

# Die Funktion von SPA1 im Netzwerk der Phytochrom A-Signaltransduktion

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rosalinde-Louise Baumgardt

aus Krefeld

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Westhoff  
Koreferent: Prof. Dr. H. Bünemann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Januar 2004

## Abkürzungen

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| $\gamma$ - <sup>32</sup> P-dATP | 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat, am $\gamma$ -P-Atom radioaktiv markiert |
| $\lambda$                       | Wellenlänge   |
| °C                              | Grad Celsius  |
| AS                              | Aminosäure  |
| $\mu$ l                         | Mikroliter  |
| $\mu$ g                         | Mikrogramm  |
| bp                              | Basenpaare  |
| bHLH                            | basisches Helix-Loop-Helix-Motiv  |
| cDNA                            | komplementäre DNA   |
| D                               | Asparaginsäure  |
| DNA                             | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP                            | 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat   |
| EDTA                            | Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> , tetraessigsäure                         |
| FR                              | far-red; dunkelrotes Licht  |
| FRc                             | kontinuierliches dunkelrotes Licht  |
| FRp                             | gepulstes dunkelrotes Licht   |
| g                               | Gramm   |
| h                               | Stunde  |
| kb                              | Kilobasen   |
| kD                              | Kilodalton  |
| l                               | Liter   |
| M                               | Molar; mol/l  |
| mg                              | Milligramm  |
| mM                              | Millimolar  |
| min                             | Minute  |
| MOPS                            | Morpholinopropansulfonsäure   |
| mRNA                            | messenger-Ribonukleinsäure  |
| nm                              | Nanometer   |
| PCR                             | Polymerasekettenreaktion  |
| Pfr                             | dunkelrotes Licht absorbierende Konformation des Phytochroms              |
| Pr                              | rotes Licht absorbierende Konformation des Phytochroms                    |
| R                               | red; hellrotes Licht  |
| RNA                             | Ribonukleinsäure  |
| RT-PCR                          | Reverse-Transkriptions-PCR  |

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| s    | Sekunde                           |
| SDS  | Natriumdodecylsulfat              |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| U    | Unit (Einheit der Enzymaktivität) |
| UV   | Ultraviolett                      |
| Upm  | Umdrehungen pro Minute            |
| W    | Tryptophan                        |

## Zur Nomenklatur der Lichtsignaltransduktionskomponenten

|             |  |
|-------------|--|
| <i>SPA1</i> | Gen (Locus, wildtypisches Allel): Großbuchstaben, kursiv |
| <i>spa1</i> | Mutiertes Allel eines Gens: Kleinbuchstaben, kursiv      |
| SPA1        | Protein: Großbuchstaben                                  |

Ausnahme: Phytochrome

|            |                              |
|------------|------------------------------|
| <i>PHY</i> | Gen: Großbuchstaben, kursiv  |
| Phy        | Apoprotein (ohne Chromophor) |
| phy        | Holoprotein (mit Chromophor) |



## Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1        | Licht und Photorezeptoren   | 1         |
| 1.2        | Die Phytochrome   | 2         |
| 1.3        | Die Phytochrom-Signaltransduktion   | 7         |
| 1.4        | SPA1 - ein negativer Regulator in der phyA-Signaltransduktion               | 11        |
| 1.5        | Ziele dieser Arbeit   | 13        |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden</b>  | <b>14</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Material</b>   | <b>14</b> |
| 2.1.1      | Chemikalien und Enzyme  | 14        |
| 2.1.2      | Bakterienstämme   | 14        |
| 2.1.3      | Plasmide  | 14        |
| 2.1.4      | Oligonukleotide   | 15        |
| 2.1.5      | Zur Verfügung gestellte DNA-Konstrukte                                      | 16        |
| 2.1.6      | Sonden  | 16        |
| 2.1.7      | Klonierungsstrategie für die verwendeten Konstrukte                         | 16        |
| 2.1.8      | Pflanzenmaterial  | 17        |
| <b>2.2</b> | <b>Allgemeine Methoden</b>  | <b>18</b> |
| 2.2.1      | Pflanzenanzucht   | 18        |
| 2.2.2      | Bestimmung der Hypokotyllängen  | 19        |
| 2.2.3      | Anthocyanbestimmung   | 20        |
| 2.3.4      | Adulte Phänotypen und Bestimmung des Blühzeitpunktes                        | 20        |
| <b>2.3</b> | <b>Molekularbiologische Methoden</b>  | <b>21</b> |
| 2.3.1      | Klonierung von DNA-Fragmenten   | 21        |
| 2.3.2      | Transformation von <i>E.coli</i>  | 21        |
| 2.3.3      | Isolation von Plasmid-DNA   | 21        |
| 2.3.4      | Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)  | 21        |
| 2.3.5      | Semi-Quantitative Reverse Transkriptions-PCR                                | 22        |
| 2.3.6      | Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101                  | 22        |
| 2.3.7      | Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit der „Floral Dip“-Methode | 22        |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.3.8      | Isolierung genomischer DNA  | 23        |
| 2.3.9      | Genotypisierung   | 23        |
| 2.3.10     | Isolation von Gesamt-RNA  | 24        |
| 2.3.11     | Immobilisierung von RNA (Northern-Transfer)   | 24        |
| 2.3.12     | Herstellung radioaktiver Sonden   | 25        |
| 2.3.13     | Hybridisierung und Detektion filtergebundener Nukleinsäuren                                       | 25        |
| 2.3.14     | Computerunterstützte Sequenzanalysen  | 25        |
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse</b>   | <b>26</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Der Einfluss der <i>spa1</i>-Mutationen auf die VLFR und die FR-HIR</b>                        | <b>26</b> |
| 3.1.1      | Deetolierung der <i>spa1</i> -Keimlinge in gepulstem und kontinuierlichem FR                      | 26        |
| 3.1.2      | Der Effekt der Dunkelzeiträume zwischen FRp bei der Deetolierung                                  | 29        |
| 3.1.3      | Die FR-HIR in <i>spa1</i> -Keimlingen ist ebenfalls erhöht  | 30        |
| 3.1.4      | Der Hellrotlicht-Phänotyp der <i>spa1</i> -Mutanten   | 31        |
| <b>3.2</b> | <b>Der phyA-abhängige Blaulichphänotyp von <i>spa1</i>-Mutanten</b>                               | <b>32</b> |
| 3.2.1      | Deetolierung der <i>spa1</i> -Keimlinge im Blaulich   | 32        |
| 3.2.2      | <i>spa1</i> -Keimlinge zeigen auch im Blaulich erhöhte Anthocyangehalte                           | 34        |
| <b>3.3</b> | <b>Epistasie-Analyse mit <i>fhy1</i> und <i>fhy3</i></b>  | <b>35</b> |
| 3.3.1      | Der Phänotyp von <i>fhy1 spa1</i> - und <i>fhy3 spa1</i> -Doppelmutanten im FR                    | 36        |
| 3.3.2      | Genetische Interaktion zwischen <i>SPA1</i> und <i>FHY1</i> sowie <i>FHY3</i> in Rc               | 39        |
| 3.3.3      | <i>Fhy1</i> und <i>Fhy3</i> spielen keine Rolle in der von phyA vermittelten Antwort auf Blaulich | 41        |
| <b>3.4</b> | <b>Austausch des WD-Repeats von <i>SPA1</i> gegen das von <i>COP1</i></b>                         | <b>43</b> |
| 3.4.1      | Transformation von <i>cop1</i> -Mutanten mit einem COP1-SPA1-Hybridkonstrukt                      | 43        |
| 3.4.2      | Nachweis der Expression der Transgene durch Northernanalyse und RT-PCR                            | 45        |
| 3.4.3      | Der Keimlingsphänotyp der transgenen Pflanzen   | 47        |
| 3.4.4      | Der adulte Phänotyp der transgenen Pflanzen   | 49        |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion</b>   | <b>51</b> |
| <b>4.1</b> | <b>SPA1 moduliert beide Antwortmodi von Phytochrom A: die VLFR und die FR-HIR</b>                 | <b>51</b> |
| <b>4.2</b> | <b>SPA1 ist Teil der phyA-vermittelten Reaktion auf Blaulich</b>                                  | <b>55</b> |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>4.3</b> | <b>Die genetische Interaktion zwischen den Loci <i>SPA1</i> und <i>FHY1</i> sowie <i>FHY3</i> ist abhängig von den Lichtbedingungen</b> | <b>56</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Das WD-Repeat als Schlüssel zur Regulation der Lichtsignaltransduktion</b>   | <b>58</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Die Funktion von <i>SPA1</i> in der <i>phyA</i>-Signaltransduktion</b>   | <b>60</b> |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>62</b> |
| <b>6</b>   | <b>Anhang</b>   | <b>63</b> |
| <b>7</b>   | <b>Literatur</b>  | <b>68</b> |

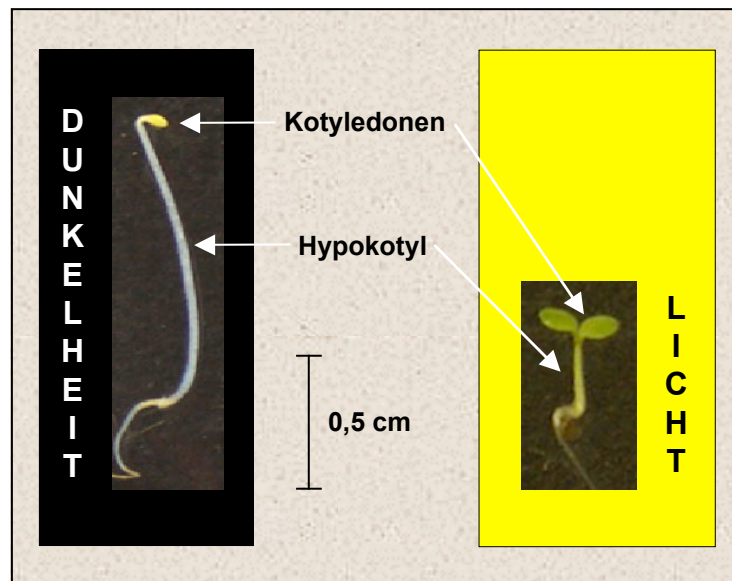
# 1 Einleitung

## 1.1 Licht und Photorezeptoren

Pflanzen sind nicht in der Lage aktiv ihren Standort zu wechseln. Daher haben Pflanzen im Laufe der Evolution einen hohen Grad an Anpassungsfähigkeit entwickelt, um ihr Wachstum und die Reproduktion optimal auf die sie umgebenden Bedingungen auszurichten. Sonnenlicht ist nicht nur die primäre Energiequelle für Pflanzen (Photosynthese), sondern gleichzeitig eine wichtige Informationsquelle und von großer Bedeutung für die Modulation von Entwicklungsprozessen. Vom Einfluss des Lichts sind zum Beispiel die Samenkeimung, die Deetiolerung des Keimlings, Gravitropismus und Phototropismus, Chloroplastenentwicklung und -bewegung, Schattenvermeidung, zirkadiane Rhythmik und die Blütenbildung abhängig (Wang & Deng 2002b).

Damit sich die Pflanze optimal an ihre Umgebung und die gegebenen Lichtbedingungen anpassen konnte, entwickelten sich während der Evolution sogenannte Photorezeptoren. Diese ermöglichen es der Pflanze Licht wahrzunehmen. Mit Hilfe dieser Photorezeptoren kann die Pflanze Lichtintensität, Lichtqualität (spektrale Eigenschaften), die Richtung des einfallenden Lichtes und die Periodizität (Tageslänge) sehr genau bestimmen. Dazu befähigt wird die Pflanze durch drei Hauptgruppen von Photorezeptoren: den Hellrotlicht (R, englisch: *red light*) und Dunkelrotlicht (FR, englisch: *far-red*) (600-750 nm) absorbierenden Phytochromen, den Blaulicht (B)/UV-A (320-500 nm) absorbierenden Cryptochromen und Phototropinen sowie den molekular bisher nicht identifizierten UV-B (282-320 nm) wahrnehmenden UV-B Rezeptoren. Diese Photorezeptoren nehmen das Licht wahr, „interpretieren“ es und leiten das Lichtsignal über spezielle Übertragungswege zu lichtregulierten Genen, die die Entwicklung der Pflanze entscheidend beeinflussen. Jede Gruppe dieser Photorezeptoren agiert sowohl unabhängig als auch gemeinsam mit den anderen bei der Regulation bestimmter Wege der Pflanzenentwicklung (Neff *et al.*, 2000; Smith, 2000; Wang & Deng 2002b).

Die Bedeutung der Photorezeptoren wird bei der Keimlingsentwicklung besonders deutlich (Abbildung 1): In Dunkelheit gewachsene Keimlinge unterliegen dem Prozess der Skotomorphogenese (*skotos*, griech.: Dunkelheit). Charakteristisch sind ein langes Hypokotyl, geschlossene Kotyledonen, geschlossener Apikalhaken und die Entwicklung der Proplastiden zu Etioplasten. Der Keimling erscheint mangels Chlorophyll farblos, daher wird dieser Prozess auch Etiolierung genannt.



**Abbildung 1: Die Keimlingsentwicklung: Phänotypen von in Dunkelheit und im Licht gewachsenen Keimlingen.** In Dunkelheit und im Licht angezogene 4 Tage alte Keimlinge von *Arabidopsis thaliana*.

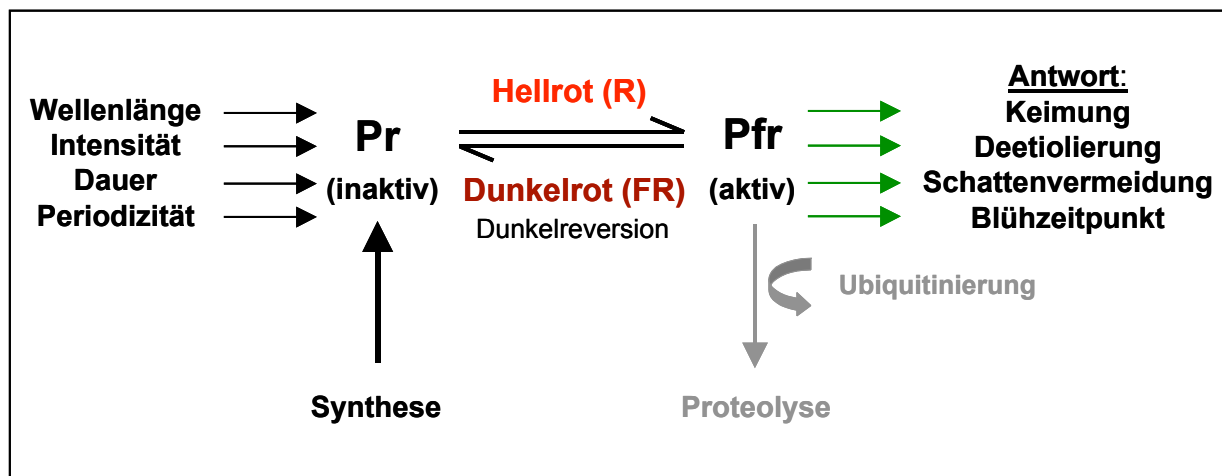
Im Licht wachsende Keimlinge dagegen durchlaufen die Photomorphogenese (Deetiolierung). Das Hypokotyl ist kurz, die Kotyledonen sind geöffnet und die Proplastiden entwickeln sich zu reifen, grünen Chloroplasten, woher der Prozess der „De-etiolierung“ auch seinen Namen hat. Diese konzertierte Anpassung an unterschiedliche Lichtverhältnisse wäre der Pflanze ohne Photorezeptoren nicht möglich.

## 1.2 Die Phytochrome

Unter den bereits erwähnten Photorezeptoren sind die R/FR absorbierenden Phytochrome die am besten untersuchte Familie. Funktionelles, natives Phytochrom (Holoprotein) besteht aus einem Dimer ca. 125 kD großer Untereinheiten. Jedes Monomer (Apoprotein) trägt an seinem N-Terminus ein Phytochromobilin-Molekül, ein lineares Tetrapyrrol, das als Chromophor kovalent an einen konservierten Cysteinrest gebunden ist. Das Apoprotein kann in zwei Hauptdomänen unterteilt werden. Die N-terminale Domäne ist die Chromophor-Bindedomäne und ist für die Lichtwahrnehmung zuständig. Der C-Terminus vermittelt die Dimerisierung. Bisher wurde angenommen, dass er für die Weiterleitung des Signals zuständig ist (Krall & Reed, 2000). Neuere, noch umstrittene Daten schlagen jedoch vor, dass der C-Terminus die Aktivität des Phytochroms zwar beeinflusst, der N-Terminus aber die wesentlichen Funktionen bei der Weiterleitung des Signals übernimmt (Matsushita *et al.*, 2003). Im C-Terminus der Phytochrome findet man zwei PAS-ähnliche Domänen und eine Histidin-Kinase-ähnliche Domäne. Die PAS-Domänen vermitteln die Homodimerisierung der

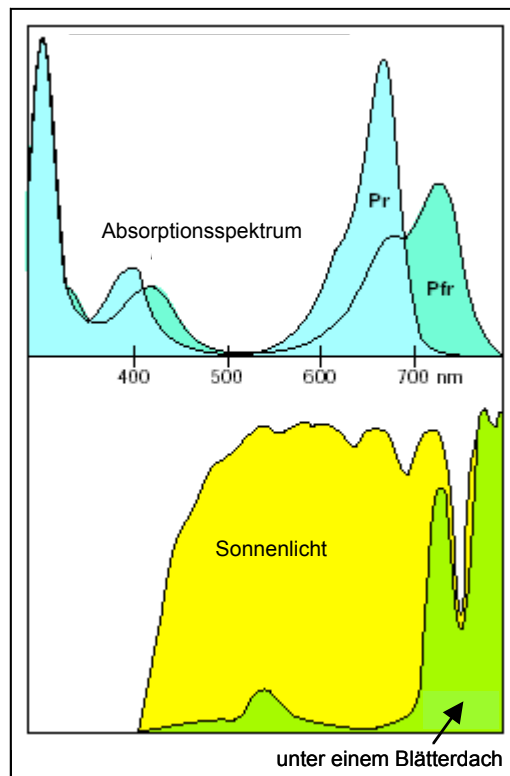
Phytochrome und vermitteln wahrscheinlich die Bindung anderer Proteine (Elich & Chory, 1997; Krall & Reed, 2000). Bei der Kinasedomäne findet man eine Besonderheit. Bakterielle Phytochrome sind lichtregulierte Histidin-Kinasen (Vierstra & Davis, 2000). Trotz der vorhandenen Ähnlichkeit der Pflanzenphytochrome zu diesen Histidin-Kinasen gibt es Ergebnisse, die sich auf Autophosphorylierungsexperimente beziehen und darauf hindeuten, dass Pflanzenphytochrome lichtregulierte Serin/Threonin-Kinasen und keine Histidin-Kinasen sind (Yeh & Lagarias, 1998).

Das Holoprotein kommt in zwei Konformationen vor, die sich in ihrem Absorptionsspektrum unterscheiden und ineinander überführbar sind (Smith, 2000; Abbildungen 2 und 3). Zunächst wird das Holoprotein in der Pr-Konformation (P = Phytochrome; r = red) synthetisiert. Durch Absorption von Licht (mit einem Absorptionsmaximum im hellroten Licht von  $\lambda_{\max}=660$  nm) kann diese Pr-Form in die Pfr-Form (fr = far-red, dunkelrot;  $\lambda_{\max}=730$  nm) umgewandelt werden. Die Anregung durch Licht führt hierbei zu einer *cis-trans*-Isomerisierung des Chromophors, worauf auch die Polypeptidkette (das Apoprotein) einer Konformationsänderung unterliegt. Ebenso kann nun die Pfr-Form durch (dunkelrotes) Licht wiederum in die Pr-Form zurückgewandelt werden (Abbildung 2 und 3 oben). Diese Photokonversion führt zu einem Gleichgewicht zwischen den beiden Konformationen, das man Photoequilibrium nennt (Smith, 2000). Das Photoequilibrium kommt dadurch zustande, dass die Absorptionsspektren der Pr- und Pfr-Konformationen zwar verschieden sind, aber überlappen (Abbildung 3 oben). Daher sind immer beide Konformationen vorhanden.



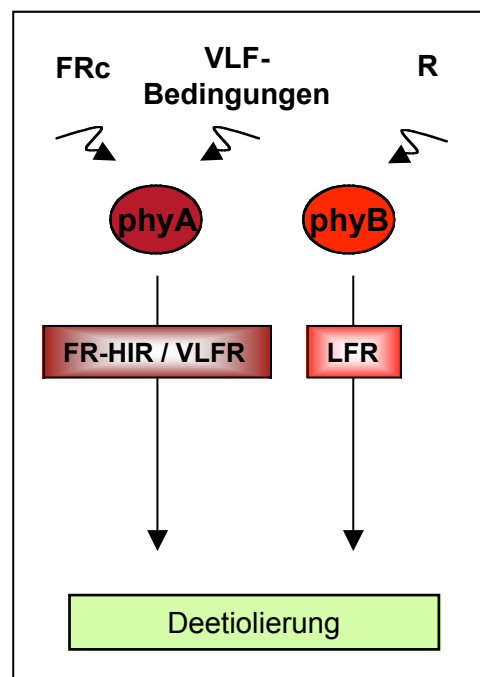
**Abbildung 2: Pr- und Pfr-Konformationen der Phytochrome.** Die inaktive Form Pr kann durch Licht in die aktive Pfr-Form umgewandelt werden und umgekehrt. Deetiolierung umfasst das Hypokotylwachstum, die Öffnung und das Ergrünen der Kotyledonen und die licht-regulierte Genexpression. *Grau:* Phytochrom A als lichtlabiles Molekül wird über den Ubiquitinweg der Degradation zugeführt.

Da nur die Pfr-Form physiologisch aktiv ist, können Phytochrome durch die Besonderheit der Photoreversibilität als eine Art „Lichtschalter“ in Bezug auf wechselnde R/FR-Umgebungen fungieren. R/FR-photoreversible Photorezeptoren kommen bei allen grünen Pflanzen vor. Ihre Bedeutung wird klar, wenn man genauer betrachtet, wie die Phytochrome diese Qualität des einfallenden Lichts als Informationsquelle nutzen können (Smith & Whitelam, 1990). Tatsächlich variieren die R/FR-Verhältnisse beträchtlich an verschiedenen Standorten. Direktes Sonnenlicht ist reich an hellrotem Licht (Abbildung 3, unten). Unter solchen Bedingungen stellt sich ein Photoequilibrium ein, bei dem der Pfr-Anteil am gesamten vorhandenen Phytochrom (Pfr/Pgesamt) ungefähr 60% beträgt. Durch Beschattung sinkt das R/FR-Verhältnis, da unter einem Blätterdach der FR-Anteil größer ist als in ungefiltertem Sonnenlicht. Durch diesen erhöhten Anteil des FR wird mehr Pfr in Pr überführt und das Photoequilibrium kann Werte erreichen, die so niedrig sind wie ein Verhältnis von Pfr/P von 0,1. Hierbei sinkt also der Anteil der Pfr-Form an der Gesamtmenge des vorhandenen Phytochroms, was zu einer Verstärkung des Sprosswachstums führt. So versucht die Pflanze die Beschattung zu vermeiden, um das für die Photosynthese notwendige Sonnenlicht optimal ausnutzen zu können (Smith, 2000).



**Abbildung 3: Absorptionsspektrum der Phytochrome und spektrale Zusammensetzung des Lichts.** Absorptionsspektren des Phytochroms in seiner Hellrotlicht (Pr) und Dunkelrotlicht (Pfr) absorbierenden Konformation (oben); Spektrum des Sonnenlichts und spektrale Eigenschaften des Lichtes, das durch ein Blätterdach gefiltert wurde (unten); aus: Smith, 2000.

Diese Schattenvermeidungsantwort ist eine sogenannte *low fluence response* (LFR), die die klassische Phytochrom-Funktion beinhaltet, deren Charakteristikum die soeben geschilderte R/FR-Photoreversibilität ist (Reed *et al.*, 1993). Eine LFR wird normalerweise durch hellrotes Licht von Photonenflussraten über  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  induziert. Neben dieser Antwort gibt es zwei weitere Phytochrom-gesteuerte Antworten auf Licht, die jedoch beide nicht die klassische R/FR-Photoreversibilität zeigen: die *very low fluence response* (VLFR) und die Dunkelrotlicht-abhängige *high irradiance response* (FR-HIR). Eine VLFR kann durch extrem niedrige Photonenflussraten von unter  $0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgelöst werden und der Anteil an gebildetem Pfr ist sehr niedrig ( $\text{Pfr/Pgesamt} < 3 \%$ ). Dies ist zum Beispiel besonders wichtig für die Keimung, wenn der Same einige Millimeter unter der Erde liegt. Hier reichen einzelne Lichtpulse aus, um eine Antwort zu induzieren. Die Wellenlänge des einfallenden Lichtes spielt bei der VLFR eine untergeordnete Rolle, da eine VLFR durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlängen 300 bis 780 nm ausgelöst werden kann (Shinomura *et al.*, 1996; Casal *et al.*, 1997). Die FR-HIR ist abhängig von der Dauer (Kontinuität) und der Intensität (Photonenflussrate) der Bestrahlung. Offenbar ist der Keimling über diesen Modus in der Lage, die Menge der in einer bestimmten Zeit eintreffenden Photonen genau zu bestimmen. Der Mechanismus der Reaktion ist noch nicht bekannt, auch wenn gerade hier wohl die Photokonversion eine wichtige Rolle spielt (Shinomura *et al.*, 2000).



**Abbildung 4:** Die Antworten der Phytochrome auf verschiedene Lichtbedingungen im Keimlingsstadium. FRc: kontinuierliches dunkelrotes Licht; VLF: *very low fluence*; R: hellrotes Licht; LFR: *low fluence response*; VLFR: *very low fluence response*; FR-HIR: Dunkelrotlicht-abhängige *high irradiance response*.

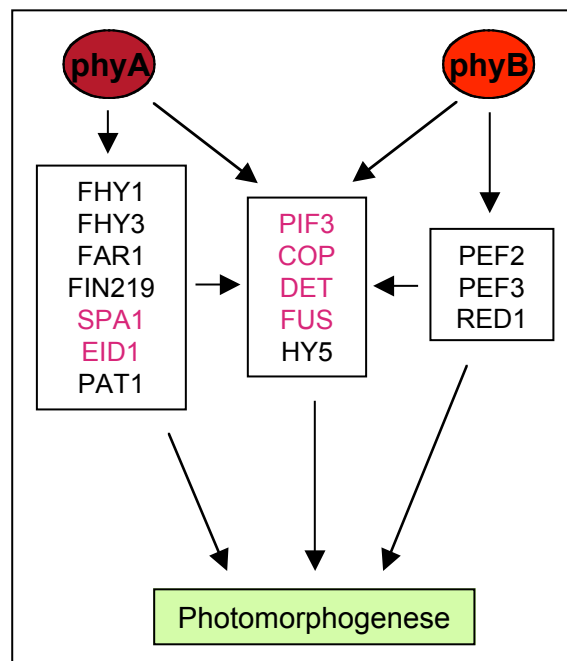


Phytochrome werden von einer Multigenfamilie kodiert. In *Arabidopsis* existieren fünf Gene, die Phytochrom A (*PhyA*) bis *PhyE* genannt werden (Clack *et al.*, 1994; Sharrock & Quail, 1989). *phyB* bis *phyE* sind im Licht stabil. Unter ihnen wird *phyB* am stärksten exprimiert (Clack *et al.*, 1994) und scheint auch die größte Bedeutung für diese Gruppe der Phytochrome zu haben. Erst in letzter Zeit konnte durch die Analyse von Doppel- und Mehrfachmutanten auch den Phytochromen C-E eine besondere, eigene Bedeutung neben den zu *phyB* redundanten Funktionen zugeschrieben werden (Devlin *et al.*, 1999; Eichenberg *et al.*, 2000; Franklin *et al.*, 2003; Monte *et al.*, 2003). Durch Untersuchungen von Phytochrom-Nullmutanten und zusätzliche Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass diese Gruppe der Phytochrome, insbesondere *phyB*, die Antwort von Pflanzen auf kontinuierliches hellrotes Licht regulieren. *phyB* vermittelt hierbei die oben erwähnte LFR, als Reaktion auf R-reiches Licht (Abbildung 4). Neben der Hemmung des Längenwachstums und der Schattenvermeidungsantwort ist auch die Hemmung der Blühinduktion eine wichtige Funktion dieses Phytochroms (Devlin *et al.*, 1996).

Phytochrom A (*phyA*) vermittelt als einziger Photorezeptor die Antworten auf kontinuierliches dunkelrotes Licht (FR). *phyA* erfüllt eine spezialisierte Aufgabe bei der Samenkeimung und vermittelt die Deetiolerung unter generell sehr geringen Lichtflussraten, unter Blaulicht niedriger Flussraten und im kontinuierlichen FR (FRc) (Casal *et al.*, 1997; Neff & Chory, 1998). *phyA* verfügt hierbei über die zwei Antwortmodi FR-HIR und VLFR (Abbildung 4). *phyA* ist im Gegensatz zu allen anderen Phytochromen lichtlabil und akkumuliert nur in Dunkelheit in großen Mengen (Hennig *et al.*, 1999). Die lichtinduzierte Degradation von *phyA* wird durch Abbau der Pfr-Form über den Ubiquitinweg erreicht (Abbildung 2; Clough *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass in der *phyA*-Signaltransduktion nicht notwendigerweise die lichtlabile Pfr-Form die „aktive“ Konformation ist, sondern dass bei bestimmten Reaktionen während der Photokonversion von Pfr zu Pr an sich ein Signal weitergeleitet wird (Shinomura *et al.*, 2000). Da *phyA* hauptsächlich Reaktionen auf reines FR vermittelt, wird angenommen, dass *phyA* unter anderem die bereits beschriebene Schattenvermeidungsreaktion von Keimlingen hemmt. Für Keimlinge ist es zwar wichtig, sich durch Längenwachstum eine gute Ausgangslage für die Lichtperzeption zu verschaffen, der Vorrat an Nährstoffen im Samen ist jedoch begrenzt. Daher ist eine vollständige Deetiolerung auch in FR-reichem Licht notwendig (Smith *et al.*, 1997). Dies wird durch *phyA* erreicht. Weiterhin spielt *phyA* eine Rolle bei der Förderung der Blühinduktion (Devlin *et al.*, 1996).

### 1.3 Die Phytochrom-Signaltransduktion

Die Identifizierung von Komponenten der Phytochrom-Signaltransduktion erfolgte zum einen über genetische Studien mit Mutanten, die einen Defekt in der Lichtantwort zeigten und zum anderen über die Identifizierung von mit Phytochrom interagierenden Proteinen. Die so identifizierten Faktoren der Signaltransduktion lassen sich zunächst in zwei Gruppen einteilen: solche, die spezifisch für den Signaltransduktionsweg eines Phytochroms sind und solche, die ihre Funktion in dem allen Phytochromen gemeinsamen Teil des Signaltransduktionsweges haben (Abbildung 5). Dies deutet wiederum auf das Wechselspiel zwischen hochselektiven und weniger spezifischen Komponenten hin, ein weiteres Indiz für die teils synergistischen, teils antagonistischen Effekte aller Phytochrome.



**Abbildung 5: Modell der Lichtsignaltransduktion** (Smith, 2000; Wang & Deng, 2002b; Kim *et al.*, 2003). Negativ wirkende Faktoren sind in violett dargestellt.

Die Konformationsänderung der Phytochrome von der Pr- in die Pfr-Form führt zu einer Translokation der Phytochrome in den Zellkern. Es scheint also, dass Phytochrome nicht nur die bloßen Rezeptoren für die Wahrnehmung der Lichtsignale darstellen, sondern auch aktiv an der Signaltransduktion beteiligt sind. Unter Umständen sind sie sogar direkt in die Aktivierung lichtregulierter Gene involviert (Kircher *et al.*, 1999). Im Zweihybrid-System der Hefe konnten bisher einige mögliche Interaktionspartner der Phytochrome identifiziert werden (Smith, 2000). Am besten untersucht wurde bisher PIF3 (*phytochrome interacting factor 3*), dessen Interaktion mit phyA und phyB lichtabhängig ist (Ni *et al.*, 1998 & 1999; Zhu *et al.*, 2000). PIF3 ist ein basisches Helix-Loop-Helix (bHLH) Protein. Es kann an ein G-

Box-Motiv in den Promotoren lichtregulierter Gene binden (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). Wie neueste Daten zeigen, handelt es sich bei PIF3 wohl um einen negativen Regulator, insbesondere der phyB-, aber auch der phyA-vermittelten Antworten auf Licht (Kim *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass der Weg vom über Phytochrom wahrgenommenen Lichtsignal bis zur Regulation lichtgesteuerter Gene mittels des Phytochrom-interagierenden PIF3 sehr kurz sein kann. (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). Das mit PIF3 nah verwandte HFR1 (auch REP1 oder RSF1 genannt) ist ebenfalls ein bHLH-Protein und wurde zunächst als phyA-spezifischer Faktor identifiziert (Fairchild *et al.*, 2000; Soh *et al.*, 2000; Fankhauser *et al.*, 2000). Bisher konnte keine direkte Interaktion zwischen HFR1 und den Phytochromen nachgewiesen werden. Neueste Daten deuten jedoch darauf hin, dass HFR1, neben seiner Rolle in der phyA-Signaltransduktion, eine Funktion in der Cryptochrom-Signaltransduktion hat (Duek & Fankhauser, 2003). Dies zeigt wiederum deutlich, wie verwoben das Netz der Lichtsignaltransduktion ist.

Seit längerer Zeit sind mehrere positive Faktoren bekannt, die spezifisch für die phyA-Signaltransduktion sind. Diese wurden über die Reduzierung der phyA-vermittelten Antworten ihrer mutanten Allele identifiziert. FHY1, FHY3, FAR1, FIN219 und PAT1 konnten mittlerweile auch auf molekularer Ebene charakterisiert werden (Desnos *et al.*, 2001; Wang & Deng, 2002a; Hudson *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2000; Bolle *et al.*, 2000; Spiegelman *et al.*, 2000). Keimlinge, die mutierte Allele von *FHY1* oder *FHY3* trugen, wurden identifiziert, da sie im FR ein, im Vergleich zum Wildtyp, langes Hypokotyl zeigten (Whitelam *et al.*, 1993). Ihre Antwort auf hellrotes Licht war dagegen normal. Diese und weitere Daten belegen, dass die Phänotypen phyA-abhängig sind (Barnes *et al.*, 1996). In *fhy1* Mutanten sind sowohl die FR-HIR als auch die VLFR betroffen (Barnes *et al.*, 1996), jedoch sind nicht alle phyA-vermittelten Antworten beeinträchtigt (Johnson *et al.*, 1994). Pflanzen, die ein mutiertes *fhy3* Allel tragen, zeigen starke Defekte in der FR-HIR, sind in der VLFR jedoch kaum betroffen. Aufgrund der pleiotropen Effekte kann postuliert werden, dass FHY1 und FHY3 bereits früh in der phyA Signaltransduktion eine Rolle spielen (Whitelam *et al.*, 1993; Yanovsky *et al.*, 2000; Wang & Deng, 2002a).

*FHY1* kodiert ein 23kD großes Protein, das reich an Serin und Glutaminsäure ist. FHY1 zeigt über seine gesamte Sequenz keine ausgeprägte Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion, allerdings ist in einer Region von ungefähr 20 Aminosäuren eine Ähnlichkeit mit der Phytochrom PAS-A Domäne vorhanden. Jedoch ist nicht bekannt, ob diese Ähnlichkeit von signifikanter Bedeutung ist (Desnos *et al.*, 2001).

FHY3 ist ein konstitutiv kernlokalisiertes ca. 92kD großes Protein und weist eine hohe Ähnlichkeit (50% identische, 75% ähnliche Aminosäuren) zu FAR1 auf, welches ebenfalls ein phyA-spezifisches Signaltransduktionsintermediat ist. Beide gehören einer Multigenfamilie

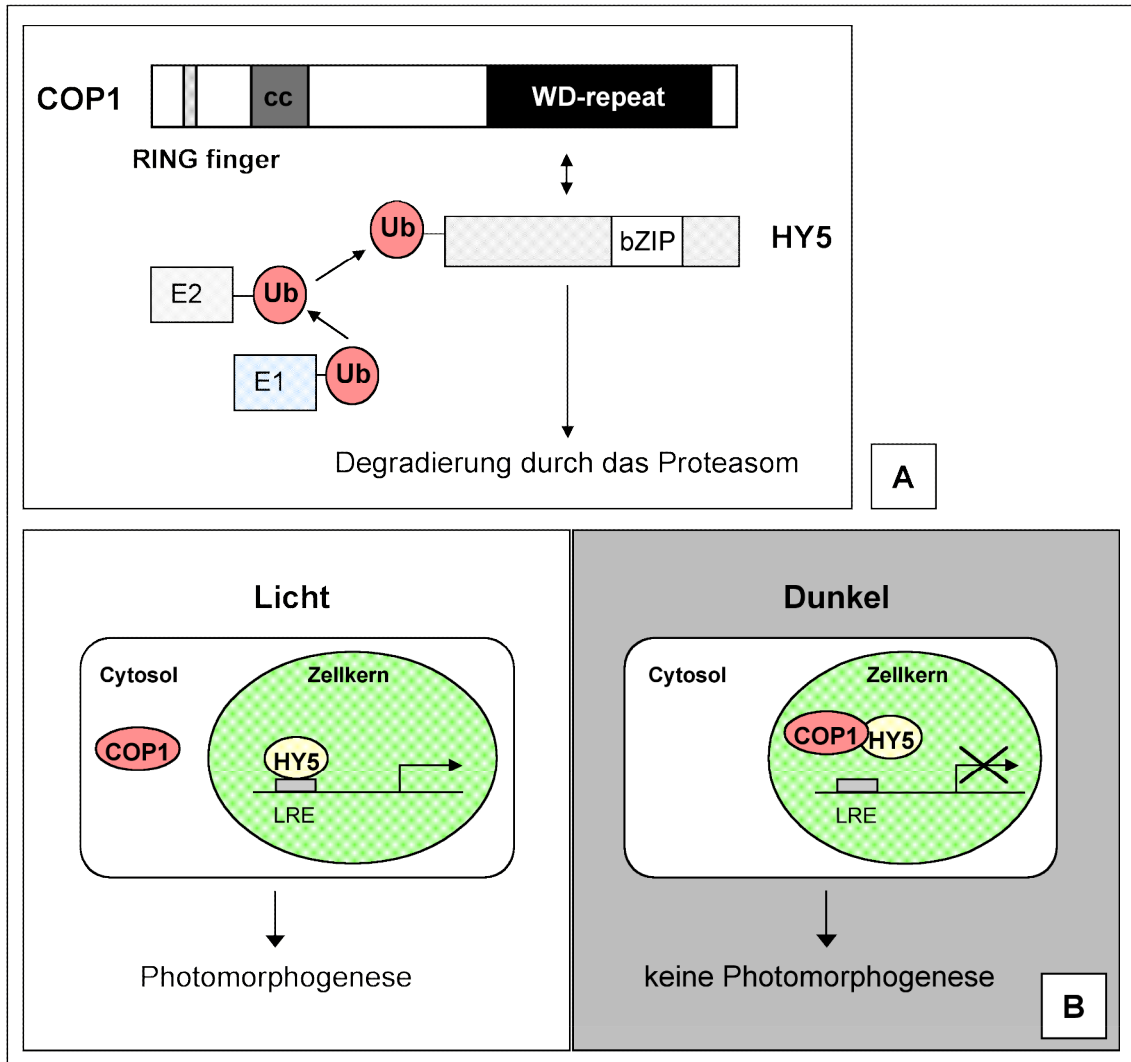
an, besitzen ein coiled-coil Motiv und eine mögliche NLS. FHY3 und FAR1 können miteinander interagieren, was die Hypothese nahe legt, dass sie als Hetero- und/oder Homodimerkomplex variierende Signale in der phyA Signaltransduktion integrieren könnten (Wang & Deng, 2002a). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass *FHY3* und *FAR1* Transposase-ähnliche Proteine kodieren, die in die Regulation der Genexpression durch den phyA Signaltransduktionsweg involviert sind (Hudson *et al.*, 2003).

Bei Untersuchungen von Mutanten der Lichtsignaltransduktion zeigten einige der identifizierten Mutanten konstitutive Photomorphogenese. Konstitutive Photomorphogenese liegt dann vor, wenn die Keimlinge auch in Dunkelheit den Phänotyp von im Licht gewachsenen Keimlingen zeigen. Diese große Klasse von Mutanten sind die *constitutive photomorphogenic (cop)*, *de-etiolated (det)* und *fusca (fus)* Mutanten, die schon früh bei der Suche nach Mutanten mit veränderten Skotomorphogenese-Phänotypen identifiziert wurden. Diese Mutanten sind meist rezessiv und zeigen pleiotrope Phänotypen, so dass man allgemein davon ausgeht, dass die *COP/DET/FUS* Loci Faktoren kodieren, die die Photomorphogenese im Dunkeln unterdrücken und spät in der Signaltransduktion unterhalb der Phytochrome und Cryptochrome agieren (Quail, 2002).

*cop1 (constitutive photomorphogenic 1)* wurde als eine dieser Mutanten identifiziert. COP1 enthält drei strukturelle Domänen: ein N-terminales RING Finger Motiv, eine coiled-coil Domäne und eine WD-Repeat-Domäne mit sieben WD-40-Wiederholungen (Abbildung 5 B). Alle drei Domänen sind essentiell für die Funktion von COP1 *in vivo* (McNellis *et al.*, 1994; Torii *et al.*, 1998). WD-Repeat-Domänen sind generell nur minimal konserviert, kommen jedoch bei allen Eukaryoten vor. Eine WD-Repeat-Einheit besteht aus ca. 40-60 Aminosäuren. Typischerweise zeigen sie 11-24 Aminosäuren von ihrem N-Terminus ein Glycin-Histidin-(GH)-Dipeptid und enden mit einem Tryptophan-Asparaginsäure-(WD)-Dipeptid. Dazwischen befindet sich die ca. 40 Aminosäuren lange Kernsequenz. Eine Wiederholungseinheit nennt man daher WD-40 Repeat. Man nimmt an, dass alle WD-Repeat-Proteine eine zirkuläre  $\beta$ -Propellerstruktur einnehmen (Smith *et al.*, 1999; Li & Roberts, 2001). WD-Repeat-Proteine können eine Vielzahl verschiedener Funktionen haben. Es wird angenommen, dass das WD-Repeat, als Basis (*scaffold*) für koordinierte Multiprotein-Komplexbildungen dienen kann (Smith *et al.*, 1999).

Über das WD-Repeat kann COP1 mit HY5, einem bZIP Transkriptionsfaktor, interagieren (Ang *et al.*, 1998). HY5 ist ein positiver Regulator der Photomorphogenese und fördert die lichtregulierte Entwicklung, indem es entsprechende Gene aktiviert. COP1 inaktiviert HY5 in Dunkelheit, indem es dieses Protein (und auch HYH, ein zu HY5 homologes Protein) einem Modell zufolge der darauffolgenden Degradation zuführt (Osterlund *et al.*, 2000). Hierbei fällt COP1 die Funktion einer E3-Ubiquitinligase zu (Saijo *et al.*, 2003; Abbildung 6A). Die direkte

Interaktion mit COP1 findet in erster Linie in Dunkelheit statt. Im Dunkeln ist COP1 im Kern lokalisiert, wird jedoch im Licht inaktiviert und aus dem Zellkern geschleust (von Arnim & Deng, 1994; Abbildung 6B).



**Abbildung 6: Modell für die Repression der Photomorphogenese durch COP1.** **A:** Modell des Mechanismus, der zur Degradierung von HY5 führt (nach Osterlund *et al.*, 2000). COP1 fungiert möglicherweise als eine E3-Ubiquitinligase. Die Ubiquitinierung von Proteinen erfordert die konzertierte Aktion von drei Enzymen, einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und einer Ubiquitin-Ligase (E3). Die E3-Ligase ist für die Substratspezifität zuständig, da dieses Enzym direkt mit dem zu ubiquitinierenden Protein interagieren muss. **B:** Im Licht bindet HY5 an Elemente von lichtregulierten Promotoren (LRE = light regulatory elements) und aktiviert die Transkription der lichtinduzierten Gene. Die Photomorphogenese kann stattfinden, während der Repressor COP1 sich im Cytosol befindet. Im Dunkeln befindet sich COP1 im Zellkern, wo es den Transkriptionsfaktor HY5 reprimiert. Dieser kann die Transkription der lichtinduzierten Gene nicht aktivieren und es findet keine Photomorphogenese statt.

Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass COP1 die Degradation von HY5 und anderen positiv wirkenden Substraten, wie LAF1 (Seo *et al.*, 2003), über das 26S Proteasom vermittelt (Osterlund *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2002; Abbildung 6 A, B). COP1 spielt somit als Repressor eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Lichtsignaltransduktion.

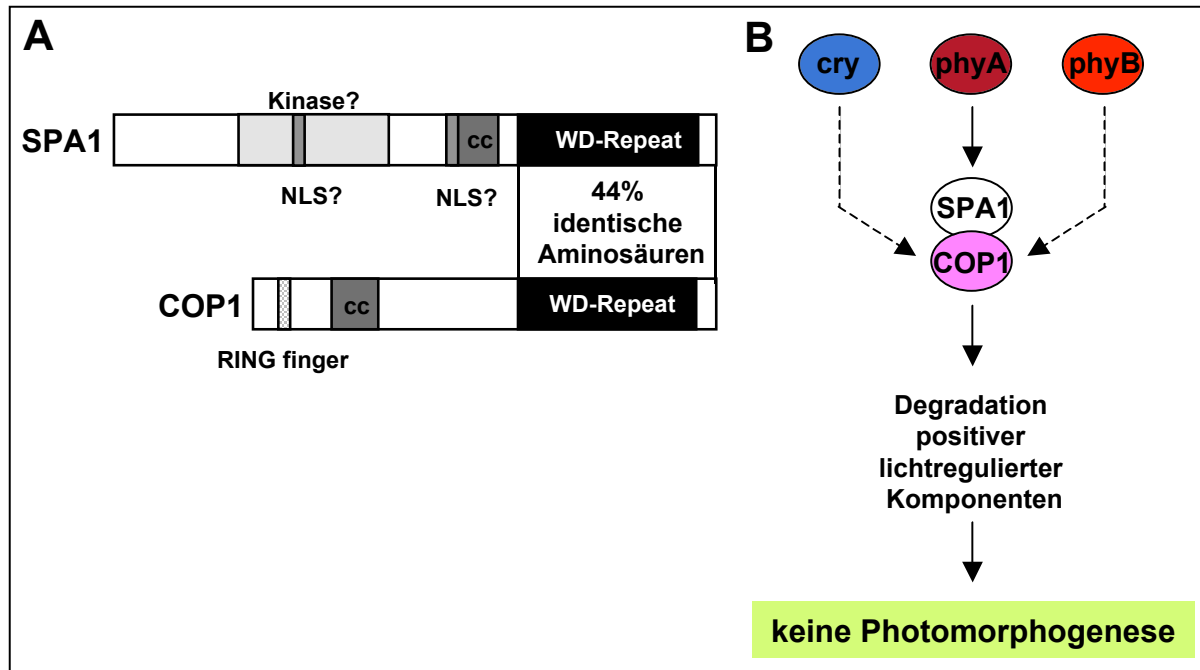
## 1.4 SPA1 - ein negativer Regulator in der phyA-Signaltransduktion

Bisher konnten nur zwei negativ wirkende spezifische Regulatoren der Phytochrom A-Signaltransduktion identifiziert werden. EID1 (empfindlicher im dunkelroten Licht) ist ein F-Box Protein und könnte daher daran beteiligt sein, aktivierte Komponenten der phyA-Signaltransduktion der Ubiquitin-abhängigen Degradation zuzuführen. Pflanzen, die mutierte *eid1*-Allele tragen, zeigen eine hypersensitive Reaktion auf FRc (Büche *et al.*, 2000; Dieterle *et al.*, 2001). Weiterführende Studien zeigten, dass EID1 wohl eher eine Funktion in der FR-HIR hat und keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der VLFR spielt (Zhou *et al.*, 2002).

*SPA1* (Suppressor of *phyA-105*) wurde bei der Suche nach extragenischen Mutationen identifiziert, die in der Lage sind, den Phänotyp einer schwachen *phyA*-Mutante (*phyA-105*) in einer lichtabhängigen Art und Weise zu unterdrücken (Hoecker *et al.*, 1998). Die *spa1*-Mutationen sind rezessiv und *spa1*-Mutanten reagieren hypersensitiv auf R und FR, zeigen hier also verstärkte Photomorphogenese. So sind *spa1*-Keimlinge im R und FR zum Beispiel deutlich kürzer als Wildtypkeimlinge. Sie besitzen im Dunkeln jedoch keinen Phänotyp. Alle bisher untersuchten Phänotypen sind vollständig *phyA*-abhängig. *SPA1* fungiert scheinbar als *phyA*-abhängiger, negativer Regulator der Lichtsignaltransduktion (Hoecker *et al.*, 1998).

Northernanalysen zeigten, dass *SPA1* ein lichtreguliertes Gen ist. Sowohl im FR als auch im R zeigte sich, dass Licht die Transkriptmengen von *SPA1* schnell hochreguliert. Diese Regulation ist *phyA*-abhängig, wird im hellroten Licht jedoch auch von *phyB* und vielleicht auch von den anderen Phytochromen beeinflusst (Hoecker *et al.*, 1999).

*SPA1* kodiert ein etwa 114kD großes Protein. Am C-Terminus befindet sich eine WD-Repeat-Domäne mit 6 Wiederholungen. N-terminal zu dieser Domäne findet man in *SPA1* eine mögliche coiled-coil-Domäne und zwei wahrscheinlich funktionelle NLS (Kernimportsequenzen) (Abbildung 7A). Die transiente Expression von rekombinantem Protein hat gezeigt, dass *SPA1* tatsächlich im Kern lokalisiert ist. Der N-Terminus von *SPA1* zeigt schwache Sequenzhomologie zu einem Ser/Thr/Tyr-Kinasemotiv. Kinase- oder Autophosphorylierungsaktivität konnten bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Hoecker *et al.*, 1999).



**Abbildung 7: SPA1 und COP1, zwei negative Regulatoren der Lichtsignaltransduktion.**

**A** Homologie von SPA1 zu COP1. cc: coiled-coil; NLS: Kernlokalisationssequenz

**B** Ein Modell für die Funktion von SPA1

Im Bereich des WD-Repeats zeigen SPA1 und COP1, der zentrale Repressor der Photomorphogenese, über 44% identische Aminosäuren (Abbildung 7 A). Es ist bekannt, dass COP1 und SPA1 miteinander interagieren, und dass diese Interaktion von den coiled-coil Domänen der beiden Proteine vermittelt wird. Dies konnte in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen sowie durch *in vitro* Co-Immunopräzipitationen festgestellt werden (Hoecker & Quail, 2001). Neueste Daten deuten darauf hin, dass SPA1 an der durch COP1 vermittelten Degradation positiver Komponenten in der Signaltransduktion beteiligt ist (Seo *et al.*, 2003; Saijo *et al.*, 2003). Die Vorstellung, dass COP1 und SPA1 in einem Komplex phyA-abhängig die Lichtsignaltransduktion modulieren (Abbildung 7 B), wird immer wahrscheinlicher.

Mittlerweile weiß man, dass SPA1 zu einer Genfamilie mit vier Mitgliedern gehört. *Spa1-related 2-4* (SPA2-SPA4) zeigen alle auf Aminosäureebene im Bereich des WD-Repeat eine hohe Ähnlichkeit zu SPA1 (58-68 % identische Aminosäuren). In ihrem N-Terminus zeigen die Proteine deutlich geringere Ähnlichkeit. Sowohl SPA3 als auch SPA4 wurden als negative Regulatoren der Lichtsignaltransduktion charakterisiert. Keimlinge, die mutierte Allele von SPA3 und SPA4 tragen, zeigen einen Phänotyp in R, FR und Blaulicht (B), wobei phyA für alle Aspekte der *spa4*-Phänotypen notwendig ist, während für *spa3* im hellroten Licht eventuell auch andere Phytochrome von Bedeutung sind. Sowohl für SPA3 als auch für SPA4 konnte nachgewiesen werden, dass sie *in vitro*, wie SPA1, mit der coiled-coil Domäne von COP1 interagieren können (Laubinger & Hoecker, 2003).

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion von SPA1 im Netzwerk der phyA-Signaltransduktion genauer untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst sollte geklärt werden, welchen Einfluss SPA1 auf die beiden Antwortmodi von phyA, die VLFR und die FR-HIR, hat. Dies würde auch helfen, die beiden Modi der phyA-Signaltransduktion weiter zu entschlüsseln.

Um SPA1 im Zusammenhang der phyA-Signaltransduktion besser einordnen zu können, wurde anhand einer Epistasieanalyse die genetische Interaktion mit den beiden Loci *FHY1* und *FHY3* untersucht. Eine intensive Untersuchung der Doppelmutanten unter verschiedenen Lichtbedingungen würde Aufschluss über weitere Zusammenhänge in der Signaltransduktionskette von phyA geben und eine Positionierung von SPA1 innerhalb der bestehenden Modelle ermöglichen.

In einem weiteren Ansatz stand die WD-Repeat-Domäne im Mittelpunkt. Da diese Domäne sowohl für die Repressorfunktion von COP1 als auch von SPA1 notwendig ist, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob das WD-Repeat von SPA1 die Funktion des COP1-WD-Repeat übernehmen kann.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten in der Regel den Reinheitsgrad *pro analysis* und wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Clontech Laboratories Inc. (USA), Difco (Detroit, USA), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Gibco BRL (Eggenstein), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Amersham Pharmacia Biotech (England) bezogen. Für alle Lösungen wurde hochreines Wasser verwendet, das der Qualität von *aqua bidestillata* entsprach.

Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Das zur Transformation von *Arabidopsis* benötigte Detergenz Silwet L-77<sup>□</sup> wurde von Lehle Seeds (Round Rock, Texas, USA) bezogen.

#### 2.1.2 Bakterienstämme

*E. coli* DH5<sup>□</sup>: deoR, endA1, gyrA96, hsdR17( $r_k^-m_k^+$ ), recA1, relA1, supE44, thi1, F<sup>-</sup>,  $\lambda^-$ ,  $\lambda$ (lacZYA-argFV169),  $\lambda$ 80 $\lambda$ acZ $\lambda$ M15 (Bethesda Res. Lab., 1986)

*Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (pMK90RK) (Koncz *et al.*, 1994)

#### 2.1.3 Plasmide

Für Standardklonierungen wurden die Vektoren pBluescript KSII+ (Stratagene, Heidelberg) und pSH9 (Holtorf *et al.*, 1995) verwendet. Für Klonierungen in *Agrobacterium tumefaciens* wurde der binäre Vektor pPZP211 (Hajdukiewicz *et al.* 1994) eingesetzt. Zwei von Ute Höcker zur Verfügung gestellte Klone basierten auf der in Hellens *et al.* (2000) beschriebenen 35S-Kassette.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer findet sich in Tabelle 1. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert.

| Name          | Sequenz (5' 3')                                 | Verwendung  |
|---------------|---|---|
| Cop1-Avall-R  | GTC <u>TGG TCC</u> CCA TGC CGG ATT<br>TCT GCT A | Herstellung der <i>COP1</i> -Sonde (R-Primer); Nachweis des Transgens <i>COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup></i> |
| Cop1-F1       | GAT GCT TTC CTC ACG GCT TGT                     | Herstellung der <i>COP1</i> -Sonde (F-Primer)   |
| Cop1-F2       | CCA TCA ATG CTT GTA TCT GGT                     | RT-PCR; Nachweis des <i>COP1</i> -Konstruktes   |
| Cop1-R2       | GTG ATG ATC AGC TGA TCC GAC                     | Nachweis des <i>COP1</i> -Konstruktes   |
| Cop1L-R1      | TCA CGC AGC GAG TAC CAG                         | Nachweis des <i>COP1</i> -Konstruktes   |
| cop1-4-C-F    | GCT GAG TGG GTC AGA TTC GC                      | Genotypisierung der <i>cop1-4</i> Mutanten  |
| cop1-4 STOP-F | GCT GAG TGG GTC AGA TTC GT                      | Genotypisierung der <i>cop1-4</i> Mutanten  |
| cop1-4 STOP-R | GTA CCA GAG AGA CAA GAA<br>GCG GC               | Genotypisierung der <i>cop1-4</i> Mutanten  |
| Fhy3-PolyF    | GAA GAT ATG GAT ATT GGC                         | Genotypisierung der <i>fhy3</i> -Mutanten   |
| Fhy3-PolyR    | CTG CTT AGC CAT TGC AGC                         | Genotypisierung der <i>fhy3</i> -Mutanten   |
| Spa1-R        | ATC ACT TCC ACT AAC AAA TTT<br>TGT TCG G        | RT-PCR; Nachweis des <i>COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup></i> -Konstruktes                                     |
| T3            | ATT AAC CCT CAC TAA AG                          | Sequenzierungen; Herstellung der <i>Spa1</i> -Sonde   |
| T7            | AAT ACG ACT CAC TAT AG                          | Sequenzierungen; Herstellung der <i>Spa1</i> -Sonde   |

**Tabelle 1: Die verwendeten Oligonukleotide.** Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

### 2.1.5 Zur Verfügung gestellte DNA-Konstrukte

Alle Konstrukte wurden von Frau Dr. Ute Höcker zur Verfügung gestellt.

| Konstruktnamen                               | Insertion                                      | Vektor                                   |
|--|--|--|
| <i>Spa1</i> -35S-CaMV cassette               | cDNA von <i>SPA1</i>                           | 35S-CaMV-Kassette (Hellens et al., 2000) |
| <i>COP1</i> -35S-CaMV cassette               | cDNA von <i>COP1</i>                           | 35S-CaMV-Kassette (Hellens et al., 2000) |
| NT-Cop1-pBS                                  | <i>COP1</i> -Sequenz bp 1-1174                 | pBluescript                              |
| DE37 (intakte Cop1 <sup>NT</sup> -Sequenz)   | Cop1 <sup>NT</sup> -(Avall)-Spa1 <sup>WD</sup> | pBluescript                              |
| DE41-3 (intakte Spa1 <sup>WD</sup> -Sequenz) | Cop1 <sup>NT</sup> -(Avall)-Spa1 <sup>WD</sup> | pBluescript                              |

**Tabelle 2: Bereitgestellte cDNA Klone**

### 2.1.6 Sonden

| Sonde   | Ursprungs-DNA/Klon    | Fragment (bp; benötigte Primer)            |
|---------|-----------------------|--|
| NT-COP1 | FL- <i>COP1</i> -cDNA | <i>Cop1</i> (~900bp; Cop1-F1/Cop1-Avall-R) |
| FL-SPA1 | FL- <i>SPA1</i> -cDNA | <i>Spa1</i> (~3,4kb; T3/T7-Primer)         |

**Tabelle 3: Aufstellung der verwendeten Sonden für die Northern-Analyse.**

### 2.1.7 Klonierungsstrategie für die verwendeten Konstrukte

Alle Konstrukte wurden unter der Kontrolle eines 35S-Promotors gerichtet in den binären Vektor pPZP211 kloniert. Folgende Klonierungsstrategie lag dem Experiment zugrunde:

Die Klonierung des *COP1*-Konstruktes erfolgte mit Hilfe des von Ute Höcker gestellten Klons „FL-Cop1-35S-CaMV-cassette“ (pGreen). Die gesamte *Cop1*-cDNA-Sequenz wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme XmaI und EcoRI aus diesem Klon geschnitten und in den Vektor pBluescript ligiert. Nach einem partiellen Dau mit SacI und EcoRI wurde die *Cop1*-Sequenz in den Vektor pSH9 überführt und von dort mit dem vektorinternen 35S-Promotor und CaMV-Terminator über die PstI-Schnittstelle in den binären Vektor pPZP211 kloniert.

Für das *COP1-NT*-Konstrukt wurde die NT-Sequenz aus dem von U. Höcker hergestellten Klon NT-Cop1-pBS (Vektor: pBluescript) als XbaI-Fragment in den Vektor pSH9 subkloniert

und dann als PstI-Fragment mit 35S-Promotor und CaMV-Terminator ebenfalls in den binären Vektor pPZP211 kloniert. *COP1-NT* umfasst die *Cop1*-cDNA-Sequenz vom ATG Startkodon bis zum Basenpaar 1174, wo sich die interne XbaI-Erkennungssequenz befindet. Für das Hybridkonstrukt *COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava* wurden zwei Klone von Frau Höcker zur Verfügung gestellt, in denen die entsprechenden Sequenzen für *Cop1* und *Spa1* bereits über eine Avall-Schnittstelle zusammengefügt im Vektor pBluescript vorlagen. Die Klone trugen jeweils im *Cop1*-Bereich (DE41-3) oder *Spa1*-Bereich (DE37) Mutationen. Daher wurde aus dem Klon DE37 die *Cop1-NT*-Sequenz über einen XmaI/Avall-Verdau und die *WD-SPA1*-Sequenz aus dem Klon DE41-3 über einen Avall/EcoRI-Verdau geschnitten, über die Avall-Schnittstelle ligiert und als XmaI/EcoRI-Fragment in den Vektor pBluescript kloniert. Die Subklonierung erfolgte als SacI/EcoRI-Fragment in pSH9 und wiederum als letzter Schritt die Klonierung als PstI-Fragment in pPZP211. Als Hybridkonstrukt dienen bp1 (ATG) -1090 der *Cop1*-cDNA und bp2130-3090 (TGA) der *Spa1*-cDNA.

In einem parallel verfolgten Ansatz wurde ein zweites Hybridkonstrukt aus *COP1* und *SPA1* hergestellt (*COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Xba*). Hierbei wurden bp 1-1174 (statt 1090) von *COP1* und bp 2220 (statt 2130) -3090 von *SPA1* verwendet. Hierzu wurde das entsprechende *SPA1*-Fragment aus dem von U. Höcker zur Verfügung gestellten Klon „*Spa1-35S-CaMV-cassette*“ über XbaI und EcoRI in pBluescript kloniert. In die XbaI-Schnittstelle wurde anschließend das entsprechende NT-*COP1*-Fragment aus NT-*Cop1*-pBS kloniert. Die Fusionssequenz wurde über SacI/EcoRI in pSH9 und von dort wie schon oben beschrieben über PstI in den binären Vektor pPZP211 kloniert.

### 2.1.8 Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurde wildtypisches Saatgut folgender *Arabidopsis thaliana* Ökotypen verwendet: RLD, Columbia, Landsberg *erecta*. Darüber hinaus wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Linien verwendet.

Für alle phänotypischen Charakterisierungen wurden immer die beiden mutierten *SPA1*-Allele *spa1-2* und *spa1-3* eingesetzt. *spa1-3* zeichnet sich durch eine Punktmutation aus, die zu einem verfrühten STOP-Kodon gegen Ende des ersten Exons von *SPA1* führt (Q414 zu STOP). Die Punktmutation in dem *spa1-2* Allel dagegen führt zu einem STOP-Kodon im letzten Exon und damit zu einer Trunkation (Verkürzung) der C-terminalen WD-Repeat Domäne. Beide Allele führen zu gleich starken Phänotypen (Hoecker *et al.*, 1998 & 1999).

Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Doppelmutanten wurde grundsätzlich das *spa1-2* Allel eingesetzt, da die Mutation in diesem Allel durch einen Restriktionspolymorphismus einfach von dem wildtypischen Allel zu unterscheiden ist. Bei den Phytochrom- Mutanten *phyA-101* und *phyB-1* handelt es sich jeweils um Nullmutanten,

d.h. es wird kein intaktes Phytochrom synthetisiert. *fhy1-1* fehlt ein einzelner Adeninrest 617 Basenpaare 3' abwärts des Startkodons. Dies führt zu einem vorzeitigen STOP-Kodon *fhy3-1* trägt eine Punktmutation, die dazu führt, dass die Aminosäure Arginin (R 91) in ein STOP-Kodon gewandelt wird. In *cop1-4* Mutanten werden aufgrund eines verfrühten STOP-Kodons nur 282 statt 675 Aminosäuren exprimiert.

| Mutante                | Ökotyp                        | Referenz   |
|------------------------|-------------------------------|--|
| <i>spa1-3</i>          | RLD                           | Hoecker <i>et al.</i> 1998                               |
| <i>spa1-2</i>          | RLD                           | Hoecker <i>et al.</i> 1998                               |
| <i>phyA-101</i>        | RLD                           | Dehesh <i>et al.</i> 1993                                |
| <i>phyB-1</i>          | RLD                           | Reed <i>et al.</i> 1993                                  |
| <i>spa1-2 phyA-101</i> | RLD / RLD                     | Hoecker <i>et al.</i> 1998                               |
| <i>spa1-2 phyB-1</i>   | RLD / RLD                     | Parks <i>et al.</i> 2001                                 |
| <i>fhy1-1</i>          | Landsberg <i>erecta</i>       | Whitelam <i>et al.</i> 1993; Desnos <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>fhy1-1</i>          | Landsberg <i>erecta</i> / RLD | erhalten von Ute Höcker                                  |
| <i>fhy3-1</i>          | Columbia                      | Whitelam <i>et al.</i> 1993; Wang & Deng, 2002a          |
| <i>fhy3-1</i>          | Columbia / RLD                | erhalten von Ute Höcker                                  |
| <i>fhy1 spa1-2</i>     | Landsberg <i>erecta</i> / RLD | erhalten von Ute Höcker                                  |
| <i>fhy3 spa1-2</i>     | Columbia / RLD                | erhalten von Ute Höcker                                  |
| <i>cop1-4</i>          | Columbia                      | Deng & Quail 1992; Holm <i>et al.</i> , 2001             |

**Tabelle 4:** Verwendetes *Arabidopsis thaliana* Saatgut

## 2.2 Allgemeine Methoden

### 2.2.1 Pflanzenanzucht

Zur Anzucht auf Erde wurden *Arabidopsis*-Pflanzen auf Komposterde (Floraton Nr.1, Floragard, Oldenburg) entweder in einer Anzuchtkammer bei einer konstanten Temperatur von 23°C in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden (h) bei einer Beleuchtung von 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Leuchtstoffröhren Fluora L58W/77 und Natura da Luxe L58W/76, Osram, Berlin) kultiviert oder im Gewächshaus bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 h und bei

einer Photonenflussrate von ca.  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Für die Samengewinnung erfolgte die Pflanzenanzucht in Aracon-Multiplatten (Arasystems, Gent, Belgien).

Für die sterile Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde das Saatgut 10 Minuten mit 25% Klorix (Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg) und 0,02% Triton-X-100 oberflächensterilisiert und anschließend viermal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden auf MS-Medium (4,4 g/l MS-Salze/NaOH pH 5,7; 1% Agar-Agar) ausplattiert (Murashige & Skoog, 1962; Valvekens *et al.* 1988). Um nach einer Transformation das Saatgut auf Anwesenheit des transformierten Plasmids zu selektieren, wurde dem Medium 50mg/l Kanamycin zugegeben. Zur Synchronisierung der Keimung wurde die Aussaat 48 h in Dunkelheit bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Keimlinge in einem Anzuchtschrank bei 23°C in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 h bei einer Beleuchtung von  $40\text{-}70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Lumilux L36W/11-Tageslichtröhren, Osram, Berlin) kultiviert. Nach etwa 10 Tagen wurden die Keimlinge auf Floraton Nr.1-Komposterde umgesetzt und in Anzuchtkammern wie oben beschrieben kultiviert.

Sollte bei den Lichtexperimenten die Hypokotyllänge der Keimlinge bestimmt werden, wurden die Samen zunächst wie oben beschrieben oberflächensterilisiert und auf MS-Medium ohne Zucker ausplattiert. Nach der Stratifizierung wurden die Samen drei Stunden zur Induzierung der Keimung mit Weißlicht behandelt und anschließend für 21 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden die Samen unter LED-Lichtquellen (Quantum Devices, Wisconsin, USA) mit den entsprechenden Lichtqualitäten und -intensitäten für 3 Tage bei 21°C angezogen. Die benötigten Photonenflussraten wurden mit Hilfe von Photometern kontrolliert und eingestellt (Quantum Photometer Modell LI-250, LI-COR, Lincoln, USA und SKP200, SKYE Instruments LTD, USA).

Zur Kontrolle der Experimente mit gepulstem Licht wurde eine programmierbare, digitale Zeitschaltuhr (ChronTrol, San Diego, CA, USA) verwendet. Um Photonenflussraten zu erreichen, die kleiner als  $0.01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  waren, wurde teilweise belichteter Röntgenfilm (Kodak Scientific imaging films, X-OMAT, AR) definierter Transmission (10% oder 50%) zwischen den Lichtquellen und den Platten mit Saatgut positioniert.

### 2.2.2 Bestimmung der Hypokotyllängen

Die Keimlinge wurden vorsichtig auf den Agar gedrückt und mit einer Digitalkamera (Pixera, Cupertino, CA, USA oder Olympus CAMEDIA E-10, Hamburg) fotografiert. Anschließend wurde mit dem Programm NIH IMAGE (National Institutes of Health IMAGE software,

Bethesda, MD, USA) die Länge der Hypokotyle bestimmt. Die statistische Auswertung dieser Daten erfolgte mit dem Programm Kaleida Graph (Synergy Software, Reading, PA, USA).

### **2.2.3 Anthocyanbestimmung**

Um die Akkumulation von Anthocyanen unter den verschiedenen Lichtbedingungen zu messen, wurden jeweils fünfzig Samen unter sterilen Bedingungen (siehe Abschnitt 2.2.1) auf MS-Medium mit 2% Saccharose ausplattiert. Für Experimente ohne Saccharose wurden jeweils 200 Samen auf 1%-igem Agarmedium ausplattiert. Nach entsprechender Lichtbehandlung wurden die Keimlinge im Grünlicht in 500µl (für 50 Keimlinge) oder 800 µl (für 200 Keimlinge) Extraktionspuffer (18 % Propanol, 1% HCl) aufgenommen, kurz durchmischt und anschließend für mindestens 18 Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben wurden für 20 Minuten bei 10000 Upm zentrifugiert und der abgenommene Überstand wurde nochmals für 10 min zentrifugiert (Schmidt and Mohr 1981). Die Anthocyangehalte wurden dann spektroskopisch am Photometer (Perkin Elmer Instruments, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Norwalk, CT, USA) bestimmt ( $A_{535}$ - $A_{650}$ ) und die ermittelten Daten anschließend mit dem Programm Kaleida Graph statistisch ausgewertet.

### **2.3.4 Adulte Phänotypen und Bestimmung des Blühzeitpunktes**

Auf MS-Platten angezogene Keimlinge wurden zunächst eindeutig in Bezug auf den Genotyp und das Vorhandensein des Transgens identifiziert. Um die adulten Phänotypen und Blühzeitpunkte verschiedener Linien zu bestimmen, wurden die Keimlinge von MS-Platten auf Erde in Multiplatten umgesetzt. Pro Linie wurden mindestens zehn Keimlinge eingesetzt. Die Verteilung auf der Multiplatte wurde mit Hilfe des Programms Research Randomizer (<http://www.randomizer.org>) zufällig (randomisiert) vorgenommen.

Zur Charakterisierung der adulten Phänotypen wurde der Gesamthabitus der Pflanzen beurteilt. Hierzu gehörten die Rosettengröße, sowie Blattlänge und Petiollänge des Blattes, das zum Zeitpunkt der Messung am größten war. Als Blühzeitpunkt galt der Tag, an dem die Infloreszenz der Pflanze 1 cm hoch war. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch die Blätter der Rosette gezählt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Klonierung von DNA-Fragmenten

Molekularbiologische Grundtechniken wie der Verdau von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten, Ligation von DNA-Fragmenten, gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung von Nukleinsäuren erfolgten nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 2001).

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick-Gel-Extraction-Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Den Gellösungen wurde 1mM Guanosin zugefügt, um die DNA vor UV-Schäden zu schützen. Nach Elektrophorese wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht bei 302 nm identifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.3.2 Transformation von *E.coli*

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgt unter Verwendung von 50mM CaCl<sub>2</sub> nach Cohen *et al.* (1972). Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert. Gefrierkompetente *E.coli* Bakterien wurden mit Hilfe der Hitzeschock-Methode (Hanahan *et al.*, 1991) mit Plasmid-DNA transformiert. Positive Klone wurden auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen selektiert. Die Vermehrung positiver Klone erfolgte in LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen. Die gewünschte Menge Medium wurde in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit dem jeweiligen Bakterienstamm (einzelne Kolonien von einer LB-Platte) angeimpft und mit 200 Upm im Rotationsschüttler bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.3.3 Isolation von Plasmid-DNA

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden entweder nach der Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) oder mit Hilfe des QIASpin Miniprep Kits (QIAGEN, Hilden) isoliert. Zur Präparation größerer Mengen (Midi-Prep aus 50-100ml Kulturen) wurden JetStar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.3.4 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden DNA-Fragmente aus genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* oder aus Plasmid-DNA amplifiziert. Für analytische Zwecke wurde die Taq-Polymerase (O. Bläsing, Universität Düsseldorf) oder in speziellen Fällen die Advantage-cDNA-KlenTaq-Polymerase (Clontech, Palo Alto, USA) verwendet. Für Klonierungen wurde die Pfu-



Polymerase (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Als Matrize dienten in einem 50 µl Ansatz je 1 µl genomische DNA (siehe Abschnitt 2.3.6) oder ca. 2 ng Plasmid-DNA, zu der je 0,1 µg Primer, je 2,5 mM dNTPs und 1U Polymerase mit entsprechendem Puffer zugegeben wurden. Die Temperaturprofile für die Reaktionen richteten sich nach den Primer-Eigenschaften und den Vorgaben des Polymerase-Herstellers. Normalerweise wurden 30-40 Reaktionszyklen mit Hilfe des Gene Amp<sup>TM</sup> PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Langen) durchgeführt.

Zur Verifizierung der Insertion des richtigen DNA-Fragments nach einer Klonierung wurde eine PCR-Reaktion mit jeweils einem Fragment-spezifischen und einem Vektor-spezifischen Primer durchgeführt. Als Matrize diente ein Teil der zu untersuchenden Bakterienkolonie.

### **2.3.5 Semi-Quantitative Reverse Transkriptions-PCR**

1 µg Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 2.3.8 A) von drei Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde mittels RT-PCR (SUPERSRIPT<sup>TM</sup> II RT, GIBCO BRL) unter Einsatz von Oligo-(dT)-Primern nach Herstellerangaben in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. 2 µl der so erhaltenen Einzelstrang-cDNA wurden für eine anschließende PCR-Amplifikation mit KlenTaq-Polymerase und sequenzspezifischen Primern eingesetzt. Aus dem 50 µl Reaktionsansatz wurden nach 25, 30, 35 und 40 Zyklen 5 µl Proben entnommen, auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und so vergleichend quantifiziert.

### **2.3.6 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

20 ng der zu transformierenden DNA (Plasmid pPZP211, Abschnitt 2.1.3) wurden zu einem 40 µl Aliquot elektrokompenter Agrobakterien in einer Elektroporationsküvette (Fa. BTX, San Diego) gegeben und mit Hilfe des Electro Cell Manipulator 600 (Fa. ITC Biotechnology GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben standardisiert transformiert.

Über Kolonie-PCR wurden einzelne Kolonien auf Anwesenheit des Fusionsgenes überprüft. Darüber hinaus wurden ebenfalls Minipräparationen der zur Transformation von *Arabidopsis* verwendeten Kulturen getestet.

### **2.3.7 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit der „Floral Dip“-Methode**

Für die Transformation wurden aus Einzelkolonien zunächst 4 ml Vorkulturen (YEB-Medium: 5 g/l Fleischextrakt; 1 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Pepton; 5 g/l Saccharose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) von transgenen Agrobakterien für 48 h bei 28 °C und 200 Upm auf einem Schüttler angezogen. Diese Kulturen wurden zu 500 ml frischem YEB-Medium gegeben und weitere 24 h unter

den gleichen Bedingungen inkubiert. Daraufhin wurden die Agrobakterien für 10 min in einem GSA-Rotor bei 4 °C und 3500 Upm in einer Sorvall-Zentrifuge (RC-B5, Fa. Sorvall, Bad Homburg) sedimentiert. Die weitere Prozedur und Transformation von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erfolgte nach dem Protokoll von Clough & Bent (1998). Pro Konstrukt wurden wenigstens 30 Pflanzen transformiert. Nach Abtrocknen der Pflanzen wurde das Saatgut pro Topf (jeweils zehn Pflanzen) geerntet.

Das Saatgut wurde wie unter 2.2.1 beschrieben behandelt und durch Selektion mit dem Antibiotikum Kanamycin (50mg/l) wurden die transgenen Keimlinge identifiziert und auf Erde umgesetzt.

### **2.3.8 Isolierung genomischer DNA**

Zur Isolierung genomischer DNA aus Einzelpflanzen bzw. Keimlingen wurden jeweils ein Blättchen von ca. 3 Wochen alten Pflanzen oder ganze Keimlinge in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß mit flüssigem Stickstoff überführt, mit einem Pistill gemörsert und mit 400 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris/HCl pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% (w/v) SDS) homogenisiert (nach Edwards *et al.* 1991). Die Extrakte wurden bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert (Tischzentrifuge; Centrifuge 5415 D, Firma Eppendorf, Hamburg). Zur Fällung der DNA wurden je 300 µl der Überstände mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 5 Minuten bei 13.000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge). Das Pellet wurde ca. 5 min luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen (20-100µl) TE-Puffer (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5) bei 4°C rückgelöst.

### **2.3.9 Genotypisierung**

Um den Genotyp von Pflanzen zu verifizieren, wurden spezielle Primer entworfen. Da es sich bei den zu untersuchenden Linien um EMS-Mutanten handelte, die somit auf Punktmutationen in den betroffenen Genen zurückgehen, konnte auf zwei verschiedene Strategien zurückgegriffen werden. Im einfachsten Fall wurde durch die Punktmutation eine Restriktionsstelle in der Sequenz zerstört oder geschaffen. Nach Amplifizierung des entsprechenden Bereiches konnte durch einen Restriktionsdau mit dem entsprechenden Enzym das mutierte Allel vom wildtypischen Allel einfach unterschieden (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, RFLP) werden. Diese Methode wurde für den Nachweis des *fhy3-1* Allels verwendet. In diesem Allel wird durch eine Punktmutation eine XbaI-Schnittstelle zerstört. Unter Verwendung der Primer Fhy3-PolyF und Fhy3-PolyR wurde ein 520 bp großes PCR-Produkt erzeugt. Durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym

XbaI konnten Wildtyp und *thy3-1* Allel unterschieden werden. Der Verdau des vom Wildtyp stammenden PCR-Produkts ließ ein 180 und ein 340 bp großes Fragment erkennen.

Wurde durch die Punktmutation keine Restriktionschnittstelle verändert, so ließen sich zwei verschiedene Allele dennoch unterscheiden. Hierbei wurden die Primer so gewählt, dass die letzte Base 3' des (Hin- oder Rück-) Primers genau auf dem Mutationsort lag. Der Primer konnte je nachdem, ob er die wildtypische oder mutierte Sequenz trug, besser oder, unter optimalen PCR-Bedingungen, nur an wildtypische oder mutierte DNA binden. Diese Methode wurde für den Nachweis des *cop1-4* Allels verwendet. Hierzu wurde der Primer *cop1-4* STOP-R kombiniert mit dem Primer *cop1-4* STOP-F eingesetzt, um das *cop1-4* Allel, oder mit dem Primer *cop1-4*-C-F verwendet, um das Wildtypallel nachzuweisen.

### 2.3.10 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus 3 Wochen alten Keimlingen erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits der Firma QIAGEN. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte spektroskopisch am Photometer (Perkin Elmer Instruments, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Norwalk, CT, USA). Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Konzentrationsbestimmung und Qualität der Probe ein Aliquot auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt.

### 2.3.11 Immobilisierung von RNA (Northern-Transfer)

Je 5 µg RNA wurden mit Glyoxal denaturiert (McMaster & Carmichael 1977) und auf einem 1,2 %-igen Agarosegel mit MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,0) aufgetrennt. Als Längenstandard wurde der RNA-Längenstandard von Gibco nach Herstellerempfehlung eingesetzt. Der Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte für drei Stunden oder über Nacht mit 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat) (Hybond-N; Amersham) mit Hilfe des Turboblotter (200 x 250 mm; Schleicher-Schuell, Dassel). Zur Fixierung der RNA wurde die Membran im UV-Crosslinker der Firma Amersham (Braunschweig) mit 300 J/m<sup>2</sup> bestrahlt und anschließend trocken und dunkel gelagert. Der geblottete Bereich des Längenstandards wurde anschließend von der restlichen Membran abgeschnitten und einer Methylenblau-Färbung (Wilkenson *et al.*, 1990) unterzogen und bis zum Vergleich mit eventuellen Signalen trocken gelagert.

### 2.3.12 Herstellung radioaktiver Sonden

Die radioaktive Markierung von aufgereinigten PCR-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des „Megaprime DNA Labelling Kit“ (Amersham) nach einer Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) gemäß den Vorgaben des Herstellers. Pro Markierungsreaktion wurden 25 ng gereinigtes DNA-Fragment (siehe Abschnitt 2.1.6) verwendet. Zur Abtrennung nicht-eingebauter Nukleotide und unspezifisch gebundenem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-dATP wurden alle Sonden über Centri-SEP-Säulen (Centri-SEP Spin Columns, Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA) aufgereinigt.

### 2.3.13 Hybridisierung und Detektion filtergebundener Nukleinsäuren

Hybridisierungen wurden nach der Methode von Church und Gilbert (1984) in einem Hybridisierungssofen durchgeführt. Die Membranen wurden 1 bis 2 h in Hybridisierungspuffer (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 7 % (w/v) SDS; 1 % BSA; 2,5 mM EDTA; pH 7,2) bei 65°C vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der markierten, denaturierten Sonde erfolgte über Nacht in 10 ml Hybridisierungspuffer. Unspezifisch gebundene Sonden wurden durch mehrere Waschstufen von je 1 Stunde entfernt. Dazu wurden SSC-Lösungen (1x SSC: 150 mM NaCl; 15 mM NaCitrat; pH 7,0) verwendet, wobei die Konzentration des Puffers stufenweise reduziert wurde (2x SSC; 1x SSC; 0,5x SSC mit je 0,1 % (w/v) SDS). Die abschließende Waschung mit 0,5x SSC/0,1 % (w/v) SDS erfolgte in einer Schale im Wasserbad bei 65 °C unter starkem Schütteln. Die Filter wurden feucht in Frischhaltefolie verpackt und 48 h bis 72 h bei Raumtemperatur mit strahlungssensitiven Imager-Platten (BAS-IP-MP 2025) belegt. Diese Platten wurden mit einem Bio-Imager (Bio-Imaging Analyzer BAS-1800, Programm: Image Reader V 1.4E) eingelesen und die ermittelten Daten mit dem Programm Image Gauge 3.0 (alles: Fa. Fuji Photo Film Co, Düsseldorf) ausgewertet.

### 2.3.14 Computerunterstützte Sequenzanalysen

Für die Analyse von Sequenzen, Sequenzvergleiche und die Identifizierung von Restriktionsschnittstellen wurden die Computerprogramme von MacMolly Tetra (Softgene GmbH, Bocholt; Schöneberg *et al.* 1994) verwendet.

Mit Hilfe des BLAST-Servers (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.* 1997) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden detaillierte Datenbankanalysen zum Sequenzvergleich auf Nukleinsäure- und/oder Aminosäureebene durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss der *spa1*-Mutationen auf die VLFR und die FR-HIR

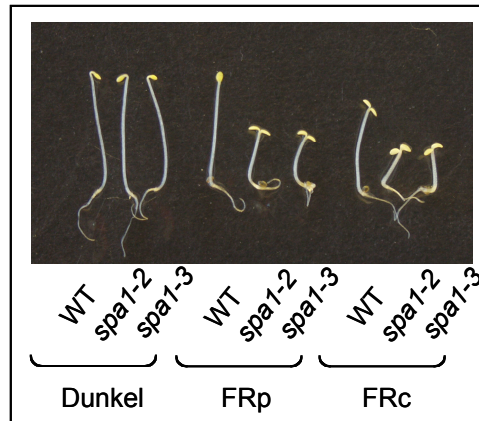
Detaillierte physiologische und genetische Analysen haben gezeigt, dass sich die phyA Signaltransduktion in unterschiedliche Wege aufzweigt, die den beiden Antwortmodi, der VLFR und der FR-HIR, zugeordnet werden können. So konnte zum Beispiel bei einer Untersuchung der *Arabidopsis* Ökotypen Columbia und Landsberg *erecta* festgestellt werden, dass diese sich in ihrer VLFR unterscheiden. Hierbei wurden zwei polymorphe Loci (QTLs, *quantitative trait loci*), *VLFR1* und *VLFR2*, identifiziert, die bei der VLFR eine Rolle spielen, nicht aber bei der FR-HIR (Yanovsky *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu ist zum Beispiel ein intaktes *FHY3* Gen lediglich für die FR-HIR notwendig (Yanovsky *et al.*, 2000). Auf der Basis der bisherigen Daten sollte die Rolle von SPA1 im Netzwerk der phyA-Signaltransduktion näher untersucht werden. Ziel der Experimente war, den Einfluss von SPA1 auf die phyA-vermittelte VLFR und/oder FR-HIR zu charakterisieren.

##### 3.1.1 Deetiolierung der *spa1*-Keimlinge in gepulstem und kontinuierlichem FR

Der Phänotyp der *spa1*-Mutanten in FRc könnte auf eine erhöhte FR-HIR, eine erhöhte VLFR oder eine Verstärkung beider Antwortmodi zurückgehen. Um zunächst den Einfluss von *spa1*-Mutationen auf die VLFR näher zu charakterisieren, wurden Wildtyp- und *spa1*-Keimlinge unter folgenden Bedingungen angezogen: unter FR Pulsen (FRp), die ausschließlich eine VLFR hervorrufen und unter FRc, welches unter niedrigen Photonenflussraten eine VLFR und unter höheren Flussraten in erster Linie eine FR-HIR, aber auch eine VLFR auslöst.

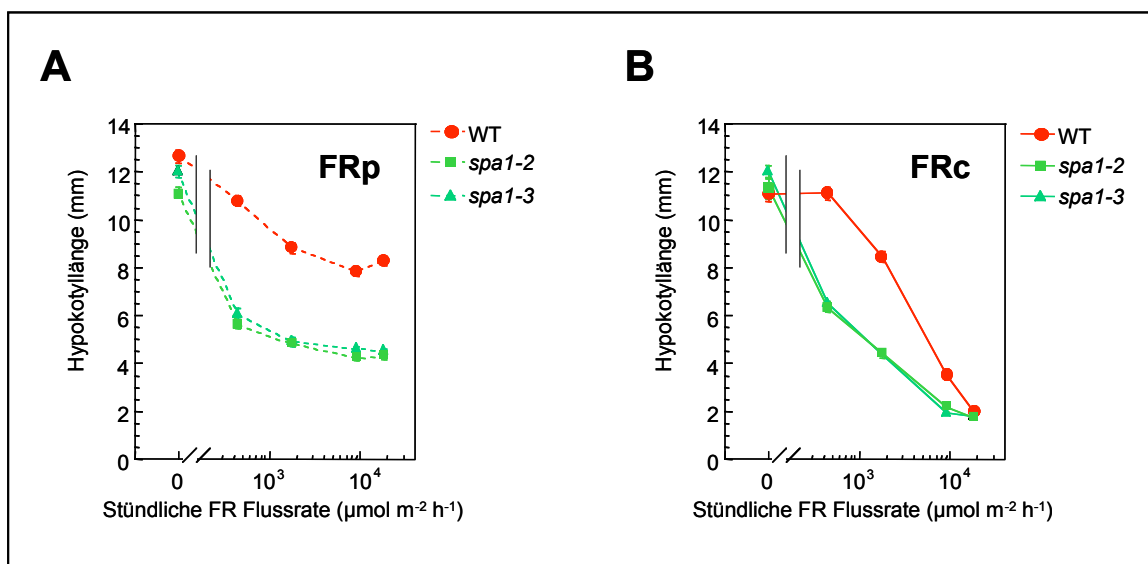
Sowohl unter FRc als auch unter FRp-Bedingungen zeigten *spa1*-Keimlinge ein im Vergleich zum Wildtyp stark verkürztes Hypokotyl (Abbildung 8). Im Dunkeln angezogene Keimlinge zeigten keinen Phänotyp. Um den tatsächlichen Einfluss der verschiedenen Bedingungen zu bestimmen, wurden die Keimlinge unter verschiedenen Flussraten und Frequenzen von FRp und FRc untersucht. Um einen direkten Vergleich zwischen den Auswirkungen von FRc oder FRp zu ermöglichen, wurden die Keimlinge unter gleichen Gesamtphotonenflussraten angezogen.

Betrachtet man zunächst die Antwort der Keimlinge auf FRp-Bedingungen, so wird deutlich, dass *spa1*-Keimlinge unter stündlicher FRp-Behandlung eine extrem verstärkte Antwort zeigten (Abbildung 9A): *spa1*-Keimlinge hatten im Vergleich zum Wildtyp unter allen eingesetzten FR-Flussraten ein stark verkürztes Hypokotyl.



**Abbildung 8:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana spa1* Keimlingen unter stündlichen FRp und FRc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit stündlichen 3-min-Dunkelrot-Lichtpulsen (FRp) oder kontinuierlichen dunkelrotem Licht (FRc) einer Flussrate von  $1800 \mu\text{mol m}^{-2}$  bestrahlt. Die stündliche Photonenflussrate von  $1800 \mu\text{mol m}^{-2}$  entsprach einer Flussrate von  $0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  FRc und einem 3-Minuten-FRp-Puls mit einer Flussrate von  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , der einmal pro Stunde gegeben wurde.

Die Sättigung dieser Reaktion auf FRp erfolgte wie bei den Wildtyp-Keimlingen bei ungefähr  $2000 \mu\text{mol m}^{-2}$ , was einer klassischen VLFR entspricht (Kendrick & Kronenberg, 1994). Dies gilt für beide hier untersuchten *spa1*-Allele, *spa1-2* und *spa1-3*.



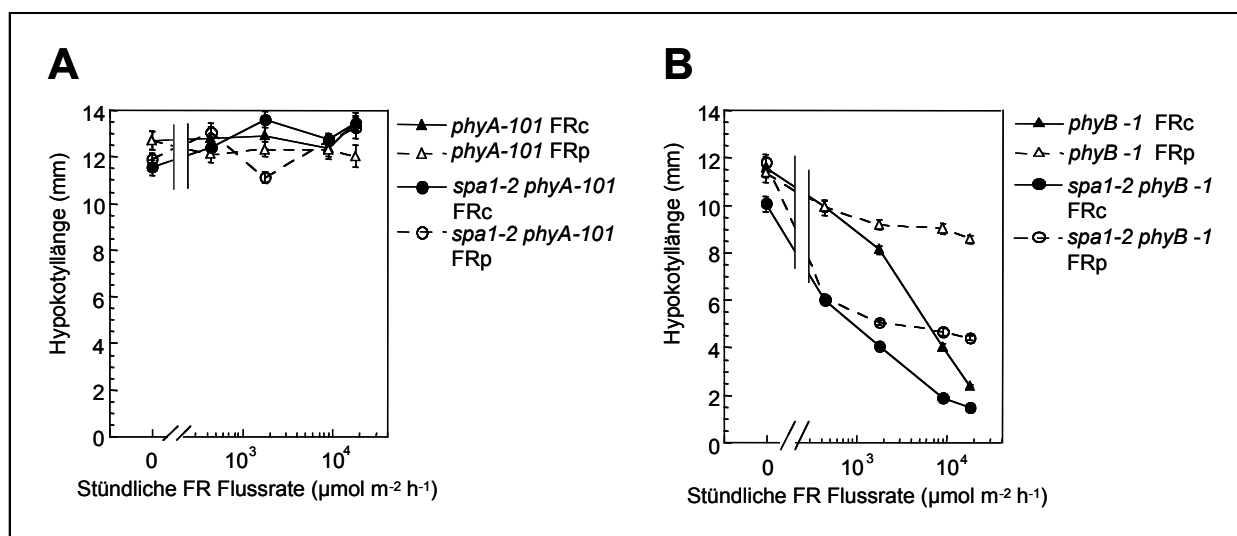
**Abbildung 9:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana spa1* Keimlingen unter stündlichen FRp und FRc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit stündlichen 3-min-Dunkelrot-Lichtpulsen (FRp) oder kontinuierlichem dunkelrotem Licht (FRc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden gegen die Photonenflussrate pro Stunde aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

**A** Hypokotyllänge von Wildtyp (RLD) und *spa1* Keimlingen unter FRp.

**B** Hypokotyllänge von Wildtyp (RLD) und *spa1* Keimlingen unter FRc.

Die Antwort der *spa1*-Keimlinge auf FR war unter Niedrigst-Fluence-Bedingungen (VLF), also den entsprechenden Lichtpulsen beinahe gesättigt. Dies war an der nur leichten zusätzlichen Hemmung des Hypokotyllängenwachstums im FRc verglichen mit unter FRp gewachsenen Keimlingen erkennbar (Abbildung 9A und B). Daher ist unter diesen Bedingungen auch keine eindeutige Aussage über den Einfluss der *spa1*-Mutationen auf die FR-HIR möglich. Die Hemmung des Hypokotyllängenwachstums bei Wildtyp-Keimlingen im FRc war dagegen deutlich stärker als unter FRp-Bedingungen. Darüber hinaus wurde die Antwort mit steigender FRc-Flussrate verstärkt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die VLFR des Hypokotyllängenwachstums durch die *spa1*-Mutationen deutlich verstärkt wurde.



**Abbildung 10:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana phyA-101*, *spa1-2 phyA-101*, *phyB-1* und *spa1-2 phyB-1* Keimlingen unter stündlichen FRp und FRc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit stündlichen 3-min-Dunkelrot-Lichtpulsen (FRp) oder kontinuierlichem dunkelrotem Licht (FRc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden gegen die Photonenflussrate pro Stunde aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

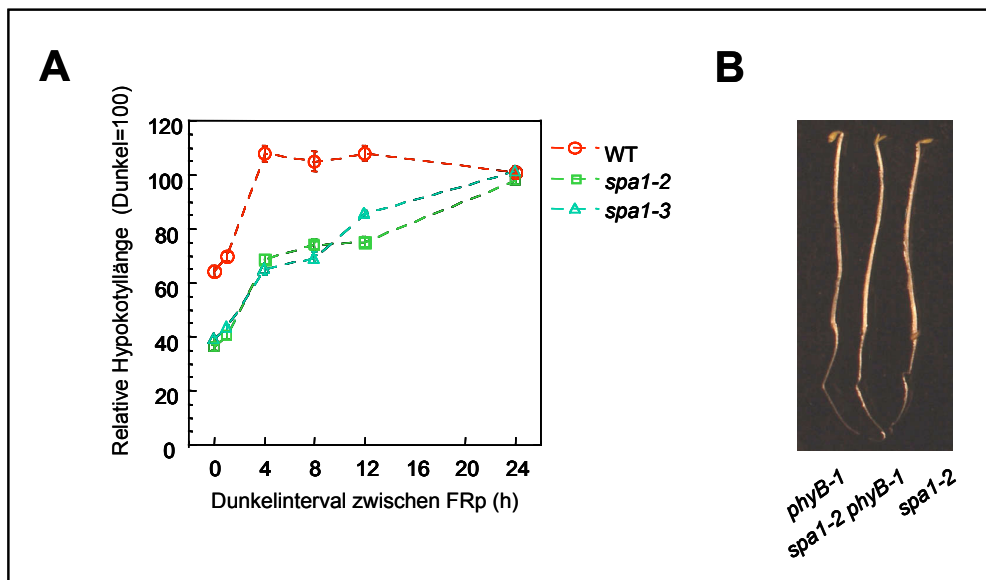
**A** Hypokotyllänge von *phyA-101* und *spa1-2 phyA-101* Keimlingen.

**B** Hypokotyllänge von *phyB-1* und *spa1-2 phyB-1* Keimlingen.

Da die VLFR wie beschrieben eine durch *phyA* vermittelte Antwort ist, sollte auch diese verstärkte Reaktion der *spa1*-Keimlinge auf FR *phyA*-abhängig sein. Um dies zu verifizieren, wurden Untersuchungen mit *spa1 phyA*- und *spa1 phyB*-Doppelmutanten durchgeführt. Beide Phytochrom-Allele *phyA-101* und *phyB-1* sind Nullallele, d.h. es wird kein *phyA* bzw. *phyB* gebildet. Tatsächlich zeigten *spa1 phyA*-Keimlinge keine Reaktion auf FRp und FRc (Abbildung 10A), während die *phyB*-defizienten *spa1 phyB*-Keimlinge eine ähnlich starke Antwort wie *spa1*-Keimlinge zeigten (Abbildung 10B). Der hier untersuchte Phänotyp von *spa1*-Keimlingen ist also *phyA*-abhängig.

### 3.1.2 Der Effekt der Dunkelzeiträume zwischen FRp bei der Deetiolierung

Wie stark die VLFR in *spa1*-Keimlingen erhöht ist, wurde in einem Experiment untersucht, bei dem die Grenze der Sensitivität dieser Antwort getestet wurde. Hierbei wurde ein drei Minuten langer FR-Puls nach unterschiedlich langen Dunkelphasen (alle ein, vier, acht, zwölf und 24 Stunden) gegeben. Wildtyp-Keimlinge zeigten nur dann eine VLFR, wenn der Lichtpuls stündlich gegeben wurde (Abbildung 11A). *spa1*-Keimlinge dagegen zeigten eine VLFR, wenn der Puls jede Stunde oder alle vier, acht oder zwölf Stunden gegeben wurde. Mit sinkender Frequenz der gegebenen Pulse verringerte sich auch das Ausmaß der Antwort. Dennoch reichten sechs Drei-Minuten-Pulse verteilt auf drei Tage (12-Stunden-Dunkelintervall), um eine starke VLFR in den *spa1*-Keimlingen hervorzurufen.



#### **Abbildung 11:** Der Effekt von Dunkelintervallen zwischen FRp auf die Deetiolierungsantwort.

Die Keimlinge wurden drei Tage mit 3-min-Dunkelrot-Lichtpulsen (FRp) unterbrochen von Dunkelphasen der angegebenen Dauer (Dunkelintervall 0 = kontinuierliches FR, FRc) behandelt. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an. Die Hypokotyllänge der Keimlinge im Dunkeln wurde auf 100 gesetzt und die Hypokotyllänge unter den anderen Lichtbedingungen wurde als relative Werte auf den Dunkelwert bezogen.

**A** Hemmung des Hypokotyllängenwachstums durch FRp bei Wildtyp und *spa1* Keimlingen.

**B** Phänotyp von *phyB-1*, *spa1-2 phyB-1* und *spa1-2*-Keimlingen, die alle 24h einem FRp ausgesetzt waren.

Eine Bestrahlung mit nur drei Pulsen verteilt über drei Tage (24-Stunden-Dunkelintervall) löste auch bei *spa1*-Keimlingen keine sichtbare VLFR mehr aus (Abbildung 11A). Jedoch konnte gezeigt werden, dass *spa1 phyB*-Keimlinge als Antwort auf nur drei FR-Pulse alle 24 Stunden mit einer Öffnung der Kotyledonen reagierten (Abbildung 11B). Im Vergleich dazu reagierten die Einzelmutanten *spa1* und *phyB* nicht mehr. Dies unterstützt Ergebnisse, die

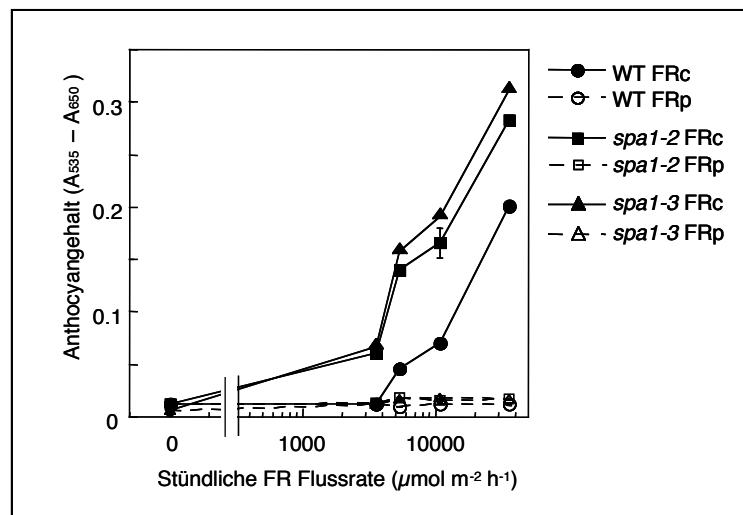


einen negativen Einfluss von *phyB* auf die *phyA*-vermittelte VLFR zeigen konnten (Mazzella *et al.* 1997, Hennig *et al.* 2001).

Insgesamt unterstreicht dieses Experiment den starken Einfluss der *spa1*-Mutationen auf die VLFR von Keimlingen.

### 3.1.3 Die FR-HIR in *spa1*-Keimlingen ist ebenfalls erhöht

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die VLFR durch Mutationen im *SPA1*-Gen erhöht wird. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern auch die FR-HIR in *spa1*-Keimlingen verändert ist. Die Akkumulation von Anthocyanen im FRc wird durch *phyA* reguliert und diese Antwort ist in erster Linie eine FR-HIR. Es ist bereits bekannt, dass diese Akkumulation in *spa1*-Keimlingen erhöht ist (Hoecker *et al.* 1998).



**Abbildung 12: Anthocyan Akkumulation in Arabidopsis *spa1* Keimlingen nach Bestrahlung mit stündlichen FRp oder FRc.** Die Keimlinge wurden drei Tage mit stündlichen 3-min-Dunkelrot-Lichtpulsen (FRp) oder kontinuierlichem Dunkelrot-Licht (FRc) der gleichen Gesamtphotonenflussrate bestrahlt. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

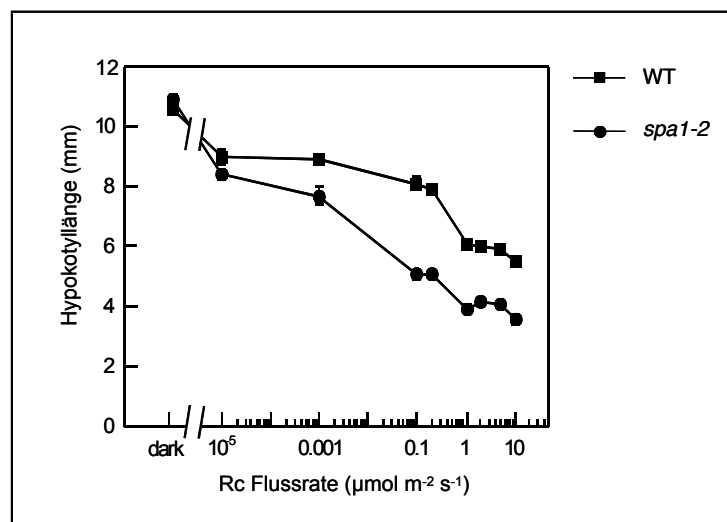
Eine Messung der Anthocyanengehalte in Keimlingen, die unter FR angezogen wurden, sollte klären, ob *SPA1* auch in der FR-HIR eine Rolle spielt. Hierzu wurden die Keimlinge auf Agarplatten ohne Zuckerzusatz im FR angezogen. Unter diesen Bedingungen war gewährleistet, dass unter VLFR-Bedingungen (FRp) nur eine vernachlässigbare Synthese von Anthocyanen stattfand. Dies war erkennbar an den kaum messbaren Anthocyangehalten von Wildtyp- und *spa1*-Keimlingen unter FRp-Behandlung (Abbildung 12). Eine FRc-Behandlung mit der gleichen Gesamtflussrate führte zu deutlich höheren Anthocyangehalten sowohl in *spa1*- als auch in Wildtyp-Keimlingen (Abbildung 12), was bestätigt, dass die Anthocyan-Akkumulation im FR hauptsächlich auf die FR-HIR zurückgeht. In *spa1*-

Keimlingen waren die Anthocyangehalte signifikant höher als im Wildtyp (Abbildung 12). Somit konnte festgestellt werden, dass auch die FR-HIR durch *spa1*-Mutationen verstärkt wird.

### 3.1.4 Der Hellrotlicht-Phänotyp der *spa1*-Mutanten

Normalerweise handelt es sich bei einer Antwort auf Rc in erster Linie um eine phyB-vermittelte LFR (*low fluence response*). Diese wird von Photonenflussraten über  $10^{-2} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgelöst, während niedrigere Flussraten eine phyA-vermittelte VLFR auslösen (Mazella *et al.*, 1997). Da *spa1*-Keimlinge einen phyA-abhängigen Phänotyp im kontinuierlichen Rotlicht (Rc) zeigen (Hoecker *et al.*, 1998), sollte untersucht werden, ob dieser Effekt ebenfalls von einer stark erhöhten VLFR ausgelöst wird. Hierzu wurden Keimlinge unter verschiedenen Rc-Photonenflussraten angezogen.

In der Reaktion der *spa1*-Keimlinge waren zwei verschiedene Phasen erkennbar (Abbildung 13): *spa1*-Keimlinge reagierten im Vergleich zum Wildtyp auf Rc-Flussraten unter  $10^{-1} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mit deutlich vermindertem Hypokotyllängenwachstum. Bei Rc-Flussraten über  $10^{-1} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  waren die *spa1*-Keimlinge zwar immer noch kürzer als Wildtyp-Keimlinge. Die Zunahme der Verkürzung war jedoch bei Wildtyp-Keimlingen deutlich stärker ausgeprägt als bei *spa1*-Keimlingen. Dies ist an der unterschiedlichen Steigung der Kurven zu erkennen: *spa1*-Keimlinge reagieren in erster Linie verstärkt auf niedrige Flussraten, also in einem Bereich, der eine phyA-vermittelte VLFR auslöst.



**Abbildung 13:** Hemmung des Hypokotyllängenwachstums durch Rc bei Wildtyp (RLD)- und *spa1*-Keimlingen. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem Rotlicht (Rc) bestrahlt. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

## 3.2 Der phyA-abhängige Blaulichtpheänotyp von *spa1*-Mutanten

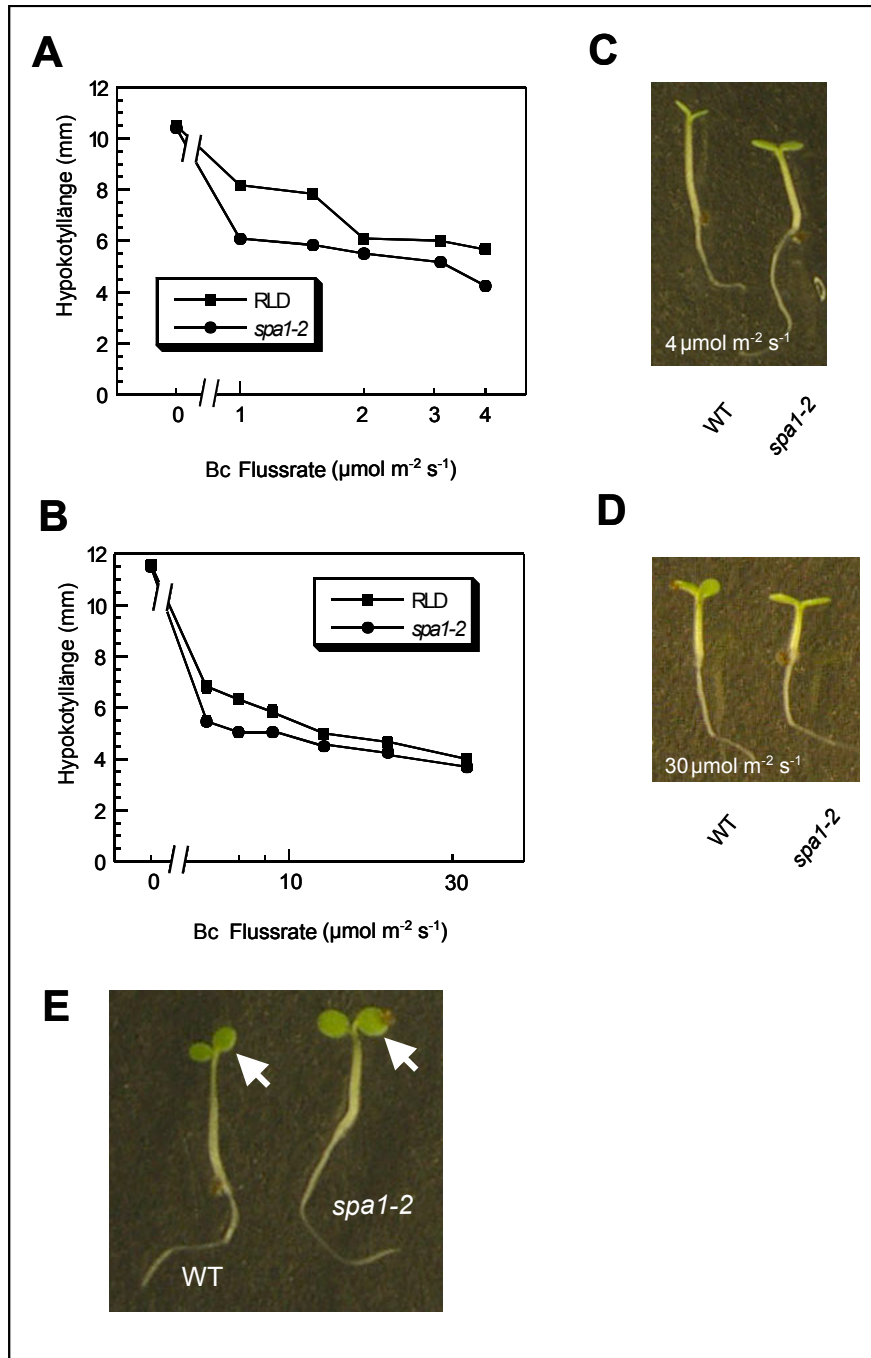
Für die Deetiolierung von Keimlingen in blauem Licht (Bc) sind in erster Linie die Cryptochrome zuständig. Jedoch spielt auch Phytochrom A eine gewisse Rolle im Blaulich. So hat phyA eine Funktion bei der Hemmung des Hypokotyllängenwachstums unter niedrigen Blaulichflussraten ( $< 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und ist der einzige Photorezeptor, der die Induktion der Samenkeimung nach Blaulich unter VLFR-Bedingungen vermitteln kann (Shinomura *et al.*, 1996; Poppe *et al.*, 1998; Neff & Chory, 1998). Mittlerweile sind mindestens zwei Faktoren, SUB1 und HFR1, bekannt, die sowohl in der phyA- als auch in der Cryptochrom-Signaltransduktion eine Rolle spielen (Guo *et al.*, 2001; Duek & Fankhauser 2003). Es stellte sich somit die Frage, ob auch *spa1*-Keimlinge einen Phänotyp im Blaulich zeigen und darüber hinaus, ob auch dieser Phänotyp ausschließlich phyA-abhängig ist.

### 3.2.1 Deetiolierung der *spa1*-Keimlinge im Blaulich

Um einen eventuellen Phänotyp von *spa1*-Keimlingen im Blaulich feststellen zu können, wurde die Deetiolierung von *spa1*-Keimlingen im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen unter einer Reihe verschiedener Photonenflussraten von kontinuierlichem Blaulich (Bc) untersucht.

Zunächst wurde die Hypokotyllänge der Keimlinge bestimmt. Die Hypokotyle der *spa1*-Keimlinge waren im Vergleich zum Wildtyp kürzer (Abbildung 14A und B). Dieser Phänotyp war bei sehr niedrigen Bc-Flussraten bis zu  $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  am stärksten ausgeprägt (Abbildung 14A, B und C). Unter höheren Bc-Flussraten war kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und *spa1*-Keimlingen mehr erkennbar (Abbildung 14B und D).

Neben der Hemmung des Hypokotyllängenwachstums sind die Öffnung und das Wachstum der Kotyledonen Vorgänge im Prozess der Deetiolierung. Auch hier war ein Unterschied zwischen *spa1*-Keimlingen und Wildtypkeimlingen zu erkennen. Die Kotyledonen von *spa1*-Keimlingen waren deutlich größer als die des Wildtyps (Abbildung 14E).



**Abbildung 14: Hypokotyllängenwachstum und Kotyledonenphänotyp von *Arabidopsis thaliana spa1*-Keimlingen unter Bc.** Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem Blaulicht (Bc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden gegen die Photonenflussrate aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

**A** Hypokotyllänge von Wildtyp (RLD) und *spa1*-Keimlingen unter niedrigen Bc-Flussraten.

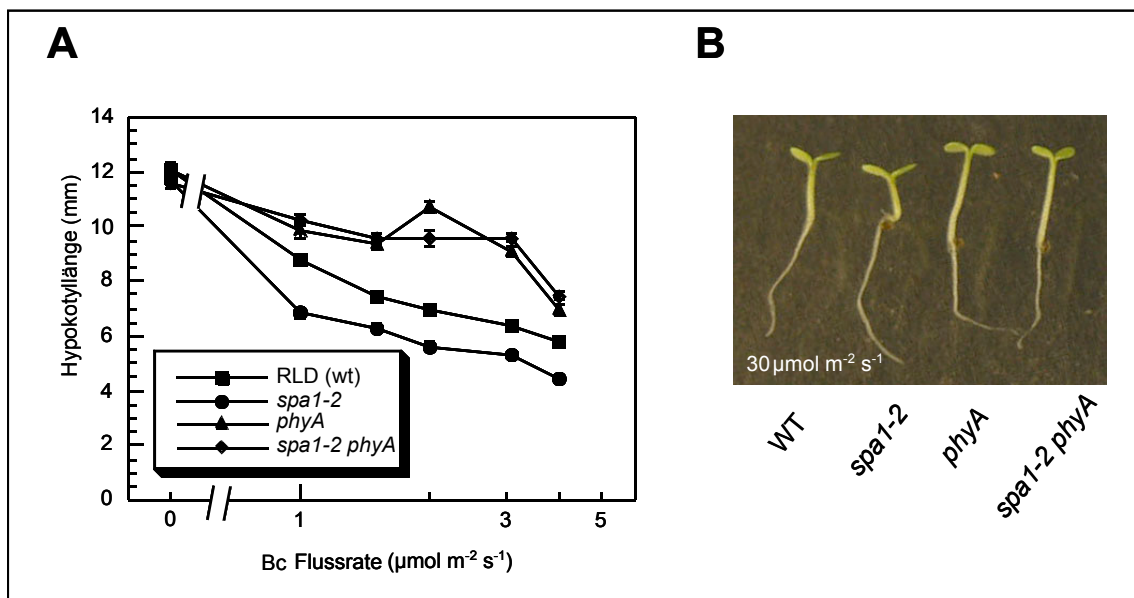
**B** Hypokotyllänge von Wildtyp und *spa1*-Keimlingen unter höheren Bc-Flussraten.

**C** Phänotyp der Wildtyp und *spa1*-Keimlinge unter Bc einer Flussrate von  $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**D** Phänotyp der Wildtyp und *spa1*-Keimlinge unter Bc einer Flussrate von  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**E** Kotyledonen-Phänotyp von *Arabidopsis thaliana spa1*-Keimlingen unter Bc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem Blaulicht (Bc) einer Flussrate von  $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestrahlt.

Um herauszufinden, ob auch der Blaulichtpheänotyp von *spa1*-Keimlingen *phyA*-abhängig ist, wurden zum Vergleich *spa1phyA*-Doppelmutante und *phyA*-Keimlinge unter variierenden Blaulichtsflussraten angezogen. In diesen Experimenten wurde deutlich, dass der *spa1*-Phänotyp im Blaulichts von *phyA* abhängig ist. Im Hintergrund der *phyA*-Nullmutante war der starke *spa1*-Phänotyp nicht mehr zu erkennen (Abbildung 16A). Dies galt sowohl für niedrige als auch für höhere Bc-Flussraten (Abbildung 16A, B).



**Abbildung 16:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana phyA*, *spa1* und *spa1 phyA*-Keimlingen unter Bc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem Blaulichts (Bc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden gegen die Photonenflussrate aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

**A** Hypokotyllänge von WT, *spa1*-, *phyA* und *spa1phyA*-Keimlingen.

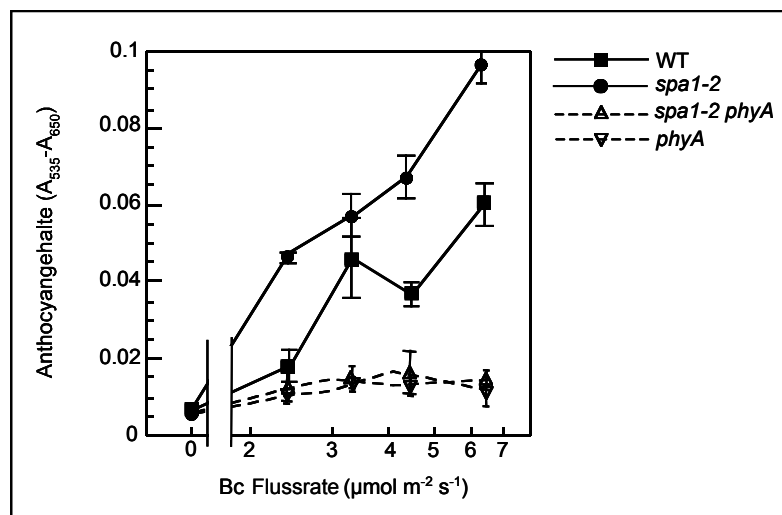
**B** Phänotyp der Keimlinge unter Bc einer Flussrate von 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Deetiolierungsantwort von *spa1*-Keimlingen im Blaulichts verstärkt ist. Die Sensitivität für blaues Licht wird also durch die *spa1*-Mutationen erhöht. Auch dieser Vorgang ist *phyA*-abhängig.

### 3.2.2 *spa1*-Keimlinge zeigen auch im Blaulichts erhöhte Anthocyanengehalte

Um den Blaulichtpheänotyp der *spa1*-Keimlinge näher zu charakterisieren, wurde untersucht, ob die Akkumulation von Anthocyanen im Blaulichts erhöht wird. Unter Blaulichts wird zwar weniger Anthocyan als im FR gebildet, dies jedoch unter dem Einfluss von *phyA* sowie weiteren Photorezeptoren wie CRY1 und in geringerem Maße *phyB* (Poppe *et al.*, 1998).

Es wurden die Anthocyangehalte von Keimlingen gemessen, die unter verschiedenen Blaulichtflussraten angezogen wurden. Auch hier konnte ein eindeutiger Phänotyp der *spa1*-Mutante festgestellt werden. Die Akkumulation von Anthocyanen war bei den *spa1*-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp unter allen Blaulichtflussraten verstärkt (Abbildung 17). Eine Untersuchung von *phyA*- und *spa1phyA*-Keimlingen zeigte, dass weder die Einzelmutante noch die Doppelmutante nennenswerte Mengen von Anthocyanen akkumulierten (Abbildung 17). Daraus kann man schließen, dass auch dieser Phänotyp von *spa1*-Keimlingen *phyA* abhängig ist.



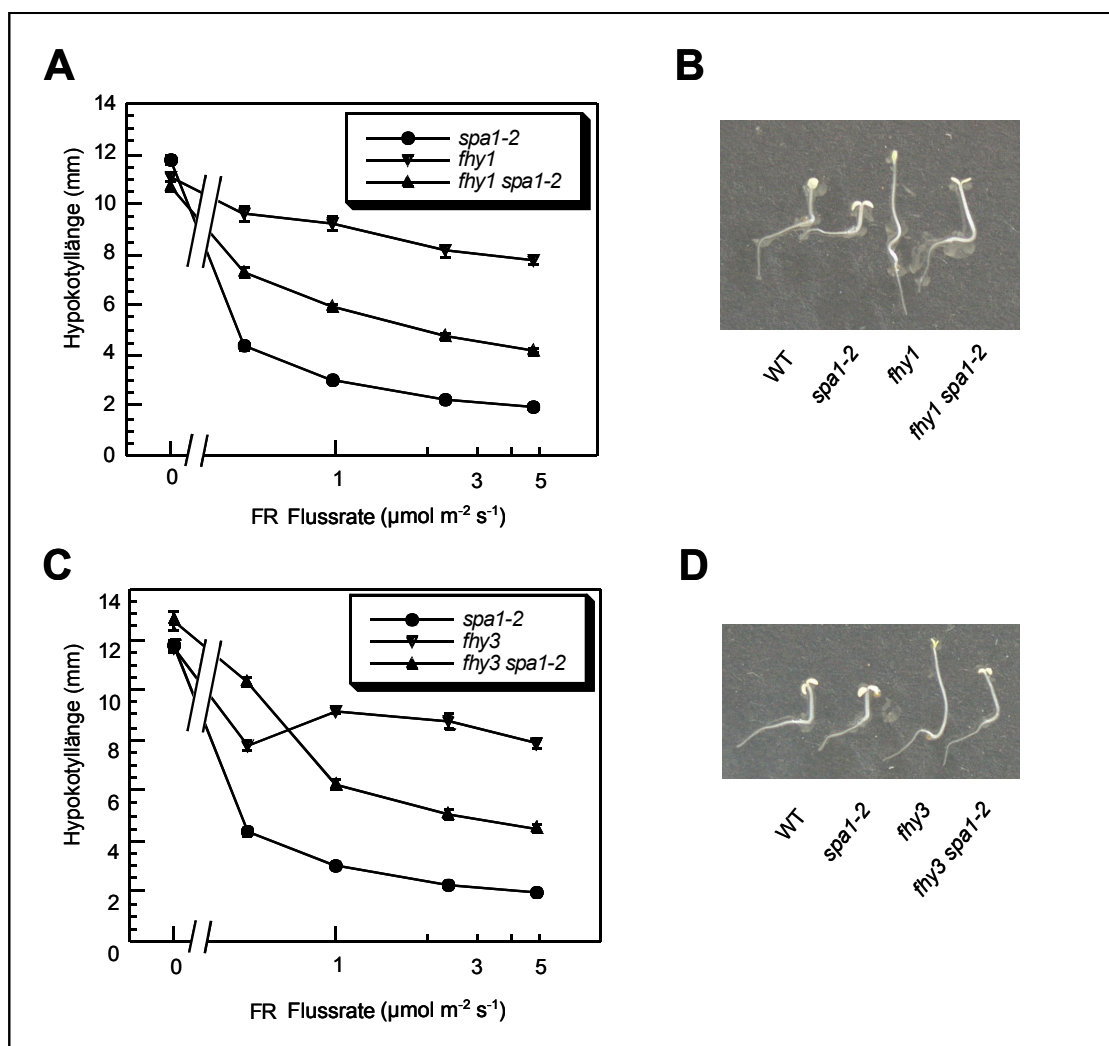
**Abbildung 17:** Anthocyan Akkumulation in *Arabidopsis* Keimlingen nach Bestrahlung mit Bc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem Blaulicht (Bc) bestrahlt. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an. Die Keimlinge wuchsen auf Medium mit Zucker.

### 3.3 Epistasie-Analyse mit *fhv1* und *fhv3*

Die beiden Mutanten *fhv1* und *fhv3* zeigen im dunkelroten Licht (FR) - ähnlich wie *phyA*-Mutanten - ein langes Hypokotyl (Whitelam *et al.*, 1993). Die entsprechenden Genprodukte FHY1 und FHY3 sind daher zwei positiv wirkende Komponenten der *phyA*-Signaltransduktion (Desnos *et al.*, 2001; Wang & Deng, 2002a). SPA1 dagegen ist ein negativer Modulator der *phyA* Signaltransduktion; *spa1* Mutanten haben im FR ein kurzes Hypokotyl (Hoecker *et al.*, 1998 & 99). Das Verhältnis dieser drei *phyA*-spezifischen Komponenten im Netzwerk der Lichtsignalwege zueinander ist nicht bekannt. Eine Epistasieanalyse mit Hilfe der Doppelmutanten *fhv1 spa1* und *fhv3 spa1* sollte Aufschluss über genetische Interaktionen zwischen den einzelnen Loci geben und könnte helfen, das Netzwerk der *phyA* Signaltransduktion weiter zu erhellen.

### 3.3.1 Der Phänotyp von *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Doppelmutanten im FR

Um die genetische Interaktion zwischen den Loci *SPA1* und *FHY1*, sowie *SPA1* und *FHY3* im dunkelroten Licht (FR) zu charakterisieren, wurde zunächst das Hypokotylwachstum der entsprechenden Doppelmutanten unter verschiedenen Flussraten von kontinuierlichem und gepulstem FR untersucht. Sowohl bei *fhy1* als auch bei *fhy3* war der typische Phänotyp im FRc zu erkennen. Beide zeigten eine nur schwache Antwort auf alle eingesetzten Flussraten (Abbildung 18A-D). Dennoch war auch zu erkennen, dass es Unterschiede in der Antwort der beiden Mutanten gab. Bei *fhy1* nahm die Hypokotyllänge mit steigender Flussrate schwach, aber weiter ab.

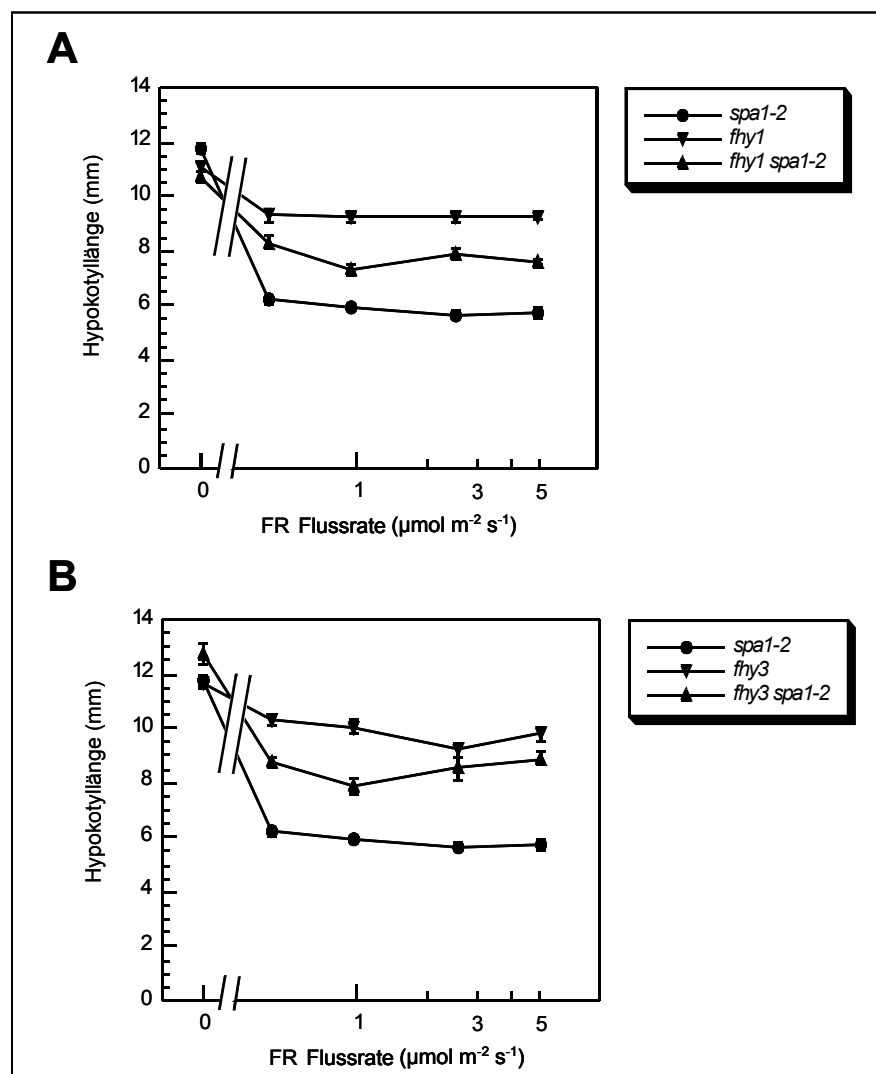


**Abbildung 18:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana fhy1*-, *fhy3*-, *spa1*-, *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Keimlingen unter FRC. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem dunkelrotem Licht (FRc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden gegen die Photonflussrate aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

**A** und **B** Hypokotyllänge der Keimlinge unter FRC.

**C** und **D** Phänotyp der Keimlinge im FRC einer Flussrate von  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Bei den *fhy3*-Keimlingen kam es bereits bei niedrigen Flussraten zu einer relativ deutlichen Hemmung des Hypokotyllängenwachstums, während höhere Flussraten keinen weiteren Einfluss hatten. *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Mutanten zeigten beide einen intermediären Phänotyp (Abbildung 18). Während also *fhy1* und *fhy3* nur schwach auf FRc reagierten und *spa1*-Mutanten eine sehr starke Reaktion auf FRc zeigten, fand man bei den Doppelmutanten eine Antwort, die der des hier eingesetzten Wildtyps RLD am ähnlichsten war (Abbildung 18B und D). Unter FRp-Bedingungen bestätigte sich diese genetische Interaktion der Loci *FHY1* und *SPA1*, sowie *FHY3* und *SPA1*: Auch hier zeigten die Doppelmutanten eine intermediäre Hemmung des Hypokotyllängenwachstums (Abbildung 19). Dies galt für alle untersuchten Flussraten.

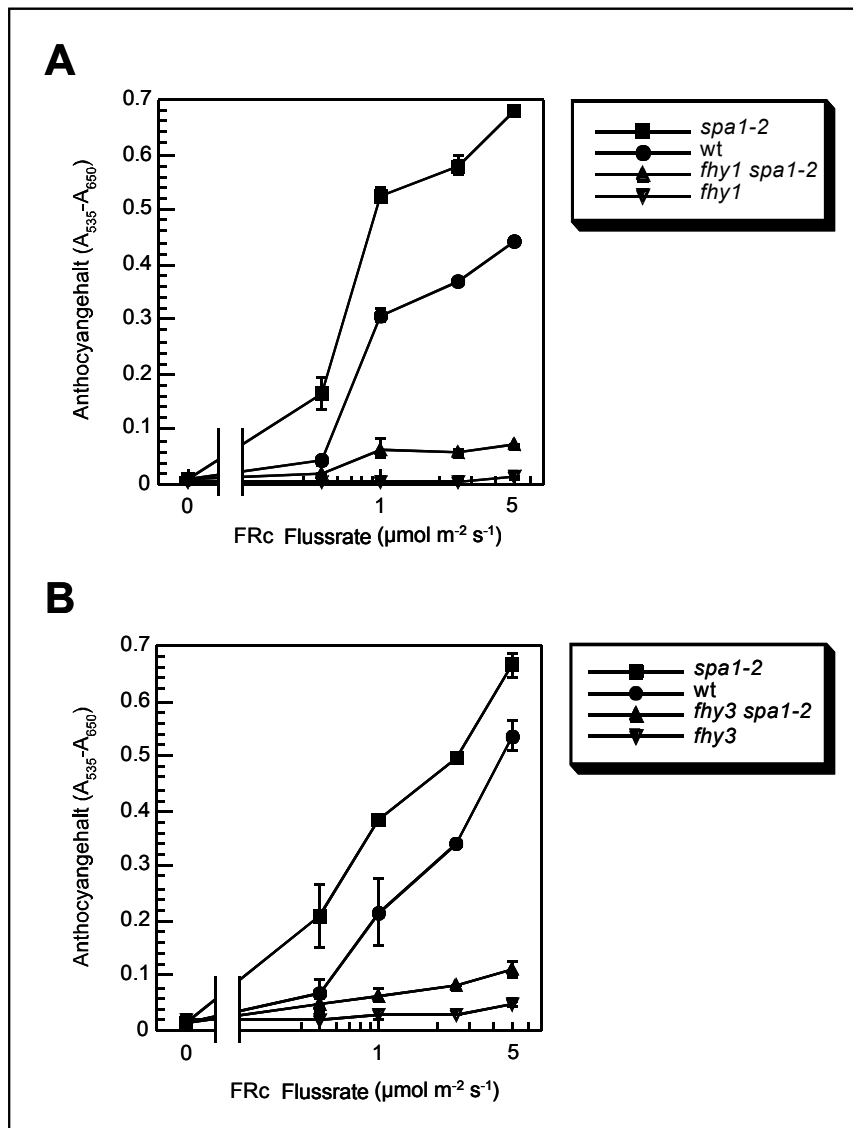


**Abbildung 19:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana fhy1*-, *fhy3*-, *spa1*-, *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Keimlingen unter FRp.

Die Keimlinge wurden drei Tage mit stündlichen 3-min-Dunkelrot-Lichtpulsen (FRp) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden gegen die Photonenflussrate aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.



Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Effekte der Mutationen additiv waren. Diese Ergebnisse für die Deetiolierungsantwort der Doppelmutanten im FR deuten darauf hin, dass keine Aussage über eventuelle Epistasie getroffen werden kann.



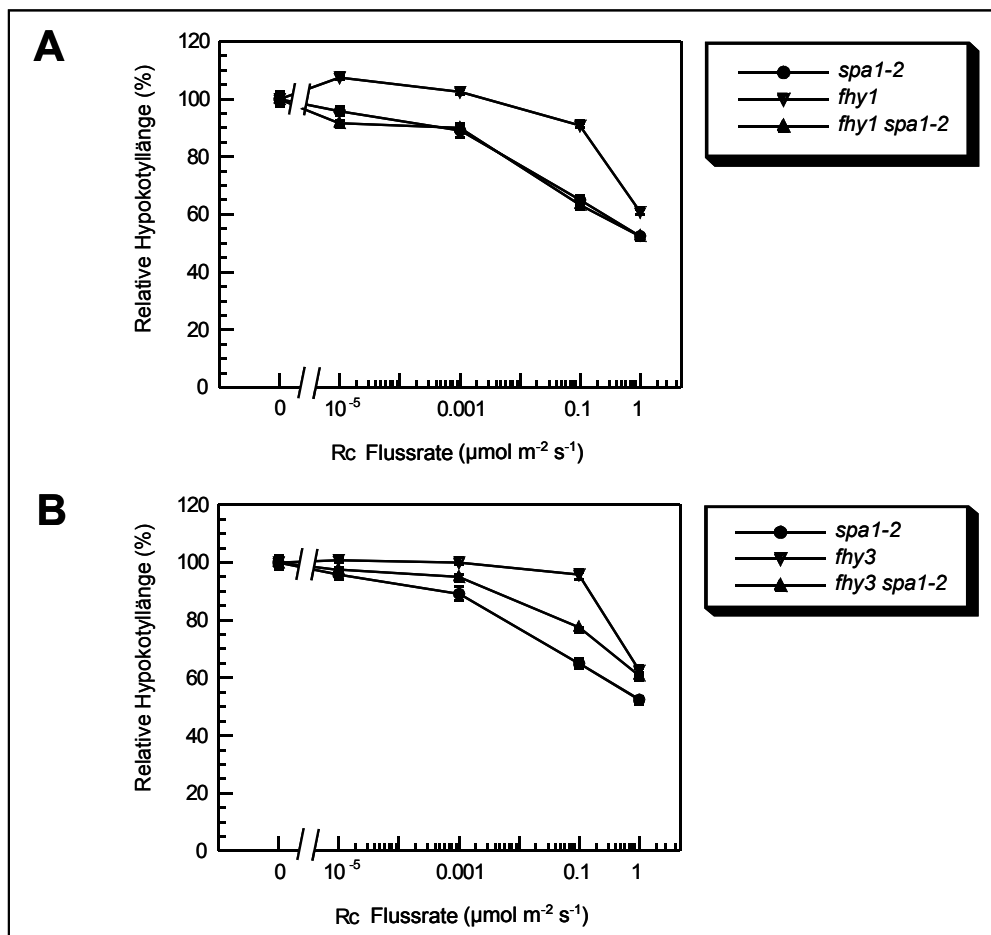
**Abbildung 20:** Akkumulation der Anthocyane in *Arabidopsis fhy1*-, *fhy3*-, *spa1*-, *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Keimlingen nach Bestrahlung mit FRC. Die Keimlinge wurden für drei Tage bestrahlt mit kontinuierlichem dunkelrotem Licht (FRC). Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

Um die Reaktion der Doppelmutanten auf FR weitergehend zu untersuchen, wurden die Anthocyanengehalte der Keimlinge nach drei Tagen unter den angegebenen FRC-Bedingungen gemessen. *fhy1*-Mutanten zeigten unter allen verwendeten FR-Flussraten keine messbare Erhöhung der Anthocyanengehalte im Vergleich zum Dunkelwert (Abbildung 20). Bei den *fhy3*-Mutanten konnte zumindest eine schwache Akkumulation von Anthocyanen festgestellt werden. Beide Doppelmutanten *fhy1 spa1* und *fhy3 spa1* zeigten einen Anstieg der Anthocyanengehalte im Vergleich zu den *fhy1*- und *fhy3*-Einzelmutanten. Im Falle von *fhy1*

*spa1* waren die Werte zumindest messbar. Die Anthocyangehalte in *fhy3 spa1* waren doppelt so hoch wie die in *fhy3*-Keimlingen gemessenen. Auch wenn die Anthocyangehalte der *spa1*-Keimlinge unter allen Flussraten mindestens zehn mal höher lagen als bei den Doppelmutanten, kann man auch hier von einem intermediären Phänotyp sprechen. Auch hier lagen also additive Effekte vor, auch wenn sich die *fhy1*- und *fhy3*-Mutationen stärker als die *spa1*-Mutation auswirkten.

### 3.3.2 Genetische Interaktion zwischen *SPA1* und *FHY1* sowie *FHY3* in Rc

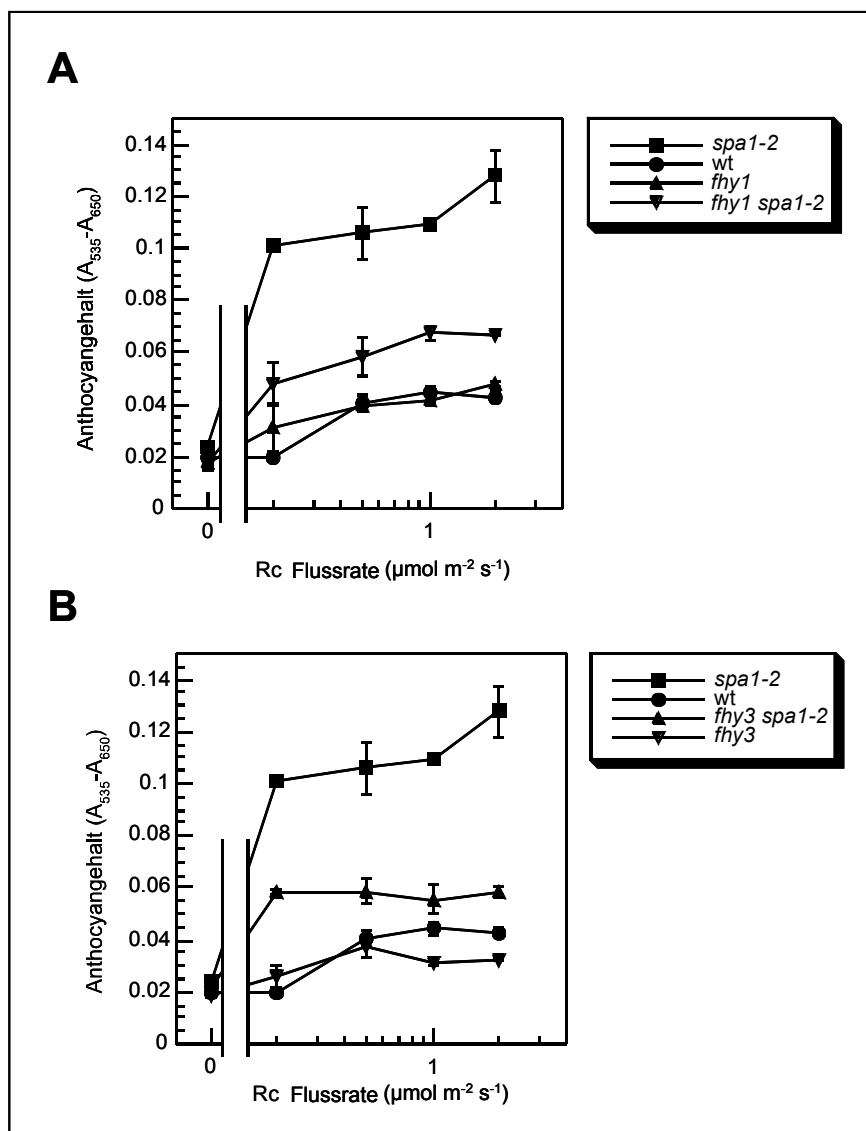
*spa1*-Mutanten zeigen auch im Rotlicht einen Phänotyp (Hoecker *et al.*, 1998). Daher war es zudem von Interesse, ob eine genetische Interaktion von *SPA1* unter Rotlicht mit den Loci *FHY1* und *FHY3* feststellbar ist. Hierzu wurden wieder die Einzel- und Doppelmutanten unter verschiedenen Flussraten kontinuierlichen Rotlichts (Rc) angezogen.



**Abbildung 21:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana fhy1*-, *fhy3*-, *spa1*-, *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Keimlingen unter Rc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem roten Licht (Rc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden als relative Hypokotyllängen im Vergleich zum Dunkelwert (Hypokotyllänge im Dunkeln = 100 %) gegen die Photonflussrate aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

Die Einzelmutanten *fhy1* und *fhy3* zeigten unter niedrigen Rc-Flussraten keine Hemmung des Hypokotyllängenwachstums. Erst unter Flussraten, die über  $0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  lagen, konnte eine zunehmende Verkürzung der Hypokotyle beobachtet werden. *spa1*-Mutanten zeigten dagegen wie beschrieben schon unter niedrigen Flussraten eine signifikante Hemmung des Hypokotyllängenwachstums (Abbildung 21A und B).

*fhy1 spa1*-Doppelmutanten zeigten unter allen Rc-Flussraten den gleichen Phänotyp wie *spa1*-Einzelmutanten (Abbildung 21A). Die *fhy3 spa1*-Doppelmutanten zeigten wie schon unter FR-Bedingungen einen im Vergleich zu den Einzelmutanten intermediären Phänotyp (Abbildung 21B).

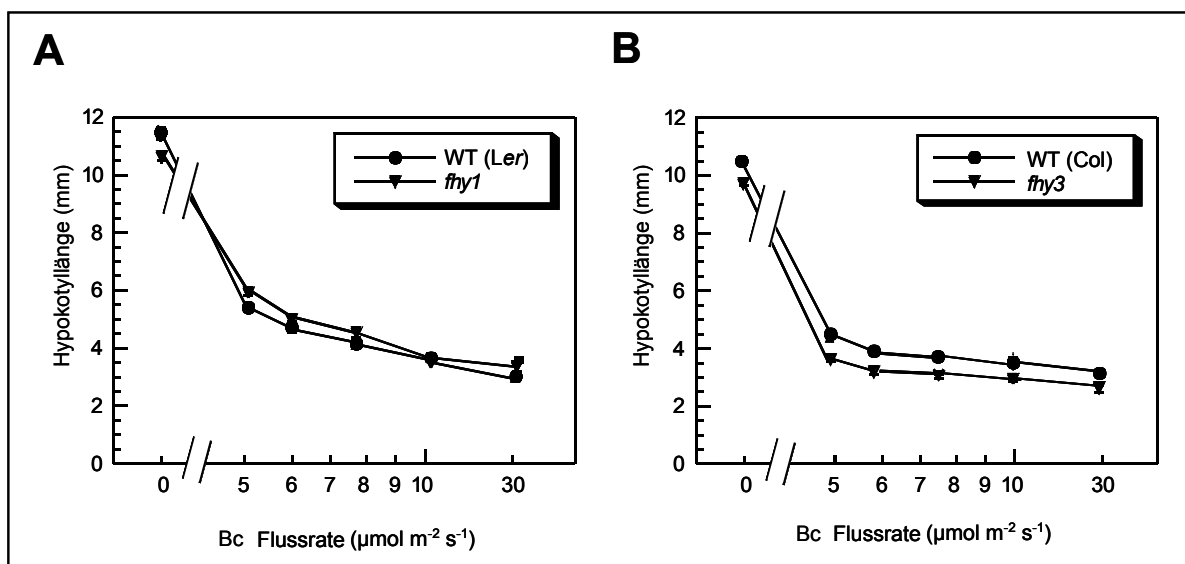


**Abbildung 22:** Akkumulation der Anthocyane in *Arabidopsis fhy1*-, *fhy3*-, *spa1*-, *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1* Keimlingen nach Bestrahlung mit Rc. Die Keimlinge wurden für drei Tage bestrahlt mit kontinuierlichem Rotlicht (Rc). Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

Im folgenden wurden die Anthocyangehalte der Keimlinge nach drei Tagen unter den angegebenen Rc Bedingungen gemessen. Die Anthocyangehalte waren generell deutlich niedriger als bei Keimlingen, die im FRc angezogen wurden (Abbildung 22A und B). Dies erklärt sich dadurch, dass die Akkumulation von Anthocyanen in erster Linie ein Symptom der *phyA* vermittelten FR-HIR ist, die durch FRc ausgelöst wird. Die Akkumulation der Anthocyane in Rc war in den *spa1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Wie im Wildtyp führten in erster Linie schon niedrige Rc-Flussraten zu einer Zunahme der Anthocyangehalte, höhere Flussraten führten kaum noch zu einer stärkeren Akkumulation der Anthocyane. *fhy1*- und *fhy3*-Einzelmutanten zeigten unter allen Rc-Flussraten keinen vom Wildtyp unterscheidbaren Phänotyp. *fhy1 spa1* und *fhy3 spa1* zeigten dagegen ungefähr doppelt so hohe Anthocyangehalte (Abbildung 22A und B). Somit ist auch dieser Phänotyp der Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten intermediär zu nennen.

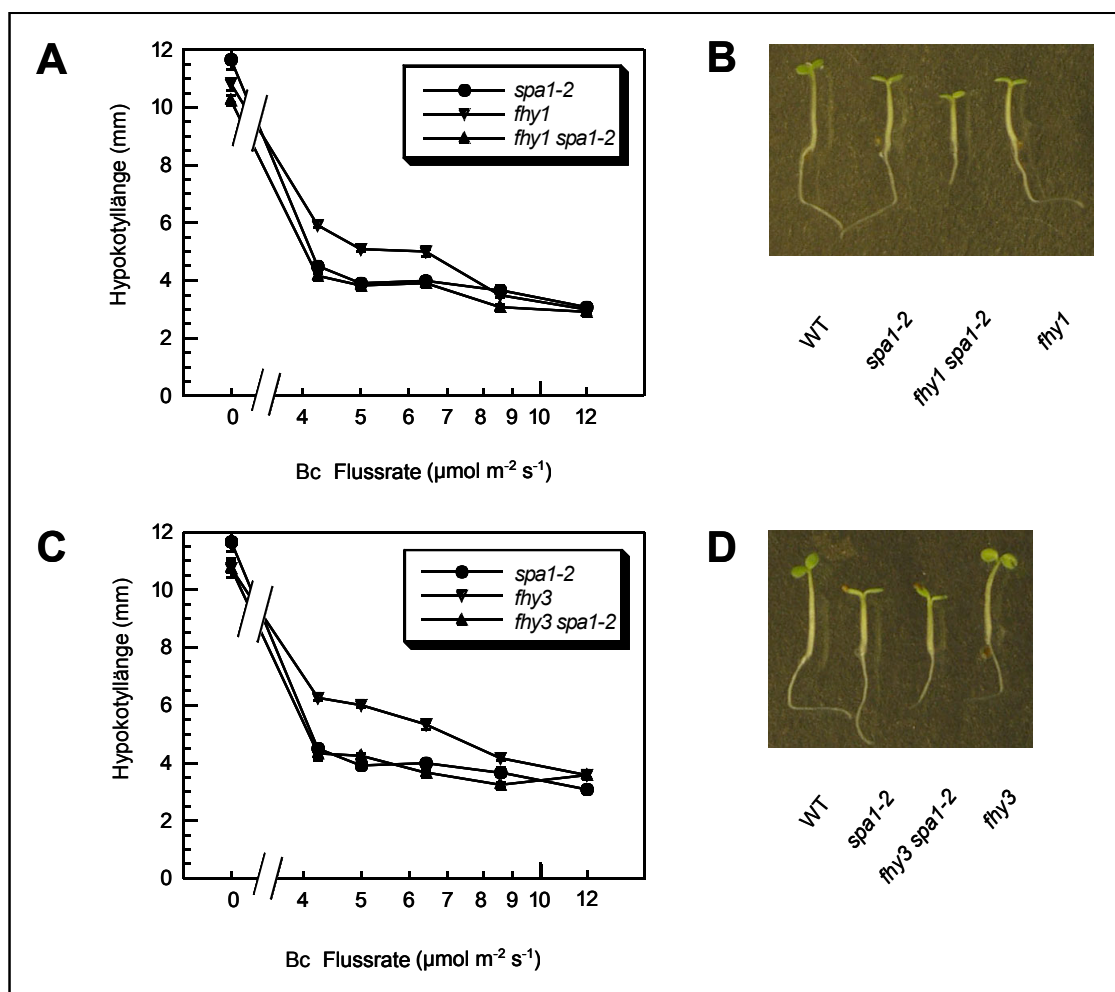
### 3.3.3 *Fhy1* und *Fhy3* spielen keine Rolle in der von *phyA* vermittelten Antwort auf Blaulicht

In dieser Arbeit konnte bei den *spa1*-Mutanten ein Phänotyp im Blaulicht festgestellt werden. Daher lag es nahe, auch die genetische Interaktion von *SPA1* mit *FHY1* und *FHY3* im Blaulicht zu untersuchen. Da bisher keine Daten über die Reaktion der *fhy1*- und *fhy3*-Mutanten im Blaulicht vorlagen, wurden zunächst diese Einzelmutanten mit ihrem jeweiligen Wildtyp verglichen.



**Abbildung 23:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis fhy1*- und *fhy3*-Keimlingen und den Wildtypen *Landsberg erecta* (Ler) und *Columbia* (Col) unter Bc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem blauen Licht (Bc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden gegen die Photonenflussrate aufgetragen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

Sowohl *fhy1*- als auch *fhy3*-Keimlinge zeigten keinen speziellen Phänotyp im Blaulicht (Abbildung 23A, B). Zwar waren die *fhy3*-Keimlinge unter allen verwendeten Flussraten etwas kürzer als ihr Wildtyp, dies galt aber auch für im Dunkeln gewachsene Keimlinge. *spa1*-Einzelmutanten zeigten den bereits in Kapitel 3.2 beschriebenen Phänotyp (Abbildung 24). *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Keimlinge waren unter den untersuchten Bc-Flussraten so kurz wie die *spa1*-Mutanten (Abbildung 24A-D). Sowohl *FHY1* als auch *FHY3* schienen also keine Rolle für diesen Aspekt des Blaulichtphänotyps von *spa1*-Keimlingen zu spielen. Zwar sollte auch die Akkumulation der Anthocyane unter kontinuierlichem Blaulicht untersucht werden, eine eindeutige Bestimmung der Anthocyangehalte war aufgrund zu großer Schwankungen zwischen einzelnen Experimenten jedoch nicht möglich.



**Abbildung 24:** Hypokotyllängenwachstum von *Arabidopsis thaliana fhy1*-, *fhy3*-, *spa1*-, *fhy1 spa1*- und *fhy3 spa1*-Keimlingen unter Bc. Die Keimlinge wurden drei Tage mit kontinuierlichem blauen Licht (Bc) bestrahlt. Die gemessenen Daten der Hypokotyllängen wurden aufgetragen gegen die Photonenflussrate. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

**A** und **B** Hypokotyllänge der Keimlinge unter Bc .

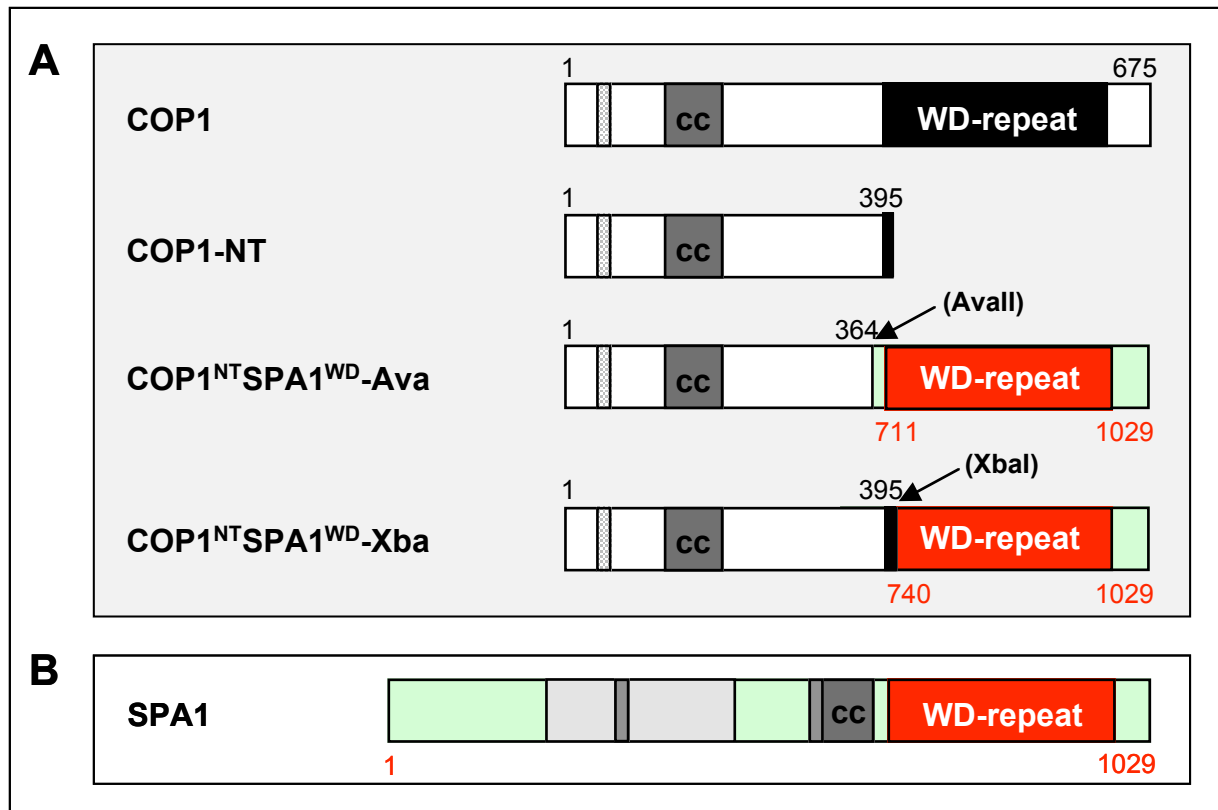
**C** und **D** Phänotyp der Keimlinge Bc einer Flussrate von  $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3.4 Austausch des WD-Repeats von SPA1 gegen das von COP1

SPA1 zeigt im Bereich seiner WD-Repeats eine deutliche Homologie zu den WD-Repeats von COP1. 44% der Aminosäuren sind identisch (Hoecker *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass beide Proteine in der Lage sind, über ihre coiled-coil Domäne zu interagieren (Hoecker & Quail, 2001). COP1 ist der zentrale Repressor der Photomorphogenese und SPA1 ein phyA-spezifischer, negativer Modulator der Lichtsignaltransduktion. Für COP1 ist bekannt, dass das WD-Repeat die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor HY5 vermittelt, und dass diese Bindung wahrscheinlich die Degradation des HY5-Proteins über den Proteasomweg zur Folge hat. Da diese Degradation positiver Intermediate eine zentrale Position in der Regulation der Lichtsignaltransduktion einnimmt, bekommt das WD-Repeat als potenzielle „Plattform“ dieser Prozesse eine besondere Bedeutung. Vor dem Hintergrund dieser bisher bekannten Fakten, stellt sich die Frage, inwieweit COP1 und SPA1 gemeinsam in einem Komplex in phyA-abhängiger Weise die Lichtsignaltransduktion negativ regulieren und ob das WD-Repeat von SPA1 eine ähnliche Funktion wie das von COP1 innerhalb des angenommenen Komplexes hat. Der experimentelle Ansatz in dieser Arbeit sollte untersuchen, ob das WD-Repeat von SPA1 das WD-Repeat von COP1 funktionell ersetzen kann.

#### 3.4.1 Transformation von *cop1*-Mutanten mit einem COP1-SPA1-Hybridkonstrukt

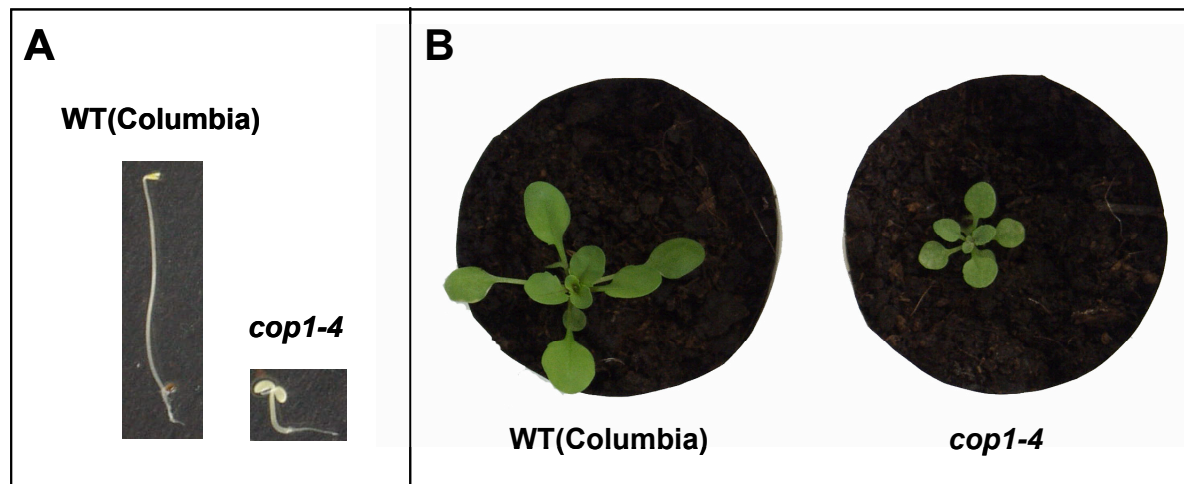
Um zu testen, ob die WD-Repeat-Domänen von SPA1 und COP1 ähnliche Funktionen übernehmen, wurden zwei alternative Hybridkonstrukte hergestellt, die aus dem N-Terminus von COP1 und dem WD-Repeat von SPA1 bestehen (COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava und COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Xba; Abbildung 25 A). Die beiden Hybridkonstrukte unterschieden sich wie folgt: Während bei COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava der gesamte für das WD-Repeat von COP1 vorhergesagte Bereich gegen den homologen Bereich des SPA1-Proteins ausgetauscht wurde, wurde in dem COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Xba-Konstrukt erst ab dem Bereich ein Austausch vorgenommen, der die WD-40 Repeats 2-6 von COP1 umfasst (Holm *et al.*, 2001). Die Konstrukte wurden in *cop1*-mutante Pflanzen transformiert und die Nachkommenschaft auf Komplementation des mutanten, also auf Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps untersucht. Als Kontrollen wurden in Parallelansätzen ein Vollängenkonstrukt von COP1 und ein Konstrukt, das nur den N-Terminus von COP1 (COP1-NT) exprimieren sollte, verwendet. Das Vollängenkonstrukt diente hier als positive Kontrolle dafür, dass eine Komplementation des *cop1-4* Allels überhaupt möglich war. Das N-terminale COP1-Konstrukt wurde als Negativkontrolle eingesetzt, um die Möglichkeit auszuschließen, dass der N-Terminus von COP1 alleine bereits in der Lage ist, eine Komplementation der *cop1*-Pflanzen hervorzurufen.



**Abbildung 25:** Schematische Darstellung der Proteinsequenzen, die von den einzelnen Konstrukten exprimiert werden sollten. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen in COP1 (schwarz) oder SPA1 (rot) wieder. AvaI und XbaI markieren die entsprechenden Restriktionsstellen auf DNA-Ebene, die für die Klonierung verwendet wurden.

Eine schematische Darstellung der Proteinsequenzen, die von den einzelnen Konstrukten exprimiert werden sollten, findet sich in Abbildung 25.

Die hier verwendeten *cop1*-Pflanzen trugen das mutierte *COP1*-Allel *cop1-4*. Durch eine Punktmutation (C-zu-T) kommt es zu einem verfrühten STOP-Kodon (Gln283). Dies führt zur Expression eines verkürzten COP1-Proteins, das nur die N-terminalen 282 Aminosäuren enthält, während wildtypisches COP1 675 Aminosäuren aufweist. Diesem COP1-Protein fehlt hier somit die gesamte WD-Repeat-Domäne, was zu einem Funktionsverlust führt (McNellis *et al.*, 1994). In Dunkelheit gewachsene *cop1-4* Keimlinge zeigen den typischen Phänotyp für *cop*-Mutanten, d.h. aufgrund der konstitutiv stattfindenden Photomorphogenese sehen die Keimlinge aus, als wären sie im Licht gewachsen (Abbildung 26A). Adulte, im Licht gewachsene *cop1-4* Pflanzen sind deutlich kleiner als wildtypische Pflanzen und haben eine niedrigere Fertilität (Abbildung 26B; Deng & Quail, 1992). Der kleinere Wuchs ist vermutlich auf eine reduzierte Zellstreckung zurückzuführen.



**Abbildung 26: Der charakteristische *cop1*-Phänotyp.**

**A** 4 Tage alte in Dunkelheit gewachsene Keimlinge. In Dunkelheit gewachsene *cop1-4* Keimlinge sehen aus, als wären sie im Licht angezogen worden.

**B** 3 Wochen alte im Licht angezogene Pflanzen. Man erkennt, dass die Rosette der *cop1-4* Pflanze im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner ist.

Die Transformation der Konstrukte in die *cop1-4 Arabidopsis* Pflanzen erfolgte durch Anwendung der *Agrobakterien*-vermittelten „Floral Dip“-Methode. Anschließend fand eine Selektion des Saatguts der transformierten Pflanzen statt. Durch sterile Aussaat auf Kanamycin-haltigem MS-Medium wurden zunächst die Keimlinge identifiziert, die das jeweilige Transgen in ihr Genom integriert hatten. Nachdem die Keimlinge auf Erde umgesetzt worden waren, wurde mittels PCR aus einer genomischen DNA-Präparation die Anwesenheit des Transgens verifiziert. Eine Liste aller aus diesen Experimenten hervorgehenden transgenen Linien ist im Anhang in den Tabellen I-IV aufgeführt.

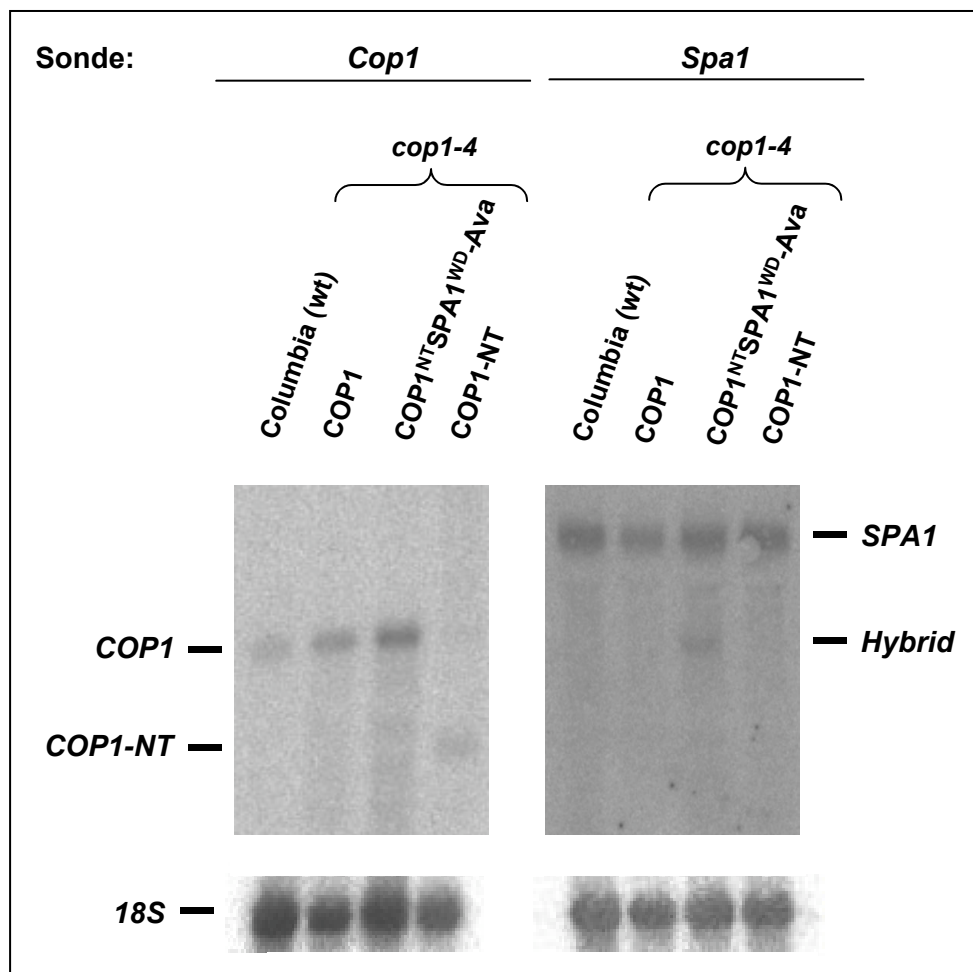
### 3.4.2 Nachweis der Expression der Transgene durch Northernanalyse und RT-PCR

Um nachzuweisen, dass die Transgene im *cop1-4* Hintergrund auch exprimiert wurden, wurden Gesamt-RNA-Präparationen aus drei Wochen alten Pflanzen einer Northernanalyse unterzogen. Dafür wurden von je einer transgenen Linie (F2-Saatgut; siehe Anhang Tabellen I-III) auf kanamycinhaltigem Medium vorselektierte Keimlinge sowie wildtypische *Arabidopsis*-Pflanzen drei Wochen auf Erde in der Klimakammer angezogen.

Die *COP1*-Sonde diente zum Nachweis des endogen exprimierten *COP1*, des Vollängen-*COP1*, des Fusionskonstruktes und der Expression des Konstruktes *NT-COP1*. Wie in Abbildung 27 zu sehen, wurden alle hier getesteten Transgene in den entsprechenden Pflanzen der verwendeten Linien auf RNA-Ebene exprimiert. Dies ist erkennbar an dem, im Vergleich mit dem Wildtyp, stärkeren *COP1*-Signal in den Spuren der *COP1*- und der *COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>*-Ava-RNA-Proben.



Auch die Expression des kleineren *COP1-NT*-Konstruktes konnte nachgewiesen werden. Das endogen in den *cop1-4* Pflanzen exprimierte *COP1* konnte in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden, möglicherweise weil das entsprechende Transkript laut Deng *et al.* (1992) nicht ausreichend abundant ist, um bei den hier eingesetzten Mengen deutlich detektiert zu werden. Die *SPA1*-Sonde sollte, neben dem endogenen *SPA1*-Transkript, nur die Expression des Fusionskonstruktes anzeigen. In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass das endogene *SPA1*-Transkript (obere Bande) und das Hybridkonstrukt  $COP1^{NT}SPA1^{WD}$ -Ava mit der *SPA1*-Sonde nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 27:** Northern Analyse der RNA transgener Pflanzen, um die Expression der Transgene im *cop1-4* Hintergrund nachzuweisen.

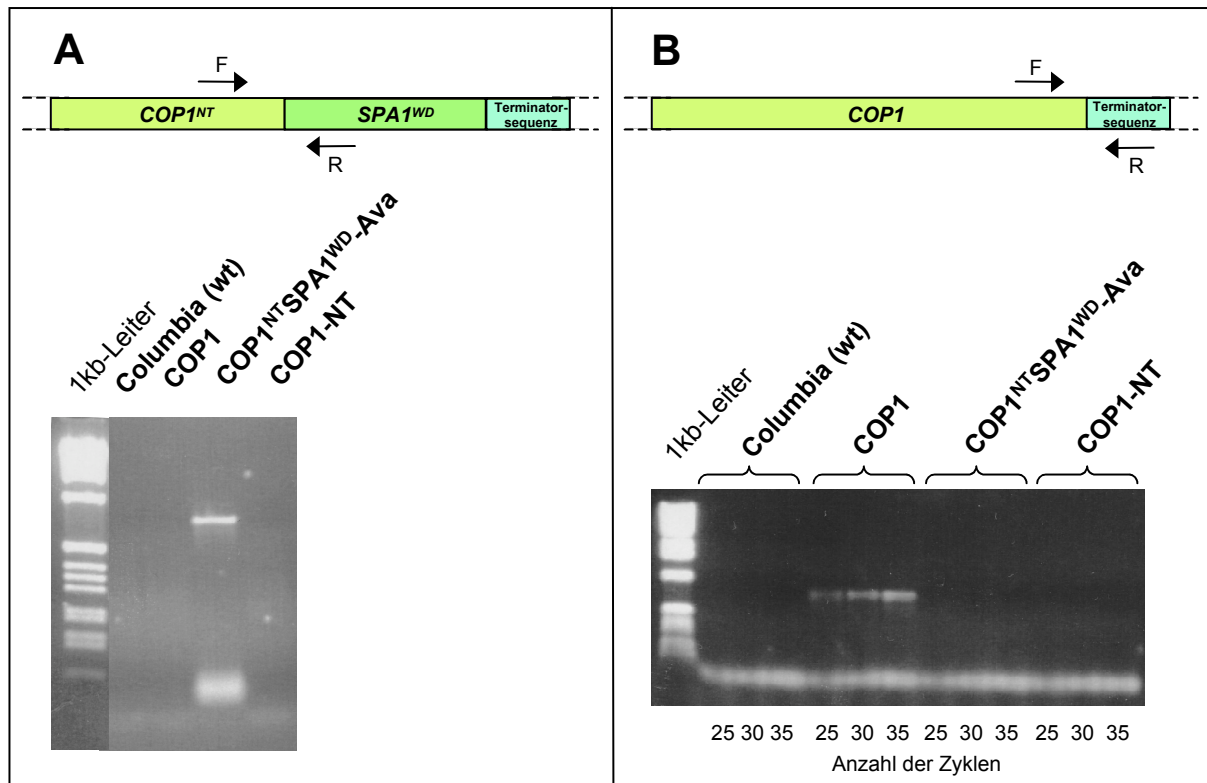
RNA-Gel-Blots von Gesamt-RNA-Extrakten aus 3 Wochen alten Pflanzen.

Als Sonde dienen die PCR-Fragmente (Abschnitt 2.1.6): *Cop1* bp 181-1090; Vollängen-*Spa1*

Zur Kontrolle wurde die Membran mit einer 18S rRNA Sonde rehybridisiert.

Als zusätzlicher Test zur Überprüfung der Expression der Transgene, die eine Komplementation hervorriefen (siehe 3.4.3), wurde in einem Parallelansatz ein Teil der RNA-Präparationen für eine RT-PCR eingesetzt (Schema Abbildung 28A, B).

In Abbildung 28A kann man erkennen, dass nur mit der Probe  $COP1^{NT}SPA1^{WD}$ -Ava und Primern spezifisch für das Hybridkonstrukt ein Produkt in der PCR erzeugt wurde. Ebenso konnte eine Expression des  $COP1$ -Konstruktes nur in den für dieses Konstrukt transgenen Pflanzen nachgewiesen werden (Abbildung 28B).



#### **Abbildung 28: RT-PCR mit der RNA transgener Pflanzen.**

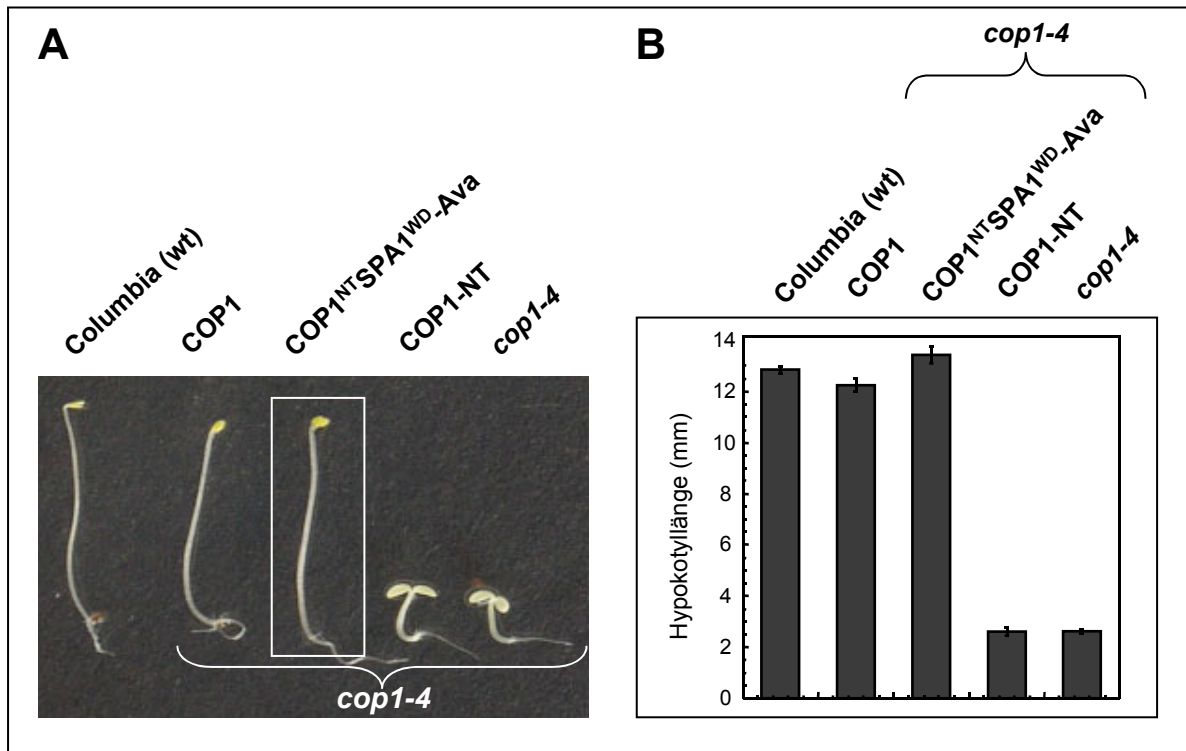
Grundlage waren Gesamt-RNA-Extrakte aus 3 Wochen alten Pflanzen.

**A:** Nachweis des Hybridkonstruktes; Primer: F: cop1-4-CF, R: Spa1-R

**B:** Nachweis des  $COP1$ -Konstruktes; Primer: F: COP1-F2, R: 35S-Terminator-Primer

### **3.4.3 Der Keimlingsphänotyp der transgenen Pflanzen**

In der F<sub>2</sub>-Generation wurden die aufspaltenden Linien auf ihren Phänotyp untersucht. Zur Bestimmung des Keimlingsphänotyps wurden die Keimlinge nach einer 4-tägigen Dunkelbehandlung untersucht. *cop1-4* Keimlinge waren unter diesen Bedingungen kurz und hatten geöffnete Kotyledonen, wildtypische Columbia-Keimlinge dagegen zeigten ein langes Hypokotyl und einen geschlossenen Apikalhaken (Abbildung 29 A). Sowohl die transgenen *cop1-4* Pflanzen, die das Volllängen- $COP1$  trugen, als auch die mit dem  $COP1^{NT}SPA1^{WD}$ -Ava-Transgen, zeigten Komplementation, d.h. der wildtypische Phänotyp wurde wieder hergestellt. Lediglich die Pflanzen, die das  $NT$ - $COP1$ -Konstrukt exprimierten, zeigten immer noch den prägnanten *cop1-4* Phänotyp (Abbildung 29A und 29B).

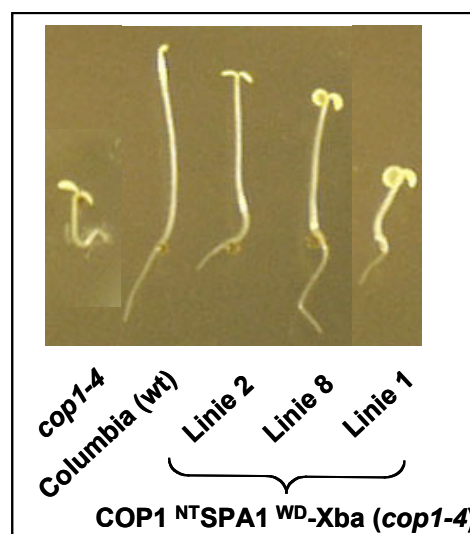


**Abbildung 29: Der Keimlingsphänotyp der transgenen Pflanzen**

**A** 4 Tage alte, im Dunkeln gewachsene Keimlinge

**B** Quantifizierung der Hypokotylllänge von 4 Tage alten, im Dunkeln gewachsenen Keimlingen. Fehlerbalken geben den Standardfehler der Messungen an.

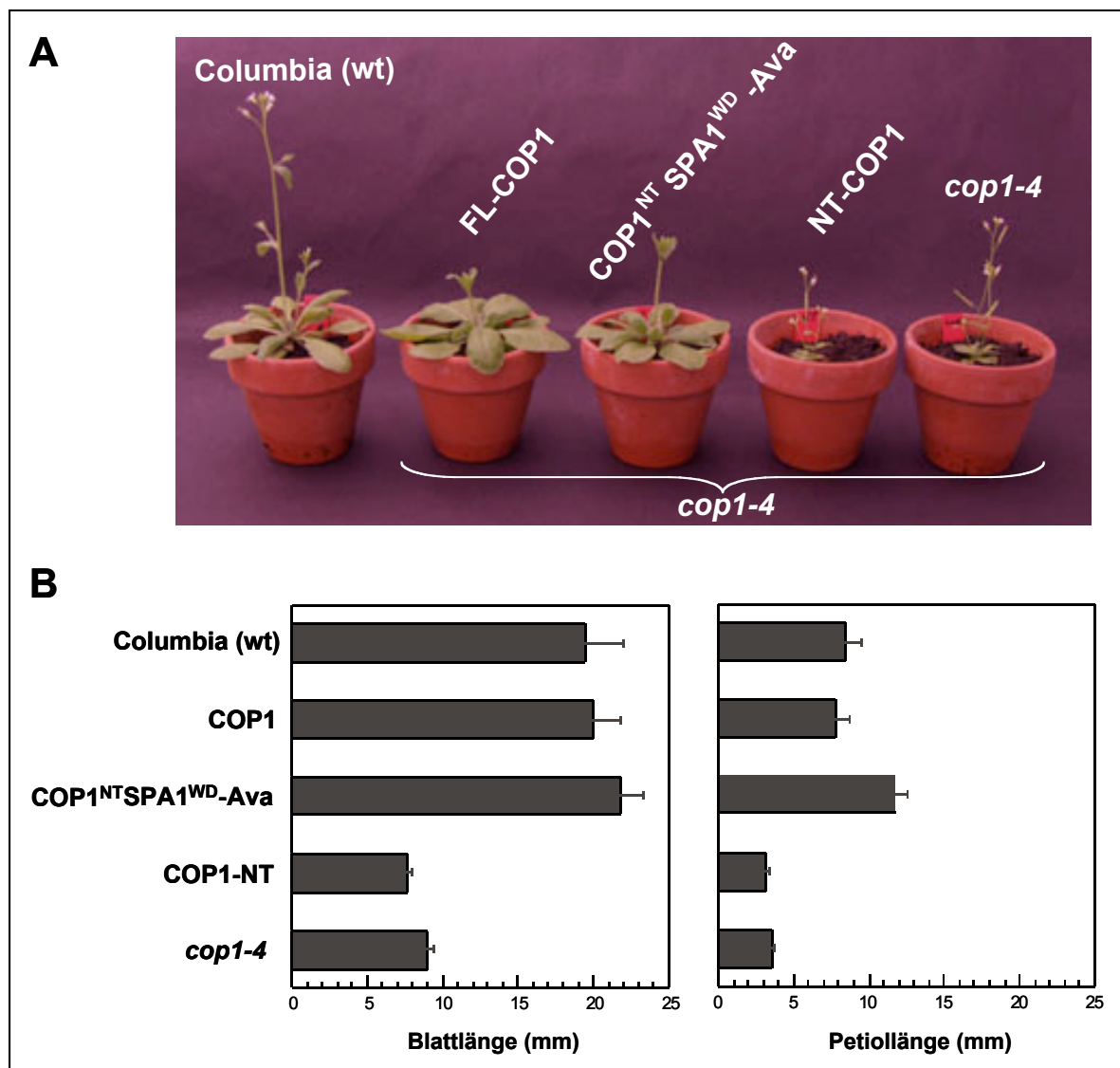
Anders als das COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava- führte das COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Xba-Konstrukt nur zu einer partiellen Komplementation des Keimlingsphänotyps (Abbildung 30) und dies auch nur in einigen Fällen (siehe Anhang, Tabelle IV). Auf eine weitergehende Untersuchung dieser Linien wurde zunächst verzichtet.



**Abbildung 30: Der Keimlingsphänotyp der Pflanzen, die das Transgen COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Xba integriert haben.** 4 Tage alte, im Dunkeln gewachsene Keimlinge der Linien 1, 2 und 8 (Anhang Tabelle IV).

### 3.4.4 Der adulte Phänotyp der transgenen Pflanzen

Um im weiteren festzustellen, ob auch adulte Ausprägungen des *cop1-4* Phänotyps komplementiert wurden, wurden Keimlinge aus den obigen Experimenten zur Bestimmung des adulten Phänotyps auf Erde umgesetzt und bis zur Blüte herangezogen. Nach drei Wochen wurden die Blatt- und Petiollängen der heranwachsenden Pflanzen zum Vergleich gemessen. Hierbei wurde von mindestens 10 Pflanzen einer Linie die Länge des Blattes bzw. der Petiole (Stiel des Blattes) gemessen, das zu diesem Zeitpunkt am größten war.



**Abbildung 31:** Der adulte Phänotyp transgener Pflanzen.

**A** Fünf Wochen alte Pflanzen.

**B** Blatt- und Stiehlängen der transgenen Pflanzen verglichen mit den Kontrollpflanzen Columbia (Wildtyp) und *cop1-4*.

*cop1-4* Pflanzen hatten deutlich kleinere und kürzere Blätter als der Wildtyp; wildtypische Rosettenblätter sind im Durchschnitt doppelt so groß wie die der mutierten Pflanzen (Abbildung 31 B). Sowohl das *COP1*-Konstrukt als auch das Hybridkonstrukt *COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava* führte zu einer vollständigen Komplementation des *cop1-4* Phänotyps. Die Blätter dieser transgenen Pflanzen waren ähnlich lang wie bei wildtypischen Pflanzen (Abbildung 31 B). Die Pflanzen, die das *COP1*-Konstrukt als auch das *COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava*-Hybrid überexprimierten, waren sogar insgesamt vitaler als die unter gleichen Bedingungen gewachsenen Wildtyppflanzen. Sowohl ihre Blätter als auch ihr Spross waren kräftiger als beim Wildtyp (Abbildung 31 A). Das *NT-COP1*-Konstrukt führte dagegen nicht zur Komplementation (Abbildung 31 B).

| <u>Genotyp</u>   | <u>Blühzeitpunkt</u><br>(in Tagen) | <u>Anzahl der Rosettenblätter</u><br><u>zum Zeitpunkt der Blüte</u> |
|--|------------------------------------|---|
| Columbia (wt)  | 34.7 +/- 1.4                       | 12.7 +/- 0.6  |
| <i>COP1(cop1-4)</i>                                    | 36.1 +/- 1.8                       | 12.9 +/- 1.1  |
| <i>COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava (cop1-4)</i> | 37.2 +/- 2.2                       | 13.4 +/- 0.7  |
| <i>NT-COP1 (cop1-4)</i>                                | 28.5 +/- 0.5                       | 7.6 +/- 1.2   |
| <i>cop1-4</i>  | 28.3 +/- 0.5                       | 8.0 +/- 1.0   |

**Abbildung 32: Die Blühzeitpunkte der transgenen Pflanzen.** Blühzeitpunkte der transgenen Pflanzen verglichen mit den Kontrollpflanzen Columbia (Wildtyp) und *cop1-4* unter Langtagbedingungen.

Von den heranwachsenden Pflanzen wurden die Blühzeitpunkte bestimmt (Abbildung 32). Während *cop1-4* Pflanzen unter den hier gewählten Langtagbedingungen deutlich früher blühten als Wildtyppflanzen, wurde durch das Hybridkonstrukt, wie auch durch das Vollängenkonstrukt der Wildtyp eindeutig wiederhergestellt. Das *COP1-NT*-Konstrukt alleine war nicht in der Lage den *cop1-* Phänotyp zu komplementieren. Die Pflanzen blühten genauso früh wie die *cop1-4* Pflanzen unter diesen Bedingungen (Abbildung 32).

Abschließend konnte festgestellt werden, dass das hier verwendete Fusionskonstrukt *COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava* aus *COP1* und *SPA1* alle Aspekte des *cop1-4* Phänotyps zu komplementieren vermochte.

## 4 Diskussion

Das *SPA1*-Gen von *Arabidopsis thaliana* ist Teil der Phytochrom A (phyA)-spezifischen Lichtsignaltransduktion. Untersuchungen an Mutanten, die kein funktionelles SPA1 besitzen, zeigten, dass diese Mutationen in phyA-abhängiger Weise die Sensitivität von Keimlingen auf FR (dunkelrotes Licht) und R (rotes Licht) erhöhen. Daraus kann abgeleitet werden, dass SPA1 ein negativer Regulator der Lichtsignaltransduktion ist. Für diese Funktion von SPA1 wird phyA benötigt (Hoecker *et al.*, 1998; Hoecker & Quail, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von SPA1 in der phyA-Signaltransduktion untersucht.

### 4.1 SPA1 moduliert beide Antwortmodi von Phytochrom A: die VLFR und die FR-HIR

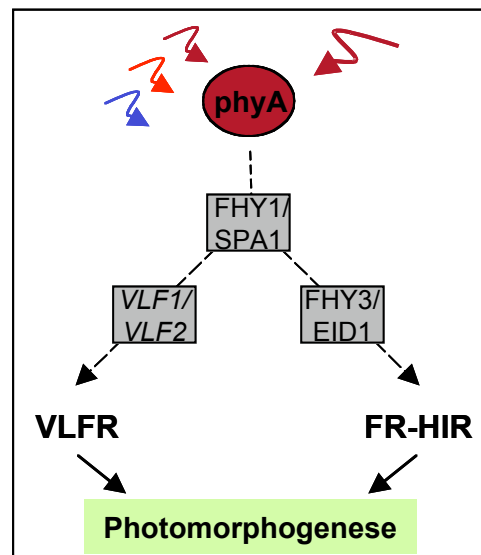
phyA hat eine besondere Funktion bei der Samenkeimung und der Deetiolierung im dunkelroten Licht (FR). Hierbei kann man unterscheiden zwischen zwei verschiedenen Antwort-Modi: Die FR-HIR (*Far-red high irradiance response*) vermittelt die Antwort auf kontinuierliches FR und die VLFR (*Very low fluence response*) die Antwort auf Lichtpulse bzw. Licht sehr geringer Intensität (Flussrate). Genetische und molekulare Daten zeigen, dass es phyA-spezifische Komponenten der Signaltransduktion gibt, die in der FR-HIR oder der VLFR wirken. Während es zwei polymorphe Loci, *VLF1* und *VLF2*, gibt, die bei der VLFR eine Rolle spielen, nicht aber bei der FR-HIR (Yanovsky *et al.*, 1997), ist ein intaktes *FHY3* beispielsweise für die FR-HIR wichtig und notwendig, nicht aber für die VLFR (Yanovsky *et al.*, 2000). Auch *EID1*, wie SPA1 ein negativer Regulator der phyA-Signaltransduktion, moduliert in erster Linie die FR-HIR und hat keine Auswirkung auf die VLFR (Zhou *et al.*, 2002). Darüber hinaus gibt es Daten, die aufzeigen, dass eine negative regulatorische Verbindung zwischen der VLFR und der FR-HIR besteht. So wurde eine Brassinosteroid-Biosynthesemutante, *eve1* (*enhanced VLFR 1*) entdeckt, die eine erhöhte VLFR, aber reduzierte FR-HIR zeigt (Luccioni *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, welche Rolle SPA1 innerhalb der beiden bekannten Aktionsmodi von phyA, der VLFR und der FR-HIR, spielt. SPA1 sollte so in das Netzwerk der phyA-Signaltransduktion eingeordnet werden. Hierzu wurden die Auswirkungen der *spa1*-Mutationen auf diese Modi in speziell hierfür konzipierten Lichtexperimenten untersucht.

Um eine VLFR spezifisch zu induzieren, wurden Keimlinge mit stündlichen FRp von 3 Minuten bestrahlt. Eine solche Behandlung schließt eine Reaktion von phyA über den FR-HIR Modus aus und ist ausreichend, um die VLFR der Keimlingsdeetiologierung zu sättigen (Casal *et al.*, 1997). Die Sättigung der Antwort auf FRp bei dem hier eingesetzten Wildtyp RLD entsprach einer klassischen VLFR (Kendrick & Kronenberg, 1994), auch wenn mehr Licht für diese Antwort benötigt wurde. Jedoch sind diese Ergebnisse vergleichbar mit denen, die für den Ökotyp Landsberg *erecta* (Ler) berichtet wurden (Yanovsky *et al.* 1997). *spa1*-Mutationen führten zu einer starken Zunahme in der Sensitivität für FRp-Signale, das heißt, die entsprechenden Antworten waren deutlich erhöht. Zu diesen Antworten gehörten die Inhibition des Hypokotyllängenwachstums und die Akkumulation der Anthocyane. Außerdem konnte bereits früher gezeigt werden, dass *spa1*-Mutationen, nach einem einzelnen FR-Puls, die Expression der *CAB* Gene (kodierend für Chlorophyll a/b bindendes Protein) erhöhen (Hoecker & Quail, 2001). Fasst man diese Daten mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen zusammen, kann festgestellt werden, dass *spa1*-Mutationen die VLFR verstärken. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass die erhöhte Antwort von *spa1*-Keimlingen auf FRp phyA-abhängig ist. Die Inhibition des Hypokotylwachstums wurde bei Wildtyp- und *spa1*-Keimlingen durch ähnlich hohe FRp Flussraten und Abstände zwischen den Pulsen gesättigt. Dies deutet darauf hin, dass *spa1*-Mutationen zwar die VLFR verstärken, nicht aber den Modus, über den phyA im FR agiert, verändern.

Bei den Wildtyp-Keimlingen war die Inhibition des Hypokotyllängenwachstums hauptsächlich auf eine FR-HIR zurückzuführen. Unter FRc-Bedingungen wurde diese Antwort außerdem mit steigenden FRc-Flussraten verstärkt, was typisch ist für eine FR-HIR. Die VLFR hingegen machte nur einen kleinen Teil der Antwort aus. Im Gegensatz dazu war die VLFR bei *spa1*-Mutanten so stark, dass die Deetiologierungsantwort der Keimlinge bereits nahezu gesättigt war und hier die Bestrahlung mit FRc, also dem Auslösen einer FR-HIR, nur noch einen sehr kleinen Beitrag zur Hemmung des Hypokotylwachstums beitrug. In Bezug auf das Hypokotyllängenwachstum konnte festgestellt werden, dass die Antwort von *spa1*-Mutanten auf FR anders als beim Wildtyp in erster Linie über den VLFR-Modus abläuft. Im Wildtyp wird die Antwort auf FR zum größten Teil über die FR-HIR vermittelt. Es scheint so, als würden *spa1*-Mutationen zu einer Verschiebung in der primären Antwort von phyA zu führen. Der hauptsächlich genutzte Antwortmodus ist hier nicht mehr eine FR-HIR sondern die VLFR als FR-induzierte Reaktion des Hypokotylwachstums.

Um zu untersuchen, ob *spa1*-Mutationen auch zu einer Verstärkung der FR-HIR führen, wurde die Akkumulation der Anthocyane in FR genauer untersucht, da diese Antwort sowohl bei *spa1*- als auch bei Wildtyp-Keimlingen in erster Linie eine FR-HIR darstellt. Es ist bereits bekannt, dass die phyA-vermittelte Akkumulation von Anthocyanen in *spa1*-Keimlingen erhöht ist. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtung unterstrichen, dass die mRNA-Gehalte der Chalcon-Synthase, einem Enzym der Anthocyan-Biosynthese, nach FRc-Behandlung in *spa1*-Keimlingen höher sind als im Wildtyp (Hoecker *et al.* 1998; Hoecker & Quail 2001). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass *spa1*-Mutationen auch zu einer Erhöhung der FR-HIR führen. Darüber hinaus existieren Daten, die dies belegen: *spa1*-Mutationen auch Antworten wie die Entfaltung der Kotyledonen und die Blockierung des Ergrünens in einer nachfolgenden Weißlichtbehandlung verstärken (Baumgardt *et al.*, 2002).



**Abbildung 33:** Modell für die Funktion von SPA1 in Bezug auf die zwei Antwortmodi von phyA.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass *spa1*-Mutationen zu einer Verstärkung sowohl der phyA-vermittelten FR-HIR als auch der VLFR führen können (Abbildung 33). In dieser Hinsicht gleichen die Ergebnisse für SPA1 denen, die für FHY1, einem positiven Regulator der phyA-Signaltransduktion, der ebenfalls sowohl in der FR-HIR als auch der VLFR eine Rolle spielt, festgestellt wurden. Eine Zusammenfassung der hier präsentierten Daten mit bereits bekannten Fakten, ermöglicht ein Modell in dem FHY1 und SPA1 oberhalb der beiden Faktoren FHY3 und EID1 agieren. Sowohl FHY1 als auch SPA1 regulieren den Teil der phyA-Signaltransduktion, der vor der Verzweigung in die VLFR und FR-HIR liegen muß (Abbildung 33). Dennoch gibt es Daten, die diesem Modell widersprechen. So kann keine Epistasie zwischen den Loci *SPA1* und *EID1* im Modus FR-HIR beobachtet werden, was aufgrund des postulierten Modells jedoch eintreten sollte (Zhou *et al.*, 2002). Es ist daher



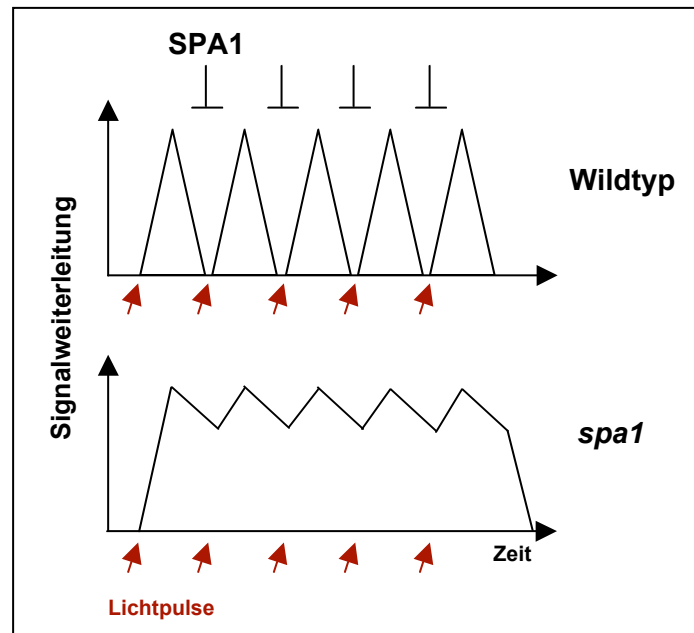
denkbar, dass die Verzweigung in Signaltransduktionswege, die der VLFR und FR-HIR zugeordnet werden können, bereits früh erfolgt, eine Interaktion und gegenseitige Modulation dieser Wege könnte jedoch auch später in der Signalkaskade stattfinden.

Es war bekannt, dass *spa1*-Mutanten eine phyA-abhängige, verstärkte Antwort auf Rc zeigen (Hoecker *et al.*, 1998). Es stellte sich daher die Frage, ob es sich bei dieser Antwort um eine VLFR und nicht um eine, eigentlich von phyB vermittelte, LFR handelt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte Reaktion auf Rc spezifisch von niedrigeren Rc-Flussraten ausgelöst wurde. Früher konnte bereits gezeigt werden, dass niedrigere Rc Flussraten eine phyA-vermittelte VLFR und höhere Rc Flussraten eine phyB-vermittelte LFR auslösen (Mazella *et al.*, 1997). Die hier erzielten Resultate deuten darauf hin, dass der Phänotyp der *spa1*-Keimlinge im Rotlicht vermutlich spezifisch auf eine Verstärkung der phyA-vermittelten VLFR zurückgeht. Auch andere Experimente belegen, dass der Phänotyp von *spa1*-Mutanten im Rotlicht wohl auf eine spezifische Erhöhung der VLFR zurückzuführen ist (Baumgardt *et al.*, 2002).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass für die starke Inhibition des Hypokotylwachstum der *spa1*-Mutanten sowohl im FR als auch im R eine stark erhöhte VLFR verantwortlich ist. Da VLFR und FR-HIR genetisch trennbar sind (Yanovsky *et al.*, 1997), könnte man nun den starken VLFR-Phänotyp der *spa1*-Mutanten nutzen, um eine mögliche VLFR-spezifische Signaltransduktionskette zu entschlüsseln. Ein Ansatz könnte sein, nach extragenischen Mutanten zu suchen, die den starken Phänotyp von *spa1*-Mutanten unterdrücken oder noch weiter verstärken. Solche Enhancer- oder Suppressormutanten könnten zur Identifizierung weiterer Faktoren führen, die spezifisch für den VLFR-Modus von phyA sind.

Auf der Basis der früheren und hier gezeigten Daten kann man zu verschiedenen Aussagen über die Funktion von SPA1 in der Lichtsignaltransduktion kommen. Möglicherweise führen Mutationen im *SPA1*-Gen zu einer verlängerten Dauer der Weiterleitung des phyA-Signals. Hierfür spricht, dass bereits eine wenig frequente Bestrahlung mit FR-Pulsen eine starke VLFR in den *spa1*-Mutanten auslöst, während für den Wildtyp stündliche Pulse notwendig waren, um eine Antwort auszulösen. In Parks *et al.* (2001) zeigte eine kinetische Analyse des Hypokotyllängenwachstums, dass in *spa1*-Mutanten die Rate des Hypokotylwachstums unter hohen Rc-Flussraten reduziert ist und das auch noch dann, wenn die phyA-Gehalte längst nicht mehr ausreichend hoch sind. Diese Reduzierung der Antwort hält auch an, wenn die Keimlinge ins Dunkel transferiert wurden. Es scheint also, dass die Abwesenheit von

intaktem SPA1 dazu führt, dass die phyA-Signaltransduktion, auch wenn kein Signal mehr vorhanden ist, andauert (Abbildung 32).



**Abbildung 34:** Modell für die Regulation der Signalweiterleitung durch SPA1. Im Wildtyp moduliert SPA1 das phyA-vermittelte Signal und hemmt so die Signalstärke. In den *spa1*-Mutanten hält die Signaltransduktion länger an, da diese negative Regulation fehlt.

## 4.2 SPA1 ist Teil der phyA-vermittelten Reaktion auf Blaulicht

In dieser Arbeit wurde ein weiterer Aspekt der von SPA1 beeinflussten Reaktionen beleuchtet: Da auch phyA notwendig für die Hemmung des Hypokotyllängenwachstums unter niedrigen Blaulichtflussraten ist (Neff & Chory, 1998) und bereits einige Faktoren identifiziert wurden, die diese Antwort auch phyA-abhängig modifizieren (Guo et al., 2001; Duek & Fankhauser 2003), wurden hier *spa1*-Mutanten auf einen Phänotyp im Blaulicht untersucht. Tatsächlich zeigten *spa1*-Keimlinge insbesondere unter niedrigen Blaulichtflussraten eine stärkere Reduktion des Hypokotyllängenwachstums im Vergleich zu Wildtyp-Keimlingen. Auch die Entwicklung der Kotyledonen war unter Einfluss der *spa1*-Mutation beschleunigt.

Im Weiteren wurde untersucht, ob diese verstärkte Deetiolierung der *spa1*-Keimlinge ein phyA-abhängiger Prozess ist. Ein Vergleich zwischen *phyA*-Nullmutante und der *spa1phyA*-Doppelmutante zeigte, dass der *spa1*-Phänotyp in der Tat phyA-abhängig war.

In einem weiteren Experiment wurde die Akkumulation der Anthocyane untersucht. Unter Blaulicht wird normalerweise im Wildtyp nur wenig Anthocyan unter dem Einfluss von phyA gebildet. Bei der Akkumulation von Anthocyanen im Blaulicht scheinen jedoch auch weitere

Photorezeptoren wie CRY1 und in geringerem Maße phyB eine Rolle zu spielen (Poppe *et al.*, 1998). Auch diese Antwort auf das Blaulichtsignal wurde durch die *spa1*-Mutation verstärkt. Unter allen eingesetzten Flussraten waren die Anthocyangehalte in den *spa1*-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Und auch diese Antwort war unter den gewählten Bedingungen phyA-abhängig.

Es kann abschließend geschlussfolgert werden, dass der Blaulichtphänotyp der *spa1*-Keimlinge in erster Linie phyA-abhängig ist, dennoch sollten Untersuchungen folgen, durch die ausgeschlossen werden kann, dass beispielsweise auch ein Einfluss der Cryptochrome auf diesen Phänotyp vorhanden ist. Ein Ansatz sollte hierbei die Herstellung von *spa1cry1cry2*-Mutanten und die Untersuchung des Blaulichtphänotyps in diesem genetischen Hintergrund sein.

#### **4.3 Die genetische Interaktion zwischen den Loci *SPA1* und *FHY1* sowie *FHY3* ist abhängig von den Lichtbedingungen**

Es war bereits bekannt, dass FHY1 und FHY3 die phyA-vermittelte Antwort auf FR modulieren (Whitelam *et al.*, 1993), während SPA1 offenbar an allen phyA-vermittelten Antworten auf Licht beteiligt ist (Hoecker *et al.*, 1998; Daten in dieser Arbeit, Abbildung 35). Darüber hinaus ist bekannt, dass SPA1 und FHY1 jeweils eine Rolle in beiden phyA-Reaktionsmodi, der FR-HIR und der VLFR, spielen, während FHY3 lediglich einen Effekt bei der FR-HIR zu haben scheint. Eine Epistasieanalyse unter allen Lichtbedingungen sollte nun weiteren Aufschluss über mögliche genetische Interaktionen zwischen diesen Komponenten der phyA-Signaltransduktion geben.

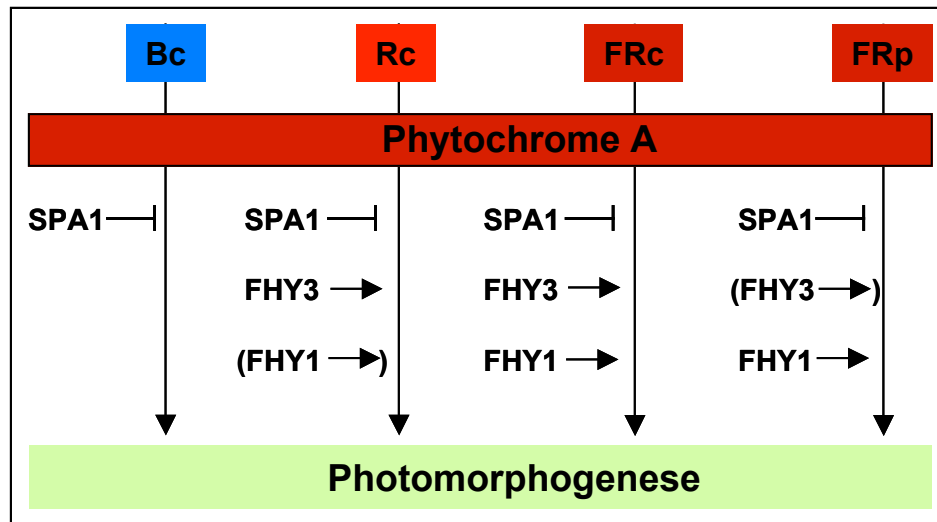
In dieser Arbeit konnten die Daten von Wang & Deng (2002a) bestätigt werden, nach denen *fhy3spa1*-Doppelmutanten einen intermediären Phänotyp im FRc zeigten. Das gleiche Resultat zeigten auch *fhy1spa1*-Mutanten im FRc. Auch unter FRp-Behandlung und bei der Akkumulation von Anthocyanen konnte gezeigt werden, dass sich die konträren Effekte der *spa1*- und *fhy1*- bzw. *fhy3*-Einzelmutanten zum Teil aufhoben. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass keine klare epistatische Beziehung zwischen diesen Komponenten vorliegt. Es liegt daher nahe, ein sehr komplexes Interaktionsnetzwerk dieser Signaltransduktionskomponenten anzunehmen, das die phyA-vermittelten Antworten auf FR reguliert. Da bekannt ist, dass sowohl *SPA1* als auch *FHY3* zu Genfamilien mit mehreren Mitgliedern gehören (Hudson *et al.*, 2003; Laubinger & Hoecker, 2003), kann das Auftreten von Redundanzeffekten nicht ausgeschlossen werden. Bei Ausfall eines Faktors könnten andere

Mitglieder der Genfamilie Funktionen übernehmen, was eindeutige Aussagen anhand von Epistasieanalysen oftmals erschwert.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass der Rotlicht-Phänotyp von *spa1*-Mutanten auf eine spezifische Verstärkung der phyA-vermittelten VLFR zurückgeht. Daher sollte nun untersucht werden, ob bei dieser Antwort die beiden positiv wirkenden Komponenten FHY1 und FHY3 eine Rolle spielen. Die Einzelmutanten *fhy1* und *fhy3* zeigten im kontinuierlichen Rotlicht (Rc) keinen Phänotyp. Bei den *fhy1spa1*-Doppelmutanten konnte Epistasie für die Deetiolierungsantwort im Rc beobachtet werden. *fhy1spa1*-Doppelmutanten zeigten unter allen Rc-Flussraten den gleichen Phänotyp wie *spa1*-Einzelmutanten. FHY1 scheint also keine Funktion in der Rc-abhängigen Antwort von phyA zu haben. Die *fhy3spa1*-Doppelmutanten zeigten wie schon im FRc einen im Vergleich zu den Einzelmutanten intermediären Phänotyp. Also konnte auch hier keine Epistasie für SPA1 und FHY3 festgestellt werden. FHY3 scheint aber eine, wenn auch untergeordnete Rolle, in der Rc-induzierten Deetiolierungsantwort zu spielen und dies auch unter niedrigen Rc-Flussraten. Diese Ergebnisse widersprechen der bisherigen Annahme, dass FHY3 keine Rolle bei der VLFR spielt, denn ein Einfluss von FHY3 auf diese phyA-vermittelte Antwort kann hier nicht völlig ausgeschlossen werden. Bei der Untersuchung der Anthocyangehalte wurde festgestellt, dass die Effekte von *fhy1* und *spa1*, sowie *fhy3* und *spa1* wiederum additiv waren. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass sowohl SPA1 als auch FHY3 hier in einem eigenen Signaltransduktionsweg agieren und FHY1 wohl keine Rolle bei der Deetiolierungsantwort auf kontinuierliches Rotlicht spielt.

Die Ergebnisse für die Untersuchung der Doppelmutanten im Blaulicht waren eindeutig: Da sowohl *fhy1spa1*- als auch *fhy3spa1*-Keimlinge unter allen gewählten Blaulichtflussraten den gleichen Phänotyp zeigten wie *spa1*-Keimlinge, werden sowohl FHY1 als auch FHY3 für den *spa1*-Phänotyp wohl nicht benötigt. Da weder *fhy1*- noch *fhy3*-Keimlinge einen Phänotyp im Blaulicht zeigten, kann man davon ausgehen, dass sowohl FHY1 als auch FHY3 keine Rolle bei der Weiterleitung des Blaulichtsignals spielen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass man zwischen Komponenten differenzieren kann, die bei allen phyA-vermittelten Antworten eine Rolle spielen und denen, die nur unter bestimmten Signaleinwirkungen eine Funktion haben. Während also SPA1 bei allen hier untersuchten phyA-vermittelten Antworten als negativer Regulator unter allen Lichtbedingungen eine Funktion hat, scheinen FHY3 und FHY1 nur bei bestimmten Reaktionen eine Rolle zu spielen (Abbildung 35). Die hier gewonnenen Einblicke in die phyA-Signaltransduktion zeigen Fall deutlich, wie komplex dieses Netzwerk ist.



**Abbildung 35:** Die Bedeutung von FHY1, FHY3 und SPA1 unter verschiedenen Lichtbedingungen.

#### 4.4 Das WD-Repeat als Schlüssel zur Regulation der Lichtsignaltransduktion

SPA1 und COP1 fungieren als Repressoren der Lichtsignaltransduktion. Während COP1 unterhalb aller Phytochrome und Cryptochrome als negativer Regulator eine zentrale Rolle spielt, ist die Funktion von SPA1 in erster Linie auf phyA-vermittelte Reaktionen beschränkt. Zunächst wurde angenommen, dass die Art der durch SPA1 und COP1 vermittelten Repressorfunktionen unterschiedlich ist, da SPA1 im Gegensatz zu COP1 Licht für seine Aktivität braucht (Deng & Quail, 1992; Hoecker *et al.*, 1999). Es wird jedoch immer deutlicher, dass unter phyA-aktivierenden Bedingungen ein konzertiertes Zusammenwirken dieser beiden Proteine wahrscheinlich ist.

Die Interaktion der beiden Proteine über ihre coiled-coil Domäne unterstreicht die Hypothese, dass COP1 und SPA1 in einem Komplex unter dem Einfluss von phyA-vermittelten Signalen die Reaktionen auf diese Signale modifizieren (Hoecker & Quail, 2001). Diese Repression könnte über die Inaktivierung oder Degradation positiv wirkender Intermediate erfolgen. In diesem Zusammenhang konnte also zum ersten Mal gezeigt werden, dass es wohl eine Verbindung zwischen der phyA-spezifischen Signaltransduktion und COP1 gibt. Vor kurzem wurde gezeigt, dass COP1 als E3-Ubiquitinligase wirken kann und durch Ubiquitinierung positiv wirkende Komponenten der Lichtsignaltransduktion der Degradation über den Proteasomweg zuführt. SPA1 scheint als Modulator diese Reaktion zu beeinflussen (Seo *et al.*, 2003). Neueste Daten belegen, dass die Interaktion zwischen COP1 und SPA1 in phyA-

abhängiger Weise die Regulation der HY5-Aktivität, einem positiv wirkendem Regulator der Lichtsignaltransduktion, vermittelt (Saijo et al., 2003).

Die Funktion von COP1 als Repressor hängt ganz wesentlich von seiner WD-Repeat-Domäne ab. Diese Domäne vermittelt nicht nur die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor HY5 und damit wahrscheinlich die Degradation dieses positiven Regulators (Osterlund *et al.*, 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass das WD-Repeat von COP1 als autonomer Repressor der Photomorphogenese fungieren kann (Torii *et al.*, 1998). Vor diesem Hintergrund ist die Tatsache, dass SPA1 eine WD-Repeat-Domäne enthält, die hohe Sequenzähnlichkeit zu der von COP1 zeigt, besonders interessant. Auch das WD-Repeat von SPA1 ist essentiell für seine Funktion als Repressor der Photomorphogenese (Hoecker *et al.*, 1999). Das WD-Repeat von COP1 setzt sich aus sieben WD-40 Wiederholungen zusammen. Über den gesamten Bereich zeigt sich eine signifikant hohe Sequenzähnlichkeit im Vergleich mit SPA1. Proteinsequenzanalysen zeigen, dass das WD-Repeat von SPA1 aus sechs WD-40 Einheiten besteht. Ein weiteres, siebtes zu COP1 ähnliches Motiv kann wohl nicht mehr als WD-40 Einheit gelten.

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob das WD-Repeat von SPA1 das WD-Repeat von COP1 funktionell ersetzen kann. Diese Information könnte weiterhelfen, die Frage zu beantworten, inwieweit das WD-Repeat von SPA1 innerhalb des postulierten Komplexes eine ähnliche Funktion wie das von COP1 haben kann. Die WD-Repeats von SPA1 und COP1 könnten hierbei gemeinsam als Basis für die weiteren Interaktionen und Reaktionen innerhalb dieses Komplexes dienen.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Hybridprotein aus dem N-Terminus von COP1 und der gesamten WD-Repeat-Domäne von SPA1 in der Lage ist, den schwachen, aber deutlichen Phänotyp der *cop1-4* Mutante zu komplementieren und die wildtypischen Merkmale in den transgenen Pflanzen wiederherzustellen. Das WD-Repeat von SPA1 kann das WD-Repeat von COP1 funktionell ersetzen. Interessant ist darüber hinaus jedoch das Ergebnis, dass ein Hybridmolekül, das nicht den gesamten vorhergesagten WD-Repeat-Bereich von COP1 durch den gesamten WD-Repeat-Bereich von SPA1 ersetzt, sondern nur die letzten sechs WD-40 Einheiten von COP1, nicht zu einer vollständigen Komplementation führt. Es kann also festgestellt werden, dass nur eine vollständige WD-Repeat-Domäne auch vollständig funktionsfähig ist.

Ein bemerkenswerter Fakt ist, dass *cop1*-Mutanten, denen das WD-Repeat fehlt, nur einen vergleichsweise schwachen Phänotyp zeigen, wenn das restliche Protein in niedriger Konzentration vorliegt. Alle bisher identifizierten lethalen *cop1*-Mutanten tragen dagegen Mutationen oder kleine Deletionen im WD-Repeat, die offenbar die Struktur des WD-Repeats

entscheidend verändern (McNellis *et al.*, 1994; Stoop-Myer *et al.*, 1999). Dies wurde in dieser Arbeit bestätigt, da der unvollständige Austausch des WD-Repeats nicht zu einer funktionellen Komplementation führte.

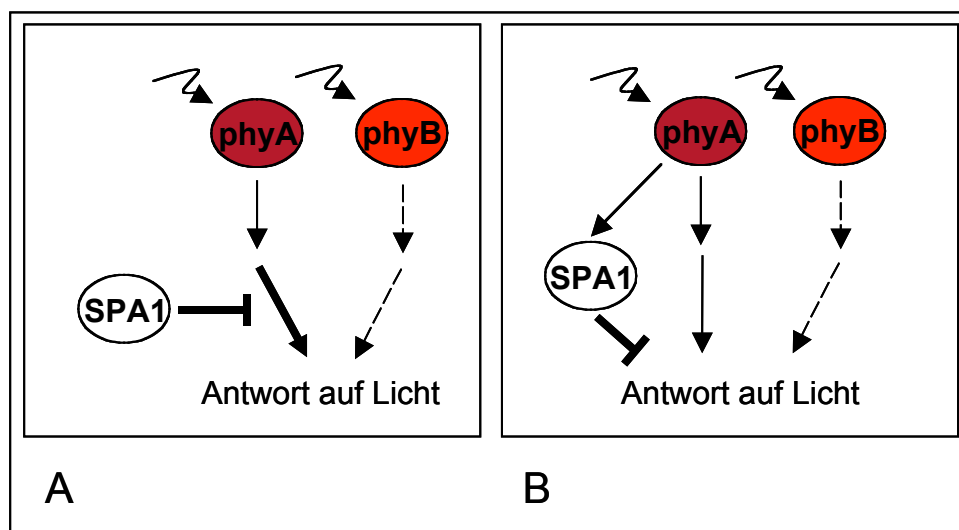
Ausführliche Interaktionsstudien mit dem in *cop1-4* Pflanzen exprimierten N-terminalen COP1-Fragment zeigten, dass dieses verkürzte Protein nicht mehr in der Lage ist, den Interaktionspartner von COP1, HY5, zu binden (Holm *et al.*, 2001). Dennoch ist die *cop1-4* Mutation nicht lethal. Da hier gezeigt werden konnte, dass das vollständige WD-Repeat von SPA1 das WD-Repeat von COP1 funktionell ersetzen kann, könnte dies eine mögliche Erklärung für den *cop1-4* Phänotyp sein. Wenn das SPA1-WD-Repeat innerhalb eines Komplexes die Funktion des WD-Repeats von COP1 übernehmen kann, so muß ein kompletter Ausfall dieser Domäne im COP1-Protein nicht zwangsläufig einen Funktionsausfall des Komplexes nach sich ziehen. Die Degradation von positiv wirkenden Intermediaten könnte dennoch stattfinden.

Die Interaktion von COP1 mit dem Faktor HY5 wird durch das WD-Repeat von COP1 vermittelt, benötigt aber zusätzlich die Anwesenheit des coiled-coil (Osterlund *et al.*, 2000). Gleiches konnte nun für die Interaktion von SPA1 mit HY5 nachgewiesen werden (Saijo *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte im Zwei-Hybridsystem der Hefe gezeigt werden, dass die coiled-coil-vermittelte Interaktion zwischen COP1 und SPA1 nicht mehr nachweisbar ist, wenn eine kleine Deletion oder ein einzelner Aminosäureaustausch in die WD-Repeat-Domäne von COP1 eingeführt wurde (Saijo *et al.*, 2003). Da die coiled-coil-Domänen der Proteine alleine aber interagieren (Hoecker & Quail, 2001), scheint nur ein missgefaltetes WD-Repeat diese Interaktion zu verhindern, nicht aber der komplette Verlust der WD-Repeat-Domäne. Diese Daten stehen im Einklang mit den hier gezeigten und es kann postuliert werden, dass das WD-Repeat von SPA1 die Funktion des WD-Repeats von COP1 ersetzen kann. Die WD-Repeats dieser Proteine könnten demnach innerhalb eines Komplexes tatsächlich ähnliche Funktionen haben.

#### **4.5 Die Funktion von SPA1 in der phyA-Signaltransduktion**

Alle bisherigen Daten ermöglichen die Annahme zweier Modelle, die sich nicht gegenseitig ausschließen, für die SPA1-Funktion in der phyA-spezifischen Signaltransduktion. In dem ersten Modell moduliert SPA1 die Aktivität einer Komponente in der phyA-spezifischen Signaltransduktion. Diese Komponente wird von phyA aktiviert und durch konstitutiv aktives SPA1 inhibiert (Abbildung 33, Modell A). Dies könnte durch Degradation oder Inaktivierung dieser Komponente erreicht werden. In Abwesenheit von intaktem SPA1 würde die phyA-

Signalaktivität also länger andauern, da die Funktion der positiven Komponente nun nicht mehr inhibiert wird. Die zweite Möglichkeit (Abbildung 30, Modell B) setzt eine Modifizierung von SPA1 durch licht-induziertes phyA voraus, um die Repressorfunktion von SPA1 zu aktivieren. Ohne solch ein modifiziertes SPA1 fehlt diese Repressoraktivität und so kommt es in *spa1*-Mutanten zu der beobachteten Verstärkung der Antwort auf Licht. Das Modell B, das die Aktivierung von SPA1 durch phyA voraussetzt, schließt auch die bekannte Komplexität der Lichtsignaltransduktion mit ein. Es ist bekannt, dass viele positive Intermediate, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, die an lichtregulierte Elemente binden, unterhalb aller Phytochrome und teilweise auch der Cryptochrome, agieren. Würde SPA1 einen solchen Faktor inhibieren, wäre ein konstitutiv aktives SPA1 nicht denkbar. Neueste Daten belegen, dass SPA1 durch Interaktion mit COP1 an der Degradation des positiven Regulators HY5 beteiligt ist (Saijo *et al.*, 2003). Da HY5 nachweislich unterhalb mehrerer Photorezeptoren agiert, liegt es nahe, anzunehmen, dass SPA1 von phyA aktiviert wird, um nur unter phyA-spezifischen Bedingungen die Degradation von HY5 zu beeinflussen.



**Abbildung 36:** Zwei mögliche Modelle für die Funktion von SPA1 bei der negativen Regulation der phyA-Signaltransduktion. **A:** SPA1 reprimiert eine von phyA aktivierte Komponente; **B:** phyA aktiviert SPA1, was zu einer dauerhaften Repressorfunktion von SPA1 führt.

Alle bisherigen Daten über das konzertierte Zusammenspiel von COP1 und SPA1 in phyA-abhängiger Weise machen diesen Komplex zu einer möglichen zentralen Schaltstelle in der phyA-Signaltransduktion. Weitere Untersuchungen sollten sich nun darauf konzentrieren, die bisher nicht identifizierten Proteine in diesem Komplex zu charakterisieren.



## 5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte auf dem Gebiet der Phytochrom A (phyA)-Signaltransduktion erzielt. In *Arabidopsis thaliana* wurden einige phyA-spezifische Faktoren identifiziert, darunter der negative Regulator SPA1, der die phyA-Signaltransduktion lichtabhängig modifiziert. SPA1 ist ein WD-Repeat-Protein und zeigt im Bereich des WD-Repeats eine hohe Ähnlichkeit zu der entsprechenden Domäne von COP1, dem zentralen Repressor der Photomorphogenese. Die beiden Proteine können miteinander interagieren und diese Interaktion wird durch ihre coiled-coil-Domänen vermittelt. Einige Daten deuten darauf hin, dass SPA1 und COP1 in einem Komplex phyA-abhängig durch Degradation positiver Komponenten die Lichtsignaltransduktion modulieren.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von SPA1 in der phyA-Signaltransduktion genauer untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass SPA1 beide bekannten Antwortmodi von phyA, die VLFR (ausgelöst durch extrem niedrige Photonenflussraten) und die FR-HIR (ausgelöst durch kontinuierliches dunkelrotes Licht), negativ reguliert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *spa1*-Mutanten nicht nur die bereits untersuchten Phänotypen im roten und dunkelroten Licht aufweisen, sondern auch auf Blaulicht hypersensitiv reagieren. Auch dieser Phänotyp ist phyA-abhängig. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass SPA1 in allen bisher untersuchten phyA-vermittelten Antworten auf Licht eine Funktion besitzt. In einer Epistasieanalyse mit den positiven Regulatoren der phyA-Signaltransduktion *FHY1* und *FHY3* konnte außerdem festgestellt werden, dass, anders als *SPA1*, diese beiden Loci nicht in alle durch phyA ausgelösten Reaktionen involviert sind. So spielt *FHY1* nur eine untergeordnete Rolle in der durch rotes Licht ausgelösten Signaltransduktion und sowohl *FHY1* als auch *FHY3* haben keine Funktion im Blaulicht.

In Experimenten, bei denen das WD-Repeat von COP1 gegen das von SPA1 ausgetauscht wurde, konnte in transgenen, *cop1*-mutanten Pflanzen gezeigt werden, dass das WD-Repeat von SPA1 das von COP1 funktionell ersetzen kann. Es ist bekannt, dass die WD-Repeat-Domäne für die Repressorfunktion beider Proteine essentiell ist. Es kann nun postuliert werden, dass die WD-Repeat-Domänen hier eine ähnliche Funktion haben.

Insgesamt kann SPA1 eine zentrale Rolle in der phyA-Signaltransduktion zugewiesen werden, da es alle bisher untersuchten phyA-abhängigen Antworten auf Licht moduliert, und in einem Komplex mit COP1 möglicherweise die Degradation positiv wirkender Intermediate beeinflusst.

## 6 Anhang

Auf den folgenden Seiten finden sich Tabellen mit Informationen über die transgenen *cop1-4* Linien. Die aufgelisteten Daten beziehen sich auf die aufspaltende F2-Generation. Neben der Aufspaltung auf Kanamycin, ist die Aufspaltung nach dem Keimlingsphänotyp im Dunkeln aufgeführt. Aus diesen Daten leitet sich das Aufspaltungsverhältnis und die Anzahl der integrierten Transgene ab. Grau unterlegt sind die Linien, die für alle weiterführenden Experimente verwendet wurde.

| COP1 ( <i>cop1-4</i> ) | Kanamycin       |                  | Phänotyp in Dunkelheit |             |                    | Aufspaltung | Insertionen |
|------------------------|-----------------|------------------|------------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
|                        | <i>sensitiv</i> | <i>resistent</i> | <i>kurz</i>            | <i>lang</i> | <i>intermediär</i> |             |             |
| 1                      | 11              | 21               | 7                      | 10          | 1                  | 1:3         | 1           |
| 2                      | 4               | 23               | 3                      | 3           | 10                 | 1:3         | 1           |
| 3                      | 3               | 30               | 8                      | 5           | 7                  | 1:15        | 2           |
| 4                      | 8               | 18               | 7                      | 21          | -                  | 1:3         | 1           |
| 5                      | 2               | 24               | 9                      | 1           | 11                 | 1:15        | 2           |
| 6                      | 5               | 21               | 4                      | 19          | -                  | 1:3         | 1           |
| 7                      | 5               | 22               | 7                      | 17          | 2                  | 1:15        | 2           |
| 8                      | 7               | 19               | 5                      | 16          | -                  | 1:3         | 1           |
| 9                      | 7               | 22               | 8                      | 17          | -                  | 1:3         | 1           |
| 10                     | 8               | 22               | 5                      | 22          | -                  | 1:3         | 1           |
| 11                     | 7               | 24               | 7                      | 15          | -                  | 1:3         | 2           |
| 12                     | 5               | 21               | 7                      | 20          | -                  | 1:3         | 1           |
| 13                     | 7               | 19               | 8                      | 17          | -                  | 1:3         | 2           |
| 14                     | 4               | 31               | 5                      | 12          | 6                  | 1:15        | 1           |
| 15                     | 2               | 31               | 8                      | 9           | 4                  | 1:15        | 1           |

**Tabelle I:** Liste der transgenen *cop1-4* Linien, die das *COP1*-Transgen in ihr Genom integriert haben.

| COP1 <sup>NT</sup> SPA1 <sup>WD</sup> -Ava ( <i>cop1-4</i> ) | Kanamycin       |                  | Phänotyp in Dunkelheit |             | Aufspaltung | Insertionen |
|--|-----------------|------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
|  | <i>sensitiv</i> | <i>resistent</i> | <i>kurz</i>            | <i>lang</i> |             |             |
| 1  | 7               | 24               | 9                      | 23          | 1:3         | 1           |
| 2  | 7               | 26               | 7                      | 24          | 1:3         | 1           |
| 3  | 20              | 10               | 17                     | 9           | ?           | ?           |
| 4  | 20              | 8                | 15                     | 9           | ?           | ?           |
| 5  | 7               | 22               | 6                      | 19          | 1:3         | 1           |
| 6  | 8               | 24               | 9                      | 24          | 1:3         | 1           |
| 7  | 14              | 17               | 13                     | 9           | ?           | ?           |
| 8  | 2               | 32               | 2                      | 28          | 1:15        | 2           |
| 9  | 8               | 22               | 7                      | 19          | 1:3         | 1           |
| 10   | 7               | 24               | 8                      | 25          | 1:3         | 1           |
| 11   | 3               | 31               | 3                      | 29          | 1:15        | 2           |
| 12   | 2               | 27               | 2                      | 30          | 1:15        | 2           |
| 13   | 21              | 7                | 23                     | 8           | ?           | ?           |
| 14   | 7               | 22               | 6                      | 24          | 1:3         | 1           |
| 15   | 19              | 5                | 23                     | 8           | ?           | ?           |
| 16   | 17              | 7                | 16                     | 8           | ?           | ?           |
| 17   | 6               | 23               | 6                      | 19          | 1:3         | 1           |

**Tabelle II:** Liste der transgenen *cop1-4* Linien, die das COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Ava-Transgen in ihr Genom integriert haben.

| NT-COP1 ( <i>cop1-4</i> ) | Kanamycin       |                  | Phänotyp in Dunkelheit |             | Aufspaltung | Insertionen |
|---------------------------|-----------------|------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                           | <i>sensitiv</i> | <i>resistent</i> | <i>kurz</i>            | <i>lang</i> |             |             |
| 1                         | 5               | 19               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |
| 2                         | 5               | 20               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |
| 3                         | 4               | 17               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |
| 4                         | 3               | 13               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |
| 5                         | 7               | 21               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |
| 6                         | 6               | 15               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |
| 7                         | 3               | 14               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |
| 8                         | 4               | 15               | alle                   | -           | 1:3         | 1           |

**Tabelle III:** Liste der transgenen *cop1-4* Linien, die das NT-COP1-Konstrukt in ihr Genom integriert haben.

| COP1 <sup>NT</sup> SPA1 <sup>WD</sup> -Xba ( <i>cop1-4</i> ) | Kanamycin       |                  | Phänotyp in Dunkelheit |             |                    | Aufspaltung | Insertionen |
|--|-----------------|------------------|------------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
|  | <i>sensitiv</i> | <i>resistent</i> | <i>kurz</i>            | <i>lang</i> | <i>intermediär</i> |             |             |
| 1  | 7               | 28               | alle                   | -           | -                  | 1:3         | 1           |
| 2  | 10              | 20               | 7                      | 1           | 13                 | 1:3         | 1           |
| 3  | 4               | 8                | alle                   | -           | -                  | 1:3         | 1           |
| 4  | 6               | 26               | alle                   | -           | -                  | 1:3         | 1           |
| 5  | 2               | 24               | alle                   | -           | -                  | 1:15        | 2           |
| 6  | 7               | 22               | alle                   | -           | -                  | 1:3         | 1           |
| 7  | 8               | 17               | 5                      | 2           | 14                 | 1:3         | 1           |
| 8  | 5               | 21               | 8                      | 1           | 12                 | 1:3         | 1           |
| 9  | 7               | 27               | alle                   | -           | -                  | 1:3         | 1           |
| 10   | 2               | 29               | alle                   | -           | -                  | 1:15        | 2           |
| 11   | 9               | 21               | 7                      | -           | 14                 | 1:3         | 1           |
| 12   | 7               | 26               | 6                      | -           | 16                 | 1:3         | 1           |

**Tabelle IV:** Liste der transgenen *cop1-4* Linien, die das COP1<sup>NT</sup>SPA1<sup>WD</sup>-Xba-Transgen in ihr Genom integriert haben.

## 7 Literatur

**Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-402

**Ang LH, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer A and Deng X-W (1998)** Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol. Cell* 1: 939-948

**Barnes SA, Quaggio RB, Whitelam GC, Chua NH (1996)** fhy1 defines a branch point in phytochrome A signal transduction pathways for gene expression. *Plant J.* 10: 1155-61

**Barnes SA, McGrath RB and Chua NH (1997)** Light signal transduction in plants. *Trends Cell Biol.* 7: 21-26

**Baumgardt RL, Oliverio KA, Casal JJ, Hoecker U (2002)** SPA1, a component of phytochrome A signal transduction, regulates the light signaling current. *Planta* 215: 745-753

**Birnboim HC and Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513

**Bolle C, Koncz C and Chua N-H (2000)** PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* 14: 1269-1278

**Büche C, Poppe C, Schafer E, Kretsch T (2000)** *eid1*: a new Arabidopsis mutant hypersensitive in phytochrome A-dependent high-irradiance responses. *Plant Cell* 12: 547-558

**Casal JJ, Sanchez RA, Yanovsky MJ (1997)** The function of phytochrome A. *Plant Cell Environ.* 20: 813-819

**Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR (1998)** *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282: 1698-701

**Church GM, Gilbert W. (1984)** Genomic sequencing. Proc Nat. Acad. Sci. 81(7):1991-1995

**Clack T, Mathews S and Sharrock RA (1994)** The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes-The sequences and expression of phyD and phyE. Plant Mol. Biol. 25: 413-427

**Clough SJ, Bent AF. (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16: 735-43

**Clough RC, Jordan-Beebe ET, Lohman KN, Marita JM, Walker JM, Gatz C and Vierstra RD (1999)** Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for Pfr ubiquitination and degradation. Plant J. 17: 155-167

**Cohen SN, Chang ACY and Hsu L (1972)** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 69: 2110

**Dehesh K, Franci C, Parks BM, Seeley KA, Short TW, Tepperman JM, Quail PH (1993)** *Arabidopsis HY8* locus encodes phytochrome A. Plant Cell 5: 1081-1088

**Deng XW, Quail P (1992)** Genetic and phenotypic characterization of cop1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 2: 83-95

**Desnos T, Puente P, Whitelam GC, Harberd NP (2001)** FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. Genes Dev. 15: 2980-2990

**Devlin PF, Halliday KJ, Harberd NP, Whitelam GC (1996)** The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: novel phytochromes control internode elongation and flowering time. Plant J. 10: 1127-1134

**Devlin PF, Robson PR, Patel SR, Goosey RA, Whitelam GC (1999)** Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. Plant Physiol. 119: 909-15

**Dieterle M, Zhou YC, Schafer E, Funk M, Kretsch T (2001)** EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. Genes Dev. 15: 939-944



**Duek PD and Fankhauser C (2003)** HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J.* 34: 827-836

**Edwards K, Johnstone C, Thompson C. (1991)** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19: 1349

**Eichenberg K, Baurle I, Paulo N, Sharrock RA, Rudiger W, Schafer E (2000)** *Arabidopsis* phytochromes C and E have different spectral characteristics from those of phytochromes A and B. *FEBS Lett.* 470: 107-12

**Elich TD and Chory J (1997)** Biochemical characterization of *Arabidopsis* wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *Plant Cell* 9: 2271-2280

**Fairchild CD, Schumaker MA and Quail PH (2000)** HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* 14: 2377-2391

**Fankhauser C, Yeh K-C, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD and Chory J (1999)** PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 284: 1539-1541

**Fankhauser C, Chory J (2000)** RSF1, an *Arabidopsis* locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol.* 124: 39-45

**Feinberg AP, Vogelstein B. (1983)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13

**Franklin KA, Davis SJ, Stoddart WM, Vierstra RD, Whitelam GC (2003)** Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant Cell* 15: 1981-1989

**Guo H, Mockler T, Duong H, Lin C (2001)** SUB1, an *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* 291: 487-490

**Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P.** The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 1994 25: 989-94

**Hanahan D, Jessee J and Bloom FR (1991)** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204: 63-113

**Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000)** pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819-832

**Hennig L, Büche C, Eichenberg K and Schäfer E (1999)** Dynamic Properties of endogenous phytochrome A in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 121: 571-577

**Hennig L, Poppe C, Sweere U, Martin A, Schafer E (2001)** Negative interference of endogenous phytochrome B with phytochrome A function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 1036-1044

**Hoecker U, Yong X and Quail PH (1998)** *SPA1*: A new genetic locus involved in phytochrome A-specific signal transduction. *Plant Cell* 10: 19-33

**Hoecker U, Tepperman JM and Quail PH (1999)** *SPA1*, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science* 284: 496-499

**Hoecker U and Quail PH (2001)** The phytochrome A-specific signaling intermediate *SPA1* interacts directly with *COP1*, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 276: 38173-38178

**Holm M, Hardtke CS, Gaudet R and Deng X-W (2001)** Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* *COP1*. *EMBO J.* 20: 118-127

**Holm M, Ma LG, Qu LJ and Deng X-W (2002)** Two interacting bZIP proteins are direct targets of *COP1*-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 16: 1247-1259

**Holtorf S, Apel K, Bohlmann H (1995)** Comparison of different constitutive and inducible promoter for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646

- Hsieh HL, Okamoto H, Wang M, Ang LH, Matsui M, Goodman H, Deng X-W (2000)** FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes Dev.* 14: 1958-70
- Hudson M, Ringli C, Boylan MT, Quail PH (1999)** The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes Dev.* 13: 2017-2027
- Hudson ME Lisch DR and Quail PH (2003)** The *FHY3* and *FAR1* genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant J.* 34: 453-471
- Johnson E, Bradley M, Harberd NP, Whitelam GC (1994)** Photoresponses of light-grown phyA mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 105: 141-149
- Kendrick RE and Kronenberg GHM (1994)** *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers)
- Kim J, Yi H, Choi G, Shin B, Song PS, Choi G (2003)** Functional characterisation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell* 15: 2399-2407
- Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schaefer E and Nagy F (1999)** Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* 11: 1445-1456
- Koncz C, Martini N, Szabados L, Hrouda M, Bachmair A and Schell J (1994)** Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In Gelvin, SB and Schilperoort, RA (eds.), *Plant Molecular Biology Manual Vol B2*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-22
- Krall L, Reed JW (2000)** The histidine kinase-related domain participates in phytochrome B function but is dispensable. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8169-8174
- Kunkel T, Neuhaus G, Batschauer A, Chua NH, Schäfer E (1996)** Functional analysis of yeast-derived phytochrome A and B phycocyanobilin adducts. *Plant J.* 10: 625-636

**Laubinger S, Hoecker U (2003)** The SPA1-like proteins SPA3 and SPA4 repress photomorphogenesis in the light. *Plant J.* 35: 373-385

**Li D and Roberts R (2001)** WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 2085-2097

**Lin C (2002)** Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell, Supplement:* S207-S225

**Luccioni LG, Olivero KA, Yanovsky MJ, Boccalandro H, Casal JJ (2002)** Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant Physiol.* 128: 173-181

**Martinez-Garcia J, Huq E and Quail PH (2000)** Direct targeting of light signals to a promotor element-bound transcription factor. *Science* 288: 859-863.

**Matsushita T, Mochizuki N, Nagatani A. (2003)** Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* 424: 571-574.

**Mazzella MA, Alconada Magliano TM, Casal JJ (1997)** Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant Cell Environ.* 20: 261-267

**McMaster GK, Carmichael GG. (1977)** Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Nat. Acad. Sci. U S A.* 74: 4835-8

**McNellis T, von Arnim AG, Araki T, Komeda Y, Misera S, Deng XW (1994)** Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell* 6: 487-500

**Monte E, Alonso JM, Ecker JR, Zhang Y, Li X, Young J, Austin-Phillips S, Quail PH (2003)** Isolation and Characterization of phyC Mutants in *Arabidopsis* Reveals Complex Crosstalk between Phytochrome Signaling Pathways. *Plant Cell* 15: 1962-1980.

**Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.* 15: 473-497

**Neff MM and Chory J (1998)** Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 118: 27-35

**Neff MM, Fankhauser F and Joanne Chory (2000)** Light: an indicator of time and place. *Genes Dev.* 14: 257-271

**Ni M, Tepperman JM and Quail PH (1998)** PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95: 657-667

**Ni M, Tepperman JM and Quail PH (1999)** Binding of phytochrome B to its nuclear signaling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400: 781-784

**Okamoto H, Matsui M and Deng X-W (2001)** Overexpression of the heterotrimeric G-protein  $\beta$ -subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1639-1651

**Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N and Deng X-W (2000)** Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405: 462-466

**Parks BM, Hoecker U, Spalding EP (2001)** Light-induced growth promotion by SPA1 counteracts phytochrome-mediated growth inhibition during de-etiolation. *Plant Physiol.* 126: 1291-1298

**Poppe C, Sweere U, Drumm-Herrel H, Schafer E (1998)** The blue light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 465-471

**Quail PH (2002)** Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Rev. Mol.* 3: 85-93

**Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M and Chory J (1993)** Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5: 147-157

**Saijo Y, Sullivan JA, Wang H, Yang J, Shen Y, Rubio V, Ma L, Hoecker U, Deng XW (2003)** The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev.* 17: 2642-2647

**Sambrook J, Russel DW (2001)** Molecular cloning - a laboratory manual. Third edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press

**Schmidt R, Mohr H (1981)** Time-dependent changes in the responsiveness to light of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Cell Environ.* 4: 433-437

**Seo HS, Yang JY, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML, Chua NH (2003)** LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 423: 995-999

**Sharrock RA and Quail PH (1989)** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* 3: 1745-1757

**Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M (1996)** Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinhibition of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 93: 8129-8133

**Shinomura T, Uchida K, Furuya M (2000)** Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 147-156

**Smith H and Whitelam GC (1990)** Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. *Plant Cell Environ.* 13: 695-707

**Smith H, Xu Y, Quail PH (1997)** Antagonistic but complementary actions of phytochromes A and B allow seedling de-etiolation. *Plant Physiol.* 11: 637-641

**Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999)** The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *TIBS* 24: 181-185

**Smith H (2000)** Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature* 407: 585-591

**Soh MS, Kim YM, Han SJ, Song PS (2000)** REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2061-74

**Spiegelman JI, Mindrinos MN, Fankhauser C, Richards D, Lutes J, Chory J, Oefner PJ (2000)** Cloning of the *Arabidopsis* RSF1 gene by using a mapping strategy based on high-density DNA arrays and denaturing high-performance liquid chromatography. *Plant Cell* 12: 2485-2498

**Stoop-Myer C, Torii KU, McNellis TW, Coleman JE and Deng X-W (1999)** The N-terminal fragment of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 maintains partial function and acts in a concentration dependent manner. *Plant J.* 20: 713-717

**Torii KU, McNellis TW and Deng X-W (1998)** Functional dissection of *Arabidopsis* COP1 reveals specific role of its three structural modules in light control of seedling development. *EMBO J.* 17: 5577-5587

**Valvekens D, Van Montagu M, Van Lijsebettens M (1988)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 85: 5536-5540

**Vierstra R, Davis SJ (2000)** Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11: 511-21

**von Arnim AG and Deng X-W (1994)** Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 79: 1035-1045

**Wang H, Ma L, Habashi J, Li J, Zhao H and Deng X-W (2002)** Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: 723-733

**Wang H and Deng X-W (2002a)** *Arabidopsis* FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *EMBO J.* 21:1339-49

**Wang H and Deng X-W (2002b)** Phytochrome Signaling Mechanism. *The Arabidopsis Book*, eds. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0074, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/toc.cfm>

**Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson ML, Cowl JS and Harberd NP (1993)** Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5: 757-768

**Wilkinson M, Doskow J, Lindsey S. (1991)** RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic Acids Res.* 19: 679

**Yanovsky MJ, Casal JJ, Luppi JP (1997)** The *VLf* loci, polymorphic between ecotypes *Landsberg erecta* and *Columbia*, dissect two branches of phytochrome A signal transduction that correspond to very-low-fluence and high-irradiance responses. *Plant J.* 12: 659-667

**Yanovsky MJ, Whitelam GC, Casal JJ (2000)** *thy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiol.* 123: 235-24

**Yeh KC and Lagarias JC (1998)** Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13976-13981

**Zhou YC, Dieterle M, Büche C, Kretsch T (2002)** The negatively acting factors EID1 and SPA1 have distinct functions in phytochrome A-specific light signaling. *Plant Physiol.* 128: 1098-1108

**Zhu Y, Tepperman JM, Fairchild CD, Quail PH (2000)** Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 13419-24



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Westhoff. Ihm sei besonders für manch anregende Diskussion zum Thema „gute Antikörper“ gedankt.

Bei Herrn Prof. Dr. Bünemann bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Frau PD Dr. Ute Höcker danke ich für die interessante Themenstellung und wissenschaftlich hervorragende Betreuung.

Der „Höckerschen“ Arbeitsgruppe sei gedankt für eine angenehme Arbeitsatmosphäre: Carmen Kulajta und Markus Nixdorf, sowie Sascha Laubinger und Kirsten Fittinghoff. Kirsten danke ich besonders für die Betreuung in der „Freiburger Phase“ und Sascha Laubinger für wissenschaftlich anregende Diskussionen und seinen Beistand in schwierigen Zeiten auch außerhalb des Labors (insbesondere auf dem Weg zum Automaten ☺ und in der „Chemie-Ecke“). Für die Unterstützung bei der Betreuung der Pflanzenanzucht in der Klimakammer sowie in fototechnischen Fragen und für so manches Gewächshausgespräch danke ich Stefanie Kuhl. Dem Team von Herrn Rogmann danke ich für die Pflege der Pflanzen im Gewächshaus. Jan Teune und Michael Lübeck danke ich für ihren Einsatz als studentische Hilfskräfte bei der Ernte, dem Ausplattieren von Saatgut und für einige genomische Präps sowie ganz besonders fürs „Spitzen stecken“. Sabine Bossmann danke ich für manch erfrischenden Kommentar, ihr unermüdliches „Alles wird gut“, sowie natürlich ihren Einsatz an der Stadtbrücke zu Heidelberg. Udo Gowik danke ich dafür, dass er es nie versäumte im unpassendsten Moment mit einem süffisanten Lächeln über den Gang hinweg Dinge zu beobachten, die gerade niemand sehen sollte ☺. Andrea Windhövel danke ich für vieles, vor allem für ihre Anwesenheit.

Ein besonderer Dank geht an Ute Schlue, Maria Koczor, Susanne Paradies und natürlich Monika Streubel, ohne die überhaupt nichts möglich gewesen wäre! Außerdem danke ich der gesamten BotIV für die gemeinsame Zeit, ganz besonders natürlich der gesamten Kindergartenfraktion ☺.

Ich danke allen meinen Freunden und Freundinnen, sowie meiner Mutter und Frits, dafür, dass sie mich während der letzten Jahre ertragen und getragen haben. Mein größter Dank geht an Dina Grohmann für Alles: Würmer, Dinge, Knöpfe; Immer: vom 2. bis zum 22. und vom 22. bis zum 2.; Überall: Düsseldorf, Dortmund, Lübeck und Timbuktu. Kurz: AIÜ und weit darüber hinaus!

Mit Zustimmung des Betreuers wurden Teile dieser Arbeit veröffentlicht:

**Baumgardt RL, Oliverio KA, Casal JJ, Hoecker U. (2002)** SPA1, a component of phytochrome A signal transduction, regulates the light signaling current. *Planta* 215:745-53.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Düsseldorf, November 2003

Rosalinde-Louise Baumgardt