die H₂O₂-

bzw. redoxabhängige Dimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5 *in vitro* gezeigt, welche für die Funktion der AHK5 entscheidend sein könnte. Mittels fluoreszenzbasiertem, bakteriellem β -Galactosidaseaktivitätsnachweis konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Aktivität von AHK5 durch H_2O_2 regulierbar ist. Dabei sind die Aminosäurereste Cystein in Position drei, sowie Histidin in Position 376 der Aminosäuresequenz von AHK5 von essentieller Bedeutung. Anhand dieser Daten und der massenspektrometrischen Auswertungen kann davon ausgegangen werden, dass ein H_2O_2 -abhängiger Signalweg über AHK5 innerhalb eines MSPs (*Multi-Step Phosphorelays*) erfolgt. Dabei könnte eine H_2O_2 -induzierte Oxidation eine Dimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5 hervorrufen und damit zur H_2O_2 - bzw. redoxabhängigen Autophosphorylierung von AHK5 führen (Abbildung 24).

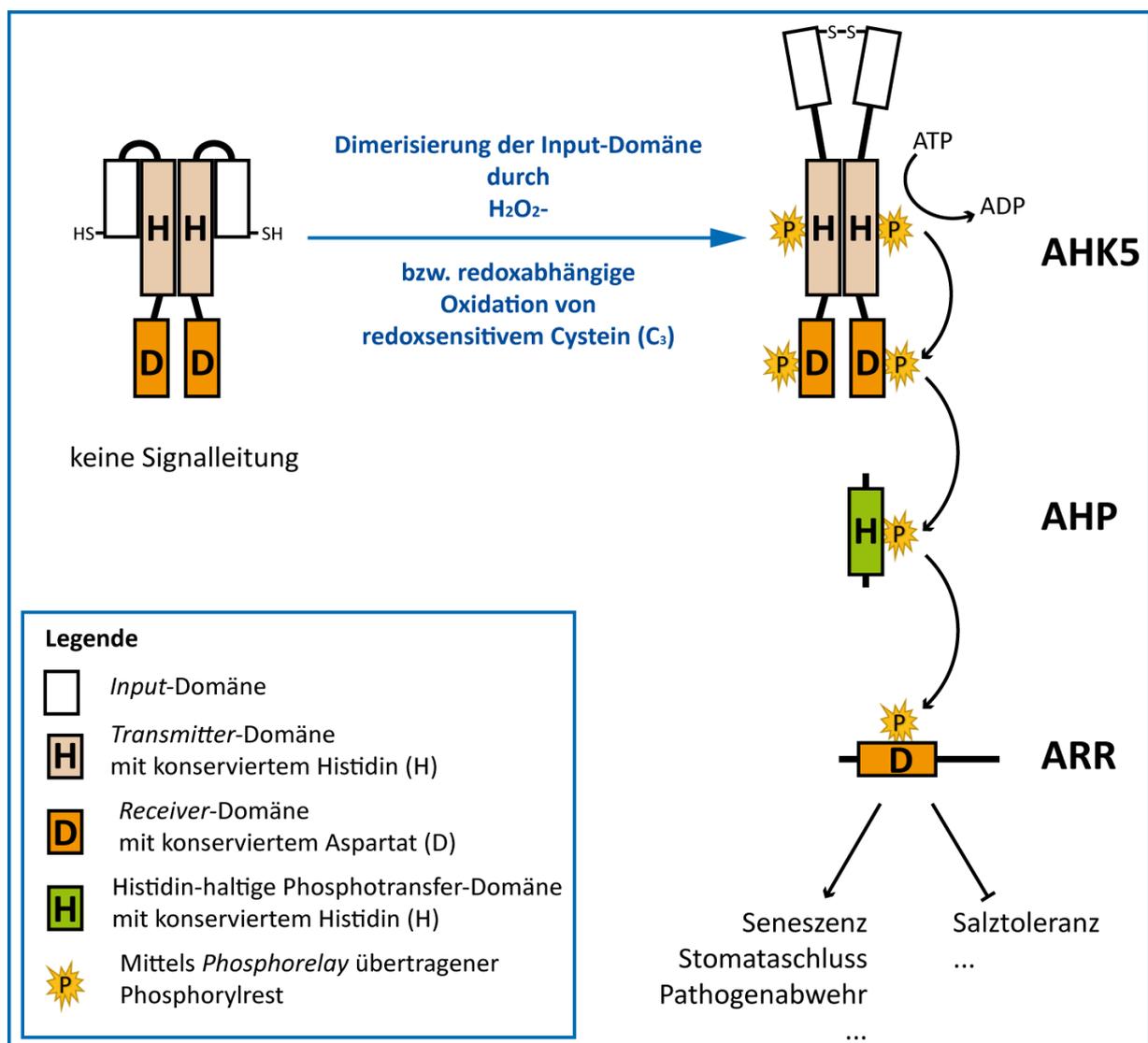


Abbildung 24: Model der H_2O_2 -Perzeption und Signalweiterleitung am Beispiel von AHK5. Links: in Abwesenheit von H_2O_2 zeigt AHK5 keine Aktivität und es findet demzufolge keine Signalleitung statt. Mitte: Durch H_2O_2 - bzw. redoxabhängige Oxidation von C_3 kommt es zur Ausbildung einer Disulfidbrückenbindung die zur Dimerisierung der *Input*-Domäne von AHK5 führt. Rechts: Die H_2O_2 - bzw. redoxaktivierte AHK5 autophosphoryliert an dem konservierten Histidinrest H_{376} in der *Transmitter*-Domäne. In der *Transmitter*-Domäne erfolgt ein intramolekularer Transfer des Phosphorylrests (P) auf ein in der *Receiver*-Domäne befindliches Aspartat (D). Ein Arabidopsis Transferprotein (AHP) übernimmt den Phosphorylrest von AHK5 und überträgt diesen auf einen Arabidopsis Responseregulator (ARR), was zu dessen Aktivierung und den angegebenen zellulären Antworten führt.

7 Literaturverzeichnis

- ABELES, F. B., DUNN, L. J., MORGENS, P., CALLAHAN, A., DINTERMAN, R. E. & SCHMIDT, J. 1988. Induction of 33-kD and 60-kD Peroxidases during Ethylene-Induced Senescence of Cucumber Cotyledons. *Plant Physiol*, 87, 609-15.
- ACHARD, P., RENO, J. P., BERTHOME, R., HARBERD, N. P. & GENSHIK, P. 2008. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol*, 18, 656-60.
- AHN, S. G. & THIELE, D. J. 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev*, 17, 516-28.
- ALVAREZ, M. E., PENNELL, R. I., MEIJER, P. J., ISHIKAWA, A., DIXON, R. A. & LAMB, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92, 773-84.
- AMASINO, R. 2005. 1955: kinetin arrives: the 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiol*, 138, 1177-84.
- APEL, K. & HIRT, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-99.
- ARGYROS, R. D., MATHEWS, D. E., CHIANG, Y. H., PALMER, C. M., THIBAUT, D. M., ETHERIDGE, N., ARGYROS, D. A., MASON, M. G., KIEBER, J. J. & SCHALLER, G. E. 2008. Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell*, 20, 2102-16.
- ASAI, T., TENA, G., PLOTNIKOVA, J., WILLMANN, M. R., CHIU, W. L., GOMEZ-GOMEZ, L., BOLLER, T., AUSUBEL, F. M. & SHEEN, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, 415, 977-83.
- BACK, A. & RICHMOND, A. 1969. An Interaction between the Effects of Kinetin and Gibberellin in Retarding Leaf Senescence. *Physiol Plant*, 22, 1207-16.
- BAILEY-SERRES, J. & MITTLER, R. 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol*, 141, 311.
- BALAZADEH, S., KWASNIEWSKI, M., CALDANA, C., MEHRNIA, M., ZANOR, M. I., XUE, G. P. & MUELLER-ROEBER, B. 2011. ORS1, an H₂O₂-responsive NAC transcription factor, controls senescence in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant*, 4, 346-60.
- BALAZADEH, S., SIDDIQUI, H., ALLU, A. D., MATAALLANA-RAMIREZ, L. P., CALDANA, C., MEHRNIA, M., ZANOR, M. I., KOHLER, B. & MUELLER-ROEBER, B. 2010. A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J*, 62, 250-64.
- BAUER, J., REISS, K., VEERABAGU, M., HEUNEMANN, M., HARTER, K. & STEHLE, T. 2013. Structure-function analysis of Arabidopsis thaliana histidine kinase AHK5 bound to its cognate phosphotransfer protein AHP1. *Mol Plant*, 6, 959-70.
- BECKER, W. 2012. Fluorescence lifetime imaging--techniques and applications. *J Microsc*, 247, 119-36.
- BENSCHOP, J. J., MOHAMMED, S., O'FLAHERTY, M., HECK, A. J., SLIJPER, M. & MENKE, F. L. 2007. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics*, 6, 1198-214.
- BIEKER, S., RIESTER, L., STAHL, M., FRANZARING, J. & ZENTGRAF, U. 2012. Senescence-specific alteration of hydrogen peroxide levels in Arabidopsis thaliana and oilseed rape spring variety Brassica napus L. cv. Mozart. *J Integr Plant Biol*, 54, 540-54.
- BIENERT, G. P., SCHJOERRING, J. K. & JAHN, T. P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 994-1003.
- BLEECKER, A. B. & KENDE, H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 1-18.

- BLUME, B., NURNBERGER, T., NASS, N. & SCHEEL, D. 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, 12, 1425-40.
- BOARD, P. G. & MENON, D. 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3267-88.
- BOLLER, T. & FELIX, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60, 379-406.
- BOLWELL, G. P., BINDSCHEDLER, L. V., BLEE, K. A., BUTT, V. S., DAVIES, D. R., GARDNER, S. L., GERRISH, C. & MINIBAYEVA, F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot*, 53, 1367-76.
- BRUNNER, F., ROSAHL, S., LEE, J., RUDD, J. J., GEILER, C., KAUPPINEN, S., RASMUSSEN, G., SCHEEL, D. & NURNBERGER, T. 2002. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J*, 21, 6681-8.
- BUCK, V., QUINN, J., SOTO PINO, T., MARTIN, H., SALDANHA, J., MAKINO, K., MORGAN, B. A. & MILLAR, J. B. 2001. Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Biol Cell*, 12, 407-19.
- CAESAR, K., THAMM, A. M., WITTHOFT, J., ELGASS, K., HUPPENBERGER, P., GREFFEN, C., HORAK, J. & HARTER, K. 2011. Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot*, 62, 5571-80.
- CANCEL, J. D. & LARSEN, P. B. 2002. Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 129, 1557-67.
- CASINO, P., RUBIO, V. & MARINA, A. 2009. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*, 139, 325-36.
- CHAMNONGPOL, S., WILLEKENS, H., MOEDER, W., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H., JR., VAN MONTAGU, M., INZE, D. & VAN CAMP, W. 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5818-23.
- CHANG, C., KWOK, S. F., BLEECKER, A. B. & MEYEROWITZ, E. M. 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262, 539-44.
- CHAOUCH, S. & NOCTOR, G. 2010. Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide. *New Phytol*, 188, 711-8.
- CHAVEZ, R. G., ALVAREZ, A. F., ROMEO, T. & GEORGELLIS, D. 2010. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol*, 192, 2009-12.
- CHINCHILLA, D., ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., KEMMERLING, B., NURNBERGER, T., JONES, J. D., FELIX, G. & BOLLER, T. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448, 497-500.
- COBBETT, C. S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 211-6.
- COLLIN, V., LAMKEMEYER, P., MIGINIAC-MASLOW, M., HIRASAWA, M., KNAFF, D. B., DIETZ, K. J. & ISSAKIDIS-BOURGUET, E. 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new γ -type. *Plant Physiol*, 136, 4088-95.
- COOPER, C. E., PATEL, R. P., BROOKES, P. S. & DARLEY-USMAR, V. M. 2002. Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem Sci*, 27, 489-92.
- D'AGOSTINO, I. B., DERUERE, J. & KIEBER, J. J. 2000. Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol*, 124, 1706-17.
- DAI, N., SCHAFFER, A., PETREIKOV, M., SHAHAK, Y., GILLER, Y., RATNER, K., LEVINE, A. & GRANOT, D. 1999. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell*, 11, 1253-66.

7. Literaturverzeichnis

- DAUTEL, R., WU, X. N., HEUNEMANN, M., SCHULZE, W. X. & HARTER, K. 2016. The Sensor Histidine Kinases AHK2 and AHK3 Proceed into Multiple Serine/Threonine/Tyrosine Phosphorylation Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 9, 182-6.
- DAUTEL R., W.X., S. & HARTER K unveröffentlicht. Functional Analysis of AHK1.
- DENG, Y., DONG, H., MU, J., REN, B., ZHENG, B., JI, Z., YANG, W. C., LIANG, Y. & ZUO, J. 2010. *Arabidopsis* histidine kinase CKI1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell*, 22, 1232-48.
- DESIKAN, R., HANCOCK, J. T., BRIGHT, J., HARRISON, J., WEIR, I., HOOLEY, R. & NEILL, S. J. 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 137, 831-4.
- DESIKAN, R., HANCOCK, J. T., ICHIMURA, K., SHINOZAKI, K. & NEILL, S. J. 2001a. Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol*, 126, 1579-87.
- DESIKAN, R., HORAK, J., CHABAN, C., MIRA-RODADO, V., WITTHOFT, J., ELGASS, K., GREFFEN, C., CHEUNG, M. K., MEIXNER, A. J., HOOLEY, R., NEILL, S. J., HANCOCK, J. T. & HARTER, K. 2008. The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. *PLoS One*, 3, e2491.
- DESIKAN, R., LAST, K., HARRETT-WILLIAMS, R., TAGLIAVIA, C., HARTER, K., HOOLEY, R., HANCOCK, J. T. & NEILL, S. J. 2006. Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *Plant J*, 47, 907-16.
- DESIKAN, R., NEILL, S. J. & HANCOCK, J. T. 2000. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic Biol Med*, 28, 773-8.
- DESIKAN, R., S, A. H.-M., HANCOCK, J. T. & NEILL, S. J. 2001b. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol*, 127, 159-72.
- DIXON, D. P., SKIPSEY, M., GRUNDY, N. M. & EDWARDS, R. 2005. Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 138, 2233-44.
- ELAD, N., MAIMON, T., FRENKIEL-KRISPIN, D., LIM, R. Y. & MEDALIA, O. 2009. Structural analysis of the nuclear pore complex by integrated approaches. *Curr Opin Struct Biol*, 19, 226-32.
- ELLIS, C. M., NAGPAL, P., YOUNG, J. C., HAGEN, G., GUILFOYLE, T. J. & REED, J. W. 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 132, 4563-74.
- FELIX, G., DURAN, J. D., VOLKO, S. & BOLLER, T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, 18, 265-76.
- FENG, J., WANG, C., CHEN, Q., CHEN, H., REN, B., LI, X. & ZUO, J. 2013. S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat Commun*, 4, 1529.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-47.
- FOREMAN, J., DEMIDCHIK, V., BOTHWELL, J. H., MYLONA, P., MIEDEMA, H., TORRES, M. A., LINSTEAD, P., COSTA, S., BROWNLEE, C., JONES, J. D., DAVIES, J. M. & DOLAN, L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422, 442-6.
- FOYER, C. H. & NOCTOR, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 1866-75.
- FOYER, C. H. & NOCTOR, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal*, 11, 861-905.
- GAN, S. & AMASINO, R. M. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270, 1986-8.
- GAO, Z., CHEN, Y. F., RANDLETT, M. D., ZHAO, X. C., FINDELL, J. L., KIEBER, J. J. & SCHALLER, G. E. 2003. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem*, 278, 34725-32.
- GATTOLIN, S., ALANDETE-SAEZ, M., ELLIOTT, K., GONZALEZ-CARRANZA, Z., NAOMAB, E., POWELL, C. & ROBERTS, J. A. 2006. Spatial and temporal expression of the response regulators ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 57, 4225-33.

- GECHEV, T. S. & HILLE, J. 2005. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol*, 168, 17-20.
- GECHEV, T. S., MINKOV, I. N. & HILLE, J. 2005. Hydrogen peroxide-induced cell death in Arabidopsis: transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life*, 57, 181-8.
- GECHEV, T. S., VAN BREUSEGEM, F., STONE, J. M., DENEV, I. & LALOI, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28, 1091-101.
- GOMEZ-GOMEZ, L. & BOLLER, T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell*, 5, 1003-11.
- GOMEZ-GOMEZ, L., FELIX, G. & BOLLER, T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 18, 277-84.
- GREEN, J., CRACK, J. C., THOMSON, A. J. & LEBRUN, N. E. 2009. Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol*, 12, 145-51.
- GREEN, J. & PAGET, M. S. 2004. Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol*, 2, 954-66.
- GRAFEN, C. & HARTEK, K. 2004. Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*, 219, 733-42.
- GRAFEN, C., OBRDLIK, P. & HARTEK, K. 2009. The determination of protein-protein interactions by the mating-based split-ubiquitin system (mbSUS). *Methods Mol Biol*, 479, 217-33.
- GRAFEN, C., STADELE, K., RUZICKA, K., OBRDLIK, P., HARTEK, K. & HORAK, J. 2008. Subcellular localization and in vivo interactions of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor family members. *Mol Plant*, 1, 308-20.
- GUO, H. & ECKER, J. R. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol*, 7, 40-9.
- GUPTA, R. & LUAN, S. 2003. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiol*, 132, 1149-52.
- HALL, A. E. & BLEECKER, A. B. 2003. Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the Arabidopsis ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell*, 15, 2032-41.
- HALLIWELL, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, 312-22.
- HALLIWELL, B. & FOYER, C. H. 1978. Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 139, 9-17.
- HANCOCK, J., DESIKAN, R., HARRISON, J., BRIGHT, J., HOOLEY, R. & NEILL, S. 2006. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J Exp Bot*, 57, 1711-8.
- HARDIN, S. C., LARUE, C. T., OH, M. H., JAIN, V. & HUBER, S. C. 2009. Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in Arabidopsis. *Biochem J*, 422, 305-12.
- HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 574-81.
- HASS, C., LOHRMANN, J., ALBRECHT, V., SWEERE, U., HUMMEL, F., YOO, S. D., HWANG, I., ZHU, T., SCHAFER, E., KUDLA, J. & HARTEK, K. 2004. The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in Arabidopsis. *EMBO J*, 23, 3290-302.
- HE, Y., FUKUSHIGE, H., HILDEBRAND, D. F. & GAN, S. 2002. Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiol*, 128, 876-84.
- HE, Y., TANG, W., SWAIN, J. D., GREEN, A. L., JACK, T. P. & GAN, S. 2001. Networking senescence-regulating pathways by using Arabidopsis enhancer trap lines. *Plant Physiol*, 126, 707-16.
- HECKER, A., WALLMERTH, N., PETER, S., BLATT, M. R., HARTEK, K. & GRAFEN, C. 2015. Binary 2in1 Vectors Improve in Planta (Co)localization and Dynamic Protein Interaction Studies. *Plant Physiol*, 168, 776-87.
- HEJATKO, J., PERNISOVA, M., ENEVA, T., PALME, K. & BRZOBOHATY, B. 2003. The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics*, 269, 443-53.

7. Literaturverzeichnis

- HEJATKO, J., RYU, H., KIM, G. T., DOBESOVA, R., CHOI, S., CHOI, S. M., SOUCEK, P., HORAK, J., PEKAROVA, B., PALME, K., BRZOBOHATY, B. & HWANG, I. 2009. The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in Arabidopsis shoots. *Plant Cell*, 21, 2008-21.
- HEUNEMANN, M., MIRA-RODADO, V., HARTEK, K. & WITTHOFT, J. unveröffentlicht. Nuclear localization signals in A-type response regulators of Arabidopsis thaliana.
- HEYL, A., WULFETANGE, K., PILS, B., NIELSEN, N., ROMANOV, G. A. & SCHMULLING, T. 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol*, 7, 62.
- HIGUCHI, M., PISCHKE, M. S., MAHONEN, A. P., MIYAWAKI, K., HASHIMOTO, Y., SEKI, M., KOBAYASHI, M., SHINOZAKI, K., KATO, T., TABATA, S., HELARIUTTA, Y., SUSSMAN, M. R. & KAKIMOTO, T. 2004. In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8821-6.
- HILL, K., MATHEWS, D. E., KIM, H. J., STREET, I. H., WILDES, S. L., CHIANG, Y. H., MASON, M. G., ALONSO, J. M., ECKER, J. R., KIEBER, J. J. & SCHALLER, G. E. 2013. Functional characterization of type-B response regulators in the Arabidopsis cytokinin response. *Plant Physiol*, 162, 212-24.
- HODGES, M. D., DELONG, M. J., FORNEY, F. C. & PRANGE, K. R. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- HONG, S. B., SEXTON, R. & TUCKER, M. L. 2000. Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiol*, 123, 869-81.
- HORAK, J., GREFFEN, C., BERENDZEN, K. W., HAHN, A., STIERHOF, Y. D., STADELHOFER, B., STAHL, M., KONCZ, C. & HARTEK, K. 2008. The Arabidopsis thaliana response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biol*, 8, 77.
- HORAK, J., JANDA, L., PEKAROVA, B. & HEJATKO, J. 2011. Molecular mechanisms of signalling specificity via phosphorelay pathways in Arabidopsis. *Curr Protein Pept Sci*, 12, 126-36.
- HOTHORN, M., DABI, T. & CHORY, J. 2011. Structural basis for cytokinin recognition by Arabidopsis thaliana histidine kinase 4. *Nat Chem Biol*, 7, 766-8.
- HUNG, K. T. & KAO, C. H. 2003. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J Plant Physiol*, 160, 871-9.
- HUNG, K. T. & KAO, C. H. 2004. Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid-induced senescence of rice leaves. *J Plant Physiol*, 161, 1347-57.
- HUTCHISON, C. E., LI, J., ARGUESO, C., GONZALEZ, M., LEE, E., LEWIS, M. W., MAXWELL, B. B., PERDUE, T. D., SCHALLER, G. E., ALONSO, J. M., ECKER, J. R. & KIEBER, J. J. 2006. The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, 18, 3073-87.
- HWANG, I., CHEN, H. C. & SHEEN, J. 2002. Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 129, 500-15.
- HWANG, I. & SHEEN, J. 2001. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*, 413, 383-9.
- IMAMURA, A., KIBA, T., TAJIMA, Y., YAMASHINO, T. & MIZUNO, T. 2003. In vivo and in vitro characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 44, 122-31.
- IMAMURA, A., YOSHINO, Y. & MIZUNO, T. 2001. Cellular localization of the signaling components of Arabidopsis His-to-Asp phosphorelay. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 2113-7.
- IMLAY, J. A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*, 77, 755-76.

- INOUE, T., HIGUCHI, M., HASHIMOTO, Y., SEKI, M., KOBAYASHI, M., KATO, T., TABATA, S., SHINOZAKI, K. & KAKIMOTO, T. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, 409, 1060-3.
- ISHIDA, K., YAMASHINO, T. & MIZUNO, T. 2008. Expression of the cytokinin-induced type-A response regulator gene ARR9 is regulated by the circadian clock in Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72, 3025-9.
- IWAMA, A., YAMASHINO, T., TANAKA, Y., SAKAKIBARA, H., KAKIMOTO, T., SATO, S., KATO, T., TABATA, S., NAGATANI, A. & MIZUNO, T. 2007. AHK5 histidine kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent abscisic acid and ethylene signaling pathway in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 48, 375-80.
- JANG, J. C., LEON, P., ZHOU, L. & SHEEN, J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, 9, 5-19.
- JARADAT, M. R., FEURTADO, J. A., HUANG, D., LU, Y. & CUTLER, A. J. 2013. Multiple roles of the transcription factor AtMYB1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. *BMC Plant Biol*, 13, 192.
- JASPERS, P. & KANGASJARVI, J. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant*, 138, 405-13.
- JEON, J., KIM, N. Y., KIM, S., KANG, N. Y., NOVAK, O., KU, S. J., CHO, C., LEE, D. J., LEE, E. J., STRNAD, M. & KIM, J. 2010. A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 285, 23371-86.
- JOO, J. H., BAE, Y. S. & LEE, J. S. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol*, 126, 1055-60.
- JU, C., YOON, G. M., SHEMANSKY, J. M., LIN, D. Y., YING, Z. I., CHANG, J., GARRETT, W. M., KESSENBROCK, M., GROTH, G., TUCKER, M. L., COOPER, B., KIEBER, J. J. & CHANG, C. 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19486-91.
- KAKIMOTO, T. 1996. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274, 982-5.
- KARIMI, M., INZE, D. & DEPICKER, A. 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, 7, 193-5.
- KARNIK, A., KARNIK, R. & GREFFEN, C. 2013. SDM-Assist software to design site-directed mutagenesis primers introducing "silent" restriction sites. *BMC Bioinformatics*, 14, 105.
- KARPINSKI, S., REYNOLDS, H., KARPINSKA, B., WINGSLE, G., CREISSEN, G. & MULLINEAUX, P. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. *Science*, 284, 654-7.
- KEE, J. M. & MUIR, T. W. 2012. Chasing phosphohistidine, an elusive sibling in the phosphoamino acid family. *ACS Chem Biol*, 7, 44-51.
- KELLER, A., MOHAMED, A., DROSE, S., BRANDT, U., FLEMING, I. & BRANDES, R. P. 2004. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Res*, 38, 1257-67.
- KHOKON, A. R., OKUMA, E., HOSSAIN, M. A., MUNEMASA, S., URAJI, M., NAKAMURA, Y., MORI, I. C. & MURATA, Y. 2011. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Environ*, 34, 434-43.
- KIBA, T., AOKI, K., SAKAKIBARA, H. & MIZUNO, T. 2004. Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. *Plant Cell Physiol*, 45, 1063-77.
- KIBA, T., YAMADA, H. & MIZUNO, T. 2002. Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 histidine kinase in roots of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 43, 1059-66.
- KIEBER, J. J., ROTHENBERG, M., ROMAN, G., FELDMANN, K. A. & ECKER, J. R. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 72, 427-41.

7. Literaturverzeichnis

- KIEBER, J. J. & SCHALLER, G. E. 2014. Cytokinins. *Arabidopsis Book*, 12, e0168.
- KIM, C., MESKAUSKIENE, R., APEL, K. & LALOI, C. 2008. No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO Rep*, 9, 435-9.
- KIM, H. J., RYU, H., HONG, S. H., WOO, H. R., LIM, P. O., LEE, I. C., SHEEN, J., NAM, H. G. & HWANG, I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 814-9.
- KIM, J. I., MURPHY, A. S., BAEK, D., LEE, S. W., YUN, D. J., BRESSAN, R. A. & NARASIMHAN, M. L. 2011. YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot*, 62, 3981-92.
- KIMURA, S., KAWARAZAKI, T., NIBORI, H., MICHIKAWA, M., IMAI, A., KAYA, H. & KUCHITSU, K. 2013. The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of Arabidopsis NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system. *J Biochem*, 153, 191-5.
- KIMURA, S., KAYA, H., KAWARAZAKI, T., HIRAOKA, G., SENZAKI, E., MICHIKAWA, M. & KUCHITSU, K. 2012. Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 398-405.
- KNAPP, G. S., TSAI, J. W. & HU, J. C. 2009. The oligomerization of OxyR in Escherichia coli. *Protein Sci*, 18, 101-7.
- KONCZ, C. A. S., J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet*.
- KORSHUNOV, S. & IMLAY, J. A. 2010. Two sources of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 75, 1389-401.
- KOTAK, S., VIERLING, E., BAUMLEIN, H. & VON KOSKULL-DORING, P. 2007. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 182-95.
- KOVTUN, Y., CHIU, W. L., TENA, G. & SHEEN, J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2940-5.
- KRIEGER-LISZKAY, A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot*, 56, 337-46.
- KUNZE, G., ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., NIEHAUS, K., BOLLER, T. & FELIX, G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell*, 16, 3496-507.
- KWAK, J. M., MORI, I. C., PEI, Z. M., LEONHARDT, N., TORRES, M. A., DANGL, J. L., BLOOM, R. E., BODDE, S., JONES, J. D. & SCHROEDER, J. I. 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J*, 22, 2623-33.
- LECOURIEUX, D., MAZARS, C., PAULY, N., RANJEVA, R. & PUGIN, A. 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in Nicotiana plumbaginifolia cells. *Plant Cell*, 14, 2627-41.
- LEIBFRIED, A., TO, J. P., BUSCH, W., STEHLING, S., KEHLE, A., DEMAR, M., KIEBER, J. J. & LOHMANN, J. U. 2005. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438, 1172-5.
- LEMAIRE, S. D. 2004. The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynth Res*, 79, 305-18.
- LI, Z., PENG, J., WEN, X. & GUO, H. 2012. Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of Arabidopsis leaf senescence. *J Integr Plant Biol*, 54, 526-39.
- LIM, P. O., KIM, H. J. & NAM, H. G. 2007. Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol*, 58, 115-36.
- LIM, P. O., LEE, I. C., KIM, J., KIM, H. J., RYU, J. S., WOO, H. R. & NAM, H. G. 2010. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot*, 61, 1419-30.
- LIM, P. O., WOO, H. R. & NAM, H. G. 2003. Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 8, 272-8.

- LINDERMAYR, C., SELL, S., MULLER, B., LEISTER, D. & DURNER, J. 2010. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell*, 22, 2894-907.
- LOHRMANN, J. & HARTEK, K. 2002. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol*, 128, 363-9.
- LOHRMANN, J., SWEERE, U., ZABALETA, E., BAURLE, I., KEITEL, C., KOZMA-BOGNAR, L., BRENNICKE, A., SCHAFER, E., KUDLA, J. & HARTEK, K. 2001. The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics*, 265, 2-13.
- LOMIN, S. N., YONEKURA-SAKAKIBARA, K., ROMANOV, G. A. & SAKAKIBARA, H. 2011. Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J Exp Bot*, 62, 5149-59.
- LUDWIG, A. A., SAITOH, H., FELIX, G., FREYMARK, G., MIERSCH, O., WASTERACK, C., BOLLER, T., JONES, J. D. & ROMEIS, T. 2005. Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10736-41.
- MAEDA, T., WURGLER-MURPHY, S. M. & SAITO, H. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369, 242-5.
- MAHONEN, A. P., BISHOPP, A., HIGUCHI, M., NIEMINEN, K. M., KINOSHITA, K., TORMAKANGAS, K., IKEDA, Y., OKA, A., KAKIMOTO, T. & HELARIUTTA, Y. 2006a. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, 311, 94-8.
- MAHONEN, A. P., HIGUCHI, M., TORMAKANGAS, K., MIYAWAKI, K., PISCHKE, M. S., SUSSMAN, M. R., HELARIUTTA, Y. & KAKIMOTO, T. 2006b. Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 16, 1116-22.
- MARINA, A., MOTT, C., AUYZENBERG, A., HENDRICKSON, W. A. & WALDBURGER, C. D. 2001. Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *J Biol Chem*, 276, 41182-90.
- MARTIN, G. B., BOGDANOVE, A. J. & SESSA, G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 23-61.
- MASON, M. G., LI, J., MATHEWS, D. E., KIEBER, J. J. & SCHALLER, G. E. 2004. Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 135, 927-37.
- MASON, M. G., MATHEWS, D. E., ARGYROS, D. A., MAXWELL, B. B., KIEBER, J. J., ALONSO, J. M., ECKER, J. R. & SCHALLER, G. E. 2005. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 3007-18.
- MAYERHOFER, H., PANNEERSELVAM, S., KALJUNEN, H., TUUKKANEN, A., MERTENS, H. D. & MUELLER-DIECKMANN, J. 2015. Structural model of the cytosolic domain of the plant ethylene receptor 1 (ETR1). *J Biol Chem*, 290, 2644-58.
- MCCABE, M. S., GARRATT, L. C., SCHEPERS, F., JORDI, W. J., STOOPEN, G. M., DAVELAAR, E., VAN RHIJN, J. H., POWER, J. B. & DAVEY, M. R. 2001. Effects of P(SAG12)-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol*, 127, 505-16.
- MCCLUNG, C. R. 2006. Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, 18, 792-803.
- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., KOCZAN, J., NOMURA, K. & HE, S. Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126, 969-80.
- MERCHANTE, C., ALONSO, J. M. & STEPANOVA, A. N. 2013. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 16, 554-60.
- MEYER, A. J., BRACH, T., MARTY, L., KREYE, S., ROUHIER, N., JACQUOT, J. P. & HELL, R. 2007. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J*, 52, 973-86.
- MHAMDI, A., HAGER, J., CHAOUCH, S., QUEVAL, G., HAN, Y., TACONNAT, L., SAINDRENAN, P., GOUIA, H., ISSAKIDIS-BOURGUET, E., RENO, J. P. & NOCTOR, G. 2010. *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol*, 153, 1144-60.

7. Literaturverzeichnis

- MIAO, Y. & ZENTGRAF, U. 2010. A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates Arabidopsis leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53. *Plant J*, 63, 179-88.
- MILLER, G. & MITTLER, R. 2006. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot*, 98, 279-88.
- MILLER, G., SCHLAUCH, K., TAM, R., CORTES, D., TORRES, M. A., SHULAEV, V., DANGL, J. L. & MITTLER, R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal*, 2, ra45.
- MILLER, G., SHULAEV, V. & MITTLER, R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant*, 133, 481-9.
- MILLER, G., SUZUKI, N., CIFTCI-YILMAZ, S. & MITTLER, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*, 33, 453-67.
- MIRA-RODADO, V., SWEERE, U., GREFEN, C., KUNKEL, T., FEJES, E., NAGY, F., SCHAFFER, E. & HARTER, K. 2007. Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in Arabidopsis. *J Exp Bot*, 58, 2595-607.
- MIRA-RODADO, V., VEERABAGU, M., WITTHOFT, J., TEPLY, J., HARTER, K. & DESIKAN, R. 2012. Identification of two-component system elements downstream of AHK5 in the stomatal closure response of Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav*, 7, 1467-76.
- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M. & VAN BREUSEGEM, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9, 490-8.
- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., SUZUKI, N., MILLER, G., TOGNETTI, V. B., VANDEPOELE, K., GOLLERY, M., SHULAEV, V. & VAN BREUSEGEM, F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*, 16, 300-9.
- MIZUNO, T. & MIZUSHIMA, S. 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol Microbiol*, 4, 1077-82.
- MIZUNO, T. & NAKAMICHI, N. 2005. Pseudo-Response Regulators (PRRs) or True Oscillator Components (TOCs). *Plant Cell Physiol*, 46, 677-85.
- MOORE, B. 2004. Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends Plant Sci*, 9, 221-8.
- MOORE, B., ZHOU, L., ROLLAND, F., HALL, Q., CHENG, W. H., LIU, Y. X., HWANG, I., JONES, T. & SHEEN, J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300, 332-6.
- MOORE, M. S. 1998. Ran and nuclear transport. *J Biol Chem*, 273, 22857-60.
- MOUSSATCHE, P. & KLEE, H. J. 2004. Autophosphorylation activity of the Arabidopsis ethylene receptor multigene family. *J Biol Chem*, 279, 48734-41.
- MUELLER, K., BITTEL, P., CHINCHILLA, D., JEHLE, A. K., ALBERT, M., BOLLER, T. & FELIX, G. 2012. Chimeric FLS2 receptors reveal the basis for differential flagellin perception in Arabidopsis and tomato. *Plant Cell*, 24, 2213-24.
- MULLER-DIECKMANN, H. J., GRANTZ, A. A. & KIM, S. H. 1999. The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1. *Structure*, 7, 1547-56.
- MULLER, B. & SHEEN, J. 2008. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, 453, 1094-7.
- MURATA, Y., PEI, Z. M., MORI, I. C. & SCHROEDER, J. 2001. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in abi1-1 and abi2-1 protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, 13, 2513-23.
- NAKAGAMI, H., KIEGERL, S. & HIRT, H. 2004. OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem*, 279, 26959-66.
- NASEEM, M., KALTDORF, M. & DANDEKAR, T. 2015. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J Exp Bot*, 66, 4885-96.

- NAVARRO, L., DUNOYER, P., JAY, F., ARNOLD, B., DHARMASIRI, N., ESTELLE, M., VOINNET, O. & JONES, J. D. 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312, 436-9.
- NEILL, S., DESIKAN, R. & HANCOCK, J. 2002a. Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 5, 388-95.
- NEILL, S. J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R. D. & HANCOCK, J. T. 2002b. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot*, 53, 1237-47.
- NISHIMURA, C., OHASHI, Y., SATO, S., KATO, T., TABATA, S. & UEGUCHI, C. 2004. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16, 1365-77.
- NOCTOR, G. & FOYER, C. H. 1998. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 249-279.
- NOH, Y. S. & AMASINO, R. M. 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol Biol*, 41, 181-94.
- NUHSE, T. S., BOTTRILL, A. R., JONES, A. M. & PECK, S. C. 2007. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J*, 51, 931-40.
- NURNBERGER, T. & BRUNNER, F. 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol*, 5, 318-24.
- NURNBERGER, T. & LIPKA, V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol*, 6, 335-45.
- OGASAWARA, Y., KAYA, H., HIRAOKA, G., YUMOTO, F., KIMURA, S., KADOTA, Y., HISHINUMA, H., SENZAKI, E., YAMAGOE, S., NAGATA, K., NARA, M., SUZUKI, K., TANOKURA, M. & KUCHITSU, K. 2008. Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J Biol Chem*, 283, 8885-92.
- OH, S. A., PARK, J. H., LEE, G. I., PAEK, K. H., PARK, S. K. & NAM, H. G. 1997. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 12, 527-35.
- OKA, A., SAKAI, H. & IWAKOSHI, S. 2002. His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in Arabidopsis thaliana. *Genes Genet Syst*, 77, 383-91.
- ORI, N., JUAREZ, M. T., JACKSON, D., YAMAGUCHI, J., BANOWETZ, G. M. & HAKE, S. 1999. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene knotted1 under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell*, 11, 1073-80.
- OROZCO-CARDENAS, M. & RYAN, C. A. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6553-7.
- OTA, I. M. & VARSHAVSKY, A. 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*, 262, 566-9.
- PANCHUK, II, ZENTGRAF, U. & VOLKOV, R. A. 2005. Expression of the Apx gene family during leaf senescence of Arabidopsis thaliana. *Planta*, 222, 926-32.
- PARKINSON, J. S. & KOFOID, E. C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet*, 26, 71-112.
- PAWLOWSKI, R., RAJAKYLA, E. K., VARTIAINEN, M. K. & TREISMAN, R. 2010. An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J*, 29, 3448-58.
- PEARCE, G., MOURA, D. S., STRATMANN, J. & RYAN, C. A., JR. 2001. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12843-7.
- PEI, Z. M., MURATA, Y., BENNING, G., THOMINE, S., KLUSENER, B., ALLEN, G. J., GRILL, E. & SCHROEDER, J. I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406, 731-4.

7. Literaturverzeichnis

- PEKAROVA, B., KLUMPLER, T., TRISKOVA, O., HORAK, J., JANSEN, S., DOPITOVA, R., BORKOVCOVA, P., PAPOUSKOVA, V., NEJEDLA, E., SKLENAR, V., MAREK, J., ZIDEK, L., HEJATKO, J. & JANDA, L. 2011. Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 67, 827-39.
- PEKAROVA, B., SZMITKOWSKA, A., DOPITOVA, R., DEGTJARIK, O., ZIDEK, L. & HEJATKO, J. 2016. Structural Aspects of Multistep Phosphorelay-Mediated Signaling in Plants. *Mol Plant*, 9, 71-85.
- PETROV, V. D. & VAN BREUSEGEM, F. 2012. Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants*, 2012, pls014.
- PHAM, J. & DESIKAN, R. 2012. Modulation of ROS production and hormone levels by AHK5 during abiotic and biotic stress signaling. *Plant Signal Behav*, 7, 893-7.
- PHAM, J., LIU, J., BENNETT, M. H., MANSFIELD, J. W. & DESIKAN, R. 2012. Arabidopsis histidine kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection. *New Phytol*, 194, 168-80.
- PIETERSE, C. M. & DICKE, M. 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci*, 12, 564-9.
- PRASAD, T. K., ANDERSON, M. D., MARTIN, B. A. & STEWART, C. R. 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *Plant Cell*, 6, 65-74.
- PRILUSKY, J., FELDER, C. E., ZEEV-BEN-MORDEHAI, T., RYDBERG, E. H., MAN, O., BECKMANN, J. S., SILMAN, I. & SUSSMAN, J. L. 2005. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics*, 21, 3435-8.
- PRIME, A. P. G., CONRATH, U., BECKERS, G. J., FLORS, V., GARCIA-AGUSTIN, P., JAKAB, G., MAUCH, F., NEWMAN, M. A., PIETERSE, C. M., POINSSOT, B., POZO, M. J., PUGIN, A., SCHAFFRATH, U., TON, J., WENDEHENNE, D., ZIMMERLI, L. & MAUCH-MANI, B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 1062-71.
- PUNWANI, J. A., HUTCHISON, C. E., SCHALLER, G. E. & KIEBER, J. J. 2010. The subcellular distribution of the Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *Plant J*, 62, 473-82.
- QU, X., HALL, B. P., GAO, Z. & SCHALLER, G. E. 2007. A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on Arabidopsis plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. *BMC Plant Biol*, 7, 3.
- QUEVAL, G., JAILLARD, D., ZECHMANN, B. & NOCTOR, G. 2011. Increased intracellular H(2)O(2) availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ*, 34, 21-32.
- QUIRINO, B. F., NOH, Y. S., HIMELBLAU, E. & AMASINO, R. M. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci*, 5, 278-82.
- RANF, S., WUNNENBERG, P., LEE, J., BECKER, D., DUNKEL, M., HEDRICH, R., SCHEEL, D. & DIETRICH, P. 2008. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J*, 53, 287-99.
- RAO, M. V. & DAVIS, K. R. 2001. The physiology of ozone induced cell death. *Planta*, 213, 682-90.
- RAO, M. V., LEE, H. I. & DAVIS, K. R. 2002. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J*, 32, 447-56.
- REN, B., LIANG, Y., DENG, Y., CHEN, Q., ZHANG, J., YANG, X. & ZUO, J. 2009. Genome-wide comparative analysis of type-A Arabidopsis response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. *Cell Res*, 19, 1178-90.
- RESH, M. D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1451, 1-16.
- RIECHMANN, J. L., HEARD, J., MARTIN, G., REUBER, L., JIANG, C., KEDDIE, J., ADAM, L., PINEDA, O., RATCLIFFE, O. J., SAMAHA, R. R., CREELMAN, R., PILGRIM, M., BROWN, P., ZHANG, J. Z.,

- GHANDEHARI, D., SHERMAN, B. K. & YU, G. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290, 2105-10.
- RIEFLER, M., NOVAK, O., STRNAD, M. & SCHMULLING, T. 2006. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, 18, 40-54.
- ROCHON, A., BOYLE, P., WIGNES, T., FOBERT, P. R. & DESPRES, C. 2006. The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell*, 18, 3670-85.
- ROMANOV, G. A., LOMIN, S. N. & SCHMULLING, T. 2006. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot*, 57, 4051-8.
- ROUHIER, N., GELHAYE, E., SAUTIERE, P. E., BRUN, A., LAURENT, P., TAGU, D., GERARD, J., DE FAY, E., MEYER, Y. & JACQUOT, J. P. 2001. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol*, 127, 1299-309.
- SADANANDOM, A., POGHOSYAN, Z., FAIRBAIRN, D. J. & MURPHY, D. J. 2000. Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 123, 255-64.
- SAGI, M., DAVYDOV, O., ORAZOVA, S., YESBERGENOVA, Z., OPHIR, R., STRATMANN, J. W. & FLUHR, R. 2004. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell*, 16, 616-28.
- SAHU, S. N., ACHARYA, S., TUMINARO, H., PATEL, I., DUDLEY, K., LECLERC, J. E., CEBULA, T. A. & MUKHOPADHYAY, S. 2003. The bacterial adaptive response gene, *barA*, encodes a novel conserved histidine kinase regulatory switch for adaptation and modulation of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Cell Biochem*, 253, 167-77.
- SAKAI, H., AOYAMA, T. & OKA, A. 2000. Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J*, 24, 703-11.
- SAKAI, H., HONMA, T., AOYAMA, T., SATO, S., KATO, T., TABATA, S. & OKA, A. 2001. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 294, 1519-21.
- SALOME, P. A., TO, J. P., KIEBER, J. J. & MCCLUNG, C. R. 2006. Arabidopsis response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell*, 18, 55-69.
- SAMBROOK ER, R. D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3rd Edition.
- SCHALLER, G. E., DOI, K., HWANG, I., KIEBER, J. J., KHURANA, J. P., KURATA, N., MIZUNO, T., PAREEK, A., SHIU, S. H., WU, P. & YIP, W. K. 2007. Nomenclature for two-component signaling elements of rice. *Plant Physiol*, 143, 555-7.
- SCHALLER, G. E., KIEBER, J. J. & SHIU, S. H. 2008. Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arabidopsis Book*, 6, e0112.
- SCHAREIN, B. & GROTH, G. 2011. Phosphorylation alters the interaction of the Arabidopsis phosphotransfer protein AHP1 with its sensor kinase ETR1. *PLoS One*, 6, e24173.
- SCHRAUDNER, M., MOEDER, W., WIESE, C., CAMP, W. V., INZE, D., LANGEBARTELS, C. & SANDERMANN, H., JR. 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J*, 16, 235-45.
- SCHURMANN, P. & JACQUOT, J. P. 2000. Plant Thioredoxin Systems Revisited. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51, 371-400.
- SHANKS, C. M., RICE, J. H., ZUBO, Y., SCHALLER, G. E., HEWEZI, T. & KIEBER, J. J. 2016. The Role of Cytokinin During Infection of Arabidopsis thaliana by the Cyst Nematode Heterodera schachtii. *Mol Plant Microbe Interact*, 29, 57-68.
- SHIU, S. H. & BLEECKER, A. B. 2003. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 132, 530-43.

7. Literaturverzeichnis

- SINGH, K. K. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic Biol Med*, 29, 1043-50.
- SIRICHANDRA, C., GU, D., HU, H. C., DAVANTURE, M., LEE, S., DJAOUI, M., VALOT, B., ZIVY, M., LEUNG, J., MERLOT, S. & KWAK, J. M. 2009. Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett*, 583, 2982-6.
- SMYKOWSKI, A., ZIMMERMANN, P. & ZENTGRAF, U. 2010. G-Box binding factor1 reduces CATALASE2 expression and regulates the onset of leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 153, 1321-31.
- SPICHAL, L. 2011. Bacterial assay to study plant sensor histidine kinases. *Methods Mol Biol*, 779, 139-47.
- STOCK, A. M. & GUHANIYOGI, J. 2006. A new perspective on response regulator activation. *J Bacteriol*, 188, 7328-30.
- STOCK, A. M., ROBINSON, V. L. & GOUDREAU, P. N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, 183-215.
- STREET, I. H., AMAN, S., ZUBO, Y., RAMZAN, A., WANG, X., SHAKEEL, S. N., KIEBER, J. J. & SCHALLER, G. E. 2015. Ethylene Inhibits Cell Proliferation of the Arabidopsis Root Meristem. *Plant Physiol*, 169, 338-50.
- SUHITA, D., RAGHAVENDRA, A. S., KWAK, J. M. & VAVASSEUR, A. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol*, 134, 1536-45.
- SUZUKI, N., MILLER, G., SALAZAR, C., MONDAL, H. A., SHULAEV, E., CORTES, D. F., SHUMAN, J. L., LUO, X., SHAH, J., SCHLAUCH, K., SHULAEV, V. & MITTLER, R. 2013. Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *Plant Cell*, 25, 3553-69.
- SUZUKI, N. & MITTLER, R. 2012. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. *Free Radic Biol Med*, 53, 2269-76.
- SUZUKI, T., MIWA, K., ISHIKAWA, K., YAMADA, H., AIBA, H. & MIZUNO, T. 2001. The Arabidopsis sensor His-kinase, AHk4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol*, 42, 107-13.
- SWEERE, U., EICHENBERG, K., LOHRMANN, J., MIRA-RODADO, V., BAURLE, I., KUDLA, J., NAGY, F., SCHAFFER, E. & HARTER, K. 2001. Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, 294, 1108-11.
- SZEKERES, M. 2003. Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. *Trends Plant Sci*, 8, 102-4.
- TAJIMA, Y., IMAMURA, A., KIBA, T., AMANO, Y., YAMASHINO, T. & MIZUNO, T. 2004. Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 45, 28-39.
- TAKEDA, S., GAPPER, C., KAYA, H., BELL, E., KUCHITSU, K. & DOLAN, L. 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*, 319, 1241-4.
- TO, J. P., DERUERE, J., MAXWELL, B. B., MORRIS, V. F., HUTCHISON, C. E., FERREIRA, F. J., SCHALLER, G. E. & KIEBER, J. J. 2007. Cytokinin regulates type-A Arabidopsis Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell*, 19, 3901-14.
- TO, J. P., HABERER, G., FERREIRA, F. J., DERUERE, J., MASON, M. G., SCHALLER, G. E., ALONSO, J. M., ECKER, J. R. & KIEBER, J. J. 2004. Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, 16, 658-71.
- TO, J. P. & KIEBER, J. J. 2008. Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci*, 13, 85-92.
- TORRES, M. A. & DANGL, J. L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 397-403.
- TORRES, M. A., DANGL, J. L. & JONES, J. D. 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 517-22.

- TRAN, L. S., URAO, T., QIN, F., MARUYAMA, K., KAKIMOTO, T., SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20623-8.
- UEDA, J. & KATO, J. 1980. Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol*, 66, 246-9.
- UEGUCHI, C., SATO, S., KATO, T. & TABATA, S. 2001. The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 42, 751-5.
- URAO, T., YAKUBOV, B., SATOH, R., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SEKI, M., HIRAYAMA, T. & SHINOZAKI, K. 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 11, 1743-54.
- URAO, T., YAKUBOV, B., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. 1998. Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett*, 427, 175-8.
- VAN DER GRAAFF, E., SCHWACKE, R., SCHNEIDER, A., DESIMONE, M., FLUGGE, U. I. & KUNZE, R. 2006. Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol*, 141, 776-92.
- VANACKER, H., CARVER, T. L. & FOYER, C. H. 2000. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol*, 123, 1289-300.
- VANDERAUWERA, S., ZIMMERMANN, P., ROMBAUTS, S., VANDENABEELE, S., LANGEBARTELS, C., GRUISSEM, W., INZE, D. & VAN BREUSEGEM, F. 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol*, 139, 806-21.
- VEERABAGU, M., ELGASS, K., KIRCHLER, T., HUPPENBERGER, P., HARTER, K., CHABAN, C. & MIRARODADO, V. 2012. The Arabidopsis B-type response regulator 18 homomerizes and positively regulates cytokinin responses. *Plant J*, 72, 721-31.
- VLOT, A. C., DEMPSEY, D. A. & KLESSIG, D. F. 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 177-206.
- VRANOVA, E., INZE, D. & VAN BREUSEGEM, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot*, 53, 1227-36.
- WANG, R. & BRATTAIN, M. G. 2007. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett*, 581, 3164-70.
- WEAVER, L. M., GAN, S., QUIRINO, B. & AMASINO, R. M. 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol*, 37, 455-69.
- WEST, A. H. & STOCK, A. M. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci*, 26, 369-76.
- WOHLBACH, D. J., QUIRINO, B. F. & SUSSMAN, M. R. 2008. Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell*, 20, 1101-17.
- WOO, H. R., GOH, C. H., PARK, J. H., TEYSSENDER DE LA SERVE, B., KIM, J. H., PARK, Y. I. & NAM, H. G. 2002. Extended leaf longevity in the ore4-1 mutant of Arabidopsis with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J*, 31, 331-40.
- WU, A., ALLU, A. D., GARAPATI, P., SIDDIQUI, H., DORTAY, H., ZANOR, M. I., ASENSI-FABADO, M. A., MUNNE-BOSCH, S., ANTONIO, C., TOHGE, T., FERNIE, A. R., KAUFMANN, K., XUE, G. P., MUELLER-ROEBER, B. & BALAZADEH, S. 2012. JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24, 482-506.

7. Literaturverzeichnis

- WULFETANGE, K., LOMIN, S. N., ROMANOV, G. A., STOLZ, A., HEYL, A. & SCHMULLING, T. 2011. The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol*, 156, 1808-18.
- XIE, Y., HUHN, K., BRANDT, R., POTSCHEIN, M., BIEKER, S., STRAUB, D., DOLL, J., DRECHSLER, T., ZENTGRAF, U. & WENKEL, S. 2014. REVOLUTA and WRKY53 connect early and late leaf development in Arabidopsis. *Development*, 141, 4772-83.
- YAMADA, H., SUZUKI, T., TERADA, K., TAKEI, K., ISHIKAWA, K., MIWA, K., YAMASHINO, T. & MIZUNO, T. 2001. The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol*, 42, 1017-23.
- YANG, S. D., SEO, P. J., YOON, H. K. & PARK, C. M. 2011. The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *Plant Cell*, 23, 2155-68.
- YE, Z., RODRIGUEZ, R., TRAN, A., HOANG, H., DE LOS SANTOS, D., BROWN, S. & VELLANOWETH, R. L. 2000. The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in Arabidopsis thaliana. *Plant Sci*, 158, 115-127.
- YOSHIOKA, H., NUMATA, N., NAKAJIMA, K., KATOU, S., KAWAKITA, K., ROWLAND, O., JONES, J. D. & DOKE, N. 2003. Nicotiana benthamiana gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to Phytophthora infestans. *Plant Cell*, 15, 706-18.
- ZDARSKA, M., DOBISOVA, T., GELOVA, Z., PERNISOVA, M., DABRAVOLSKI, S. & HEJATKO, J. 2015. Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. *J Exp Bot*, 66, 4913-31.
- ZHAO, Z., ANDERSEN, S. U., LJUNG, K., DOLEZAL, K., MIOTK, A., SCHULTHEISS, S. J. & LOHMANN, J. U. 2010. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, 465, 1089-92.
- ZHONG, M., OROSZ, A. & WU, C. 1998. Direct sensing of heat and oxidation by Drosophila heat shock transcription factor. *Mol Cell*, 2, 101-8.
- ZIMMERMANN, P., HEINLEIN, C., ORENDI, G. & ZENTGRAF, U. 2006. Senescence-specific regulation of catalases in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant Cell Environ*, 29, 1049-60.
- ZIPFEL, C., KUNZE, G., CHINCHILLA, D., CANIARD, A., JONES, J. D., BOLLER, T. & FELIX, G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*, 125, 749-60.
- ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., NAVARRO, L., OAKELEY, E. J., JONES, J. D., FELIX, G. & BOLLER, T. 2004. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, 428, 764-7.
- ZU, X. L., BESANT, P. G., IMHOF, A. & ATTWOOD, P. V. 2007. Mass spectrometric analysis of protein histidine phosphorylation. *Amino Acids*, 32, 347-57.
- ZWACK, P. J. & RASHOTTE, A. M. 2015. Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J Exp Bot*, 66, 4863-71.

8 Anhang

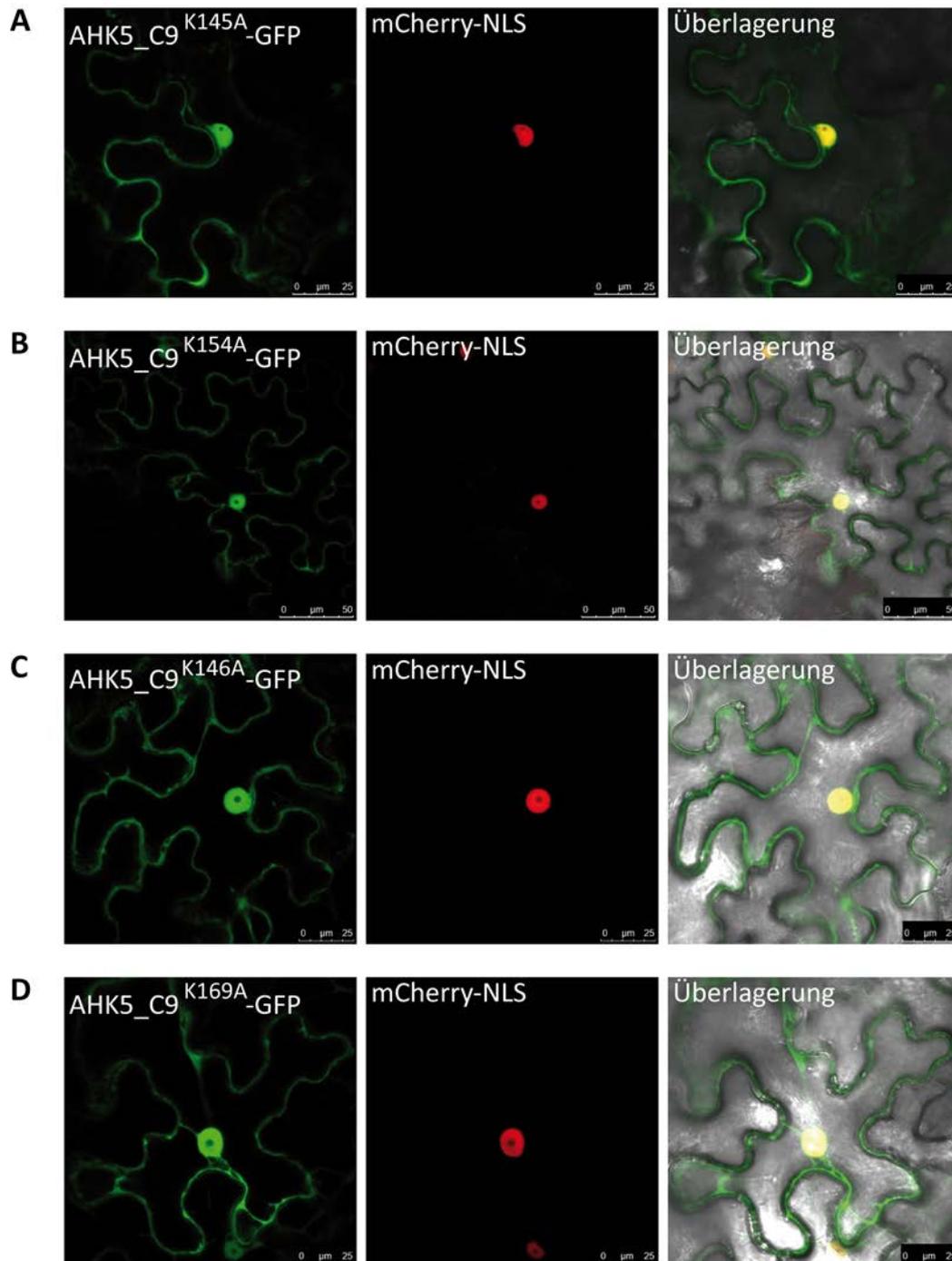


Abbildung A 1: Subzelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine verschiedener mutanter Varianten von AHK5_C9 in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana*. **(A)** AHK5_C9^{K145A}-GFP, **(B)** AHK5_C9^{K154A}-GFP, **(C)** AHK5_C9^{K146A}-GFP und **(D)** AHK5_C9^{K169A}-GFP. Jeweils von links nach rechts: GFP-Signal, mCherry-Signal und die Überlagerung beider Signale.

8. Anhang

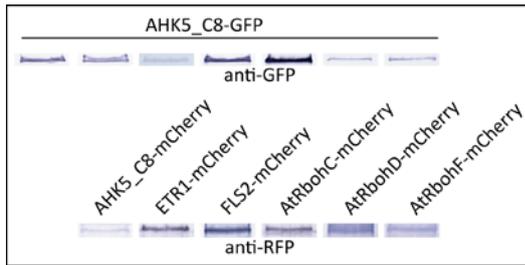


Abbildung A 2: Western Blot und spezifischer Nachweis der GFP-, bzw. mCherry Fusionsproteine aus *N. benthamiana* Blattextrakten mittels anti-GFP, bzw. anti-RFP. Die jeweils aus einer Koexpression stammenden Fusionsproteine sind in Spalten angeordnet.

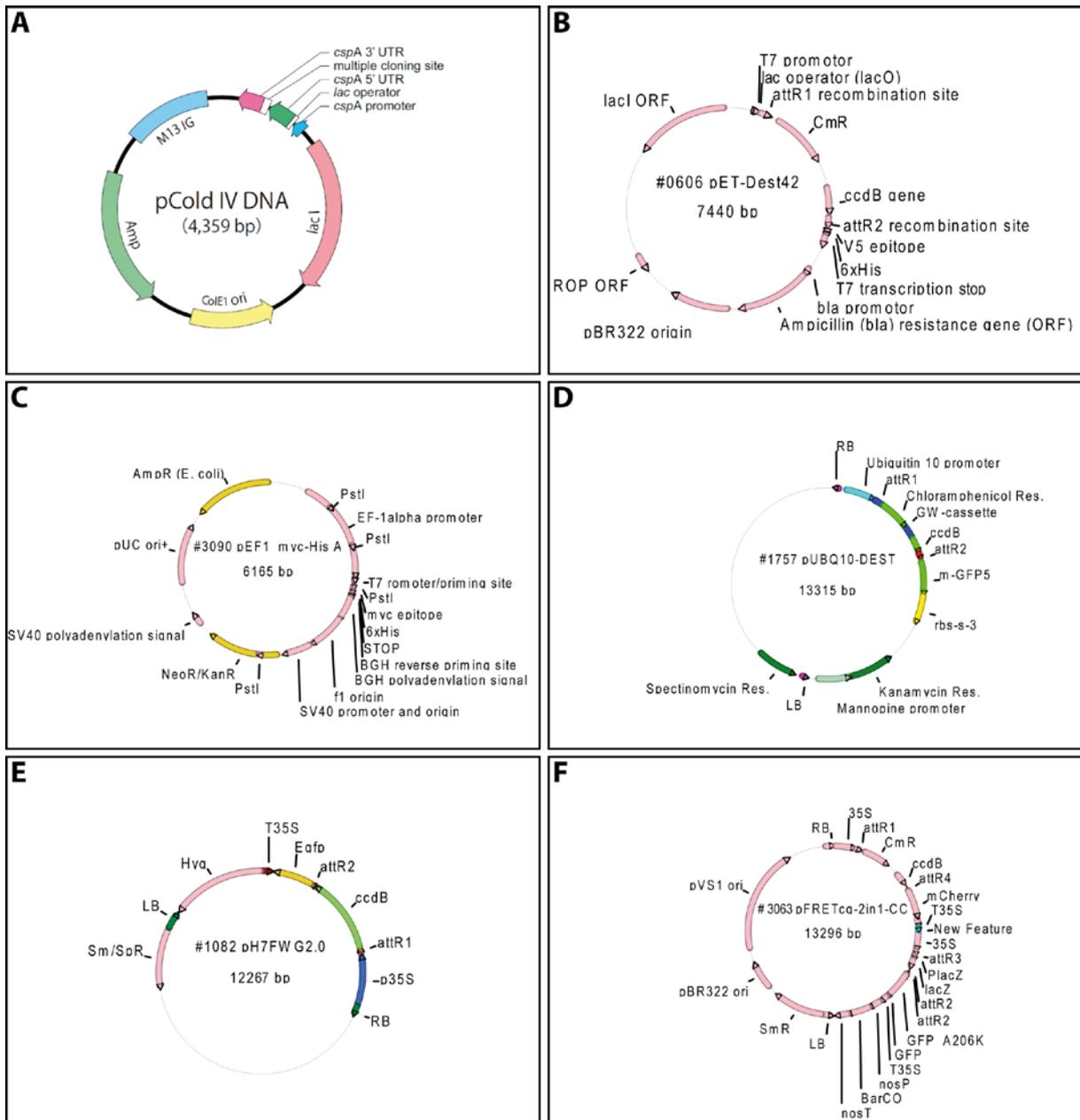


Abbildung A 3: Vektorkarten der verwendeten Expressionsvektoren, die für die Expression bestimmter Gene in *E. coli* (A) [<http://takara-bio.com>] und (B), humanen Zellen (C) und Pflanzen (D-F) benutzt wurden.

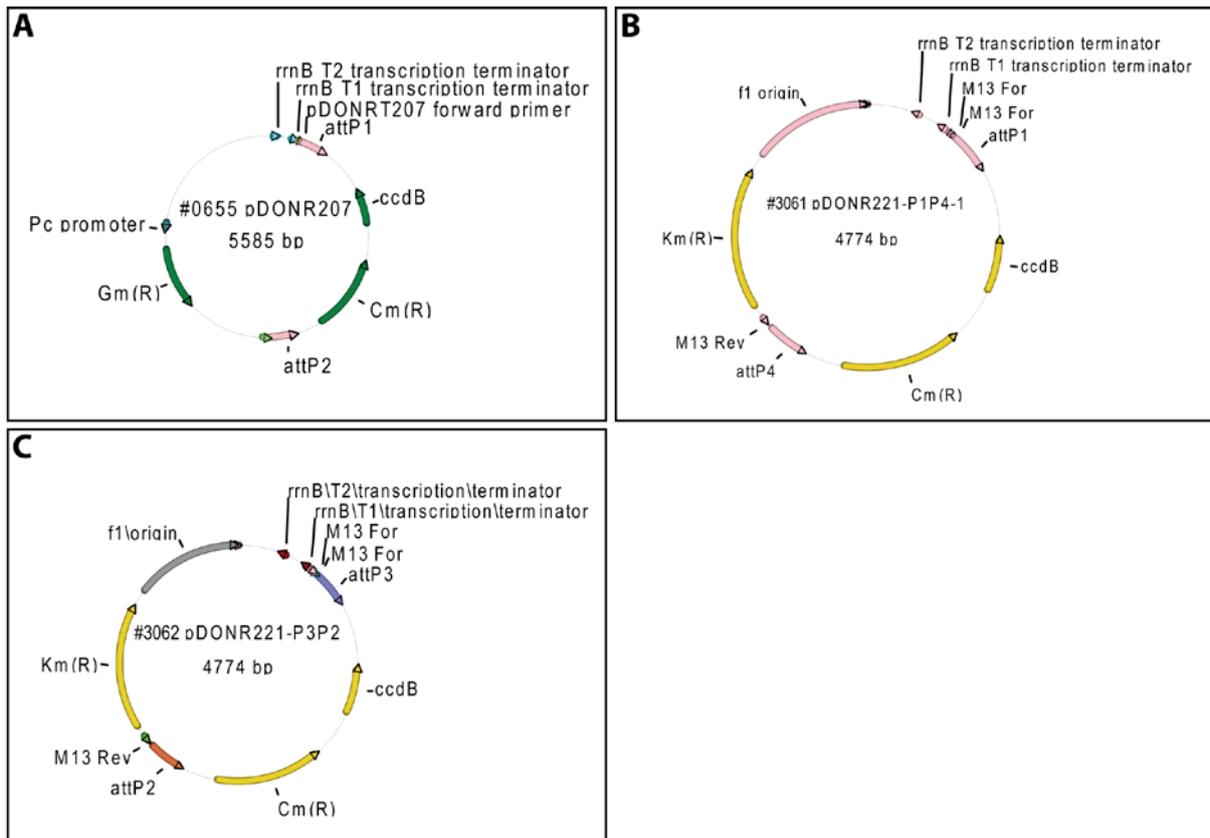


Abbildung A 4: Vektorkarten der verwendeten Entry-Vektoren, die für die Herstellung von Entry-Klonen benutzt wurden. Dabei wurden Entry-Klone aus **(A)** für normal LR-Reaktionen und Entry-Klone aus **(B)** und **(C)** für das „2in1-cloning“ benutzt.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name, Vorname	Heunemann, Michael
Geburtstag	14.03.1985
Geburtsort	Reichenbach im Vogtland
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Akademische Ausbildung

06/2011 – heute	Doktorand, AG Harter am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP) an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
10/2005 – 06/2011	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls Universität Tübingen Abschluss mit Diplom
10/2003 – 07/2005	Studium der Bioinformatik an der Eberhard-Karls Universität Tübingen

Schulische Laufbahn

06/2003	Allgemeine Hochschulreife am Goethe-Gymnasium Reichenbach im Vogtland
---------	---

Praktische Erfahrung

07/2007 – 05/2011	Studentische Hilfskraft am ZMBP der Eberhard-Karls Universität Tübingen
06/2007 – 07/2007	Praktikum am Friedrich-Loeffler-Intitut Tübingen (FLI)
07/2005 – 10/2005	Praktikum bei Eurifins Agrosience Services EcoChem GmbH (ehemals GAB Biotechnologie GmbH) in Niefern Öschelbronn (D) und Barr (FR)

Veröffentlichungen

The Sensor Histidine Kinases AHK2 and AHK3 Proceed into Multiple Serine/Threonine/Tyrosine Phosphorylation Pathways in Arabidopsis thaliana (Mol Plant. 2016)

R. Dautel · X. N. Wu · M. Heunemann · W. X Schulze · K. Harter

Structure–Function Analysis of Arabidopsis thaliana Histidine Kinase AHK5 Bound to Its Cognate Phosphotransfer Protein AHP1 (Mol Plant. 2013)

J. Bauer · K. Reiss · M. Veerabagu · M. Heunemann · K. Harter · T. Stehle

Degradation of Arabidopsis CRY2 Is Regulated by SPA Proteins and Phytochrome A (Plant Cell, 20012)

G. Weidler · S. Z. Oven-Krockhaus · M Heunemann · C. Orth · F. Schleifenbaum · K. Harter · U. Hoecker · A. Batschauer

Nuclear localization signals in A-type response regulators of Arabidopsis thaliana (unveröffentlicht)

M. Heunemann · V. Mira-Rodado · J. Witthoeft · K. Harter

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. **Klaus Harter** für die Überlassung des interessanten Themas, der motivierenden Betreuung und der Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. **Claudia Oecking** für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Dr. **Janika Witthöft** für die zügige und kritische Korrektur dieser Arbeit.

Auch **Joachim Waldmann** danke ich für das noch kurzfristige Korrekturlesen.

Dr. **Sacchie Kimura** möchte ich für die Einweisung in die Handhabung von HEK-Zellen und der Mitarbeit bei der Herstellung von stabilen Linien danken.

Ich bedanke mich bei Dr. **Volker Niemann** und **Matthias Vorländer** für die große Unterstützung bei den biochemischen Analysen.

Bei **Stefan Bieker** möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den Seneszenzexperimenten bedanken.

Für die Kenntnisübermittlung zur Durchführung der ROS-burst Assays danke ich **Lei Wang**.

Thomas Drechsler danke ich für die Expression und Reinigung rekombinanter Proteine im Rahmen seiner Masterarbeit.

Für die massenspektrometrischen Analysen der Proteinproben danke ich Dr. **Edda von Roepenack-Lahaye**.

Anne Mohrholz gebührt der Dank für die Klonierung eines Expressionsklons, der für *in vivo* Analyse der AHK5-Aktivität unerlässlich war.

Auch meinen anderen Kollegen und Freunden in Bay 7 und Bay 8 (**Andreas Hecker, Rebecca Dautel, Stefan Fischer, Juan Suarez, Nathalia Krieger und Nina Glöcknerin**), sowie am gesamten Institut (vor allem **Niklas Wallmeroth** und Dr. **Joachim Kilian**) möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Zu guter Letzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie, speziell meinen Eltern **Andreas und Petra Heunemann**, sowie meiner Freundin **Anna Reichart**, ohne deren immerwährende Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre!!