

Die Funktion der *SPA* Gene in der lichtgesteuerten Entwicklung von
Arabidopsis thaliana

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sascha Laubinger
aus Hilden

April 2006

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. P. Westhoff
Koreferent: Prof. Dr. R. Simon

Tag der mündlichen Prüfung: 5.5.2006

Abkürzungen

α -[³² P]-dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat, a-P-Atom radioaktiv markiert
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
A	Ampere
B	blaues Licht
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
D	Asparaginsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenyl-indol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Di-thiothreitol
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> , tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
FR	dunkelrotes Licht
g	Gramm
GAD	GAL4-Aktivierungsdomäne
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
HA	Influenza Hemagglutinin
KT	Kurztag
KTP	Kurztagpflanze
l	Liter
LT	Langtag
LTP	Langtagpflanze
LRE	Light Responsive Elements
M	Molar, mol/l
mm	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion

Pfr	dunkelrotes Licht absorbierende Konformation des Phytochroms
Pr	rotes Licht absorbierende Konformation des Phytochroms
R	hellrotes Licht
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen in der Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
SAM	Sprossapikalmeristem
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
T-DNA	Transfer- Desoxyribonukleinsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
ZT	Zeitgeber

Nomenklatur der Gene

<i>SPA</i>	Locus, Gen, wildtypisches Allel
<i>spa</i>	Mutiertes Allel eines Gens
SPA	Protein

Ausnahme: Photorezeptoren:

<i>PHY</i>	Locus, Gen, wildtypisches Allel
<i>phy</i>	Mutiertes Allel eines Gens
PHY	Apoprotein (ohne Chromophor)
phy	Holoprotein (mit Chromophor)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Pflanzliche Photorezeptoren und die Lichtsignaltransduktion	1
I.2 Die Rolle der <i>SPA</i> Genfamilie in der lichtgesteuerten Keimlingsentwicklung	7
I.3 Induktion der Blütenbildung	10
I.4 Ziele dieser Arbeit	13
II. Material und Methoden	14
II.1 Material	14
II.1.1 Chemikalien und Enzyme	14
II.1.2 DNA-Konstrukte	14
II.1.3 Oligonukleotide	14
II.1.4 Sonden	15
II.1.5 Pflanzenmaterial und molekulare Überprüfung der Genotypen	16
II.2 Allgemeine Methoden	18
II.2.1 Pflanzenanzucht	18
II.2.2 Bestimmung der Hypokotyllänge	18
II.2.3 Bestimmung des Blühzeitpunktes und der Blattgröße	19
II.2.4 Bestimmung des Anthocyangehaltes	19
II.3 Molekularbiologische Methoden	19
II.3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	19
II.3.2 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen	20
II.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
II.3.4 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen	20
II.3.5 RNA-Gelblotanalyse	21
II.3.6 DNase Behandlung von Gesamt-RNA und Reverse Transkription aller RNAs	21
II.3.7 RT-PCR-Analyse	22
II.4 Proteinbiochemische Methoden	23
II.4.1 Isolierung von Proteinen aus Arabidopsis-Keimlingen	23
II.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	23

II.4.3	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	23
II.4.4	Immunologischer Nachweis Membran-gebundener Proteine	23
II.4.5	Herstellung rekombinanter Proteine im TnT-System	24
II.4.6	In vitro Ko-immunpräzipitation	24
II.5	Histochemische und mikroskopische Methoden	25
II.5.1	In-situ Nachweis der β -Glucuronidase (GUS)	25
II.5.2	Mikroskopische Analyse von GUS-SPA2 transgenen Keimlingen	26
III.	Ergebnisse	27
III.1	Die Rolle der <i>SPA</i> Gene in der Keimlingsentwicklung	27
III.1.1	Eine Mutation im <i>SPA2</i> Gen hat keinen Effekt auf die Entwicklung des Keimlings	27
III.1.2	<i>spa1 spa2</i> Doppelmutanten zeigen konstitutive Photomorphogenese	27
III.1.3	Die konstitutive Photomorphogenese von <i>spa1 spa2</i> Mutanten wird durch den Verlust der Funktion von <i>SPA3</i> und/oder <i>SPA4</i> verstärkt	30
III.1.4	<i>spa</i> Tripelmutanten, die konstitutive Photomorphogenese aufweisen, zeigen konstitutive Expression lichtregulierter Gene	31
III.1.5	<i>SPA1</i> und <i>SPA2</i> sind ausreichend für die Unterdrückung der Photomorphogenese in Dunkelheit	32
III.2	<i>SPA</i> Gene spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung adulter Pflanzen	34
III.3	Die Rolle der <i>SPA</i> Gene in der Induktion der Blütenbildung	36
III.3.1	Mutationen im <i>SPA1</i> Gen führen zu einer verfrühten Blüte in kurzen Tagen	36
III.3.2	<i>spa1</i> Mutanten zeigen eine verfrühte Blüte unabhängig von <i>phyA</i>	37
III.3.3	<i>SPA1</i> ist ausreichend für die Hemmung der Blütenbildung in kurzen Tagen	39
III.3.4	Mutationen in <i>SPA</i> Genen führen zu einer Erhöhung der <i>FT</i> mRNA-Mengen	39
III.3.5	Die verfrühte Blütenbildung von <i>spa1</i> Mutanten ist abhängig von <i>CO</i>	42

III.3.6 SPA Proteine interagieren mit CO in vitro	43
III.3.7 Analyse der SPA Transkriptmengen in im Kurztag entwickelten Pflanzen	44
III.4 Funktionsanalyse der SPA Proteine	45
III.4.1 Licht erhöht die Abundanz des SPA1 Proteins	45
III.4.2 Das SPA2 Protein befindet sich konstitutiv im Zellkern	47
III.4.3 Das GUS-SPA2 Protein ist nur in Anwesenheit von intaktem COP1 aktiv	48
IV. Diskussion	50
IV.1 SPA Proteine hemmen die Photomorphogenese in Dunkelheit	50
IV.2 SPA Proteine wirken zusammen mit der Ubiquitinligase COP1	52
IV.3 Die Funktion der SPA Gene in der phyA-spezifischen Keimlingsentwicklung	54
IV.4 Die Funktion der SPA Proteine in der vegetativen Pflanzenentwicklung	56
IV.5 Die Rolle der SPA Proteine bei der Induktion der Blütenbildung	57
IV.6 Die Existenz von vier SPA Proteinen könnte Pflanzen eine optimale Anpassung an veränderte Umweltbedingungen ermöglichen	60
V. Zusammenfassung	63
VI. Zusammenfassung (in englischer Sprache)	64
VII. Anhang	65
VIII. Literatur	66

I. Einleitung

I.1 Pflanzliche Photorezeptoren und die Lichtsignaltransduktion

Als sessile Organismen können Pflanzen ihren Standort nicht wechseln, um auf veränderte Umwelteinflüsse zu reagieren. Daher haben Pflanzen ein kompliziertes sensorisches System entwickelt, um verschiedene Umwelteinflüsse wahrzunehmen. So können Pflanzen Wachstum und Entwicklung optimal an die entsprechenden Standortbedingungen anpassen. Neben der Temperatur ist das Sonnenlicht der wichtigste exogene Faktor, der die Entwicklung von Pflanzen beeinflusst. Dabei dient das Licht nicht nur als primäre Energiequelle. Pflanzen sind zudem in der Lage die Intensität, die Qualität, die Richtung und die Dauer (Photoperiode) des einfallenden Lichtes wahrzunehmen. Diese mit Hilfe von Photorezeptoren gesammelten Informationen dienen der optimalen Anpassung verschiedener Entwicklungsprozesse wie der Samenkeimung, der Keimlingsentwicklung (Deetiolierung), dem vegetativen Wachstum und der Induktion der Blütenbildung.

Pflanzen haben im Laufe der Evolution verschiedene Arten von Photorezeptoren entwickelt. In der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* konnten bisher vier verschiedene Arten von Photorezeptoren identifiziert werden (Briggs und Olney, 2001; Imaizumi et al., 2003). Hellrotes (R) und dunkelrotes (FR) Licht wird von Phytochromen (phy) absorbiert (Abbildung 1). Blaues Licht (B) kann von drei verschiedenen Arten von Photorezeptoren wahrgenommen werden: den Cryptochromen (cry), den Phototropinen (phot) und den zeitlupe (ztl)/flavin-binding, kelch repeat, f-box 1 (fkf1) / lov-kelch protein 2 (lkp2) Proteinen (Briggs und Olney, 2001; Abbildung 1). Auch Licht nicht sichtbarer Wellenlängen steuert die Entwicklung von Pflanzen (Fuglevand et al., 1996). UV-A-Strahlung wird von den Cryptochromen wahrgenommen (Briggs und Olney, 2001). Der Photorezeptor, der für die Absorption von UV-B-Strahlung verantwortlich ist, konnte noch nicht identifiziert werden.

ztl/fkf1/lkp2 spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der zirkadianen Uhr und des Blühzeitpunktes (Schultz et al., 2001; Imaizumi et al., 2003; Mas et al., 2003; Somers et al., 2004). phots fördern das Pflanzenwachstum und sind für den Phototropismus und die Chloroplastenbewegung verantwortlich (Liscum und Briggs, 1995; Takemiya et al., 2005). In *Arabidopsis* konnten drei verschiedene CRYs (*CRY1-CRY3*) identifiziert werden (Briggs und Huala, 1999; Kleine et al., 2003). cry1 spielt die wichtigste Rolle in der Blaulicht-abhängigen Deetiolierung, fördert aber auch die Blütenbildung und reguliert die vegetative Entwicklung (Ahmad und Cashmore, 1993; Ahmad et al., 1995; Lin et al., 1996; Mockler et al., 1999). cry2 reguliert vor allem die Induktion der Blütenbildung (Guo et al., 1998).

Zu den wichtigsten Reaktionen auf Licht, die von den phys kontrolliert werden, gehören die Samenkeimung, die Deetiolierung, die Schattenvermeidungsreaktion und die Kontrolle des Blühzeitpunktes (Sullivan und Deng, 2003). phys liegen in zwei ineinander überführbaren Formen, der Pr- und der Pfr-Form, vor. In Dunkelheit akkumulieren Keimlinge die inaktive Pr-Form, die durch Absorption von hellrotem Licht in die aktive Pfr-Form überführt wird. Durch Absorption von dunkelrotem Licht wird die Pfr-Form der phys wieder in die inaktive Pr-Form überführt (Rockwell et al., 2006). phys sind im Dunkeln im Cytosol lokalisiert und werden nach Lichtabsorption in den Zellkern transportiert (Kircher et al., 1999).

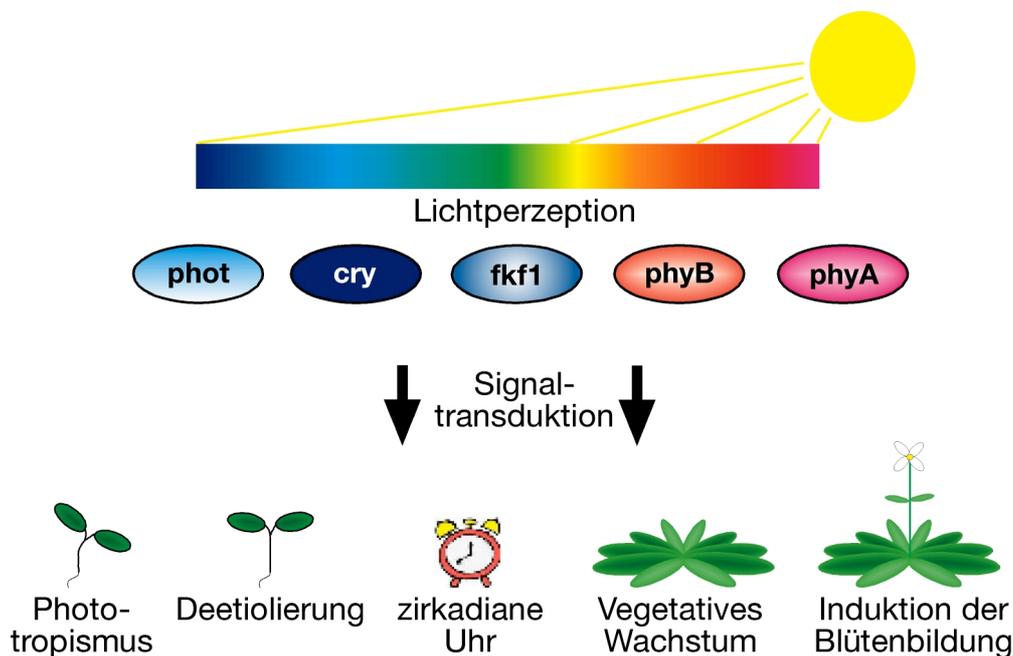


Abbildung 1: Licht beeinflusst pflanzliche Entwicklungsprozesse. Das Sonnenlicht aktiviert verschiedene Photorezeptoren. Blaues Licht wird von crys, phots und fkf1 wahrgenommen. Hellrotes und dunkelrotes Licht wird von den phys absorbiert. Die aktivierten Photorezeptoren setzen eine Signalkaskade in Gang, die verschiedene Entwicklungsprozesse steuert.

In Arabidopsis konnten fünf verschiedene *PHYs* (*PHYA-PHYE*) identifiziert werden, von denen phyA und phyB die wichtigsten Funktionen ausüben (Briggs und Olney, 2001). phyA vermittelt dabei die Reaktionen auf kontinuierliches dunkelrotes Licht und auf hellrotes und blaues Licht geringer Flussraten (Whitelam et al., 1993; Casal et al., 1997). phyB ist der wichtigste Rezeptor von hellrotem Licht (Reed et al., 1993). phyA und phyB unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stabilitäten und Funktionen: phyA ist ein lichtlabiler Photorezeptor, der die Deetiolierung reguliert und die Blütenbildung fördert (Somers et al., 1991; Schepens et al., 2004). phyB hingegen ist ein lichtstabiler Photorezeptor. phyB ist für die Keimlingsentwicklung in hellrotem Licht wichtig, reguliert zudem die Schattenvermeidungsantwort und hemmt, in Gegensatz zu phyA, die Blütenbildung (Somers et al., 1991; Schepens et al., 2004; Franklin und Whitelam, 2005).

Nachdem Photorezeptoren das Licht wahrgenommen haben, leiten sie das Lichtsignal weiter. Am Ende dieser Signalketten agieren Transkriptionsfaktoren, die an cis-regulatorische Elemente, so genannte LIGHT RESPONSIVE ELEMENTS (LRE), in den Promotoren lichtregulierter Gene binden (Martinez-Garcia et al., 2000). Dadurch wird die Expression des Gens entweder verstärkt oder vermindert. In Arabidopsis werden 10-30 % aller Gene in ihrer Expression durch Licht reguliert (Ma et al., 2001; Tepperman et al., 2001). Dementsprechend konnten verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die diese Prozesse steuern. Dabei können Transkriptionsfaktoren pleiotrop wirken oder eine spezifische Funktion in der Lichtsignaltransduktion ausüben. Transkriptionsfaktoren mit einem breiten Wirkungsspektrum sind LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) und LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1 (HFR1). HY5 spielt eine Rolle in der Keimlingsentwicklung im Dunkelrot-, Hellrot-, Blau- und UV-B-Licht und bindet direkt an LREs (Oyama et al., 1997; Chattopadhyay et al., 1998; Ulm et al., 2004). HFR1 erfüllt wichtige Aufgaben bei der Keimlingsentwicklung und der Schattenvermeidungsreaktion (Fairchild et al., 2000; Soh et al., 2000; Fankhauser und Chory, 2000; Duek et al., 2003; Sessa et al., 2005). Hingegen wirkt der MYB-Transkriptionsfaktor LONG AFTER FAR-RED (LAF1) speziell in der phyA-Signaltransduktion (Ballesteros et al., 2001). Einige Transkriptionsfaktoren können direkt mit phys interagieren (Quail, 2000). Diese PHYTOCHROME-INTERACTING PROTEINs (PIFs) und PIF-LIKE PROTEINs (PILs) regulieren verschiedene Entwicklungsprozesse wie die Samenkeimung, das Hypokotyllängenwachstum, die Chlorophyll- und Anthocyanakkumulation und die Chloroplastenentwicklung (Huq and Quail, 2002; Kim et al., 2003; Huq et al., 2004; Monte et al., 2004; Oh et al., 2004). PIF3 bindet mit großer Affinität speziell an die aktive Pfr-Form von phyB (Ni et al., 1999). Ein Lichtsignaltransduktionsweg besteht daher in der Möglichkeit, dass phys nach Lichtabsorption in den Zellkern transportiert werden, wo sie mit PIFs interagieren. Diese Interaktion führt dann zu einer Bindung des phy-PIF-Komplexes an cis-regulatorische Elemente in den Promotoren lichtregulierter Gene (Martinez-Garcia et al., 2000). Transkriptionsfaktoren wie HFR1 können nicht direkt mit den phys interagieren (Fairchild et al., 2000). Daher müssen Signalwege existieren, die unabhängig von der direkten Interaktion von Photorezeptoren mit Transkriptionsfaktoren wirken. In den letzten Jahren haben verschiedene Studien zeigen können, dass die Proteinstabilität verschiedener Signalintermediate durch Licht reguliert wird (Hoecker, 2005). Zum Beispiel sind HY5 und HFR1 im Licht stabil und werden in der Dunkelheit durch das Proteasom degradiert (Osterlund et al., 2000; Duek et al., 2004; Yang et al., 2005; Jang et al., 2005a). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass negativ wirkende Regulatoren die Stabilität von Signalintermediaten wie HY5 und HFR1 in Dunkelheit reduzieren.

Bei der Suche nach Mutanten, die eine veränderte Lichtantwort aufweisen, konnte eine Gruppe von Genen, *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS (COP)/DE-ETIOLATED (DET)/FUSCA (FUS)*, identifiziert werden, die für die Unterdrückung der Photomorphogenese im Dunkeln verantwortlich sind (Deng et al., 1991; Chory et al., 1989). Mutationen in diesen Genen führen zu konstitutiver Photomorphogenese. Das bedeutet, dass *cop/det/fus* Mutanten in Dunkelheit ein kurzes Hypokotyl und weit geöffnete Kotyledonen zeigen (Abbildung 2A). Ferner akkumulieren diese Keimlinge in Dunkelheit Anthocyane, differenzieren Etioplasten zu Chloroplasten und zeigen Deregulation lichtgesteuerter Gene (Chory et al., 1989; Deng et al., 1991). Der Phänotyp dieser Mutanten kann sich nur in Anwesenheit positiv wirkender Transkriptionsfaktoren wie HY5 oder HFR1 voll ausprägen (Ang und Deng, 1994; Pepper und Chory, 1997; Kim et al., 2002). Diese genetische Interaktion lässt darauf schließen, dass die Genprodukte der *COP/DET/FUS* Loci die Aktivität von HY5 und HFR1 im Dunkeln drosseln. Mit dieser Hypothese korreliert die Beobachtung, dass HY5 in *cop/det/fus* Mutanten auch in der Dunkelheit akkumulieren kann (Osterlund et al., 2000). Im Licht werden die negativ wirkenden Regulatoren der COP/DET/FUS Gruppe gehemmt und somit Transkriptionsfaktoren wie HY5 und HFR1 stabilisiert (Abbildung 2B). Es konnte gezeigt werden, dass *phys* und *crys* für die Stabilisierung von HY5 im Licht verantwortlich sind (Osterlund et al., 2000; Abbildung 2B).

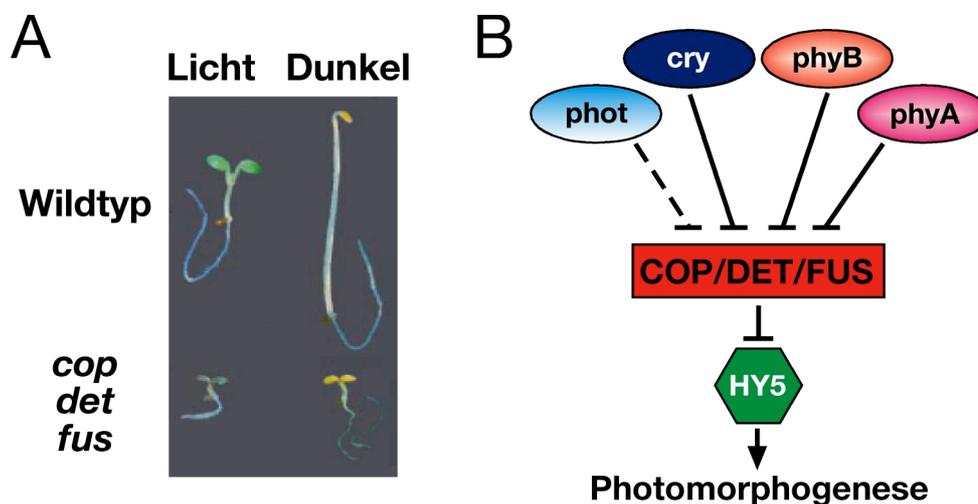


Abbildung 2: COP/DET/FUS Proteine hemmen die Photomorphogenese in der Dunkelheit. (A) Im Licht entwickelte wildtypische Keimlinge zeigen ein kurzes Hypokotyl und geöffnete Kotyledonen. In der Dunkelheit zeigen wildtypische Keimlinge ein langes Hypokotyl, einen Apikalhaken und geschlossene Kotyledonen. In der Dunkelheit entwickelte *cop/det/fus* Mutanten zeigen ein kurzes Hypokotyl und geöffnete Kotyledonen. (B) COP/DET/FUS Proteine hemmen die Akkumulation positiver Regulatoren der Lichtsignaltransduktion wie HY5 in der Dunkelheit. Im Licht hemmen verschiedene Photorezeptoren die Aktivität der COP/DET/FUS Proteine.

Das am besten charakterisierte Gen aus der Gruppe der *COP/DET/FUS* Loci ist *COP1*. *COP1* kodiert ein Protein mit drei charakteristischen Proteindomänen: Ein RING-Finger-Motiv,

eine Coiled-Coil-Domäne und eine WD-Repeat-Domäne (Deng et al., 1992). Das COP1 Protein ist kein pflanzenspezifisches Protein, sondern wurde in fast allen höheren Eukaryoten entdeckt (Wang et al., 1999). Alle Proteindomänen von COP1 können Wechselwirkungen mit anderen Proteinen herbeiführen. Das RING-Finger-Motiv gehört zu einer Subklasse von E3-Ubiquitinligasen. Ubiquitin ist ein kleines Peptid, das an Proteine geheftet werden kann. Ubiquitin wird aktiviert indem es über eine energiereiche Thioester-Bindung an ein E1-Protein, ein Ubiquitin-aktivierendes-Enzym, gekoppelt wird. Vom E1-Protein wird das Ubiquitin auf ein E2-Protein, ein Ubiquitin-konjugierendes-Enzym, übertragen, das mit der E3-Ubiquitinligase interagiert. E3-Ubiquitinligasen vermitteln eine spezifische Bindung mit dem Zielprotein, das ubiquitiniert werden soll. Ubiquitinierte Proteine werden vom Proteasom erkannt und abgebaut (Moon et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass COP1 E3-Ubiquitinligase-Aktivität besitzt (Saijo et al., 2003; Seo et al., 2003). COP1 interagiert mit den Transkriptionsfaktoren HY5, LAF1, und HFR1 und führt diese der Degradation zu (Osterlund et al., 2000; Holm et al., 2002; Duek et al., 2004; Yang et al., 2005a; Jang et al., 2005). Die Aktivität von COP1 wird im Licht stark unterdrückt. Dafür stehen mindestens zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung. COP1 wirkt in der Dunkelheit im Zellkern (von Arnim und Deng, 1994; Abbildung 3A). Im Licht wird COP1 aus dem Zellkern in das Cytosol transportiert (von Arnim und Deng, 1994; Subramanian et al., 2004; Abbildung 3C). Dieser Prozess beginnt ca. 12 Stunden nach der Lichteinstrahlung und ist nach ca. 36 Stunden abgeschlossen (von Arnim et al., 1997). Ein anderer, schnellerer Mechanismus der Inaktivierung von COP1 besteht in der direkten Interaktion mit den Photorezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass phyA, phyB, cry1 und cry2 direkt mit COP1 interagieren können (Yang et al., 2001; Wang et al., 2001; Seo et al., 2004; Abbildung 3B). cry1 und cry2 interagieren im Licht und in der Dunkelheit mit COP1 (Wang et al., 2001). Licht induziert bei crys eine Homodimerbildung (Sang et al., 2005). Transgene Keimlinge, die die COP1-bindenden Regionen von cry1 und cry2 als konstitutives Dimer stark exprimieren, zeigen konstitutive Photomorphogenese (Yang et al., 2000). Daher scheinen die Photorezeptoren cry1 und cry2 im Licht als Homodimere die Aktivität von COP1 durch eine direkte Wechselwirkung zu hemmen.

Die Funktion von COP1 wird durch Licht jedoch nicht vollständig gehemmt. Auch im Licht befinden sich noch geringe Mengen von COP1 im Zellkern, die dort wichtige Aufgaben erfüllen (von Arnim und Deng, 1994). Eine zu starke Akkumulation der Signalintermediate wie HY5 oder HFR1 wird so verhindert. Es konnte auch gezeigt werden, dass COP1 für die Degradation der lichtlabilen Photorezeptoren cry2 und phyA essentiell ist (Shalitin et al., 2002; Seo et al., 2004). COP1 scheint dadurch die Lichtsignaltransduktion zu desensibilisieren und so Pflanzen vor einer Überstimulierung durch Licht zu schützen.

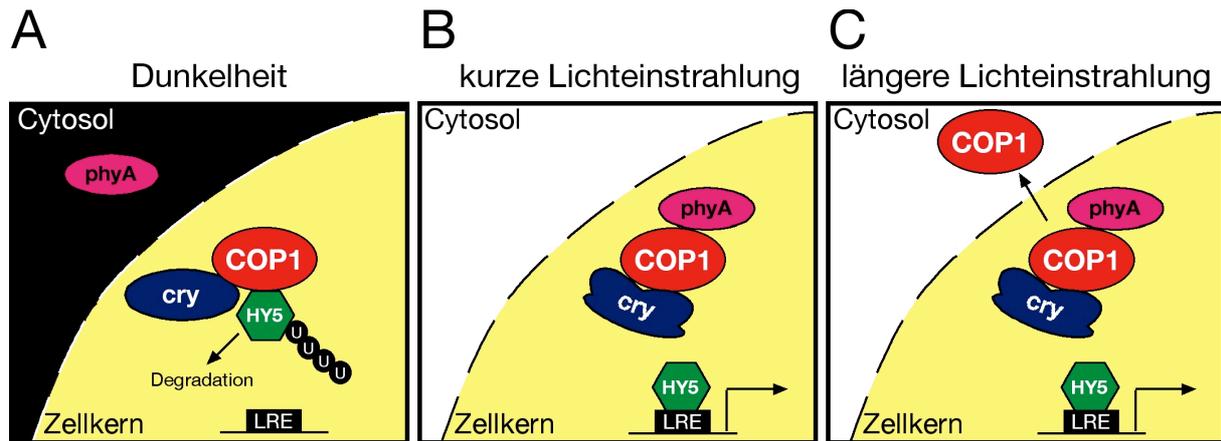


Abbildung 3: Mechanismus der COP1-Inaktivierung im Licht. (A) In der Dunkelheit wirkt COP1 im Zellkern und ubiquitiniert positive Faktoren der Lichtsignaltransduktion wie HY5. (B) Nach kurzer Lichtbestrahlung werden phyA in den Zellkern transportiert, wo phyA direkt mit COP1 interagieren und so die Aktivität von COP1 hemmen könnte. cry1 und cry2 interagieren im Dunkeln und im Licht mit COP1. crys unterlaufen nach Lichtabsorption eine Konformationsänderung (und Dimerisierung), wodurch COP1 gehemmt zu werden scheint (Sang et al., 2005). Das durch die Inaktivierung von COP1 stabilisierte HY5 kann dann an LREs in den Promotoren lichtregulierter Gene binden. (C) Nach längerer Lichteinwirkung (12-36 h) wird COP1 aus dem Zellkern in das Cytosol transportiert. Trotz der verschiedenen Inaktivierungsmechanismen, die durch Licht ausgelöst werden, verbleiben geringe Mengen von COP1 im Zellkern und erfüllen dort wichtige Aufgaben im Licht.

COP1 wirkt nicht alleine, sondern ist Bestandteil hochmolekularer Komplexe (Saijo et al., 2003). Die genaue Zusammensetzung dieser Komplexe ist unbekannt. Einige Interaktionspartner von COP1 gehören der Gruppe der COP/DET/FUS Proteine an, die für die Unterdrückung der Photomorphogenese in der Dunkelheit verantwortlich sind. COP10 bindet an die RING-Finger-Domäne von COP1 (Suzuki et al., 2002). Bei COP10 handelt es sich um ein Protein, das die Aktivität von Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzymen verstärkt (Yanagawa et al., 2004). COP10 selber bildet mit DET1 und UV-DAMAGED DNA-BINDING PROTEIN 1A (DDB1) einen kleineren Proteinkomplex (CDD-Komplex; Abbildung 4; Yanagawa et al., 2004). Einige Proteine aus der COP/DET/FUS Gruppe, die für die Degradation von HY5 notwendig sind, bilden einen weiteren Komplex, das so genannte COP9-Signalsom (CSN; Abbildung 4). In Hefen, Invertebraten und Vertebraten konnten homologe Komplexe identifiziert werden (Wei und Deng, 1998; von Arnim, 2003). Das CSN ist für die Aktivität von E3-Ubiquitinligasen des SKIP/CULLIN/F-BOX (SCF)-Typs essentiell und scheint mit dem Proteasom zu interagieren (Kwok et al., 1999; Serino und Deng, 2003; Peng et al., 2003). Dem CSN scheint dabei eine wichtige Funktion beim Abbau von ubiquitinierten Proteinen zuzukommen (von Arnim, 2003). Das CSN reguliert nicht nur die Photomorphogenese, sondern ist auch ein wichtiger Regulator von Hormonantworten, der Blütenarchitektur und der Pathogenabwehr (Liu et al., 2002; Wang et al., 2003; Feng et al., 2003; Schwechheimer et al., 2001). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle drei Komplexe, der COP1-

Komplex, der CDD-Komplex und das CSN, den proteolytischen Abbau von Proteinen regulieren. Die Wirkung der Lichtsignaltransduktion konzentriert sich dabei auf die Inaktivierung von COP1.

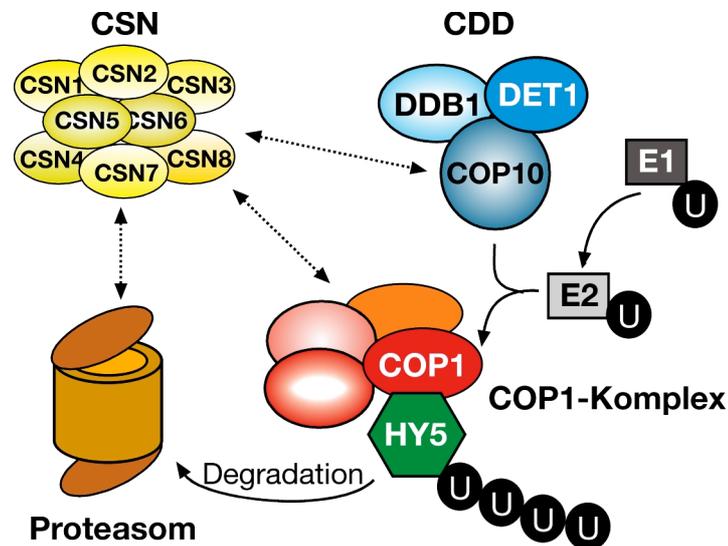


Abbildung 4: Vier Sub-Komplexe, das Proteasom, der CDD-Komplex, das CSN, und der COP1-Komplex, regulieren den proteolytischen Abbau von Proteinen. Der CDD-Komplex verstärkt die Aktivität von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2). Die genaue Zusammensetzung des COP1-Komplexes ist noch nicht bekannt. COP1 ist die E3-Ubiquitinligase, die die Ubiquitinierung von HY5 vermittelt. Die korrekte Ubiquitinierung erfordert die Aktivität des CSN. Ubiquitinierte Proteine werden vom Proteasom abgebaut. Die jeweiligen Subkomplexe können mit verschiedenen Untereinheiten der anderen Komplexe interagieren.

I.2 Die Rolle der SPA Genfamilie in der lichtgesteuerten Keimlingsentwicklung

Die Lichtsignaltransduktion kann von verschiedenen Modulatoren beeinflusst werden. Diese Modulatoren können positiv oder negativ agieren und dabei auf verschiedenen Ebenen der Signalkette wirken. Zum Beispiel wird der Kernimport von phyA im Licht durch den positiven Modulator FAR-RED ELONGATED HYPOKOTYL 1 (FHY1) gefördert (Hiltbrunner et al., 2005). Ein wichtiger negativer Regulator der phyA-Signaltransduktion ist *SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A-105 (SPA1)*. *SPA1* wurde bei der Suche nach Suppressoren einer schwachen *phyA* Mutante identifiziert (Hoecker et al., 1998). *spa1* Mutanten zeigen eine verstärkte Reaktion auf dunkelrotes, hellrotes und blaues Licht (Hoecker et al., 1998; Fittinghoff et al., 2006). *spa1* Mutanten zeigen ein verkürztes Hypokotyl und akkumulieren erhöhte Mengen Anthocyan im Licht (Hoecker et al., 1998; Abbildung 5A). In Dunkelheit sind *spa1* Mutanten jedoch nicht vom Wildtypen zu unterscheiden (Abbildung 5A). Das legte die Vermutung nahe, dass *SPA1*, im Gegensatz zu COP1, die Photomorphogenese nur im Licht unterdrückt. Der Phänotyp der *spa1* Mutante kann sich nur in Anwesenheit von intaktem phyA ausprägen (Hoecker et al., 1998; Fittinghoff et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass

der negative Regulator SPA1 durch phyA aktiviert wird, oder SPA1 einen negativen Einfluss speziell auf die phyA-Signaltransduktion ausübt. Die SPA1 Transkriptmengen werden durch Licht erhöht, jedoch ist dieser Effekt nicht ausschließlich von phyA abhängig (Hoecker et al., 1999; Fittinghoff et al., 2006). SPA1 kodiert ein Protein mit drei verschiedenen Strukturdomänen. Die carboxyterminale Region weist eine WD-Repeat-Domäne und eine Coiled-Coil-Domäne auf, die Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln können (Hoecker et al., 1999, Abbildung 5B). Der Aminoterminus zeigt eine geringe Ähnlichkeit mit einer Kinase-Domäne (Hoecker et al., 1999; Abbildung 5B). Ferner zeigt das SPA1 Protein ein ATP-bindendes Motiv und eine Kernlokalisationssequenz (Nuclear Localisation Sequence, NLS) (Hoecker et al., 1999). SPA1 ist sowohl im Licht als auch in der Dunkelheit im Zellkern lokalisiert (Hoecker et al., 1999). Die WD-Repeat-Domäne von SPA1 zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit mit der WD-Repeat-Domäne von COP1 (Hoecker et al., 1999). Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass SPA1 direkt mit COP1 interagieren kann (Hoecker und Quail, 2001; Saijo et al., 2003). Die Interaktion wird über die jeweiligen Coiled-Coil-Domänen von COP1 und SPA1 vermittelt (Hoecker und Quail, 2001; Saijo et al., 2003, Abbildung 5B). Die biologische Relevanz dieser Interaktion wurde durch die Beobachtung verstärkt, dass eine *spa1* Mutation den Effekt einer schwachen *cop1* Mutation verstärken kann (Saijo et al., 2003).

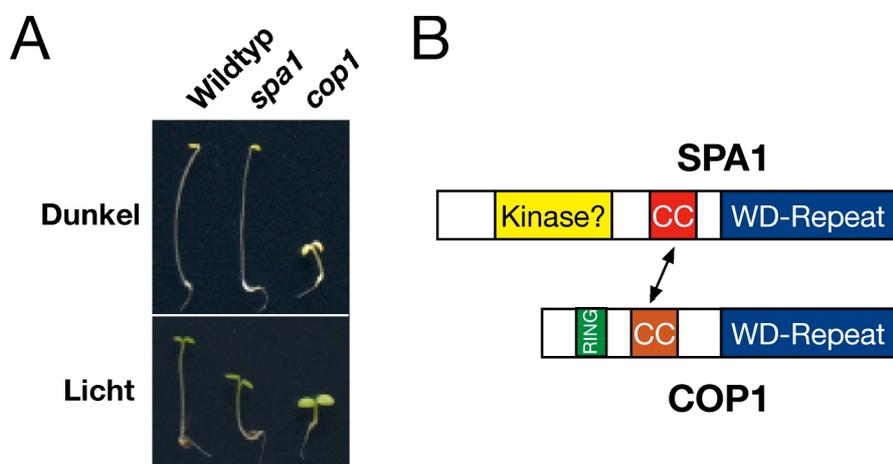


Abbildung 5: SPA1 ist ein negativer Regulator der Lichtsignaltransduktion. (A) *spa1* Mutanten zeigen im Vergleich mit Wildtypen ein verkürztes Hypokotyl im Licht. Im Gegensatz zu *cop1* Mutanten sind *spa1* Mutanten, die sich im Dunkeln entwickeln, nicht vom Wildtypen zu unterscheiden. Demnach scheint SPA1 ein negativer Regulator zu sein, der nur im Licht wirkt und nicht, wie COP1, im Dunkeln. **(B)** Das SPA1 Protein weist eine WD-Repeat-Domäne, eine Coiled-Coil-Domäne (CC) und eine Kinase-ähnliche-Domäne auf. Die WD-Repeat-Domäne zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit mit der WD-Repeat-Domäne von COP1. Die Coiled-Coil-Domäne von SPA1 vermittelt die Interaktion mit COP1.

Die Funktion von SPA1 könnte darin bestehen, die Aktivität von COP1 im Licht zu erhöhen. Diese Hypothese geht einher mit der Beobachtung, dass die Transkriptionsfaktoren

HY5 und HFR1 in *spa1* Mutanten im Licht stärker abundant sind (Saijo et al., 2003; Yang et al., 2005b). Wie SPA1 die Aktivität von COP1 erhöht ist noch nicht geklärt. SPA1 kann wie COP1 mit HY5 und HFR1 interagieren (Saijo et al., 2003; Yang et al., 2005b). Ferner beeinflusst SPA1 die E3-Ubiquitinligaseaktivität von COP1 in vitro (Seo et al., 2003; Saijo et al., 2003). Damit könnten SPA1 zwei Funktionen zukommen: Zum einen vermittelt SPA1 die Substraterkennung und/oder beeinflusst die E3-Ubiquitinligaseaktivität von COP1.

SPA1 ist Teil einer kleinen Genfamilie (*SPA1-SPA4*) (Laubinger und Hoecker, 2003; Abbildung 6A). Alle SPA1 Proteine weisen eine WD-Repeat-Domäne, ein Coiled-Coil-Domäne und eine Kinase-ähnliche-Domäne auf (Abbildung 6A). Die größte Sequenzähnlichkeit aller vier SPA Proteine besteht im Bereich der WD-Repeat-Domänen (57-68% identische Aminosäuren; Laubinger und Hoecker, 2003). SPA2 zeigt die größte Ähnlichkeit mit SPA1. Beide Gene liegen auf Abschnitten des Genoms, die im Laufe der Evolution durch eine Duplikation entstanden sind (Simillion et al., 2002). Dies gilt auch für *SPA3* und *SPA4*, die auf Proteinebene eine Übereinstimmung in 74% aller Aminosäuren aufweisen (Laubinger und Hoecker, 2003). Analysen von *spa3* und *spa4* Mutanten haben ergeben, dass sie, wie *spa1* Mutanten, eine verstärkte Reaktion auf dunkelrotes, hellrotes und blaues Licht zeigen (Laubinger und Hoecker, 2003). In Dunkelheit sind *spa3* und *spa4* Mutanten hingegen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Der Phänotyp von *spa4* Mutanten prägt sich nur in Gegenwart von intaktem *phyA* aus, während der Phänotyp von *spa3* Mutanten auch von anderen *phys* abzuhängen scheint (Laubinger und Hoecker, 2003). Da SPA3 und SPA4 eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, wurde vermutet, dass beide Proteine redundante Funktionen ausüben. In der Tat reagiert die *spa3 spa4* Doppelmutante hypersensitiver auf Licht als die jeweiligen Einzelmutanten. Je nach Lichtqualität interagieren die Mutationen additiv oder synergistisch (Laubinger und Hoecker, 2003). Wie SPA1 interagieren auch SPA3 und SPA4 mit COP1 (Laubinger und Hoecker, 2003). Demnach scheinen SPA3 und SPA4 ähnliche Funktionen wie SPA1 auszuüben: SPA3 und SPA4 hemmen die Photomorphogenese im Licht und interagieren mit dem zentralen negativen Regulator COP1 (Abbildung 6B). Eine Funktion von SPA2 konnte noch nicht ermittelt werden.

Es besteht jedoch Grund zur Annahme, dass alle SPA Proteine eine ähnliche Funktion ausüben: Alle SPA Proteine interagieren mit COP1 und SPA1, SPA3 und SPA4 unterdrücken die Photomorphogenese im Licht (Laubinger und Hoecker, 2003; Laubinger, 2002). Demnach könnten alle SPA Proteine redundante Funktionen ausüben. Deshalb würde man die Funktion der SPA Proteine erst dann verstehen, wenn man Mutanten untersucht, die kein funktionelles SPA Gen enthalten.

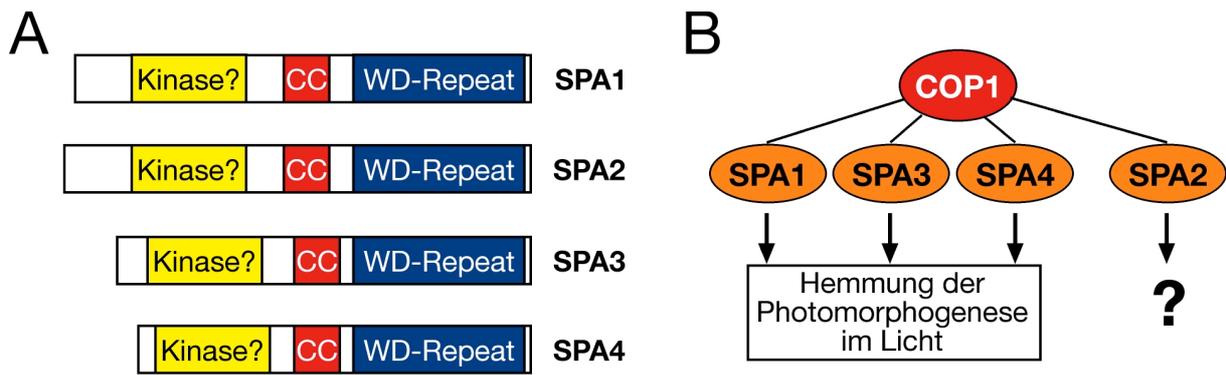


Abbildung 6: SPA1 ist Teil einer kleinen Proteinfamilie. (A) Alle vier Mitglieder der SPA Proteinfamilie weisen eine WD-Repeat-Domäne, eine Coiled-Coil-Domäne und eine Kinase-ähnliche-Region auf. **(B)** Alle SPA Proteine können direkt mit COP1 interagieren. Ähnlich wie SPA1 hemmen SPA3 und SPA4 die Photomorphogenese im Licht. Die Funktion von SPA2 ist unbekannt.

I.3 Induktion der Blütenbildung

Eine der wichtigsten Phasen im Lebenszyklus einer Pflanze ist der Übergang vom vegetativen zum generativen Wachstum. In Arabidopsis wird das vegetative Sprossmeristem (Sprossapikalmeristem, SAM), aus dessen Stammzellen bisher Blätter hervorgingen, irreversibel in das Infloreszenzmeristem und später in Blütenmeristeme umgewandelt. Wichtige Faktoren dieser Umwandlung sind *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) und *LEAFY* (*LFY*) (Weigel et al., 1992; Wigge et al., 2005; Abe et al., 2005). *FT* kodiert ein kleines Protein, das Ähnlichkeiten mit einem RAF-kinase Inhibitor aufweist, und mit dem bZIP-Transkriptionsfaktor *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) interagiert (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Wigge et al., 2005; Abe et al., 2005). Der FT-FD Komplex und LFY, ein pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktor, regulieren den Übergang des Sprossapikalmeristems zum Infloreszenzmeristem und Blütenmeristem (Weigel et al., 1992; Busch et al., 1999; Ruiz-Garcia et al., 1997; Wigge et al., 2005; Abe et al., 2005; Abbildung 7). *FT* fördert unter anderem die Expression von *SUPPRESSOR OF CO OVEREXPRESSION 1* (*SOC1*) (Samach et al., 2000). *SOC1* wiederum fördert die Expression von *LFY* (Moon et al., 2005). *LFY* und der FT-FD Komplex initiieren die Expression von *APETALA1* (*AP1*) (Wagner et al., 1999; William et al., 2004; Wigge et al., 2005; Abe et al., 2005; Yoo et al., 2005; Abbildung 7). Eine der Funktionen von *AP1* ist die Bildung von Blütenmeristemen (Mandel et al., 1992).

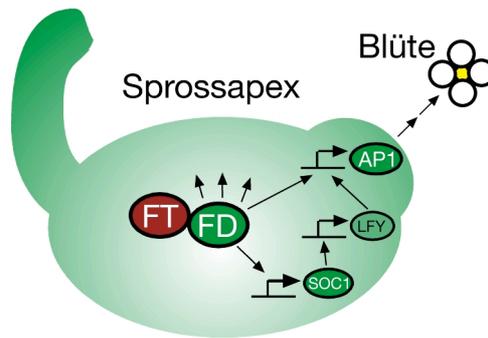


Abbildung 7: FT ist ein wichtiger Regulator der Blütenbildung. Lange Tage induzieren die Expression von *FT*. Die *FT* mRNA wandert über das Phloem in den Sprossapex. Dort interagiert das FT Protein mit FD. Der FT-FD-Komplex induziert die Expression verschiedener Gene wie *SOC1* und *AP1*. *AP1* ist dann für die Bildung der Blütenmeristeme und damit für die Entwicklung der Blüten verantwortlich (Abbildung modifiziert nach Abe et al., 2005).

Die Blütenbildung wird durch verschiedene endogene und exogene Faktoren gesteuert. Zu den wichtigsten endogenen Faktoren gehört das Pflanzenalter (Simpson, 2004). Damit die Blütenbildung nicht in zu frühen Stadien der Entwicklung eingeleitet wird, wird sie durch den Repressor FLOWERING LOCUS C (*FLC*) unterdrückt (Simpson, 2004). *FLC* ist ein MADS-Box-Transkriptionsfaktor, der unter anderem an die regulatorischen Sequenzen von *SOC1* bindet und so dessen Transkription unterdrückt (Michaels und Amasino, 1999; Hepworth et al., 2002).

Der wichtigste exogene Faktor, der die Blütenbildung induziert, ist die Veränderung der Tageslänge (Photoperiode). Viele Pflanzen unserer Breiten blühen wenn die Tageslänge einen kritischen Wert übersteigt. Im Gegensatz zu diesen Langtagpflanzen (LTP) blühen Kurztagpflanzen (KTP) wenn die Tageslänge unterhalb eines kritischen Wertes liegt. Die Modellpflanze *Arabidopsis* ist eine fakultative Langtagpflanze. Das bedeutet, dass lange Tage die Blütenbildung in *Arabidopsis* beschleunigen, aber Pflanzen auch in kurzen Tagen zur Blüte gelangen. Ein wichtiger Regulator der photoperiodischen Blütenbildung ist *CONSTANS* (*CO*). *CO* kodiert einen Transkriptionsfaktor mit zwei Zink-Finger Domänen und einer CCT-Domäne (CCT: CO, CO-like, TOC1) (Putterill et al., 1995). *CO* aktiviert die Transkription von *FT* und damit indirekt die Expression von *SOC1*, *LEAFY* und *AP1* (Simon et al., 1996; Kardailsky et al., 1999; Samach et al., 2000; Wigge et al., 2005;). *co* Mutanten blühen spät in langen Tagen (Putterill et al., 1995). In kurzen Tagen blühen *co* Mutanten zum gleichen Zeitpunkt wie wildtypische Pflanzen (Putterill et al., 1995). Daraus lässt sich ableiten, dass *CO* die Induktion der Blütenbildung speziell in langen Tagen fördert. Die mRNA-Pegel von *CO* werden von der zirkadianen Uhr reguliert (Suarez-Lopez et al., 2001). In den ersten acht Stunden des Tages (Zeitgeber 0-8) sind die *CO* mRNA-Gehalte sehr niedrig (Suarez-Lopez et al., 2001; Abbildung 8). Die höchsten *CO* mRNA-Pegel werden am späten Nachmittag (Zeitgeber 12-16) erreicht (Suarez-Lopez et al., 2001; Abbildung 8). Somit gibt es in kurzen

Tagen (Licht von Zeitgeber 0 bis 8) keine Überschneidung zwischen starker *CO* mRNA-Abundanz und Lichteinwirkung. In langen Tagen (Licht von Zeitgeber 0 bis 16) koinzidieren hohe *CO* mRNA-Abundanz und Lichteinfall (Abbildung 8). Licht kann die Aktivität von *CO* beeinflussen indem es das Protein stabilisiert (Valverde et al., 2004). In Dunkelheit wird *CO* ubiquitiniert und über den Proteasomweg abgebaut (Valverde et al., 2004). Dementsprechend kann *CO* in kurzen Tagen nicht akkumulieren, da die stärkste *CO* mRNA-Abundanz in die Dunkelphase fällt. In langen Tagen hingegen wird *CO* am späten Nachmittag durch Licht stabilisiert.

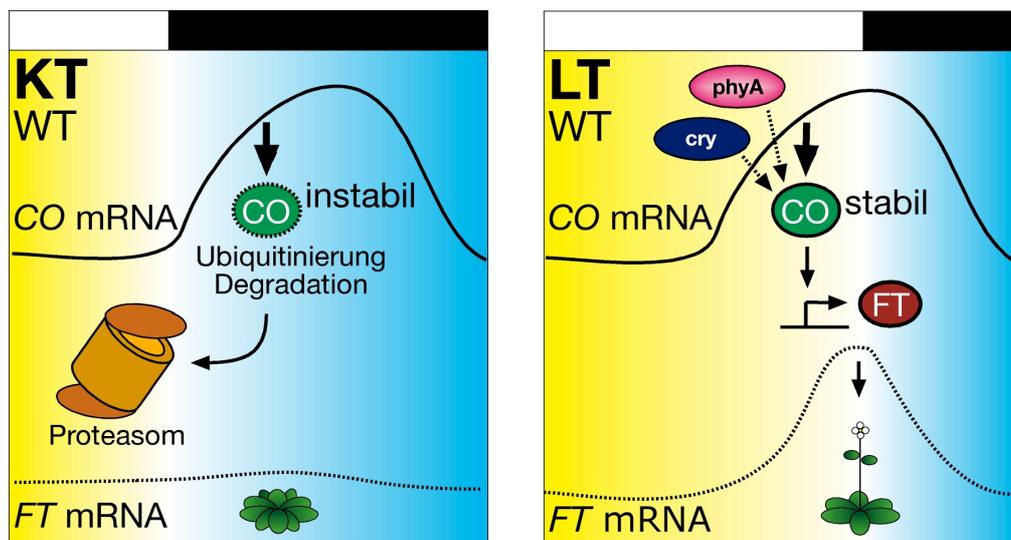


Abbildung 8: CO induziert die Blütenbildung in langen Tagen. Die zirkadiane Uhr reguliert die Expression von *CO* in kurzen Tagen (KT) und langen Tagen (LT). Die höchsten *CO* mRNA Pegel werden am späten Nachmittag erreicht. In kurzen Tagen herrscht zu diesem Zeitpunkt Dunkelheit. Das gebildete *CO* Protein ist instabil und wird Proteasom-abhängig abgebaut. In langen Tagen koinzidieren hohe *CO* mRNA Pegel und Licht. Das gebildete *CO* Protein wird durch Licht stabilisiert. Dabei spielen die Photorezeptoren *cry1*, *cry2* und *phyA* eine wichtige Rolle. Das stabilisierte *CO* aktiviert die Expression von *FT*, das die Blütenbildung auslöst.

Die Photorezeptoren *phyA*, *phyB*, *cry1* und *cry2* regulieren die Stabilität des *CO* Proteins im Licht. *phyB* hat einen negativen Einfluss auf die Stabilität von *CO*, hingegen wirken *phyA*, *cry1* und *cry2* positiv auf die Stabilität von *CO* (Valverde et al., 2004). Diese Beobachtungen korrelieren mit den Phänotypen der entsprechenden Photorezeptormutanten. *phyB* Mutanten kommen in kurzen Tag früh zur Blüte (Reed et al., 1994). *phyA* Mutanten zeigen eine verspätete Blütenbildung in langen Tagen, deren Lichtphase reich an dunkelrotem Licht ist (Mockler et al., 2003). Ebenso zeigen *cry2* Mutanten und *cry1 cry2* Doppelmutanten eine verspätete Blütenbildung in langen Tagen (Gou et al., 1998; Mockler et al., 1999; Mockler et al., 2003). Wie *phyA*, *cry1* und *cry2* die Stabilität von *CO* erhöhen, ist noch nicht aufgeklärt. Jedoch zeigen *cop1* und *det1* Mutanten eine verfrühte Blüteninduktion speziell in kurzen Tagen (McNellis et al., 1994; Pepper und Chory, 1997). Ferner konnte

gezeigt werden, dass COP1 mit CO-LIKE 3 (COL3), einem CO-ähnlichem Protein, wechselwirkt (Datta et al., 2005). Diese Indizien sprechen für eine Beteiligung der E3-Ubiquitinligase COP1 bei der dunkelabhängigen Degradation von CO in kurzen Tagen. Demnach könnte die CO-stabilisierende Funktion der Photorezeptoren phyA, cry1 und cry2 in langen Tagen auf einer Hemmung von COP1 beruhen. Jedoch werden erst zukünftige Untersuchungen genauen Aufschluss über den Mechanismus der dunkelabhängigen Degradation von CO geben. Auch der negative Regulator SPA1 interagiert mit dem CO-ähnlichem Protein COL1 (Kulajta, 2002). Die biologische Bedeutung dieser Interaktion ist ebenso unbekannt wie die Frage, ob SPA1 eine Rolle in der Induktion der Blütenbildung spielt.

I.4 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Funktionen der *SPA* Gene ermittelt werden. Den Genen *SPA1*, *SPA3* und *SPA4* konnte durch vorherige Analysen bereits eine Funktion als negative Regulatoren der Lichtsignaltransduktion zugeordnet werden (Hoecker et al., 1998; Laubinger und Hoecker, 2003). Die Funktionen von *SPA2* sind jedoch unbekannt. Um die Funktionen von *SPA2* zu ermitteln, sollen zunächst *spa2* Mutanten auf einen veränderten Phänotyp hin untersucht werden. Vorherige Analysen haben ergeben, dass die Gene *SPA3* und *SPA4* eine redundante Funktion ausüben. Da alle SPA Proteine eine große Sequenzähnlichkeit im Bereich der WD-Repeat-Domäne und die gleichen Proteindomänen aufweisen, besteht die Möglichkeit, dass alle *SPA* Gene redundante Funktionen ausüben. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher eine *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante erstellt und analysiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ermittelt werden, ob *SPA* Gene eine Rolle in der Induktion der Blütenbildung spielen. Grundlagen dieser Untersuchung sind die Beobachtungen, dass einige Intermediate der Lichtsignaltransduktion, wie die Photorezeptoren oder COP1, einen Einfluss auf den Zeitpunkt der Blütenbildung haben. Ferner interagieren SPA1 und COP1 mit CONSTANS-ähnlichen Proteinen (Kulajta, 2002; Datta et al., 2005). Zudem soll untersucht werden, ob SPA Proteine und COP1 auch direkt mit CONSTANS interagieren können.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollen ansatzweise verschiedene Wirkmechanismen der SPA Proteine untersucht werden. Dazu gehören unter anderem die Analyse der SPA Proteinabundanz und die subzelluläre Lokalisation der SPA Proteine *in vivo*.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), Clontech (Palo Alto, USA), Colgate-Palmolive (Hamburg), Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Janssen (Beerse, Belgien), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Chemikalien hatten in der Regel p.a.-Qualität. Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnologie, Roche und Sigma-Adrich bezogen. [³⁵S]-Methionin und α -[³²P]-dATP wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) bezogen.

II.1.2 DNA-Konstrukte

Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte und deren Verwendungszweck ist in Tabelle 2.1 aufgeführt. Der Vektor pet15b wird von der Firma Novagen, der pDEST-17 Vektor wird von der Firma Clontech vertrieben.

Tabelle 2.1: Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA Konstrukte.

DNA-Konstrukt	Insertion	Verwendungszweck	Referenz
GADHA-pet15b	<i>T7_{Pro}::GAD</i>	<i>In vitro</i> Proteinsynthese	Hoecker und Quail, 2001
GAD-SPA1-pet15b	<i>T7_{Pro}::GAD-SPA1</i>	<i>In vitro</i> Proteinsynthese	Hoecker und Quail, 2001
GAD-SPA2-pet15b	<i>T7_{Pro}::GAD-SPA2</i>	<i>In vitro</i> Proteinsynthese	Laubinger et al., 2004
GAD-SPA3-pet15b	<i>T7_{Pro}::GAD-SPA3</i>	<i>In vitro</i> Proteinsynthese	Laubinger und Hoecker, 2003
GAD-SPA4-pet15b	<i>T7_{Pro}::GAD-SPA4</i>	<i>In vitro</i> Proteinsynthese	Laubinger und Hoecker, 2003
CO-pDEST-17	<i>T7_{Pro}::His₆-CO</i>	<i>In vitro</i> Proteinsynthese	G. Coupland, MPIZ Köln

II.1.3 Oligonukleotide

Eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und deren Verwendungszweck ist in Tabelle 2.2 aufgeführt. Oligonukleotidsynthesen wurden bei der Firma Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) in Auftrag gegeben.

Tabelle 2.2: Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (in 5`-3` Richtung)	Verwendungszweck
RT-SPA1-F	TGGTCATGAGAAAGCGGTGA	RT-PCR
RT-SPA1-R	CCTCCAACAGACGCTCGAC	RT-PCR
RT-SPA2-F	GCAGTTAGCTATGCGAAGTTC	RT-PCR
RT-SPA2-R	GCAAACGCTTGAAACGAACAGG	RT-PCR
RT-SPA3-F	GAGAAAGGAGTCTACAATAAGTTG	RT-PCR
RT-SPA3-R	CTCATTGATGGTCGACAAGTTGGCTCA	RT-PCR
RT-SPA4-F	TGAAGAAGATAATGGTTCTCTGTG	RT-PCR
RT-SPA4-R	CTCATCGATGGTCGACAGCTA	RT-PCR
RT-UBQ10-F	GATCTTTGCCGAAAAACAATTGGAGGATGGT	RT-PCR
RT-UBQ10-R	CGACTTGTCAATTAGAAAAGAAAGAGATAACAGG	RT-PCR
RT-CO-F	ACGCCATCAGCGAGTTCC	RT-PCR
RT-CO-R	AAATGTATGCGTTATGGTTAATGG	RT-PCR
RT-FT-F	ACAACCTGGAACAACCTTTGGCAATG	RT-PCR
RT-FT-R	ACTATATAGGCATCATCACCGTTCGTTACTCG	RT-PCR
RT-SOC1-F	ATGGTGAGGGGCAAACTCAGATGAA	RT-PCR
RT-SOC1-R	TTCATGAGATCCCACTTTTCAGAGA	RT-PCR
RT-FLC-F	ATGGGAAGAAAAAACTAGAAATCAA	RT-PCR
RT-FLC-R	CTAATTAAGTAGTGGGAGAGTCAC	RT-PCR
LB-SALK-T-DNA	AACCAGCGTGGACCGCTTGCTG	Genotypisierung
LB-Sail-T-DNA	TAGCATCTGAATTTATAACCA	Genotypisierung
LB-GABI-T-DNA	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	Genotypisierung
Geno-spa1-7-F	CCAGTGCCTTGTTTGTACCAAC	Genotypisierung
Geno-spa1-7-R	GGTCCCCACTTCTTATTGTCCC	Genotypisierung
Geno-spa1-3-WT-F	TCCAGACAGTTGCGAGCTTC	Genotypisierung
Geno-spa1-3-MUT-F	TCCAGACAGTTGCGAGCTTT	Genotypisierung
Geno-spa1-3-R	GGGTATTCGTCCATACCTCAAACAG	Genotypisierung
Geno-spa2-1-F	GCAGTTAGCTATGCGAAGTTC	Genotypisierung
Geno-spa2-1-R	GCAAACGCTTGAAACGAACAGG	Genotypisierung
Geno-spa3-1-F	TTCGGACTTGGCTCTGATTCCTTG	Genotypisierung
Geno-spa3-1-R	GTCCTCATTGATGGTCGACAAGTT	Genotypisierung
Geno-spa4-1-F	GTAACCTTTGAAGGCGTGGTTCAAG	Genotypisierung
Geno-spa4-1-R	CATCTCCAAAATCTTGATATTGCCGG	Genotypisierung

II.1.4 Sonden

Die DNA-Sonden zur Detektion der Transkripte von *FEDA*, *CAB3*, *RBCL*, *RBSC* und *18S-rRNA* wurden zusammenfassend in Deng et al. (1991) beschrieben und von Ute Höcker zur Verfügung gestellt. Alle Sonden zur Detektion der RT-PCR-Produkte wurden durch PCR-Amplifikation hergestellt. Als Matrize für die PCR-Amplifikation wurden revers-transkribierte RNAs (siehe II.3.6) eingesetzt. Die entsprechenden Sonden, deren Herstellung sowie der amplifizierte Bereich der jeweiligen cDNA sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden und deren Herstellung.

Sonde	Hergestellt durch PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden	Amplifizierter Bereich der cDNA (ATG=1)
<i>CO</i>	RT-CO-F und RT-CO-R	Basenpaare 295 – 572
<i>FT</i>	RT-FT-F und RT-FT-R	Basenpaare 276 – 649
<i>SOC1</i>	RT-SOC1-F und RT-SOC1-R	Basenpaare 1 – 525
<i>FLC</i>	RT-FLC-F und RT-FLC-R	Basenpaare 1 – 700
<i>UBQ10</i>	RT-UBQ10-F und RT-UBQ10-R	Basenpaare 1041 – 1523
<i>SPA1</i>	RT-SPA1-F und RT-SPA1-R	Basenpaare 2673 – 3024
<i>SPA2</i>	RT-SPA2-F und RT-SPA2-R	Basenpaare 2650 – 2982
<i>SPA3</i>	RT-SPA3-F und RT-SPA3-R	Basenpaare 520 – 865
<i>SPA4</i>	RT-SPA4-F und RT-SPA4-R	Basenpaare 552 – 779

II.1.5 Pflanzenmaterial und molekulare Überprüfung der Genotypen

Tabelle 2.4 enthält eine Auflistung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials. Genotypisierungen von T-DNA Mutanten wurden durch PCR mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die *spa1-7* T-DNA-Linie stammt aus der SALK T-DNA-Kollektion (Linie SALK_023840; Alonso et al., 2003). Die T-DNA-Insertion in den *spa1-7* Mutanten wurde durch eine PCR mit dem gen-spezifischen Oligonukleotid Geno-*spa1-7-F* und dem T-DNA-spezifischen Oligonukleotid LB-SALK-T-DNA verifiziert. Die *spa2-1* T-DNA-Linie stammt aus der GABI-KAT T-DNA-Kollektion (Linie 195F12; Rosso et al., 2003). Die T-DNA-Insertion in den *spa2-1* Mutanten wurde durch eine PCR mit dem gen-spezifischen Oligonukleotid Geno-*spa2-1-F* und dem T-DNA-spezifischen Oligonukleotid LB-GABI-T-DNA verifiziert. Die *spa3-1* und *spa4-1* T-DNA-Linien wurden in Laubinger und Hoecker (2003) beschrieben. Die T-DNA-Insertion in den *spa3-1* Mutanten wurde durch eine PCR mit dem gen-spezifischen Oligonukleotid Geno-*spa3-1-F* und dem T-DNA-spezifischen Oligonukleotid LB-SAIL-T-DNA verifiziert. Die T-DNA-Insertion in den *spa4-1* Mutanten wurde durch eine PCR mit dem gen-spezifischen Oligonukleotid Geno-*spa4-1-R* und dem T-DNA-spezifischen Oligonukleotid LB-SAIL-T-DNA verifiziert. Die jeweiligen wildtypischen *SPA* Gene wurden durch PCR mit zwei gen-spezifischen Oligonukleotiden verifiziert (siehe Tabelle 2.2). Alle T-DNA Mutanten wurden in der Columbia (Col) Akzession erzeugt. In den *spa1-3* Mutanten führt ein Basenpaaraustausch zu einem verfrühten Stopcodon (Hoecker et al., 1999). Die *spa1-3* Mutation kann von einem wildtypischen *SPA1* Allel durch eine PCR mit allel-spezifischen Primern unterschieden werden. Das wildtypische *SPA1* Gen konnte in PCRs nur durch die Oligonukleotide Geno-*spa1-3-WT-F* und Geno-*spa1-3-R* amplifiziert werden. Das *spa1-3* Allel konnte hingegen nur durch die Oligonukleotide Geno-*spa1-3-MUT-F* und Geno-*spa1-3-R* amplifiziert werden. Alle PCRs wurden wie unter

II.3.3 beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass bei PCRs mit den Oligonukleotiden Geno-*spa1-3-MUT-F* und Geno-*spa1-3-R* beziehungsweise Geno-*spa1-3-WT-F* und Geno-*spa1-3-R* die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide auf 62°C erhöht wurde.

Tabelle 2.4: Auflistung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials.

Genotyp	Akzession	Mutationen wurden mit folgendem Mutagen erzeugt:	Referenzen
Wildtyp	RLD		
<i>spa1-2</i>	RLD	EMS	Hoecker et al., 1998
<i>spa1-3</i>	RLD	EMS	Hoecker et al., 1998
<i>phyA</i>	RLD	EMS	Dehesh et al., 1993
<i>spa1-2 phyA</i>	RLD	EMS	Hoecker et al., 1998
Wildtyp	Col		
<i>spa1-7</i>	Col	T-DNA (SALK-Kollektion)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa2-1</i>	Col	T-DNA (GABI-Kollektion)	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa3-1</i>	Col	T-DNA (SAIL-Kollektion)	Laubinger und Hoecker, 2003
<i>spa4-1</i>	Col	T-DNA (SAIL-Kollektion)	Laubinger und Hoecker, 2003
<i>spa1-3 spa2-1</i>	Col/RLD	EMS/ T-DNA	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa3-1 spa4-1</i>	Col	T-DNA	Laubinger und Hoecker, 2003
<i>spa2-1 spa3-1 spa4-1</i>	Col/RLD	T-DNA	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa1-3 spa3-1 spa4-1</i>	Col/RLD	EMS/ T-DNA	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa1-3 spa2-1 spa4-1</i>	Col/RLD	EMS/ T-DNA	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa1-3 spa2-1 spa3-1</i>	Col/RLD	EMS/ T-DNA	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa1-3 spa2-1 spa3-1 spa4-1</i>	Col/RLD	EMS/ T-DNA	im Rahmen dieser Arbeit erstellt
<i>spa1-7 spa3-1 spa4-1</i>	Col	T-DNA	U. Hoecker, Universität Düsseldorf
<i>spa2-1 spa3 spa4</i>	Col	T-DNA	U. Hoecker, Universität Düsseldorf
<i>co-sail</i>	Col	T-DNA (SAIL-Kollektion)	G. Coupland, MPIZ Köln
<i>spa1-7 co-sail</i>	Col	T-DNA	U. Hoecker, Universität Düsseldorf
<i>35S::GUS-SPA2</i>	Col		U. Hoecker, Universität Düsseldorf
<i>spa1-3 SPA1::SPA1-HA</i>	RLD		U. Hoecker, Universität Düsseldorf
<i>cop1-4</i>	Col	EMS	McNellis et al., 1994

spa1 spa2 Doppelmutanten wurden durch Kreuzung von *spa1-3* und *spa2-1* Mutanten erzeugt. Die entstandene F2-Generation wurde in dunkelrotem Licht geringer Flussrate untersucht. Die kürzesten Keimlinge wurden auf Komposterde überführt. *spa1-3 spa2-1* Doppelmutanten wurden mittels PCR-basierender Genotypisierung verifiziert. *spa1 spa2 spa3*, *spa1 spa2 spa4*, *spa1 spa3 spa4*, *spa2 spa3 spa4* und *spa1 spa2 spa3 spa4* Mehrfachmutanten wurden durch Kreuzung von *spa1-3 spa2-1* und *spa3-1 spa4-1* Doppelmutanten (Laubinger und Hoecker, 2003) erzeugt. Die entstandene F2-Generation wurde in Dunkelheit oder hellrotem Licht geringer Flussrate untersucht. Die kürzesten Keimlinge wurden auf Komposterde überführt. Die entsprechenden Mutanten konnten durch PCR-basierende Genotypisierungen ermittelt werden.

II.2 Allgemeine Methoden

II.2.1 Pflanzenanzucht

Zur Ausbringung von Saatgut auf Komposterde wurde das Saatgut in Wasser mit 0,1 % (w/v) Agarose überführt und anschließend für zwei bis vier Tage bei 4°C stratifiziert. Das Saatgut wurde dann mit Hilfe einer Pasteurpipette auf Komposterde (Floraton II, Floragrad, Oldenburg) ausgebracht. Zur Vermehrung des Saatguts wurden die Pflanzen in Gewächshäusern angezogen. Zur Bestimmung des Blühzeitpunktes und der Größe adulter Pflanzen wurden die Pflanzen bei einer konstanten Temperatur von 21°C angezogen. Licht wurde durch Fluoreszenzlampen (TLD 58W/840, Philipps; $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) erzeugt. Die Photoperiode betrug 8 Stunden Licht und 16 Stunden Dunkelheit (für kurze Tage) oder 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit (für lange Tage). Für Experimente in verlängerten kurzen Tagen wurden die Pflanzen 8 Stunden weißem Licht (Fluoreszenzlampen F72T12/CW/VHO, CLF Laborgeräte GmbH; $200 - 225 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 8 Stunden Glühbirnenlicht (60W, Osram; $2 - 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 8 Stunden Dunkelheit ausgesetzt.

Zur Bestimmung der Hypokotyllänge und des Anthocyangehalt wurde das Saatgut mit 10 % (v/v) Klorix (Colgate) und 0,05 % (v/v) Tween-20 für 10 Minuten oberflächensterilisiert und viermal mit sterilem H₂O gewaschen. Zur Bestimmung der Hypokotyllänge wurden 15 bis 20 Samen unter sterilen Bedingungen auf agar-haltigem MS Medium (4,4 g/l MS-Salze (Serva), pH 5,7 und 1 % (w/v) Agar-Agar) ausgebracht. Zur Bestimmung des Anthocyangehaltes wurden 50 Samen unter sterilen Bedingungen auf agar-haltigem MS-Medium mit 2 % (w/v) Saccharose ausgebracht. Zur Synchronisation der Keimung wurden die Platten für zwei bis vier Tage bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Keimung durch eine dreistündige Behandlung mit weißem Licht ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Leuchtstoffröhren Fluora L58W/77, Osram, Berlin) induziert. Das Saatgut wurde weitere 21 Stunden in Dunkelheit bei 21°C belassen und dann in Dunkelheit, hellrotes, dunkelrotes, oder blaues Licht für drei Tage überführt. Diese spezifischen Lichtbedingungen wurden durch LED Lichtquellen (Quantum Devices, Barneveld, USA) erzeugt.

II.2.2 Bestimmung der Hypokotyllänge

Zur Bestimmung der Hypokotyllänge wurden die Keimlinge auf das Agar-haltige Medium gedrückt und anschließend mit einer digitalen Kamera (Camedia E-10, Olympus, Hamburg) fotografiert. Die Hypokotyllänge wurde mit Hilfe der Software NIH Image (Bethesda, USA)

quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software).

II.2.3 Bestimmung des Blühzeitpunktes und der Blattgröße

Der Blühzeitpunkt unter Lang- und Kurztagbedingungen wurde ermittelt, indem die Anzahl der echten Blätter am Tag der ersten sichtbaren Infloreszenz bestimmt wurde. Es wurden zwischen 10 und 15 Pflanzen pro Genotyp analysiert. Die Größe der Pflanzen wurde ermittelt, indem die Länge des längsten Blattes nach 22 Tagen in Langtagbedingungen gemessen wurde. Es wurden zwischen 10 und 15 Pflanzen pro Genotyp analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software).

II.2.4 Bestimmung des Anthocyangehaltes

Die Keimlinge wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 800 µl Anthocyanextraktionspuffer (18 % (v/v) Isopropanol und 1% (v/v) konz. HCl) versetzt. Die Proben wurden für drei Minuten bei 100°C und anschließend mindestens 18 Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile der Proben wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge entfernt. Der Anthocyangehalt wurde spektral-photometrisch über die Differenz der Absorption bei 535 nm und der Absorption bei 650 nm ($A_{535} - A_{650}$) bestimmt.

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Nukleinsäurefällungen, gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Färbungen von Nukleinsäuren wurden nach Protokollen durchgeführt, die in Sambrook und Russell, (2001) beschrieben sind. Aufreinigungen von Nukleinsäuren wurden mit dem Qiagen Gel Extraktion Kit oder dem Qiagen PCR Purifikation Kit (Qiagen) durchgeführt. Plasmid-DNA in größeren Maßstäben wurde mit Hilfe der JetSorb-Säulen (Genomed, Bad Oeyenhausen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

II.3.2 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde genomische DNA aus ganzen Keimlingen oder Blättern adulter Pflanzen isoliert. Das Pflanzenmaterial wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Pistill gemörsert und anschließend mit 400 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris/HCl pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA und 0,5 % (w/v) SDS) versetzt und gut gemischt. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurden die Proben 3 Minuten in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 300 µl des Homogenats wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit 300 µl Isopropanol gefällt. Die Lösung wurde 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde 5 Minuten getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

II.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine Standard-PCR fand in einem Reaktionsvolumen von 25 µl oder 50 µl statt. Es wurden die jeweiligen Oligonukleotide (0,2 µM), die dNTPs (0,2 mM), und 1 x Reaktionspuffer (1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0,1 % (w/v) BSA; und 20 mM Tris/HCl, pH 8,3) zugegeben. Als DNA-Matrize wurde 1 µl genomische DNA aus Pflanzen oder 1 µl DNA aus Reverse-Transkriptase-Reaktionen eingesetzt. Für eine Standard-PCR wurde 1 µl Taq-DNA-Polymerase (Udo Gowik, Universität Düsseldorf) eingesetzt. Für RT-PCR-Analysen (siehe Kapitel II.3.7) wurde rekombinante Taq-DNA-Polymerase (MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für PCRs mit genomischer DNA aus Pflanzen wurde auch der cDNA Polymerase-Mix (Clontech) eingesetzt. Der cDNA Polymerase-Mix wurde nach Angaben des Herstellers verwendet, mit der Ausnahme, dass 0,5 µl der Polymerase zu einer Standard-PCR gegeben wurden. Ein Standard-PCR-Zyklus beinhaltete eine Denaturierung bei 94 °C für 10 Sekunden, einen Anlagerungsschritt bei 55 °C für 30 Sekunden und einen Amplifikationsschritt bei 72 °C für 30 Sekunden pro 1000 zu amplifizierende Basenpaare.

II.3.4 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Gesamt-RNA wurde aus Keimlingen und adulten Pflanzen mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA spektral-photometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der Intaktheit wurde die RNA über ein 1,2 %-iges Agarose Gel aufgetrennt und analysiert.

II.3.5 RNA-Gelblotanalyse

5 µg Gesamt-RNA wurde mit Glyoxal (Ambion) nach Angaben des Herstellers denaturiert und auf einem 1,2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die RNAs wurden mit Hilfe des Turboblotter (Schleicher und Schüll) auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) übertragen. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC (3 M NaCl und 0,3 M Na-Citrat) verwendet. Die RNAs wurden Mittels eines UV-Crosslinkers (Amersham, 300 J m⁻²) kovalent an die Nylonmembran gebunden.

Zur Hybridisierung wurden die Membranen mindestens eine Stunde im Hybridisierungspuffer (250 mM Na₂HPO₄; 7% (w/v) SDS; 1% (w/v) BSA und 2,5 mM EDTA; pH 7,2) bei 65 °C inkubiert und anschließend mit α-[³²P]-dATP-markierten Sonden für 18 bis 24 Stunden hybridisiert. Radioaktiv-markierte Sonden wurden mit Hilfe des Mega Prime Labelling Kits (Amersham) nach Angaben des Herstellers hergestellt.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen einmal in 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS, einmal in 0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und einmal 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS gewaschen und anschließend getrocknet. Die Membranen wurden auf Phosphorimagerplatten (Typ BAS-MS, Fuji Film) für 3 bis 24 Stunden exponiert und anschließend mit einem Bio-Imager (BAS Image Reader 1800, Fuji) analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Image Gauge 3.0 dargestellt und quantifiziert.

II.3.6 DNase Behandlung von Gesamt-RNA und Reverse Transkription aller RNAs

0,5 bis 1,0 µg Gesamt-RNA wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl DNase (RNase-frei) und 1 µl 10 x DNase Puffer (MBI-Fermentas) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dem Ansatz wurde 1 µl EDTA (25 mM) hinzugegeben, um die RNAs vor einer hydrolytischen Spaltung während der Hitzeinaktivierung der DNasen zu schützen. Die DNasen wurde 10 Minuten bei 65°C inaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei 4°C oder -20°C gelagert.

9 µl der mit DNase verdauten RNA wurde für die reverse Transkription zusammen mit Oligo-dT-Nukleotiden (25 pmol) in einem Volumen von 11 µl bei 70 °C für fünf Minuten denaturiert. Der Ansatz wurde danach auf Eis abgekühlt um eine Renaturierung der RNAs zu verhindern. Der Ansatz wurde mit dNTPs (1mM pro dNTPs), RevertAID™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase Reaktionspuffer (1x, MBI-Fermentas) und 200 Units RevertAID™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für fünf Minuten bei 37 °C und weitere 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch eine zehninminütige

Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C oder –20 °C aufbewahrt.

II.3.7 RT-PCR-Analyse

Für RT-PCR-Analysen wurden die Reverse-Transkriptionsansätze zunächst eins zu fünf mit H₂O verdünnt. Als Matrize für eine Standard PCR-Reaktion wurden 5 µl dieser verdünnten Reverse-Transkriptionsansätze verwendet. Für alle RT-PCR-Analysen wurden eine Standard-PCR-Reaktionen (siehe II.3.3) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Als DNA-Polymerase wurde die rekombinante Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas) und der mitgelieferte (NH₂)₄SO₄-haltige Reaktionspuffer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Zur Minimierung von Ungenauigkeiten, die durch das Pipittieren entstehen, wurde eine PCR-Reaktion dreimal unabhängig angesetzt. Nach der PCR wurden die drei unabhängigen PCR-Reaktionen zu einem Reaktionsansatz vereint. 10 µl der PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 1,2 %-igen Agarosegel aufgetrennt und durch einen alkalischen Transfer mit Hilfe des Turboblotter (Schleicher und Schüll) auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) übertragen. Für den alkalischen Transfer wurde das Agarosegel zweimal für jeweils 30 Minuten im Denaturierungspuffer (3 M NaCl und 0,4 M NaOH) inkubiert und anschließend für 15 Minuten im Transferpuffer (3 M NaCl und 8 mM NaOH) gewaschen. Nach einstündigem Transfer wurde die Nylonmembran für 5 Minuten im Neutralisationspuffer (0,2 M NaPO₄-Puffer, pH 6,8) inkubiert. Mittels eines UV-Crosslinkers (Amersham) wurden die PCR-Produkte kovalent an die Nylonmembran gebunden.

Die Detektion der PCR-Produkte mit radioativ-markierten Sonden, die Visualisierung und Auswertung der Signale erfolgte wie unter Punkt II.3.5 beschrieben. Um eine quantitative Aussage über die Expression eines Genes zu machen ist es für RT-PCR-Analysen von großer Bedeutung, die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase der Amplifikation zu beenden. Daher wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene zunächst die Zyklenanzahl bestimmt, in der sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase der Amplifikation befindet. Dafür wurde der PCR-Reaktion nach jeweils 5 Zyklen (bis 35 Zyklen) ein 5 µl Aliquot entnommen. Alle Aliquots wurden anschließend wie oben beschrieben behandelt und analysiert. Die Signalstärke der Aliquots wurde anschließend halblogarithmisch gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Auf diese Art konnte die Anzahl an PCR-Zyklen bestimmt werden, in denen sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase der Amplifikation befand. Für die analysierten Gene wurde folgende PCR-Zyklenzahl bestimmt. Für *UBQ10* wurden 17 PCR Zyklen, für *SOC1*, *FLC*, *SPA1*, und

SPA2 wurden 20 PCR-Zyklen, für *SPA3* wurden 22 PCR-Zyklen, für *SPA4* wurden 24 PCR-Zyklen, für *CO* 25 PCR-Zyklen und für *FT* 28 PCR-Zyklen verwendet.

II.4 Proteinbiochemische Methoden

II.4.1 Isolierung von Proteinen aus Arabidopsis-Keimlingen

300 mg Keimlinge wurde in Gegenwart von flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in ein gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM NaF; 25 mM β-Glycerolphosphat; 2 mM Na₃VO₄; 10 % (v/v) Glycerin; 1 mM DTT; 1 mM PMSF und 1 x Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) versetzt. Das Homogenat wurde in einer Hettich-Zentrifuge mit 13000 rpm bei 4°C für 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt mit dem Bio-Rad Protein-Assay (BIO-RAD, München) bestimmt.

II.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

25 µg des isolierten Gesamtproteins wurde mit 5 x Laemmli-Puffer (10 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerol; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau; 500 mM DTT; 310 mM Tris, pH 6,8) versetzt und für 10 Minuten bei 80°C inkubiert. Die Proteinproben wurden dann in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das Trenngel enthielt dabei eine Acrylamidkonzentration von 7,5 % (w/v). Die Elektrophorese wurde bei konstanten 20 mA durchgeführt.

II.4.3 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel für 10 Minuten im Protein-Transferpuffer (96 mM Glycin, 10 mM Tris und 10 % (v/v) Methanol) inkubiert. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Trockenblotapparatur (CTI, Taunusstein) für 90 Minuten bei 0,45 mA cm⁻² auf Nitrocellulosemembranen (0,45 µM, Schleicher und Schüll, Dassel) transferiert.

II.4.4 Immunologischer Nachweis Membran-gebundener Proteine

Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit 1 x Roti-Block (Roth) für 16 Stunden bei 4°C abgesättigt.

Anschließend wurden die Membranen in 1 x PBS-B (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄ und 5 % (w/v) Magermilchpulver) mit den entsprechenden Antikörpern für 60 bis 120 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anti-HA Antikörper (Rat Anti-HA High Affinity Monoclonal Antibody, Peroxidase Conjugated, Clone 3F10, Roche, Best.-Nr.: 2013819) wurden in einer Verdünnung von 1:1000, Anti- α -Tubulin Antikörper (Sigma, Best.-Nr. T6199) wurden in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Anschließend wurde die Membranen dreimal für je 10 bis 15 Minuten mit 1 x PBS-T (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄ und 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Membranen, die mit Anti- α -Tubulin Antikörpern behandelt worden waren, wurden für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Anti-Mouse IgG-Peroxidase Antikörpern (Sigma; Verdünnungsfaktor 1:50000) in PBS-B behandelt und anschließend dreimal mit 1 x PBS-T gewaschen. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden das ECL plus Western Blot Detection Kit (Amersham) und Röntgenfilme (Kodak) eingesetzt.

II.4.5 Herstellung rekombinanter Proteine im TnT-System

Rekombinante Proteine wurden mit dem TnT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) hergestellt. cDNAs, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, können in diesem Retikulozytenlysat zunächst transkribiert und die entstanden mRNAs anschließend translatiert werden. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die radioaktive Markierung von Proteinen wurde die Reaktion in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde 60 Minuten bei 30°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

II.4.6 In vitro Ko-immunpräzipitation

Die im TnT-System produzierten rekombinanten Proteine wurden für die in vitro Ko-immunpräzipitationen eingesetzt (Abbildung 2.1). 10 μ l eines GAL4-Aktivierungsdomäne (GAD)-Fusionsproteins (Köderprotein) und 10 μ l des Beuteproteins wurden in 200 μ l des Bindepuffers (20 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,1 % (v/v) Tween-20; und 1 x Proteaseinhibitorcocktail Complete EDTA-free, Roche) gegeben. Als negative Kontrolle wurde das GAD Protein alleine als Köder mit dem Beuteprotein zusammengegeben (Abbildung 2.1). Der Versuchsansatz wurde 3 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l Anti-GAD Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) hinzugefügt und eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Dann wurden 10 μ l magnetische Kügelchen, auf deren Oberfläche Protein A kovalent gebunden ist (Dynal beads, Dynal), hinzugegeben und weitere

45 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die magnetischen Kügelchen durch einen Magneten immobilisiert und der Überstand abgenommen (Abbildung 2.1). Die Kügelchen wurden dreimal mit dem Bindepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die magnetischen Kügelchen in 30 µl 1 x Laemmlipuffer resuspendiert und 10 Minuten bei 80°C inkubiert. Der 1 x Laemmlipuffer wurde anschließend abgenommen und als Pelletfraktion aufbewahrt.

Überstände und Pelletfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele im Geltrockner (Gel Dryer Model 583, Vakuumpumpe Pro Hydrotech, Biorad) getrocknet. Die Proteingele wurden auf Phosphorimagerplatttern (Typ BAS-MS, Fuji Film) 24 Stunden exponiert und anschließend mit einem Bio-Imager (BAS Image Reader 1800) analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Image Gauge 3.0 dargestellt und quantifiziert.

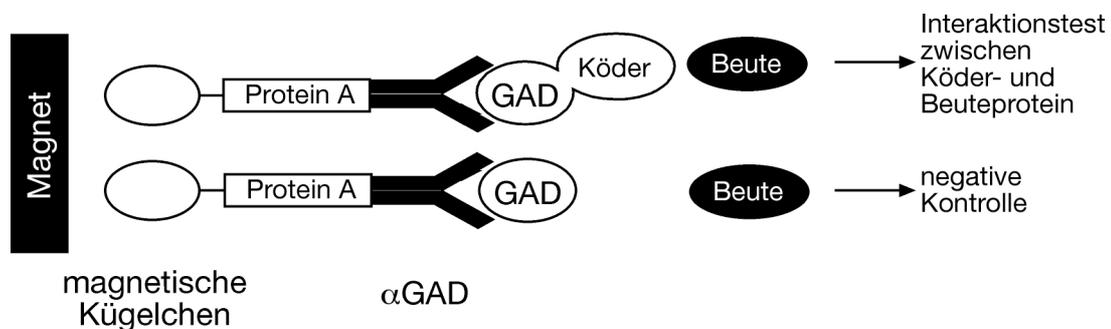


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der durchgeführten Ko-immunpräzipitation.

II.5 Histochemische und mikroskopische Methoden

II.5.1 In-situ Nachweis der β-Glucuronidase (GUS)

Transgene Keimlinge, die das GUS-SPA2-Transgen trugen, wurden wie unter II.2.1 beschrieben angezogen. Die Keimlinge wurden in eine Vorfixierungslösung (100 mM NaPO₄ pH 7,0; 2 % (v/v) Formaldehyd und 1 mM EDTA) überführt, für 10 Sekunden einem Vakuum ausgesetzt und anschließend gründlich mit 100 mM NaPO₄-Puffer pH 7,0, gewaschen. Die Keimlinge wurden dann in die GUS-Färbelösung (100 mM NaPO₄ pH 7,0; 0,1% (v/v) Triton X-100; 5 mM K₄Fe(CN)₆; 5mM K₃Fe(CN)₆; 1 mM EDTA und 1 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-glucuronid) überführt, für 10 Sekunden einem Vakuum ausgesetzt und anschließend für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Keimlinge wurden 20 Minuten in 100 mM NaPO₄, pH 7,0

mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd fixiert, mehrfach in 100 mM NaPO₄-Puffer, pH 7,0 gewaschen und bis zur mikroskopischen Analyse in 100 mM NaPO₄-Puffer, pH 7,0 aufbewahrt.

II.5.2 Mikroskopische Analyse von GUS-SPA2 transgenen Keimlingen

Zur Visualisierung des Zellkerns wurden die Keimlinge nach der GUS-Färbung in 100 mM NaPO₄-Puffer, pH 7,0 mit 0,001 % (w/v) DAPI überführt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Keimlinge wurden anschließend licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Axiophot, Zeiss, Jena; Fluorezenzfilterset 01, 488001-0000, Zeiss). Fotos wurden mit der Olympus DP50-CO Kamara (Olympus Optical, Tokio, Japan) angefertigt.

III. Ergebnisse

III.1 Die Rolle der *SPA* Gene in der Keimlingsentwicklung

III.1.1 Eine Mutation im *SPA2* Gen hat keinen Effekt auf die Entwicklung des Keimlings

Die Funktionen von *SPA1*, *SPA3* und *SPA4* konnten durch Analyse von Mutanten ermittelt werden. *spa1*, *spa3* und *spa4* Mutanten zeigen im Keimlingsstadium eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dunkelrotem, hellrotem und blauem Licht (Hoecker et al., 1998; Laubinger und Hoecker, 2003; Fittinghoff et al., 2006). Um den Einfluss von *SPA2* in der lichtgesteuerten Entwicklung von Arabidopsis zu untersuchen, wurde aus einer T-DNA-Kollektion eine *spa2* Mutante zur Verfügung gestellt. Die Mutation beruht auf einer T-DNA-Insertion im letzten Intron, 4008 Basenpaare nach dem Startcodon (Abbildung 3.1 A). Um zu testen, ob in *spa2-1* Mutanten wildtypische *SPA2* mRNA akkumuliert, wurde RNA aus *spa2-1* Mutanten und Wildtypen isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine PCR verwendet. Die Oligonukleotide flankierten die Position der T-DNA-Insertion. Im Gegensatz zum Wildtypen konnte in *spa2-1* Mutanten nicht das entsprechende DNA-Fragment amplifiziert werden (Abbildung 3.1 A). Demnach enthielt die *spa2-1* Mutante keine wildtypische *SPA2* mRNA. Um die Auswirkungen der *spa2-1* Mutation zu untersuchen, wurden die Hypokotyllängen von *spa2-1* Mutanten und Wildtypen unter verschiedenen Lichtqualitäten (dunkelrotes Licht, hellrotes Licht und blaues Licht) und Flussraten bestimmt. Unter allen Lichtbedingungen zeigten die *spa2-1* Mutanten keine signifikante Veränderung der Hypokotyllänge im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.1 B-D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *spa2-1* Mutanten keine wildtypische *SPA2* mRNA akkumulieren, dies jedoch keinen Einfluss auf die lichtgesteuerte Entwicklung der Keimlinge hat.

III.1.2 *spa1 spa2* Doppelmutanten zeigen konstitutive Photomorphogenese

spa2-1 Mutanten zeigten keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass *SPA* Gene eine redundante Funktion ausüben. Daher könnte der Verlust der Funktion von *SPA2* durch die Aktivitäten der Gene *SPA1*, *SPA3* und *SPA4* ausgeglichen werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden *spa* Mehrfachmutanten hergestellt. Die Sequenz von *SPA2* ist der von *SPA1* am ähnlichsten. Ferner entstanden beide

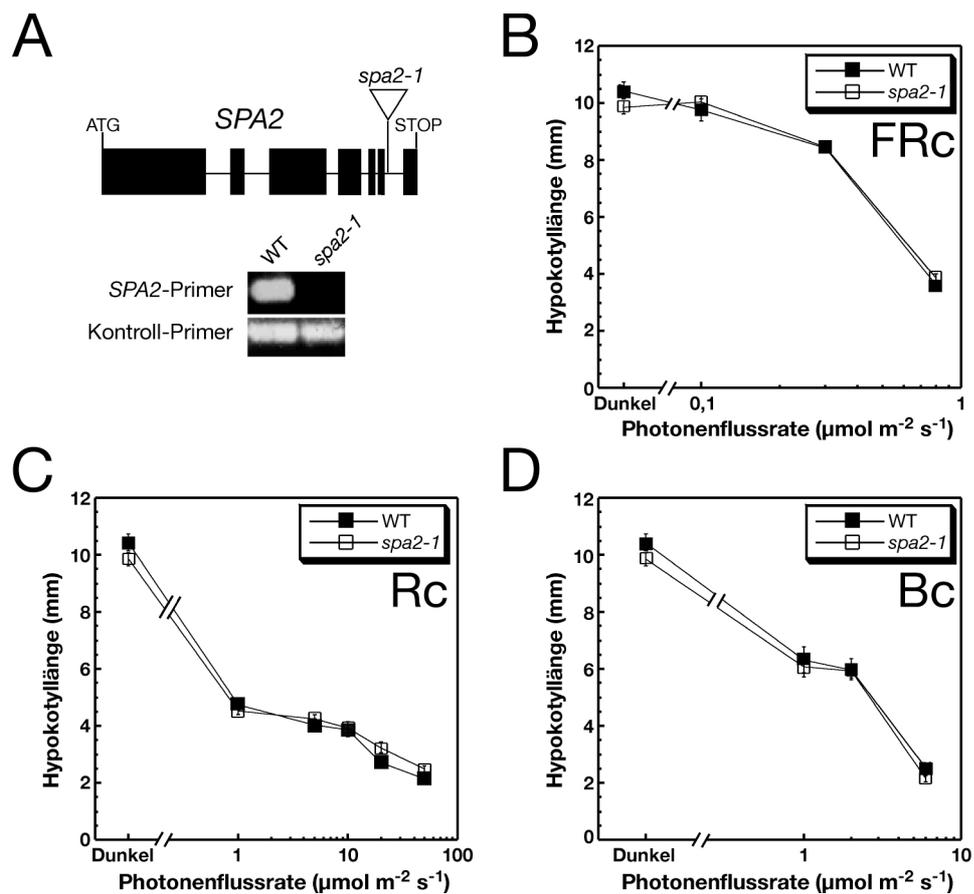


Abbildung 3.1: Eine Mutation im SPA2 Gen hat keinen Einfluss auf die Keimlingsentwicklung. (A) Schematische Darstellung des SPA2 Gens und die relative Lage der T-DNA-Insertion in der *spa2-1* Mutante. Außerdem ist eine reverse-Transkriptase PCR von cDNA aus wildtypischen Keimlingen oder *spa2-1* Mutanten gezeigt. Die verwendeten SPA2 spezifischen Primer (Geno-*spa2-1*-F und -R) flankierten die T-DNA Insertion in der *spa2-1* Mutante. Als Kontrolle wurden SPA3 spezifische Oligonukleotide verwendet. (B-D) Hypokotyllängen von wildtypischen Keimlingen und *spa2-1* Mutanten in dunkelrotem Licht (B), hellrotem Licht (C) und blauem Licht (D) unterschiedlicher Flussraten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Gene aus einer direkten Duplikation der entsprechenden Chromosomenabschnitte (Simillion et al., 2002). Daher wurden zunächst *spa1 spa2* Doppelmutanten untersucht.

Im Gegensatz zum Wildtyp, *spa1* oder *spa2* Mutanten zeigten Keimlinge von *spa1 spa2* Doppelmutanten partielle Photomorphogenese auch in völliger Dunkelheit: *spa1 spa2* Mutanten wiesen ein kürzeres Hypokotyl und weit geöffnete Kotyledonen im Dunkeln auf (Abbildung 3.2 A, B). Ferner akkumulierten *spa1 spa2* Mutanten Anthocyan in Dunkelheit (Abbildung 3.2 C). Anthocyan wird normalerweise als Schutzpigment bei zu starker Lichteinstrahlung gebildet. Aus der Analyse von *spa1*, *spa3* und *spa4* Mutanten wurde geschlossen, dass die SPA-Gene eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Photomorphogenese im Licht spielen. Der Phänotyp der *spa1 spa2* Doppelmutanten aber zeigt, dass SPA Gene auch eine wichtige Funktion bei der Unterdrückung der Lichtantwort in Dunkelheit ausüben. Im Licht wiesen die Hypokotyllängen von *spa1* Mutanten und *spa1 spa2* Doppelmutanten keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 3.2 C, D, E). Lediglich der

Gehalt an Anthocyanen war in der *spa1 spa2* Doppelmutante im Vergleich zur *spa1* Mutante leicht erhöht (Abbildung 3.2 F).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kombination einer *spa1* Mutation und einer *spa2* Mutation zu Photomorphogenese in völliger Dunkelheit führt.

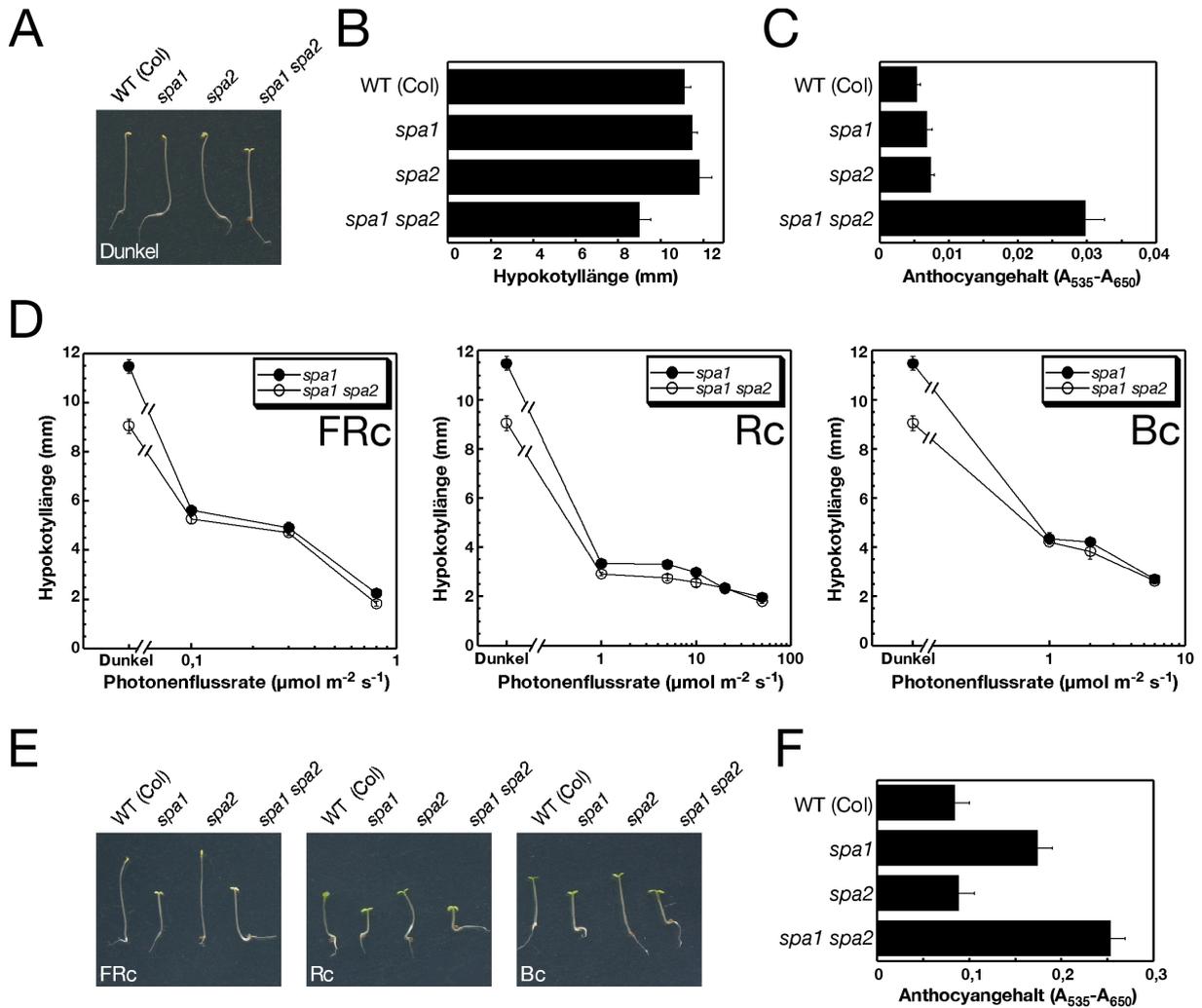


Abbildung 3.2: *spa1 spa2* Doppelmutanten unterlaufen Photomorphogenese in Dunkelheit. (A-C) Fotografie (A), Hypokotyllängen (B) und Anthocyanengehalte (C) von wildtypischen Keimlingen (WT), *spa1* Mutanten, *spa2* Mutanten und *spa1 spa2* Doppelmutanten, die sich in Dunkelheit entwickelten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (D) Hypokotyllängen von *spa1* Mutanten und *spa1 spa2* Doppelmutanten im dunkelroten Licht (FRc), im hellroten Licht (Rc) und im blauen Licht (Bc) unterschiedlicher Flussraten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (E) Fotografie von wildtypischen Keimlingen (WT), *spa1* Mutanten, *spa2* Mutanten und *spa1 spa2* Doppelmutanten, die sich im dunkelroten Licht (FRc, 0,08 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), im hellroten Licht (Rc, 8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder im blauen Licht (Bc, 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entwickelten. (F) Anthocyanengehalte von wildtypischen Keimlingen (WT), *spa1* Mutanten, *spa2* Mutanten und *spa1 spa2* Doppelmutanten im dunkelroten Licht (FRc, 3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

III.1.3 Die konstitutive Photomorphogenese von *spa1 spa2* Mutanten wird durch den Verlust der Funktion von *SPA3* und/oder *SPA4* verstärkt

Da *spa1 spa2* Doppelmutanten eine leichte konstitutive Photomorphogenese aufwiesen, wurde getestet, ob der zusätzliche Verlust von *SPA3* oder *SPA4* diesen Phänotyp verstärkt. *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten zeigten ein stark vermindertes Hypokotylwachstum und weit geöffnete Kotyledonen in Dunkelheit (Abbildung 3.3 A). Der Phänotyp dieser Mutanten ähnelte sehr stark dem einer milden *cop1* Mutante (Abbildung 3.3 A, B). Obwohl die Hypokotyle dieser Mutanten bereits in Dunkelheit stark verkürzt waren, konnte Licht verschiedener Qualitäten das Hypokotylwachstum noch weiter hemmen (Abbildung 3.3 A, B).

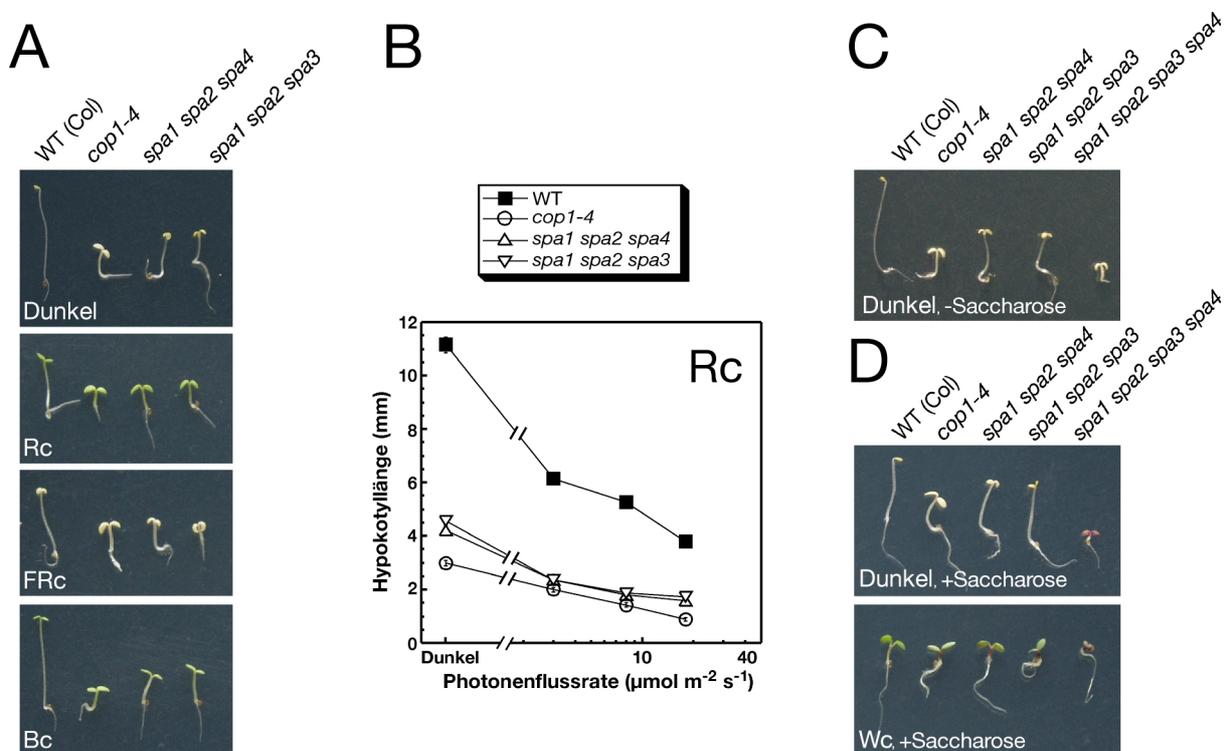


Abbildung 3.3: *spa1 spa2 spa3* und *spa1 spa2 spa4* Tripelmutanten und *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten zeigen konstitutive Photomorphogenese. (A) Phänotyp von wildtypischen Keimlingen (WT), *cop1-4* Mutanten, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten in Dunkelheit, im dunkelroten Licht (FRC, $0,08 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), im hellroten Licht (Rc, $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und im blauen Licht (Bc, $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **(B)** Hypokotyllängen von wildtypischen Keimlingen (WT), *cop1-4* Mutanten, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten im hellroten Licht (Rc) verschiedener Flussraten. **(C, D)** Phänotyp von wildtypischen Keimlingen, *cop1-4* Mutanten, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten und *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten in Dunkelheit oder weißem Licht (Wc, $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gewachsen auf Medium ohne Saccharose (C) oder mit Saccharose (D).

Schaltete man die Funktion aller *SPA* Gene aus, so wies die resultierende *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante sehr starke konstitutive Photomorphogenese auf (Abbildung

3.3 C). Das Hypokotyl der *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante war kürzer als das der *spa1 spa2 spa4* Tripelmutante, der *spa1 spa2 spa3* Tripelmutante und der *cop1-4* Mutante (Abbildung 3.3 C). In Dunkelheit zeigte die *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante in Gegenwart von Saccharose eine intensive rot-violette Färbung (Abbildung 3.3 D). Diese Färbung beruhte vermutlich auf einer starken Akkumulation von Anthocyanen. Der Phänotyp der *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante in Dunkelheit war kaum von dem im Licht zu unterscheiden (Abbildung 3.3 D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *spa* Quadrupelmutante starke konstitutive Photomorphogenese aufweist. Der Phänotyp der *spa* Quadrupelmutante ähnelt dem einer *cop1* Mutante.

III.1.4 *spa* Tripelmutanten, die konstitutive Photomorphogenese aufweisen, zeigen konstitutive Expression lichtregulierter Gene

spa1 spa2 spa3 und *spa1 spa2 spa4* Tripelmutanten, die sich in Dunkelheit entwickelten, zeigten morphologische und physiologische Eigenschaften eines im Licht gewachsenen wildtypischen Keimlings. Um zu untersuchen, ob diese *spa* Mutante auch auf molekularer Ebene Eigenschaften eines im Licht gewachsenen Keimlings aufweisen, wurden die Transkriptmengen lichtregulierter Gene untersucht. Dabei handelte es sich um die kernkodierte Gene *RBCS*, *CAB3* und *FEDA* sowie um das plastidärkodierte Gen *RBCL*. *RBCS* und *RBCL* kodieren die kleine und große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase. *CAB3* und *FEDA* kodieren eine Untereinheit des Lichtsammelkomplexes und Ferredoxin A. Allen Genen ist gemeinsam, dass die jeweiligen mRNA-Pegel durch Licht stark erhöht werden (Caspar und Quail, 1993; Gilmartin et al., 1990).

Eine Northern-Analyse von Keimlingen, die sich 4 Tage in Dunkelheit oder weißem Licht entwickelt hatten, zeigte im Wildtyp eine starke Expression von *RBCS*, *RBCL*, *CAB3* und *FEDA* nur in den belichteten Keimlingen (Abbildung 3.4). *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten wiesen in Dunkelheit im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhte Transkriptpegel der untersuchten Gene auf (Abbildung 3.4). Dabei ähnelten die Transkriptmengen von *RBCS*, *RBCL*, *CAB3* und *FEDA* in den *spa* Tripelmutanten denen in der *cop1* Mutante. Die morphologischen Ähnlichkeiten der *spa* Tripelmutanten zu *cop1* Mutanten spiegelten sich daher auch auf molekularer Ebene wieder.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *spa* Tripelmutanten, die konstitutive Photomorphogenese aufweisen, lichtgesteuerte Gene konstitutiv exprimieren.

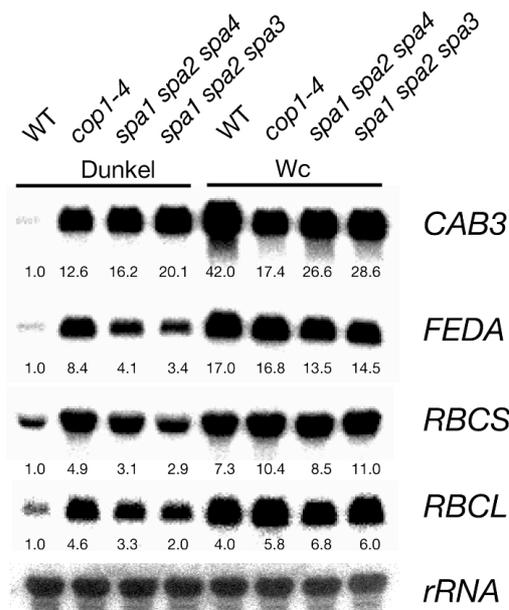


Abbildung 3.4: *spa* Mehrfachmutanten, die Photomorphogenese im Dunkeln unterlaufen, zeigen konstitutive Expression lichtregulierter Gene. Transkriptanalyse der Gene *CAB3*, *FEDA*, *RBCS* und *RBCL* aus wildtypischen Keimlingen, *cop1-4* Mutanten, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten. Die Keimlinge entwickelten sich vier Tage in Dunkelheit oder Weißlicht (Wc, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Als Ladekontrolle wurden die Membranen mit einer *18S-rRNA* spezifischen Sonde hybridisiert. Die Signale der Transkripte wurden über die Signale der entsprechenden *18S-rRNA* normalisiert. Die Zahlen geben die relativen Transkriptmengen an (Wildtyp im Dunkeln entspricht 1). Das Experiment wurde zweimal unabhängig durchgeführt.

III.1.5 *SPA1* und *SPA2* sind ausreichend für die Unterdrückung der Photomorphogenese in Dunkelheit

Alle bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die *SPA* Gene redundante Funktionen bei der Unterdrückung der Photomorphogenese ausüben. Daher ist es schwierig die Funktion eines einzelnen *SPA* Gens vom Phänotyp der entsprechenden Einzelmutante abzuleiten. So lässt sich die Funktion von *SPA1* zum Beispiel nicht von der *spa1* Mutante ableiten, da der Verlust der Funktionen von *SPA1* durch die Funktionen von *SPA2*, *SPA3* und *SPA4* ausgeglichen werden kann. Untersucht man hingegen eine *spa2 spa3 spa4* Tripelmutante, die nur noch intaktes *SPA1* enthält, erhält man Informationen über die spezielle Funktion und das Potenzial von *SPA1*. Daher werden im weiteren Verlauf die vier verschiedenen Tripelmutanten, die jeweils nur ein intaktes *SPA* Gen enthalten, mit dem Wildtyp verglichen.

In Dunkelheit entwickelte Keimlinge von *spa2 spa3 spa4* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten, die jeweils nur intaktes *SPA1* beziehungsweise *SPA2* enthalten, waren nicht von wildtypischen Keimlingen zu unterscheiden (Abbildung 3.5 A). Daher ist ein funktionelles *SPA1* oder *SPA2* Gen ausreichend um eine Unterdrückung der Photomorphogenese im Dunkeln zu gewährleisten. In Dunkelheit entwickelte Keimlinge von *spa1 spa2 spa4*

beziehungsweise *spa1 spa2 spa3* Mutanten, die nur intaktes *SPA3* oder *SPA4* enthalten, zeigten, wie bereits oben erwähnt, konstitutive Photomorphogenese und erhöhte Anthocyanakkumulation (Abbildung 3.5 A-C).

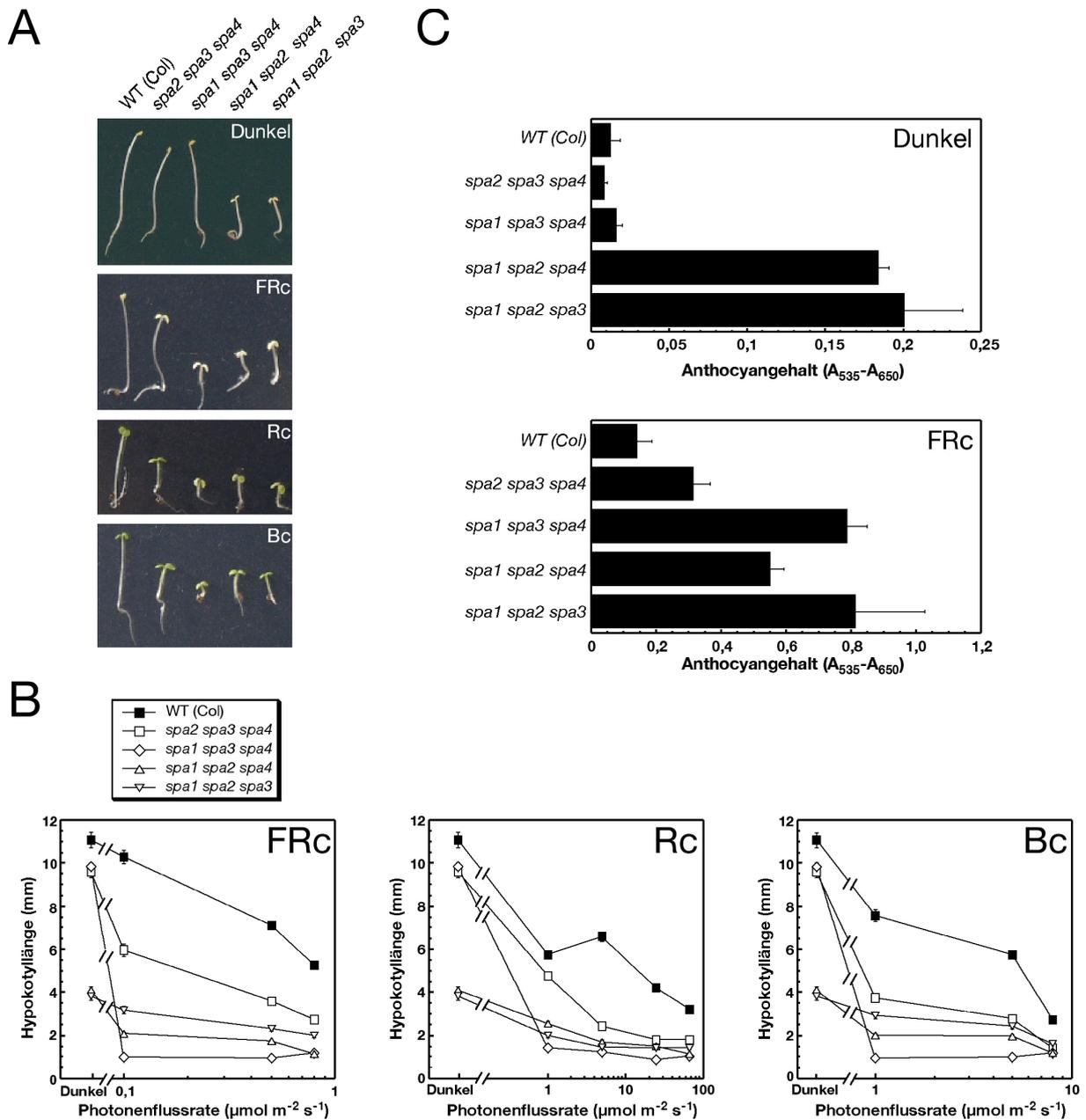


Abbildung 3.5: SPA1 und SPA2 sind ausreichend für die Unterdrückung der Photomorphogenese im Dunkeln. (A) Phänotypen von wildtypischen Keimlingen (WT), *spa2 spa3 spa4*, *spa1 spa3 spa4*, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten, die sich in Dunkelheit, im dunkelroten Licht (FRc, $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), im hellroten Licht (Rc, $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder im blauen Licht (Bc, $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entwickelten. (B) Hypokotyllänge von wildtypischen Keimlingen (WT), *spa2 spa3 spa4*, *spa1 spa3 spa4*, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten im dunkelroten Licht (FRc) im hellroten Licht (Rc) oder im blauen Licht (Bc) verschiedener Flussraten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (C) Anthocyanengehalte von wildtypischen Keimlingen (WT), *spa2 spa3 spa4*, *spa1 spa3 spa4*, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten in Dunkelheit oder in dunkelrotem Licht (FRc, $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Keine der im hellroten, dunkelroten oder blauen Licht entwickelten *spa* Tripelmutanten zeigte einen wildtypischen Phänotyp (Abbildung 3.5 A, B). Das bedeutet, dass, anders als in Dunkelheit, kein einzelnes *SPA* Gen ausreichend für eine Hemmung der Photomorphogenese im Licht ist. Keimlinge von *spa1 spa3 spa4* Mutanten, die nur intaktes *SPA2* enthalten, zeigten die stärkste Hemmung des Hypokotyllängenwachstums im Licht. Bereits niedrige Photonenflussraten von dunkelrotem, hellrotem oder blauem Licht waren ausreichend, um eine gesättigte Antwort des Keimlings im Licht zu erzeugen (Abbildung 3.5 B). *spa1 spa3 spa4* Mutanten akkumulierten auch große Mengen Anthocyan (Abbildung 3.5 C). Dies legt die Vermutung nahe, dass *SPA2* nur eine untergeordnete Rolle in der lichtabhängigen Entwicklung des Keimlings spielt. Hingegen scheint *SPA1* von allen *SPA* Genen der wichtigste Regulator in der lichtgesteuerten Entwicklung von Keimlingen zu sein. Das Hypokotyllängenwachstum von *spa2 spa3 spa4* Mutanten war zwar im Vergleich zum Wildtypen reduziert, jedoch weniger stark als in Mutanten, die nur noch intaktes *SPA2*, *SPA3* oder *SPA4* enthielten (Abbildung 3.5 A). Auch *spa2 spa3 spa4* Mutanten akkumulierten im Vergleich mit dem Wildtypen höhere Mengen Anthocyan im Licht, jedoch signifikant weniger als Mutanten, die nur noch intaktes *SPA2*, *SPA3* oder *SPA4* enthielten (Abbildung 3.5 C). Keimlinge von *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Mutanten zeigten bereits im Dunkeln ein verkürztes Hypokotyl (Abbildung 3.5 A, B). Im Licht wurde das Hypokotyllängenwachstum dieser Tripelmutanten weiter unterdrückt (Abbildung 3.5 A, B). Dies deutet darauf hin, dass die Photomorphogenese im Dunkeln in Mutanten mit intaktem *SPA3* oder *SPA4* Gen noch teilweise gehemmt wird.

Die Analyse von Mutanten, die nur noch ein intaktes *SPA* Gen enthalten, hat gezeigt, dass *SPA1* oder *SPA2* für die Unterdrückung der Photomorphogenese im Dunkeln ausreichend sind. *SPA3* und *SPA4* sind nicht ausreichend für eine Unterdrückung der Photomorphogenese im Dunkeln. Im Licht übt *SPA2* nur eine sehr geringe Funktion aus. *SPA1* hingegen ist das wichtigste der *SPA* Gene in der lichtabhängigen Keimlingsentwicklung.

III.2 *SPA* Gene spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung adulter Pflanzen

Licht reguliert nicht nur die Entwicklung im Keimlingsstadium, sondern beeinflusst auch die vegetative Entwicklung. Daher zeigen Mutanten, die Defekte in der Lichtsignaltransduktion aufweisen, Veränderungen in der vegetativen Pflanzenentwicklung. Zum Beispiel zeigen lebensfähige *cop1*-Mutanten eine stark reduzierte Pflanzengröße (McNellis et al., 1994; Deng und Quail, 1992). Starke Mutationen im *COP1* Gen führen zu Letalität (McNellis et al., 1994). Diese Mutanten erreichen die vegetative Phase nicht sondern sterben im Keimlingsstadium (McNellis et al., 1994). *SPA* Proteine interagieren mit *COP1* und die *spa* Quadrupelmutante

weist einen Phänotyp ähnlich dem einer *cop1* Mutante auf. Daher stellt sich die Frage, ob die *SPA* Gene auch die vegetative Entwicklung von Arabidopsis regulieren.

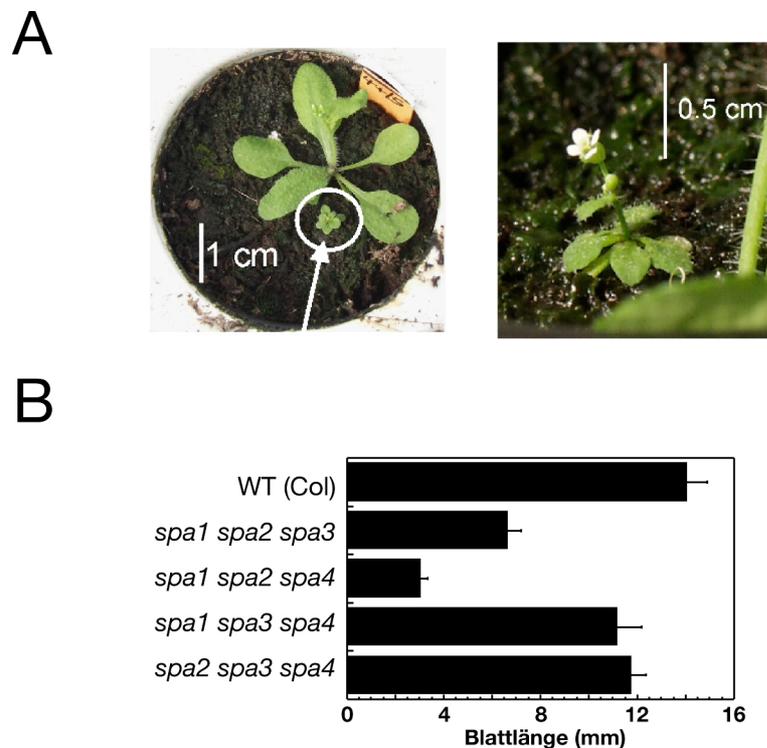


Abbildung 3.6: *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten sind zwergwüchsig, aber lebensfähig. (A) Phänotyp von 22 Tage alten (links) und 26 Tage alten (rechts) *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten. **(B)** Blattlängen von 23 Tage alten wildtypischen Pflanzen (WT), *spa2 spa3 spa4*, *spa1 spa3 spa4*, *spa1 spa2 spa4* und *spa1 spa2 spa3* Tripelmutanten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Da ungeklärt war, ob *spa* Quadrupelmutanten im adulten Stadium überlebensfähig sind, wurden Samen von *spa1 spa2 spa3 SPA4* (+/-) Mutanten direkt auf Erde ausgebracht. Statistisch sollten 25% der nachfolgenden Pflanzen *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten sein. Etwa ein Viertel der Pflanzen zeigten einen starken Zwergwuchs (Abbildung 3.6 A). Mittels PCR wurde der Genotyp an den vier verschiedenen *SPA* Loci bestimmt. So wurde verifiziert, dass es sich bei den zwergwüchsigen Pflanzen um *spa* Quadrupelmutanten handelte. *spa* Quadrupelmutanten waren demnach überlebensfähig, sie produzierten normale Blüten und bildeten Samen (Abbildung 3.6 A). Auch im adulten Entwicklungsstadium sollte die Relevanz der individuellen *SPA* Gene bestimmt werden. Dafür wurden *spa* Tripelmutanten, die nur noch ein funktionstüchtiges *SPA* Gen enthalten, in langen Tagen angezogen. Die Größe der Pflanze wurde bestimmt, indem nach 23 Tagen die Länge des am weitesten entwickelten Blattes gemessen wurde. *spa1 spa2 spa3* und *spa1 spa2 spa4* Mutanten, die nur intaktes *SPA3* oder *SPA4* enthalten, zeigten eine Blattlänge, die sich nicht signifikant von wildtypischen Pflanzen unterschied (Abbildung 3.6 B). Die Länge der Blätter

von *spa2 spa3 spa4* Mutanten, die nur intaktes *SPA1* enthalten, war im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen um die Hälfte reduziert (Abbildung 3.6 B). Mutanten, die nur intaktes *SPA2* enthalten, zeigten eine um dreiviertel verminderte Blattlänge im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen (Abbildung 3.6 B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass aus der Gruppe der *SPA* Gene *SPA3* und *SPA4* die wichtigsten Regulatoren der vegetativen Entwicklung sind.

III.3 Die Rolle der *SPA* Gene in der Induktion der Blütenbildung

III.3.1 Mutationen im *SPA1* Gen führen zu einer verfrühten Blüte in kurzen Tagen

Licht beeinflusst bei Pflanzen den Wechsel von der vegetativen in die generative Phase. Die Dauer der täglichen Lichteinstrahlung, die Photoperiode, hat einen wichtigen Einfluss auf das Blühverhalten vieler Pflanzen. Lange Tage, wie sie im Sommer herrschen, fördern die Blütenbildung bei Arabidopsis. Arabidopsis-Pflanzen, die sich in kurzen Tagen entwickeln, zeigen hingegen eine verlängerte vegetative Phase und kommen erst sehr spät zur Blüte (Hayama und Coupland, 2004).

Da *SPA* Gene wichtige Funktionen in der lichtgesteuerten Entwicklung von Arabidopsis ausüben, wurde das Blühverhalten von *spa* Mutanten im Kurztag (KT) und Langtag (LT) untersucht. Als Maß für den Zeitpunkt der Blütenbildung wurde die Anzahl der Rosettenblätter am Tag der ersten sichtbaren Infloreszenz bestimmt. Veränderungen bezüglich der Geschwindigkeit, mit der sich die Pflanzen entwickeln, fallen so nicht ins Gewicht. Auf diese Art können direkt die Entwicklungsstadien der Pflanzen miteinander verglichen werden, in denen sie zur Blüten gelangen.

In langen Tagen zeigten *spa* Mutanten in der Columbia(Col)-Akzession keine veränderte Blattanzahl im Vergleich mit wildtypischen Pflanzen (Tabelle 3.1). Auch in der RLD-Akzession hatten Mutationen im *SPA1* Gen keinen Einfluss auf den Blühzeitpunkt im Vergleich mit dem Wildtyp (Tabelle 3.1). In kurzen Tagen zeigten *spa1* Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verfrühte Blütenbildung. Sowohl *spa1-2* und *spa1-3* Mutanten in der RLD-Akzession als auch *spa1-7* in der Col-Akzession blühten signifikant früher als die jeweiligen Wildtypen (Tabelle 3.1, Abbildung 3.7). Mutationen in den Genen *SPA2*, *SPA3* oder *SPA4* hatten hingegen keinen Einfluss auf den Zeitpunkt der Blüte (Tabelle 3.1, Abbildung 3.7). Die Anzahl der Blätter zum Zeitpunkt der Blütenbildung von *spa2*, *spa3* und *spa4* Mutanten weichte nicht signifikant von der des Wildtyps ab (Tabelle 3.1, Abbildung 3.7).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Verlust der *SPA1* Funktion zu einer verfrühten Induktion der Blütenbildung in kurzen Tagen, aber nicht in langen Tagen führt. Mutationen im *SPA2*, *SPA3* oder *SPA4* Gen haben keinen Einfluss auf den Zeitpunkt der Blütenbildung.

Tabelle 3.1: Bestimmung des Blühzeitpunktes von *spa* Mutanten im LT und KT. Es wurde die durchschnittliche Anzahl der Blätter \pm Standardfehler am Tag der ersten sichtbaren Infloreszenz bestimmt.

Genotyp	Anzahl der Blätter (LT)	Anzahl der Blätter (KT)
WT (RLD)	10,9 \pm 0,3	73,2 \pm 1,9
<i>spa1-2</i>	10,7 \pm 0,4	13,6 \pm 0,4
<i>spa1-3</i>	10,9 \pm 0,4	13,5 \pm 0,4
WT (Col)	19,1 \pm 0,5	105,7 \pm 2,8
<i>spa1-7</i>	20,3 \pm 0,7	46,6 \pm 1,0
<i>spa2-1</i>	19,0 \pm 0,8	101,2 \pm 3,3
<i>spa3-1</i>	18,8 \pm 0,9	107,5 \pm 4,8
<i>spa4-1</i>	19,8 \pm 1,1	99,2 \pm 3,0

III.3.2 *spa1* Mutanten zeigen eine verfrühte Blüte unabhängig von *phyA*

Im Keimlingsstadium prägt sich der Phänotyp von *spa1* Mutanten nur in Anwesenheit von intaktem *phyA* aus (Hoecker et al., 1998; Fittinghoff et al., 2006). Da *phyA* auch eine wichtige Rolle in der Blühinduktion spielt (Mockler et al., 2003; Reed et al., 1994), wurde eine Epistasieanalyse von *spa1* und *phyA* Mutationen durchgeführt. *spa1 phyA* Mutanten zeigten in kurzen Tagen eine ähnlich verfrühte Blütenbildung wie *spa1* Mutanten (Tabelle 3.2). Ein Verlust der Funktion von *phyA* hatte keinen Einfluss auf den Blühzeitpunkt verglichen mit dem Wildtyp (Tabelle 3.2). Die Funktion von *SPA1* bei der Blühinduktion in kurzen Tagen war unabhängig vom Photorezeptor *phyA*.

phyA fördert die Blütenbildung in langen Tagen. Experimentell kann man den Effekt einer *phyA* Mutation darstellen, indem man *phyA* Mutanten in speziellen Langtag-Bedingungen anzieht (Kurztag+Verlängerung: 8 h Weißlicht / 8 h dunkelrot-reiches Licht/ 8 h Dunkelheit). Unter diesen Bedingungen blühten *phyA* Mutanten später als wildtypische Pflanzen (Tabelle 3.2). *spa1 phyA* Doppelmutanten blühten signifikant früher als *phyA*

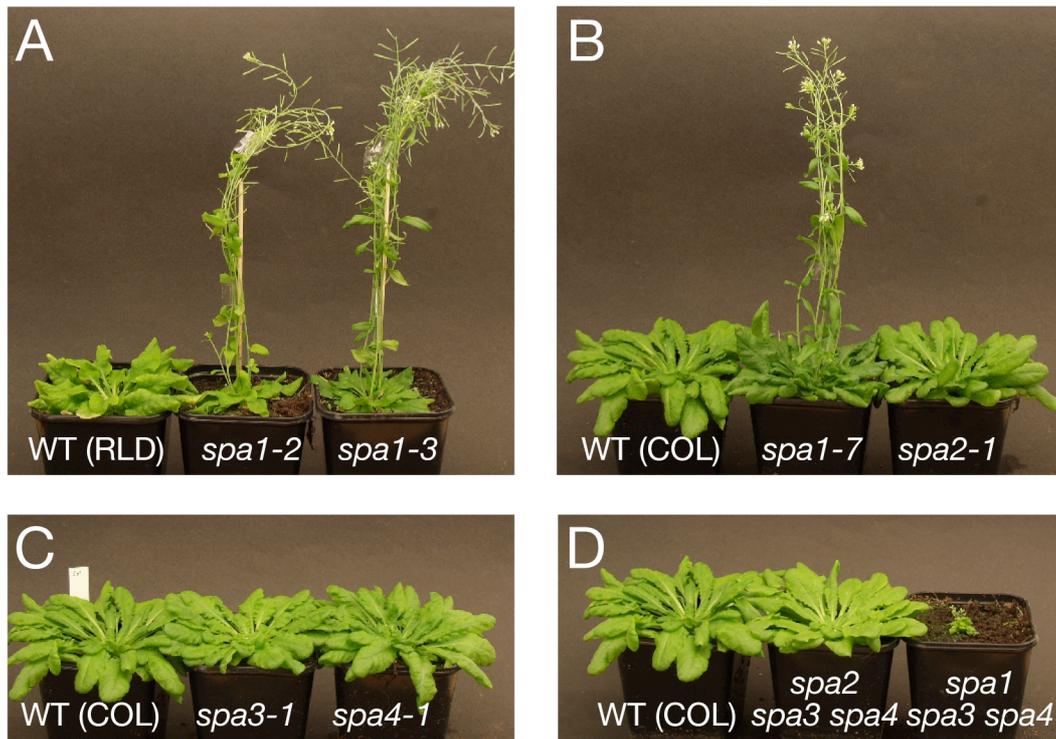


Abbildung 3.7: SPA1 ist ein wichtiger Regulator der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung. (A-D) Phänotypen 78 Tage alter Pflanzen, die sich in kurzen Tagen entwickelt haben. *spa1-2* und *spa1-3* Mutanten wurden mit wildtypischen Pflanzen (WT) in der RLD Akzession verglichen (A). *spa1-7*, *spa2-1*, *spa3-1*, *spa4-1*, *spa2 spa3 spa4* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten wurden in der Col Akzession erstellt (B-D).

Mutanten (Tabelle 3.2). Demnach hebt eine Mutation im *SPA1* Gen den Effekt der *phyA* Mutation zu einem großen Teil auf (Tabelle 3.2).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Funktion von *SPA1* in der Regulation der Blütenbildung in kurzen Tagen unabhängig von *phyA* erfolgt. Der spätblühende Phänotyp der *phyA* Mutante in langen Tagen ist zu einem großen Teil abhängig von *SPA1*.

Tabelle 3.2: Bestimmung des Blühzeitpunktes von *spa1* und *phyA* Mutanten. Es wurde die durchschnittliche Anzahl der Blätter \pm Standardfehler am Tag der ersten sichtbaren Infloreszenz bestimmt.

Genotyp	Anzahl der Blätter (KT)	Anzahl der Blätter (KT+Verlängerung)
WT (RLD)	35,9 \pm 1,7	10,2 \pm 0,3
<i>phyA</i>	34,3 \pm 2,6	22,1 \pm 1,9
<i>spa1-2</i>	13,2 \pm 0,6	7,3 \pm 0,2
<i>spa1-2 phyA</i>	17,3 \pm 1,3	10,6 \pm 0,4

III.3.3 *SPA1* ist ausreichend für die Hemmung der Blütenbildung in kurzen Tagen

SPA Gene üben bei der Unterdrückung der Photomorphogenese im Keimling redundante Funktionen aus. Der Verlust der alleinigen Funktion von *SPA2*, *SPA3* oder *SPA4* könnte durch die Funktionen anderer intakter *SPA* Gene ausgeglichen werden. Daher wurde der Blühzeitpunkt von verschiedenen *spa* Mehrfachmutanten analysiert.

spa1 spa3 spa4 Mutanten, die nur noch intaktes *SPA2* enthalten, zeigten in kurzen Tagen eine stark verfrühte Blütenbildung. Diese Mutanten blühten nach Ausbildung von nur durchschnittlich 15 Blättern im Vergleich zu 106 Blättern, die der Wildtyp ausbildete (Abbildung 3.7, Tabelle 3.3). Dieses Ergebnis zeigte auch, dass der zusätzliche Verlust der Funktionen von *SPA3* und *SPA4* den Effekt der *spa1* Mutation verstärkt. *spa1 spa3 spa4* Mutanten zeigten ähnliche Blühzeitpunkte in kurzen Tagen wie in langen Tagen, was auf eine konstitutive Induktion der Blütenbildung deutet. Auch in langen Tagen war der Blühzeitpunkt von *spa1 spa3 spa4* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp etwas verfrüht (Tabelle 3.3). *spa2 spa3 spa4* Mutanten, die nur intaktes *SPA1* enthalten, zeigten hingegen sowohl in langen Tagen als auch in kurzen Tagen ein wildtypisches Blühverhalten (Tabelle 3.3, Abbildung 3.7). Dies bedeutet, dass der Verlust der Funktionen von *SPA2*, *SPA3* und *SPA4* keinen Einfluss auf die Hemmung der Blütenbildung in kurzen Tagen hatte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass intaktes *SPA1* für eine wildtypische Blühinduktion in kurzen Tagen ausreichend ist.

Tabelle 3.3: Bestimmung des Blühzeitpunktes von *spa* Mutanten in langen Tagen (LT) und kurzen Tagen (KT). Es wurde die durchschnittliche Anzahl der Blätter \pm Standardfehler am Tag der ersten sichtbaren Infloreszenz bestimmt.

Genotyp	Anzahl der Blätter (LT)	Anzahl der Blätter (KT)
WT (Col)	19,1 \pm 0,5	105,7 \pm 2,8
<i>spa1-7</i>	20,3 \pm 0,7	46,6 \pm 1,0
<i>spa2 spa3 spa4</i>	18,4 \pm 0,4	119,6 \pm 4,6
<i>spa1 spa3 spa4</i>	16,0 \pm 0,8	14,8 \pm 0,4

III.3.4 Mutationen in *SPA* Genen führen zu einer Erhöhung der *FT* mRNA-Mengen

Im Folgenden sollen die molekularen Ursachen des verfrühten Blühzeitpunktes von *spa* Mutanten in kurzen Tagen aufgedeckt werden. *spa1* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten weisen

einen spezifischen Defekt in der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung auf. Die photoperiodische Induktion der Blütenbildung beruht auf der Koinzidenz von hohen *CO* mRNA-Spiegeln und Licht (Searle und Coupland, 2004). Daher wurde zunächst untersucht, ob die verfrühte Blütenbildung von *spa1* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten auf Veränderungen der *CO* mRNA-Mengen beruht.

Die *CO* mRNA-Gehalte waren in den frühblühenden *spa1* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abbildung 3.8 A, B). Vor allem der charakteristische Verlauf am Tag mit niedrigen *CO* Gehalten zwischen Zeitgeber 0 bis 8 und hohen *CO* Gehalten zwischen Zeitgeber 12 und 20 war in den untersuchten Mutanten nicht verändert. Der frühblühende Phänotyp von *spa1* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten beruht demnach nicht auf einer Veränderung der *CO* mRNA Spiegel.

Das Gen *FT* spielt ebenfalls bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung eine entscheidende Rolle (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Die *FT* mRNA-Gehalte sind in Pflanzen, die sich in langen Tagen entwickeln, höher als in Pflanzen, die sich in kurzen Tagen entwickeln (Kardailsky et al., 1999). Dabei wird in langen Tagen die Expression von *FT* durch *CO* gefördert (Wigge et al., 2005). Die Bestimmung der *FT* mRNA-Gehalte in *spa* Mutanten ergab, dass die frühblühenden *spa1* Mutanten in kurzen Tagen eine 70-fache Erhöhung der *FT* Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp bei ZT 20 zeigten (Abbildung 3.8 A, C). Die noch früher blühenden *spa1 spa3 spa4* Mutanten zeigten sogar einen 1000-fach erhöhten Gehalt an *FT* mRNA (Abbildung 3.8 A, C). Der Verlauf der *FT* Transkriptmengen in *spa1* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten in kurzen Tagen erinnert stark an den Verlauf der *FT* mRNA-Gehalte in wildtypischen Pflanzen in langen Tagen (Yanovsky und Kay, 2002; Abbildung 3.8 A, C). Die Mengen an *FT* mRNA in den unverändert blühenden *spa2 spa3 spa4* Mutanten waren wie im Wildtyp nicht induziert (Abbildung 3.8 A, C). Die *SOC1* mRNA-Gehalte waren in *spa1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abbildung 3.8 A, D). *spa1 spa3 spa4* und *spa2 spa3 spa4* Mutanten zeigten in den ersten acht Stunden des Tages leicht erhöhte Mengen der *SOC1* mRNA. Von Zeitgeber 12 bis 24 hingegen waren die *SOC1* mRNA-Mengen vergleichbar mit denen im Wildtyp und *spa1* Mutanten (Abbildung 3.8 A, D).

Das Gen *FT* ist ein Konvergenzpunkt von zwei unterschiedlichen Wegen, die die Blütenbildung in Arabidopsis steuern: der photoperiodische Weg und der autonome Weg (Mouradov et al., 2002). Dabei unterdrückt der autonome Weg die Blütenbildung in frühen Entwicklungsstadien (Simpson, 2004). Mit zunehmendem Pflanzenalter lässt die reprimierende Wirkung des autonomen Weges nach (Simpson, 2004). Der zentrale Repressor des autonomen Weges ist das MADS-Box Protein FLC (Simpson, 2004). Die Gene *FT* und *SOC1* werden durch FLC reprimiert (Michaels et al., 2005; Hepworth et al., 2002). Um

auszuschließen, dass die erhöhten *FT* Gehalte in *spa1* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten auf verminderte Mengen von *FLC* zurückzuführen sind, wurden die *FLC* mRNA-Mengen in *spa* Mutanten und im Wildtyp bestimmt. Die Abundanz der *FLC* mRNA in *spa1* Mutanten ist im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abbildung 3.8 A, E). *spa1 spa3 spa4* und *spa2 spa3 spa4* Mutanten zeigten sogar leicht erhöhte Gehalte der *FLC* mRNA. Da *spa2 spa3 spa4* Mutanten wie wildtypische Pflanzen und *spa1 spa3 spa4* Mutanten in kurzen Tagen sehr früh blühten, korrelieren die veränderten *FLC* mRNA-Mengen nicht mit den beobachteten Phänotypen.

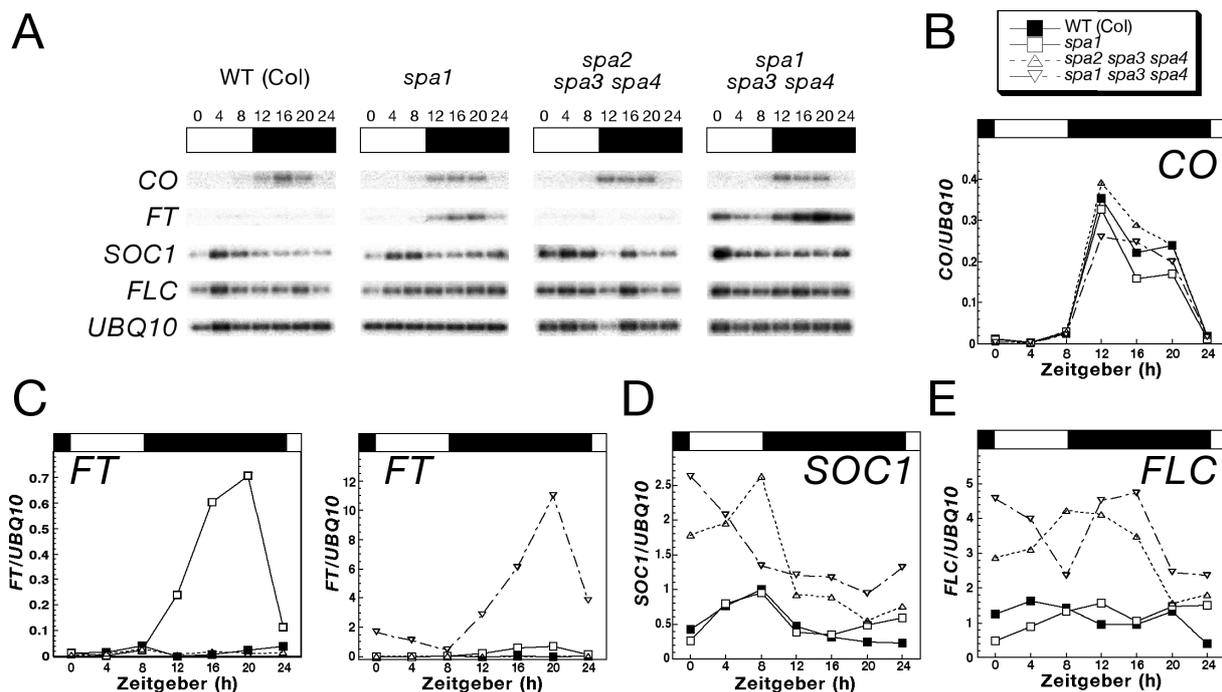


Abbildung 3.8: Die frühblühenden *spa1* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten zeigen erhöhte *FT* mRNA-Pegel in kurzen Tagen (A) Repräsentatives Ergebnis einer RT-PCR-Analyse der *CO*, *FT*, *SOC1* und *FLC* Transkripte in wildtypischen Pflanzen (Col), *spa1*, *spa2 spa3 spa4* und *spa1 spa3 spa4* Mutanten, die sich in kurzen Tagen entwickelt haben. Das Gen *UBQ10* diente als Ladekontrolle. **(B-E)** Quantifizierung der *CO* (B), *FT* (C), *SOC1* (D) und *FLC* (E) Transkriptmengen der RT-PCR-Analyse aus (A). Das linke Diagramm in (C) zeigt die Quantifizierung der *FT* mRNA-Pegel ohne die *spa1 spa3 spa4* Mutante. Das rechte Diagramm in (C) zeigt die Quantifizierung der *FT* mRNA-Pegel mit der *spa1 spa3 spa4* Mutante.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in frühblühenden *spa* Mutanten die *FT* mRNA-Gehalte stark erhöht sind. Die Mengen an *CO* mRNA hingegen sind in den *spa* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

III.3.5 Die verfrühte Blütenbildung von *spa1* Mutanten ist abhängig von *CO*

spa1 Mutanten blühen früher in kurzen Tagen und weisen erhöhte *FT* mRNA-Pegel trotz wildtypischer *CO* mRNA-Gehalte. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass *SPA1* die Aktivität oder die Stabilität des *CO* Proteins beeinflusst. Um zu analysieren, ob sich der frühblühende Phänotyp der *spa1* Mutante in kurzen Tagen auch ohne intaktes *CO* ausprägt, wurde eine Epistasieanalyse durchgeführt. Dafür wurde das Blühverhalten von wildtypischen Pflanzen, *spa1*-Mutanten, *co* Mutanten und *spa1 co* Doppelmutanten in kurzen Tagen analysiert.

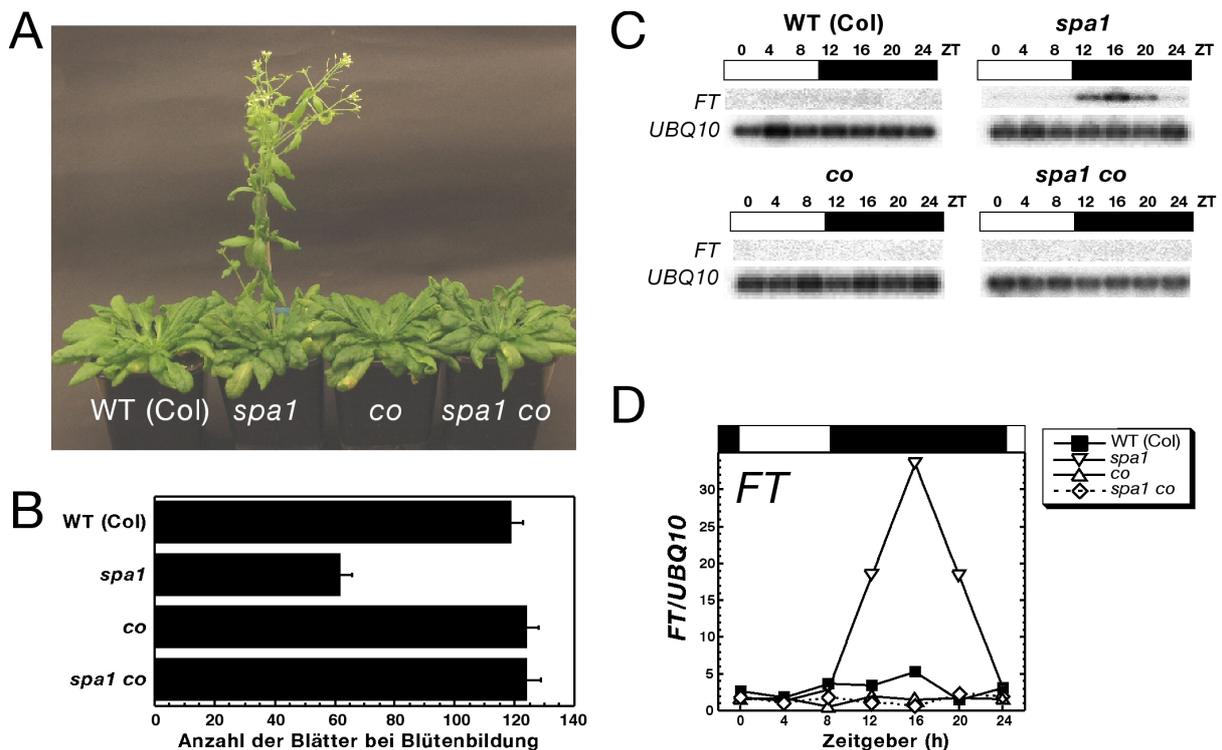


Abbildung 3.9: Der frühblühende Phänotyp der *spa1* Mutante prägt sich nur Gegenwart von intaktem *CO* aus. (A) Phänotyp von 83 Tage alten wildtypischen Pflanzen (Col), *spa1*, *co* und *spa1 co* Mutanten, die sich in kurzen Tagen entwickelten. **(B)** Anzahl der Blätter zum Zeitpunkt der Blütenbildung der Genotypen in (A). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. **(C)** RT-PCR-Analyse der *FT* mRNA-Pegel von wildtypischen Pflanzen (Col), *spa1*, *co* und *spa1 co* Mutanten, die sich in kurzen Tagen entwickelten. *UBQ10* diente als Ladekontrolle. **(D)** Quantifizierung der RT-PCR-Analyse aus C über *UBQ10* normalisiert.

Wildtypische Pflanzen blühten im Durchschnitt mit 120 Blättern (Abbildung 3.9 A, B). *spa1* Mutanten kamen bereits nach Ausbildung von 60 Blättern zur Blüte (Abbildung 3.9 A, B). Der Blühzeitpunkt von *co* Mutanten unterschied sich nicht von dem des WT (Abbildung 3.9 A, B). Dies ist nicht überraschend, da *CO* die Blütenbildung nur in langen Tagen und nicht in kurzen Tagen fördert (Putterill et al., 1995). *spa1 co* Doppelmutanten blühten wie der Wildtyp und *co* Mutanten mit durchschnittlich über 120 Blättern (Abbildung 3.9 A, B). Dies zeigt, dass die verfrühte Induktion der Blütenbildung in *spa1* Mutanten abhängig von

CO ist. Im Vergleich zur *spa1* Mutante zeigte die *spa1 co* Doppelmutante keine erhöhten *FT* mRNA Gehalte (Abbildung 3.9 C, D). In kurzen Tagen war die Expression der *FT* mRNA in der *spa1 co* Doppelmutante wie im Wildtyp und der *co* Mutante nicht induziert (Abbildung 3.9 C, D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erhöhten *FT* mRNA-Gehalte in *spa1* Mutanten und der damit verbundene frühblühende Phänotyp in kurzen Tagen vollständig von *CO* abhängig ist.

III.3.6 SPA Proteine interagieren mit CO in vitro

Die Epistasieanalyse von *SPA1* und *CO* hat gezeigt, dass der Phänotyp der *spa1* Mutante von *CO* abhängig ist. Da die mRNA-Pegel von *CO* in der *spa1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert sind, könnten die *SPA* Gene die Aktivität oder Stabilität des *CO* Proteins beeinflussen. Daher wurde untersucht, ob *SPA* Proteine direkt mit dem *CO* Protein *in vitro* wechselwirken können.

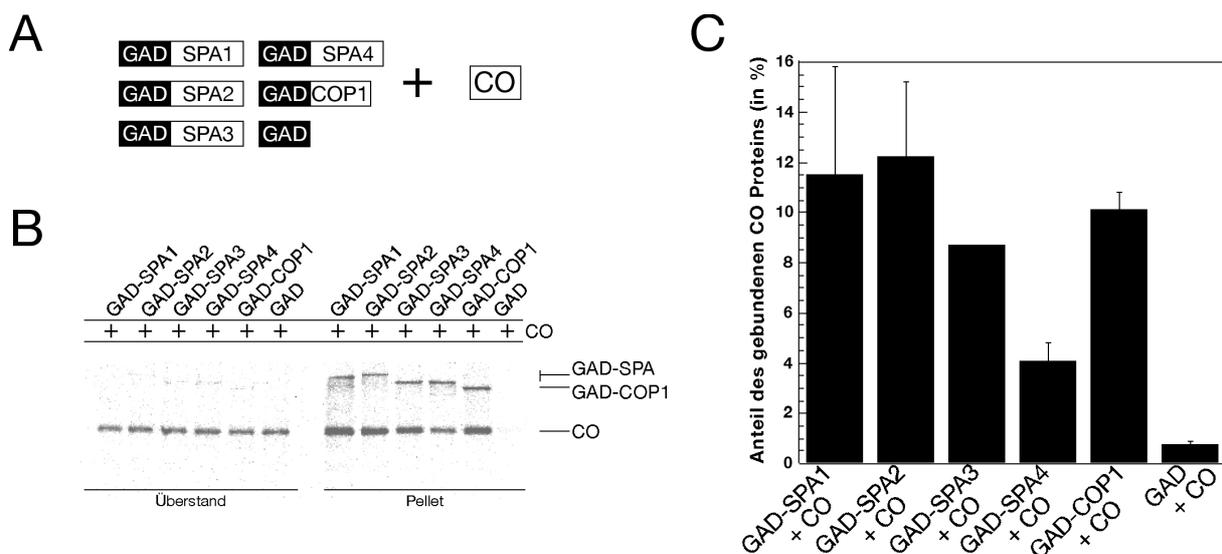


Abbildung 3.10: Alle SPA Proteine und COP1 interagieren mit CO in vitro. **(A)** Schematische Darstellung der getesteten Interaktionen. **(B)** Rekombinantes, [³⁵S]-markiertes CO wurde mit verschiedenen rekombinanten, teilweise [³⁵S]-markierten GAD-SPA Proteinen oder GAD-COP1 inkubiert und mit GAD-spezifischen Antikörpern ko-immunpräzipitiert. 1,6 % der Überstandfraktion und 33 % der Pelletfraktion wurden auf einem 10 %-gen SDS-Page aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht. **(C)** Der Anteil des CO Proteins, der durch die verschiedenen GAD-Fusionsproteine und GAD gebunden wurde, wurde berechnet. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten an.

Für den *in vitro* Interaktionstest wurden radioaktiv-markierte, rekombinante *CO*, *GAD-COP1* und *GAD-SPA* Proteine hergestellt. Mit spezifischen Antikörpern gegen den *GAD*-Anteil wurden die *GAD*-Fusionsproteine präzipitiert und die Anteile an gebundenem *CO* Protein

bestimmt. Alle GAD-SPA und GAD-COP1 Proteine konnten zwischen 4 und 12 Prozent des eingesetzten CO Proteins binden (Abbildung 3.10 A, B). Hingegen banden nur 0,5 Prozent des eingesetzten CO Proteins an den GAD-Anteil (Abbildung 3.10 A, B). Auch das GAD-COP1 Protein konnte direkt mit dem CO Protein wechselwirken (Abbildung 3.10 A, B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle SPA Proteine und COP1 in vitro mit dem CO Protein interagieren können.

III.3.7 Analyse der SPA Transkriptmengen in im Kurztag entwickelten Pflanzen

Die bisherigen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass SPA Proteine die Blütenbildung steuern, indem sie die Aktivität oder Stabilität des CO Proteins verringern. Die CO mRNA akkumuliert in kurzen Tagen während der Nachtphase (Suarez-Lopez et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt ist das CO Protein jedoch instabil (Valverde et al., 2004). Faktoren, die die Aktivität oder Stabilität von CO hemmen, müssen zu diesem Zeitpunkt besonders aktiv oder abundant sein. Um zu untersuchen, ob die Abundanz der SPA mRNAs mit den Pegeln der CO mRNA koinzidiert, wurden die SPA Transkriptmengen in einer Kurztag-Photoperiode bestimmt.

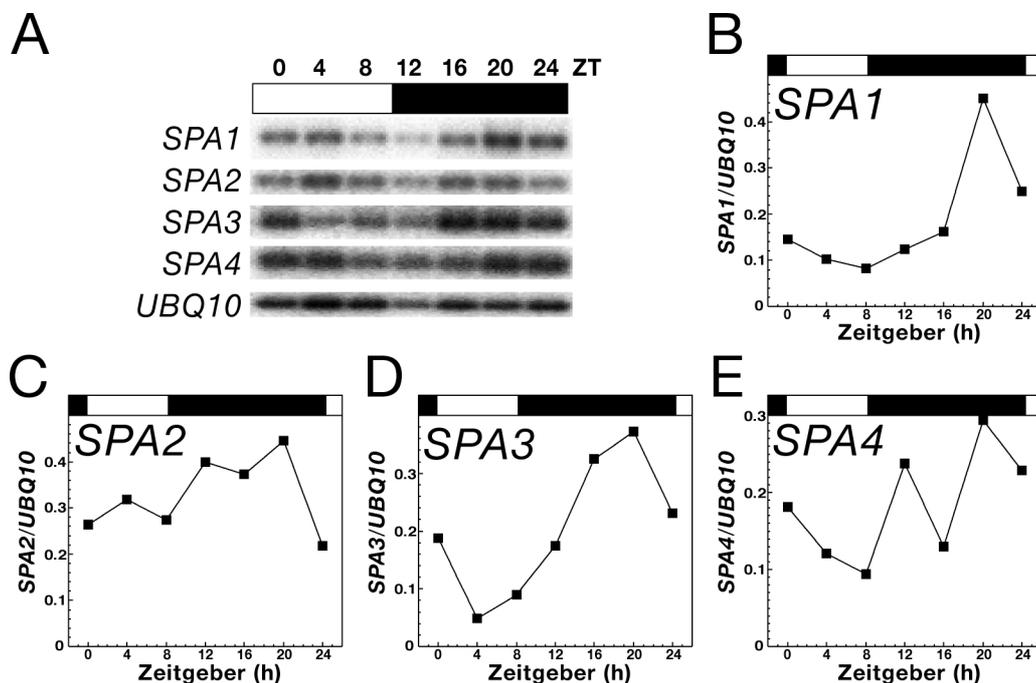


Abbildung 3.11: SPA mRNA-Pegel akkumulieren in den späten Abendstunden. (A) Repräsentative RT-PCR-Analyse der SPA1, SPA2, SPA3 und SPA4 mRNA-Pegel in wildtypischen Pflanzen, die sich in kurzen Tagen entwickelten. UBQ10 diente als Ladekontrolle **(B-E)** Quantifizierung der Signalstärke der verschiedenen SPA Transkripte aus A über UBQ10 normalisiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig durchgeführt.

Die *SPA1* Transkriptmengen zeigten einen deutlichen Anstieg in der Nachtphase (Abbildung 3.11 A). Die Mengen der *SPA1* mRNA sind zum Zeitgeber 20 etwa vier bis fünfmal größer als zum ZT 8. Die Verteilung der *SPA1* mRNA-Mengen über den Tag in kurzen Tagen ähnelt den bereits veröffentlichten Ergebnissen aus einer 12 h Licht/12 h Dunkelheit Photoperiode (Abbildung 3.11 B, Harmer et al., 2001). Auch die Gehalte der *SPA3* mRNA und *SPA4* mRNA sind in der Nacht (Zeitgeber 20) im Vergleich zum Tag (Zeitgeber 8) um den Faktor drei bis fünf erhöht (Abbildung 3.11 D). Die mRNA-Gehalte von *SPA2* hingegen sind in der untersuchten Photoperiode nicht stark reguliert (Abbildung 3.11 C, E).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mRNA-Pegel der *SPA* Gene im tageszeitlichen Verlauf in den späten Abendstunden ansteigen.

III.4 Funktionsanalyse der SPA Proteine

Die bisher dargelegten Ergebnisse beschreiben die Rolle der *SPA* Gene in verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsprozessen. Der genaue Mechanismus, wie *SPA* Proteine diese Entwicklungsprozesse steuern, ist unbekannt. Die folgenden Versuche sind der Beginn des Versuches, die Wirkmechanismen der *SPA* Proteine zu verstehen.

III.4.1 Licht erhöht die Abundanz des SPA1 Proteins

Die bisherigen Ergebnisse haben aufgedeckt, dass von allen *SPA* Genen *SPA1* der wichtigste Repressor der Photomorphogenese im Licht ist. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre eine Erhöhung der Abundanz des aktiven *SPA1* Proteins im Licht. Um die Frage zu klären, ob die Abundanz des *SPA1* Proteins durch Licht beeinflusst wird, wurden transgene Pflanzen erstellt, die ein Epitop-markiertes *SPA1* Fusionsprotein exprimieren. Der gesamte transkribierte Bereich von *SPA1* und der cDNA des *Influenza Hemagglutinin (HA)*-Epitops vor dem STOP-Codon stand unter der Kontrolle der potenziellen *SPA1* regulatorischen Sequenzen (Abbildung 3.12 A). *spa1* Mutanten wurden mit diesem Konstrukt (*SPA1::SPA1-HA*) transformiert. Verschiedene unabhängige transgene Linien wurden auf eine Rettung des *spa1* Phänotyps untersucht. Im dunkelroten Licht waren die Hypokotyllängen von verschiedenen transgenen *spa1 SPA1::SPA1-HA* Linien nicht von denen des Wildtyps zu unterscheiden (Abbildung 3.12 B). Auch der erhöhte Anthocyangehalt in *spa1* Mutanten wurde durch Einführung des *SPA1::SPA1-HA* Transgens auf wildtypische Pegel zurückgeführt. Demnach konnte das *SPA1::SPA1-HA* Transgen den Phänotyp der *spa1* Mutanten vollständig retten. Dies lässt darauf schließen, dass das *SPA1-HA* Protein funktionsfähig ist.

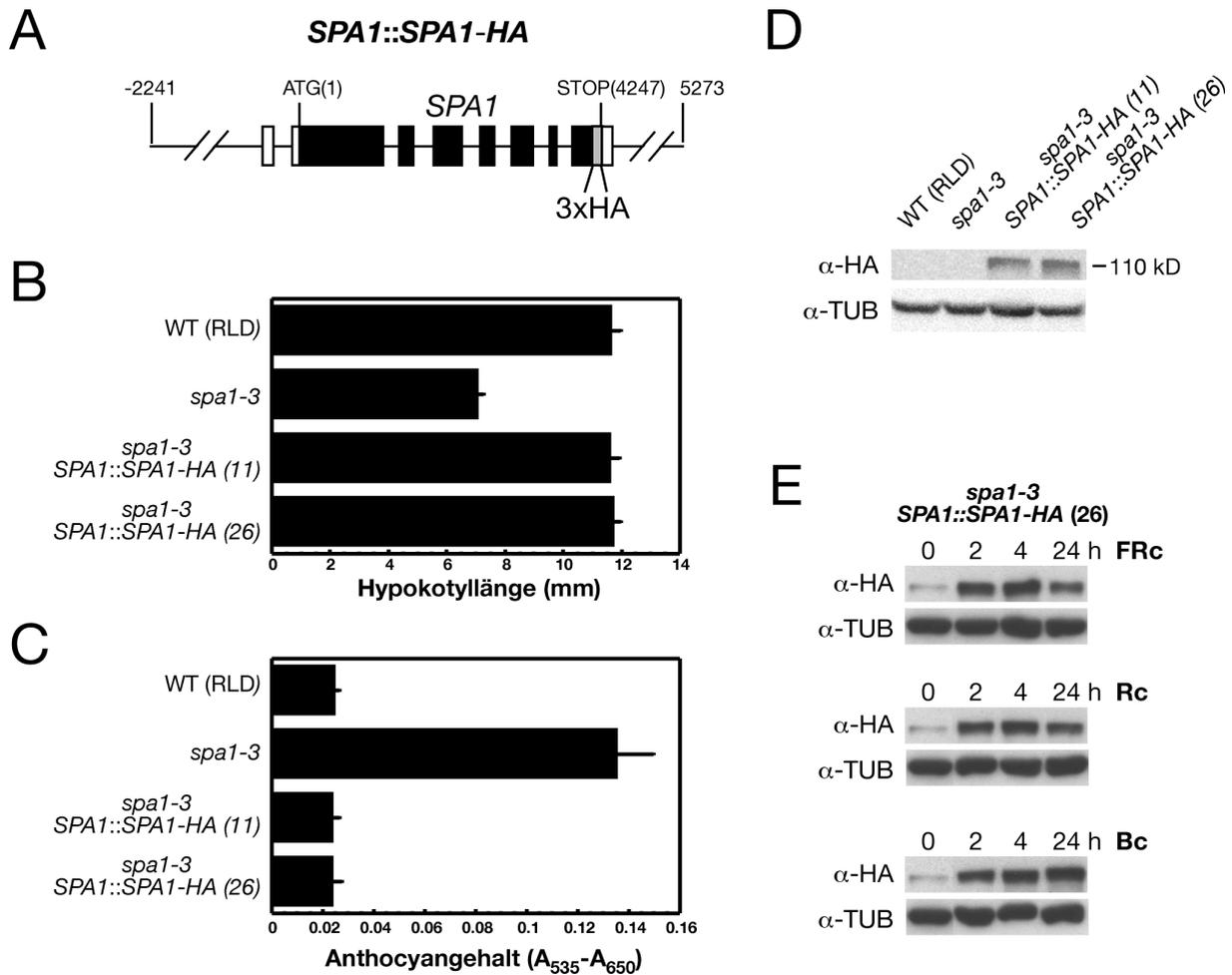


Abbildung 3.12: Die Abundanz des SPA1 Proteins wird durch Licht erhöht. (A) Schematische Darstellung des Konstruktes zur Rettung des *spa1* Phänotyps mit HA-Epitop-markiertem SPA1. (B-C) Hypokotyllängen (B) und Anthocyanengehalte (C) wildtypischer Keimlinge (WT), von *spa1* Mutanten und zwei unabhängigen *spa1 SPA1::SPA1-HA* Linien in dunkelrotem Licht (0,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (D) Westernanalyse von Proteinextrakten aus wildtypischen Keimlingen (WT), *spa1* Mutanten und zwei unabhängigen *spa1 SPA1::SPA1-HA* Linien. Die Membran wurde mit HA- oder, als Ladekontrolle, Tubulin (TUB)-spezifischen Antikörpern inkubiert. (E) Westernanalyse von Proteinextrakten aus *spa1 SPA1::SPA1-HA* transgenen Keimlingen, die sich für vier Tage in Dunkelheit entwickelten und für 0, 2, 4 oder 24 Stunden in dunkelrotes (FRc), hellrotes (Rc) oder blaues Licht (Bc) überführt wurden. Die Membranen wurden wie in (D) inkubiert.

Eine Westernanalyse von Gesamtproteinextrakten aus wildtypischen Keimlingen, *spa1* Mutanten und zwei verschiedenen *spa1 SPA1::SPA1-HA* Linien zeigte mit HA-spezifischen Antikörpern eine Proteinbande auf der erwarteten Höhe des SPA1-HA Proteins nur in den *spa1 SPA1::SPA1-HA* Linien (Abbildung 3.12 D). Um zu testen, ob die Abundanz des SPA1 Proteins durch Licht veränderbar ist, wurden Keimlinge von *spa1 SPA1::SPA1-HA* Linien für vier Tage im Dunkeln angezogen. Danach wurden die Keimlinge für 0, 2, 4 oder 24 Stunden in dunkelrotes, hellrotes oder blaues Licht überführt und die SPA1 Proteinmengen mittels Westernanalyse sichtbar gemacht. In allen drei untersuchten Lichtqualitäten waren die SPA1 Proteinmengen zwei Stunden nach der Lichtbehandlung erhöht (Abbildung 3.12 E). Die SPA1

Proteinmengen im Licht blieben im untersuchten Zeitraum (zwei bis 24 Stunden) auf einem gleichmäßig hohen Pegel im Vergleich zur Dunkelkontrolle (Abbildung 3.12 E). Eine Quantifizierung mit einem Phosphorimager ergab, dass die Proteinmengen im Licht um den Faktor 6 bis 8 im Vergleich zur Dunkelkontrolle erhöht waren.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die SPA1 Proteingehalte im Licht höher sind als in der Dunkelheit.

III.4.2 Das SPA2 Protein befindet sich konstitutiv im Zellkern

Die Aktivität einiger Faktoren der Signaltransduktion wird durch den Transport in oder aus dem Zellkern reguliert. Im Licht werden beispielsweise die Phytochrome in den Zellkern, der negative Regulator COP1 hingegen aus dem Zellkern transportiert (von Arnim und Deng, 1994; Kircher et al., 1999). Da die SPA Proteine direkt mit COP1 interagieren, stellt sich die Frage, ob die SPA Proteine, wie COP1, im Licht aus dem Zellkern transportiert werden.

Um diese Frage zu beantworten, wurden transgene Pflanzen erzeugt, die ein GUS-SPA2 Fusionsprotein unter der Kontrolle der 35S-Promotors exprimieren. Um zu testen, ob das GUS-SPA2 Protein funktionstüchtig ist, wurde die Lichtantwort von zwei unabhängigen *35S::GUS-SPA2* Linien und wildtypischen Keimlingen untersucht. Im hellrotem reagierten beide *35S::GUS-SPA2* Linien mit einer verstärkten Hypokotylelongation (Anhang Abbildung 1). In weißem Licht zeigten Keimlinge, die das *35S::GUS-SPA2* Transgen trugen, eine verminderte Antwort auf Licht im Vergleich zu wildtypischen Keimlingen (Abbildung 3.13 A). Ferner war das GUS-SPA2 Protein fähig, den Phänotyp einer *spa1 spa2* Mutante zu retten (Laubinger et al., 2004). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass das GUS-SPA2 Protein die Funktion des endogenen SPA2 Proteins übernehmen kann. Der Aufenthaltsort des GUS-SPA2 Proteins konnte über einen histochemischen Nachweis des GUS-Proteins bestimmt werden. Keimlinge, die als Kontrolle das GUS-Protein ohne Fusion mit SPA2 exprimierten, zeigten GUS-Aktivität im Cytosol der gesamten Zelle, vornehmlich um die Leitgefäße (Abbildung 3.13. B). Sowohl im Dunkeln als auch in verschiedenen Lichtqualitäten war das GUS-SPA2 Protein im Zellkern lokalisiert (Abbildung 3.13 C). Demnach lässt sich zusammenfassend feststellen, dass das SPA2 Protein konstitutiv im Zellkern lokalisiert ist.

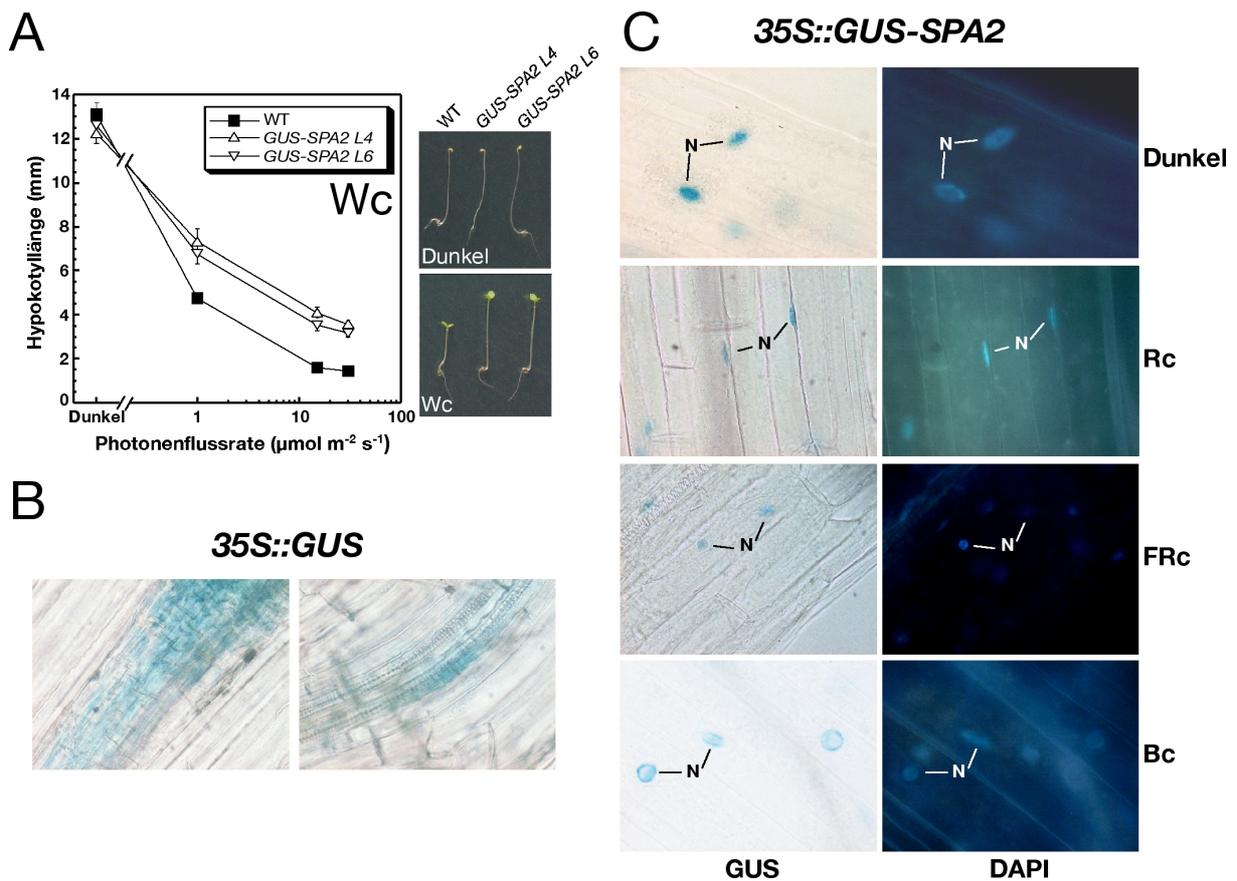


Abbildung 3.13: Das GUS-SPA2 Protein ist konstitutiv im Zellkern lokalisiert. (A) Hypokotyllängen von wildtypischen Keimlingen (WT) und zwei unabhängigen *GUS-SPA2* Linien im Dunkeln und in verschiedenen Intensitäten von weißem Licht. **(B)** Repräsentativer histochemischer Nachweis des GUS Proteins in Keimlingen, die sich im Licht entwickelt haben. **(C)** Repräsentativer histochemischer Nachweis des GUS-SPA2 Proteins in Keimlingen, die sich im Dunkeln, im hellroten (Rc, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), im dunkelroten (FRc, $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder im blauen Licht (Bc, $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entwickelt haben. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. N: Nukleus, Zellkern

III.4.3 Das GUS-SPA2 Protein ist nur in Anwesenheit von intaktem COP1 aktiv

Bisherige Studien haben ergeben, dass die SPA Proteine mit dem Repressor der Photomorphogenese COP1 direkt interagieren (Hoecker und Quail, 2001; Saijo et al., 2003; Laubinger und Hoecker, 2003; Laubinger et al., 2004). Das gegenwärtige Model geht davon aus, dass die Aktivität von COP1 durch die SPA Proteine in einer unbekanntem Weise verstärkt wird. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die SPA Proteine nur in Union mit COP1 wirken können. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein genetischer Ansatz gewählt. Die unter III.4.2 beschriebenen *GUS-SPA2* überexprimierenden Linien sind die ersten transgenen Linien, die ein *SPA* Gen überexprimieren und eine verminderte Reaktion auf Licht zeigen. Um zu testen, ob das *GUS-SPA2* Protein in Abwesenheit von COP1 wirkt, wurde eine *GUS-SPA2* Linie mit einer *cop1-4* Mutante gekreuzt. Die resultierende F₂-Population wurde im Dunkeln analysiert. In dieser Generation sind 25 % der Keimlinge homozygot für die *cop1-4* Mutation.

Aufgrund der dominanten Natur des GUS-SPA2 Transgens exprimieren 75 % dieser *cop1* Mutanten ein GUS-SPA2 Protein. Sollte das GUS-SPA2 Protein den Effekt einer *cop1-4* Mutation vollständig komplementieren können, würden nicht 25 % der Keimlinge, sondern 6,25 % der Keimlinge einen *cop1* Phänotyp zeigen.

Tabelle 3.4: Analyse des Effektes eines GUS-SPA2 Transgens in Abwesenheit von funktionellem COP1. Die F2-Population einer Kreuzung zwischen einer *cop1-4* Mutante und einer GUS-SPA2 Linie wurde in Dunkelheit oder in hellrotem Licht schwacher Intensität ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) analysiert. Die Anzahl der Keimlinge mit sehr kurzem Hypokotyl (*cop1* Phänotyp) wurde der Anzahl der Keimlinge mit langem Hypokotyl gegenübergestellt.

	n	Kurzes Hypokotyl (<i>cop1</i> Phänotyp)	Langes Hypokotyl	% aller Keimlinge mit <i>cop1</i> Phänotyp
Experiment 1 Dunkelheit	186	47 (davon zeigten 32 Keimlinge GUS-Aktivität)	139	25,2
Experiment 2 Dunkelheit	167	49	118	29,9
Experiment 3 Hellrotes Licht	106	25	81	23,6
Experiment 4 Hellrotes Licht	268	58	210	21,6

Im Dunkeln zeigten circa ein viertel aller Keimlinge einen *cop1-4* Phänotypen (Tabelle 3.4). Um auszuschließen, dass der fehlende Effekt des GUS-SPA2 Transgens auf eine fehlende Anwesenheit des GUS-SPA2 Proteins zurückzuführen ist, wurden die Keimlinge, die einen *cop1* Phänotypen zeigten, einer GUS-Färbung unterzogen. Ein Großteil der Keimlinge, die einen *cop1* Phänotypen zeigten, exprimierten das GUS-SPA2 Protein (Tabelle 3.4). Demnach ist das GUS-SPA2 Protein nicht in der Lage, den Phänotypen einer *cop1* Mutante im Dunkeln zu retten. Da Überexpression von GUS-SPA2 vor allem zu einer verminderten Reaktion in hellrotem Licht führt, wurde untersucht, ob dieser Effekt abhängig von funktionellem COP1 ist. Dafür wurde die F2-Population der Kreuzung zwischen einer *cop1-4* Mutante und einer GUS-SPA2 Linie in hellrotem Licht schwacher Intensität analysiert. Auch hier zeigten 21,6 % beziehungsweise 23,6 % aller Keimlinge den Phänotyp einer *cop1* Mutante. Demnach kann das GUS-SPA2 Protein auch im Licht den Phänotyp einer *cop1* Mutante nicht retten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das GUS-SPA2 Protein weder im Dunkeln noch im Licht den Verlust der Funktion von COP1 kompensieren kann.

IV. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktionen der *SPA* Gene näher zu untersuchen. *SPA1*, *SPA3* und *SPA4* waren bereits als negative Regulatoren der *phyA*-Signaltransduktion identifiziert worden (Laubinger und Hoecker, 2003; Hoecker et al., 1998). *SPA* Proteine interagieren mit dem zentralen Repressor der Photomorphogenese COP1 (Hoecker und Quail, 2001; Saijo et al., 2003, Laubinger und Hoecker, 2003; Laubinger, 2002). COP1 ist eine E3-Ubiquitinligase, die Faktoren der Lichtsignaltransduktion, wie die positiv wirkenden Transkriptionsfaktoren HY5 und HFR1, der Degradation durch das 26S-Proteasom zuführt.

IV.1 *SPA* Proteine hemmen die Photomorphogenese in Dunkelheit

Besonderes Augenmerk wurde zunächst auf die Charakterisierung von *SPA2* gelegt. Funktionen der anderen *SPA* Gene (*SPA1*, *SPA3* und *SPA4*) waren bereits durch Analyse von Mutanten bestimmt worden. *spa1*, *spa3* und *spa4* Mutanten zeigen im Keimlingsstadium eine hypersensitive Antwort auf Licht verschiedener Wellenlängen (Hoecker et al., 1998; Laubinger et al., 2003). In Dunkelheit sind *spa1*, *spa3* und *spa4* Mutanten hingegen nicht von wildtypischen Keimlingen zu unterscheiden (Hoecker et al., 1998, Laubinger und Hoecker, 2003). Demnach scheinen *SPA1*, *SPA3* und *SPA4* die Photomorphogenese speziell im Licht zu unterdrücken. *spa2* Mutanten waren weder in Dunkelheit noch in dunkelrotem, hellrotem oder blauem Licht verschiedener Intensitäten von wildtypischen Keimlingen zu unterscheiden (siehe III.1.1). Diese Beobachtung könnte durch zwei verschiedene Erklärungen gedeutet werden. Zum einen ist es möglich, dass das *SPA2* Gen keine Funktion in der Photomorphogenese besitzt. Demnach hätte ein Ausschalten des *SPA2* Gens auch keinen Effekt auf die Keimlingsentwicklung. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Funktion von *SPA2* in den *spa2* Mutanten durch andere *SPA* Gene übernommen wird. Für diese Hypothese sprechen verschiedene Beobachtungen. Eine Überexpression des *SPA2* Gens (als Fusion mit dem *GUS*-Gen) durch den starken, konstitutiven 35S Promotor führte zu einer hyposensitiven Reaktion auf Licht (siehe III.4.1). Demnach ist das *SPA2* Protein ein funktioneller Repressor der Photomorphogenese. Ferner zeigen alle *SPA* Proteine einen uniformen Aufbau der Proteindomänen (Kinase-ähnliche Domäne, Coiled-Coil-Domäne und WD-Repeat-Domäne; Laubinger und Hoecker, 2003). Zudem interagieren alle *SPA* Proteine mit der E3-Ubiquitinligase COP1 (Laubinger et al, 2004; Laubinger und Hoecker, 2003; Hoecker et al., 1999). Demnach könnte der Ausfall der Funktionen von *SPA2* durch die Funktionen von *SPA1*, *SPA3* und/oder *SPA4* ausgeglichen werden. Um die Frage einer möglichen funktionellen Redundanz der *SPA* Gene zu klären, wurden *spa* Mehrfachmutanten

erstellt. Da *spa2* Mutanten keine Veränderungen verglichen mit wildtypischen Keimlingen zeigten, sollte geklärt werden, ob ein zusätzlicher Verlust von *SPA1* eine Funktion von *SPA2* offenbart. *SPA1* wurde gewählt, da das SPA1 Protein die höchste Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu *SPA2* zeigt und beide Gene durch eine direkte Duplikation der entsprechenden Genomabschnitte entstanden sind (Laubinger und Hoecker, 2003; Simillion et al., 2002). Im Licht gewachsene Keimlinge von *spa1* Mutanten waren nicht von *spa1 spa2* Doppelmutanten zu unterscheiden. Hingegen wiesen in Dunkelheit angezogene *spa1 spa2* Doppelmutanten Zeichen von im Licht entwickelten Keimlingen auf. *spa1 spa2* Mutanten zeigten ein verkürztes Hypokotyl und geöffnete Kotyledonen in Dunkelheit. Weder *spa1* noch *spa2* Mutanten wiesen einen solchen Phänotyp auf (siehe III.1.2; Hoecker et al., 1998). Daher konnte geschlussfolgert werden, dass SPA1 und SPA2 eine redundante Funktion bei der Unterdrückung der Photomorphogenese in der Dunkelheit ausüben.

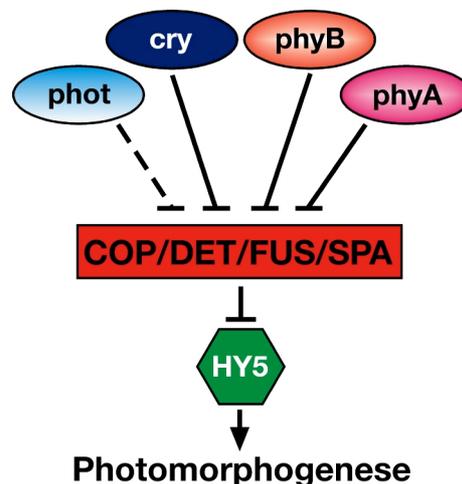


Abbildung 4.1 Die SPA Proteine unterdrücken die Photomorphogenese im Dunkeln und im Licht. Die SPA Proteine werden nicht als Modulatoren der Lichtsignaltransduktion betrachtet, sondern wirken wie die COP/DET/FUS Proteine als zentrale Repressoren der Lichtsignaltransduktion.

Der Effekt, den Mutationen in *SPA1* und *SPA2* auslösten, wurde durch den zusätzlichen Verlust der Funktion von *SPA3* und *SPA4* weiter verstärkt. Die *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten zeigten konstitutive Photomorphogenese ähnlich einer starken *cop/det/fus* Mutante. In Dunkelheit entwickelte *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten zeigten ein stark verkürztes Hypokotyl und weit geöffnete Kotyledonen. Diese Mutanten waren hinsichtlich ihrer Morphologie nicht von im Licht entwickelten Keimlingen zu unterscheiden. Im Licht zeigten *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten eine rötliche Färbung, die auf eine erhöhte Akkumulation von Anthocyanen zurückzuführen ist. Auf Ebene der Genexpression zeigten *spa* Mehrfachmutanten, die Photomorphogenese in der Dunkelheit unterlaufen, eine konstitutive Expression lichtregulierter Gene.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die SPA Proteine redundante Funktionen bei der Unterdrückung der Photomorphogenese in Dunkelheit ausüben (Abbildung 4.1). Damit ähnelt die Funktion der SPA Proteine der Funktion der COP/DET/FUS Proteine (Abbildung 4.1).

IV.2 SPA Proteine wirken zusammen mit der Ubiquitinligase COP1

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass SPA Proteine direkt mit COP1 interagieren (Saijo et al., 2003; Laubinger et al., 2004; Laubinger und Hoecker, 2003; Hoecker und Quail, 2001). Eine Hypothese war, dass SPA Proteine im Licht aktiv sind und dann die Funktion von COP1 in einer unbekanntem Weise verstärken (Laubinger und Hoecker, 2003; Hoecker und Quail, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anlass zu der Vermutung, dass SPA Proteine nicht nur im Licht, sondern auch in der Dunkelheit für die Aktivität von COP1 essentiell sind. COP1 wirkt nicht alleine, sondern ist Teil hochmolekularer Komplexe (Saijo et al., 2003). Ein essentieller Bestandteil dieser Komplexe könnten die SPA Proteine sein. Saijo et al. (2003) konnten zeigen, dass SPA1-Komplexe und COP1-Komplexe in Gelfiltrationsanalysen ko-fractionieren. Jedoch können erst Analysen der COP1-Komplexe in der *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante die Hypothese testen, ob SPA Proteine essentielle Bestandteile des COP1-Komplexes sind.

Eine andere interessante Fragestellung ist, ob SPA Proteine nur zusammen mit COP1 wirken können und vice versa. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein genetischer Ansatz verfolgt. Dafür wurden die *GUS-SPA2* überexprimierenden Linien, die eine hyposensitive Antwort auf Licht zeigen, mit einer überlebensfähigen *cop1* Mutante gekreuzt. Interessanterweise konnte sich der Phänotyp, der durch Überexpression von *GUS-SPA2* erzeugt wurde, nur in Anwesenheit von intaktem COP1 voll ausprägen. Diese Tatsache spricht für die Vermutung, dass das *GUS-SPA2* Protein nur zusammen mit der Ubiquitinligase COP1 seine volle Wirkung entfalten kann. Eine Überexpression des *GUS-SPA2* Proteins war nicht ausreichend, die photomorphogenetische Entwicklung der *cop1* Mutante in Dunkelheit zu unterdrücken. Das *GUS-SPA2* Protein ist jedoch in der Lage, die photomorphogenetische Entwicklung einer *spa1 spa2* Doppelmutante in Dunkelheit zu unterdrücken (Laubinger et al., 2004). Daher scheint der Wirkmechanismus von SPA Proteinen und von COP1 unterschiedlich zu sein.

Die Funktion der SPA Proteine innerhalb des COP1-Komplexes ist nicht bekannt. Jedoch haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass SPA1 einen Effekt auf die Ubiquitinligaseaktivität von COP1 in vitro hat (Seo et al., 2003; Saijo et al., 2003). Während die Coiled-Coil-Domäne von SPA1 die Ubiquitinligaseaktivität von COP1 zu dem Substrat

LAF1 erhöht, verringert das vollständige SPA1 Protein die Ubiquitinligaseaktivität von COP1 zu HY5 (Seo et al., 2003; Saijo et al., 2003). Aus diesen Ergebnissen sind Rückschlüsse auf den Einfluss der SPA Proteine auf die Ubiquitinligaseaktivität von COP1 in vivo nicht möglich. Da jedoch die HY5 und HFR1 Proteingehalte in *spa1* Mutanten erhöht sind (Jang et al., 2005b; Saijo et al., 2003), scheint SPA1 den Abbau dieser Transkriptionsfaktoren in vivo zu fördern.

Interessanterweise zeigen SPA Proteine und COP1 eine hohe Sequenzähnlichkeit im Bereich der WD-Repeat-Domäne (Hoecker et al., 1999; Laubinger und Hoecker, 2003). Die WD-Repeat-Domäne ist essentiell für die Interaktion mit verschiedenen Substraten, die von COP1 ubiquitiniert werden (Holm et al., 2001; Seo et al., 2004; Jang et al., 2005a). Dazu gehören unter anderem die Transkriptionsfaktoren HY5 und HFR1 sowie der Photorezeptor phyA (Holm et al., 2001; Seo et al., 2004; Yang et al., 2005; Jang et al., 2005a). Auch SPA1 interagiert mit HY5 über die WD-Repeat-Domäne (Saijo et al., 2003). Demnach ist es möglich, dass SPA Proteine für die Rekrutierung der Ubiquitinierungssubstrate innerhalb des COP1-Komplexes notwendig sind. SPA Proteine könnten nicht nur die Bindung von Ubiquitinierungssubstraten, sondern auch die Bindung weiterer, noch unbekannter, Untereinheiten des COP1/SPA-Komplexes herbeiführen. Auf diese Weise könnten SPA Proteine die Assemblierung oder die Stabilität des COP1/SPA-Komplexes kontrollieren.

Eine weitere alternative Funktion der SPA Proteine könnte in der N-terminalen Region der SPA Proteine verborgen sein. Der N-Terminus der SPA Proteine zeigt eine geringe Ähnlichkeit zu Serin/Threonin Kinasen (Hoecker et al., 1999; Laubinger und Hoecker, 2003). Demnach könnten SPA Proteine für Phosphorylierungsreaktionen innerhalb des COP1-Komplexes verantwortlich sein. Duek et al. (2004) konnten zeigen, dass das Ubiquitinierungssubstrat HFR1 phosphoryliert wird. Die phosphorylierte Form von HFR1 wird präferentiell abgebaut (Duek et al., 2004). Erst die Analysen des Phosphorylierungsstatus von Proteinen wie HFR1 in *spa* Mutanten und in vitro Kinase-Analysen mit SPA Proteinen werden Aufschluss über die mögliche Kinaseaktivität der SPA Proteine geben.

SPA Proteine könnten auch die Akkumulation von COP1 im Zellkern kontrollieren. Im Gegensatz zu COP1 sind andere Komponenten, die für die Unterdrückung der Photomorphogenese im Licht verantwortlich sind, wie DET1, COP9 oder COP10 konstitutiv im Zellkern lokalisiert (Pepper et al., 1994; Chamovitz et al., 1996; Suzuki et al., 2002). Auch das GUS-SPA2 Protein akkumulierte in Dunkelheit und in allen untersuchten Lichtqualitäten im Zellkern (siehe III.4.2). Mutationen in *COP9*, *COP10* und *DET1* verringern die Abundanz von COP1 im Zellkern im Licht und in der Dunkelheit (von Arnim et al., 1997). Jedoch könnte dieser Effekt indirekt sein, da in *cop9*, *cop10* oder *det1* Mutanten die Lichtsignaltransduktion, die zu einem Ausschluss von COP1 aus dem Zellkern führt, konstitutiv abläuft. Demnach

besteht die Möglichkeit, dass auch *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmутanten, die konstitutive Photomorphogenese unterlaufen, einen indirekten Defekt in der nukleären Akkumulation von COP1 zeigen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass SPA Proteine in einem Komplex mit COP1 wirken (Abbildung 4.2). Dabei könnten die SPA Proteine verschiedene Aufgaben übernehmen. SPA Proteine könnten 1. die Ubiquitinligaseaktivität von COP1 erhöhen, 2. die Substratspezifität des Ubiquitinligasekomplexes übernehmen, 3. die Assemblierung und Stabilität des COP1/SPA-Komplexes kontrollieren, 4. als Kinase wirken, und Ubiquitinierungs-substrate phosphorylieren und/oder 5. die subzelluläre Lokalisation von COP1 beeinflussen (Abbildung 4.2).

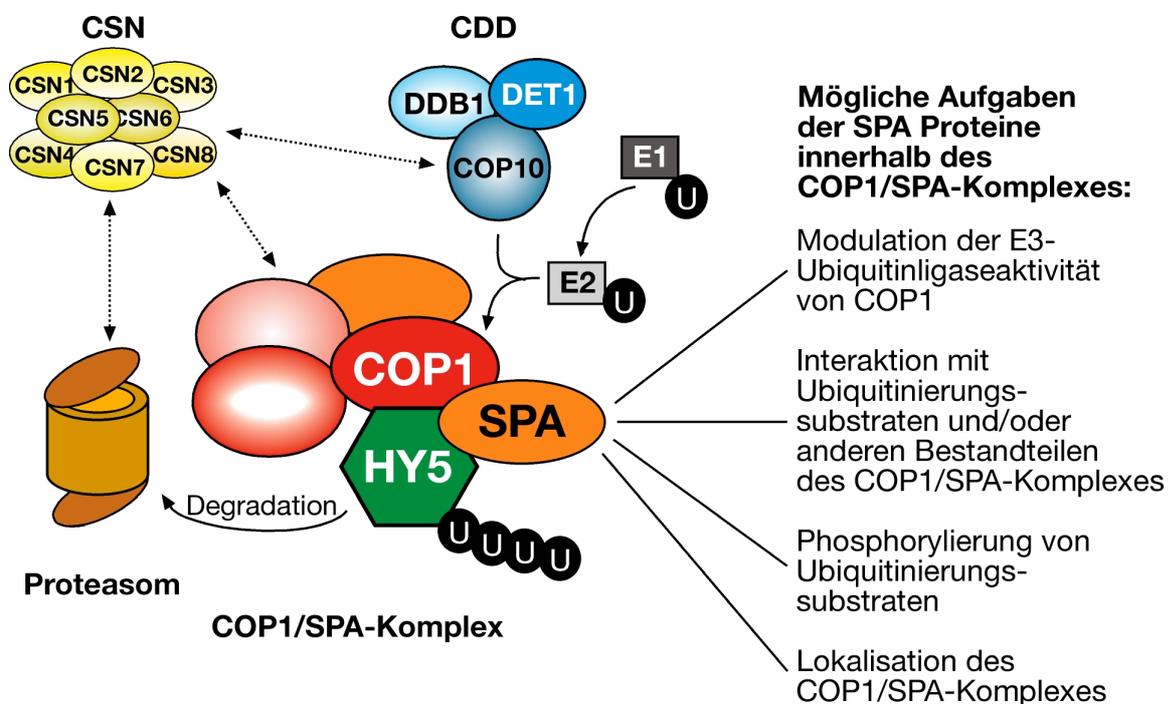


Abbildung 4.2: SPA Proteine sind wichtige Bestandteile des COP1-Komplexes. Die SPA-Proteine könnten innerhalb des Komplexes für verschiedene Funktionen notwendig sein.

IV.3 Die Funktion der SPA Gene in der phyA-spezifischen Keimlingsentwicklung

Frühe Untersuchungen haben SPA1 als negativen Regulator der phyA-Signaltransduktion identifiziert (Hoecker et al., 1998). Auch die Phänotypen von *spa3* oder *spa4* Mutanten können sich nur in Gegenwart von intaktem phyA voll ausprägen (Laubinger und Hoecker, 2003). Es wurde daher postuliert, dass die Aktivität von SPA1, SPA3 und SPA4 entweder direkt durch Licht kontrolliert wird oder SPA1, SPA3 und SPA4 eine spezifische Aufgabe in der phyA Lichtsignaltransduktion ausüben. Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Arbeiten

scheinen diese Hypothesen jedoch zu widerlegen (Parks et al., 2001). Im Gegensatz zu *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten waren *spa2 spa3 spa4* Tripelmutanten, die nur intaktes SPA1 enthalten, in Dunkelheit nicht von wildtypischen Keimlingen zu unterscheiden. Diese Tatsache zeigt, dass SPA1 eine wichtige Aufgabe in Abwesenheit von Licht wahrnimmt. Ferner war der frühblühende Phänotyp der *spa1* Mutante nicht abhängig von phyA. Diese Tatsachen sprechen dafür, dass SPA1 weder durch phyA aktiviert werden muss, noch spezifisch in der phyA-Signaltransduktion wirkt, sondern nur eine wichtige Aufgabe in der phyA-Signaltransduktion im Keimlingsstadium spielt.

Der genaue Mechanismus der phyA-abhängigen Inaktivierung von COP1 ist nicht bekannt. phyA ist für den Ausschluss von COP1 aus dem Zellkern speziell in dunkelrotem Licht verantwortlich (Osterlund und Deng, 1998). Jedoch beginnt der Ausschluss von COP1 aus dem Zellkern erst circa 12 Stunden nach der Lichteinwirkung und ist erst nach 36 Stunden abgeschlossen (von Arnim et al., 1997). In Keimlingen, die 6 Stunden dunkelrotem Licht ausgesetzt wurden, ist jedoch der Transkriptionsfaktor HFR1 bereits stabilisiert (Jang et al., 2005a). Demnach scheint es einen weiteren phyA-abhängigen Mechanismus zu geben, der die Aktivität von COP1 drosselt (Jang et al., 2005a). Ein möglicher Mechanismus, der zu früheren Zeitpunkten der Signaltransduktion wirkt, könnte die direkte Interaktion von phyA mit COP1 sein (Seo et al., 2004). COP1 wiederum desensibilisiert die phyA-Signaltransduktion, indem es phyA ubiquitiniert und es der Degradation durch das 26S-Proteasom zuführt (Seo et al., 2004). Innerhalb dieses Modells könnten SPA Proteine verschiedene Aufgaben in der phyA-Signaltransduktion wahrnehmen. Auch SPA1 wirkt früh in der phyA-Signaltransduktion, denn HFR1 akkumuliert nach vierstündiger Bestrahlung mit dunkelrotem Licht stärker in *spa1* Mutanten als im Wildtyp (Jang et al., 2005b). Sollten die WD-Repeat-Domäne der SPA Proteine, ähnlich wie die WD-Repeat-Domäne von COP1, mit phyA wechselwirken, könnten SPA Proteine an der Erkennung von phyA als Substrat der Ubiquitinligase COP1 beteiligt sein. *spa1* Mutanten zeigen jedoch keine veränderten phyA Proteinmengen verglichen mit dem Wildtyp (Hoecker et al., 1998). Alternativ könnten SPA Proteine die durch phyA vermittelte Inaktivierung von COP1 vermindern. Da Licht jedoch die Abundanz des SPA1 Proteins verstärkt (siehe III.4.1), könnte SPA1 mehr phyA binden, als COP1, das in seiner Expression nicht durch Licht reguliert ist (Deng et al., 1992). Dieses Astitrieren von phyA durch SPA1 könnte COP1 vor einer zu schnellen Inaktivierung durch phyA schützen. In *spa1* Mutanten hingegen wird COP1 direkt durch phyA inaktiviert.

Alternativ könnten SPA Proteine an der Degradation von phyA-spezifischen Signalintermediaten wie LAF1 beteiligt sein oder die nukleäre Akkumulation von phyA regulieren. Jedoch können erst Versuche, die die Abundanz verschiedener phyA-spezifischer Signalintermediate oder die phyA Akkumulation im Zellkern in *spa* Mutanten feststellen,

einen genauen Aufschluss über die Wirkmechanismen der SPA Proteine in der phyA-Signaltransduktion geben.

IV.4 Die Funktion der SPA Proteine in der vegetativen Pflanzenentwicklung

Überlebensfähige *cop/det/fus* Mutanten zeigen nicht nur konstitutive Photomorphogenese, sondern auch Zwergwuchs in adulten Entwicklungsstadien. *cop/det/fus* Nullmutanten hingegen sind letal und sterben kurz nach der Keimlingsentwicklung (McNellis et al., 1994; Wei und Deng, 1992). *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten zeigten konstitutive Photomorphogenese wie *cop/det/fus* Mutanten, waren jedoch überlebensfähig. Diese Beobachtung kann zwei verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es sich bei der *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante nicht um eine *spa* Null-Quadrupelmutante handeln. Die T-DNA-Insertionen in den verwendeten *spa2* und *spa4* Mutanten sind im letzten Intron beziehungsweise letzten Exon lokalisiert. Beide Mutanten akkumulieren eine mRNA mit einer im Vergleich zum Wildtyp veränderten Größe (Laubinger und Hoecker, 2003; Fittinghoff, 2003). Beide mRNAs könnten zu partiell funktionstüchtigen Proteinen translatiert werden. *cop1* Mutanten, die einen Defekt im Bereich der WD-Repeat-Domäne aufweisen, zeigen den gleichen Phänotyp wie *cop1* Nullmutanten (McNellis et al., 1994). Man kann jedoch nicht ausschließen, dass in der verwendeten *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante veränderte SPA Proteine gebildet werden, die eine Restfunktion ausüben können. Eine alternative Erklärung für die Überlebensfähigkeit der *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante könnte sein, dass SPA Proteine für die Überlebensfähigkeit von Pflanzen nicht notwendig sind. Der COP1-Komplex könnte auch ohne ein funktionelles SPA Protein eine Grundaktivität besitzen, die ausreichend für ein Überleben der Pflanze ist. Für diese Hypothese ist die Beobachtung interessant, dass COP1 in Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien Homodimere bilden kann (Torii et al., 1998). Die Homodimerisierung von COP1 wird von der Coiled-Coil-Domäne, und in geringem Maße von der RING-Finger-Domäne, vermittelt (Torii et al., 1998). In wildtypischen Pflanzen konnte durch Gelfiltrationsanalysen kein COP1 Homodimer in vivo nachgewiesen werden (Saijo et al., 2003). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass das aktive Zentrum des COP1-Komplexes aus einem COP1-Homodimer besteht, oder dass die Homodimerisierung von COP1 ein transientes Phänomen ist. In einer *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante könnte jedoch dieses aktive COP1-Homodimer oder die transiente Homodimerisierung von COP1 ein Überleben der Pflanzen gewährleisten.

Über die Wirkung des COP1-SPA Komplexes in adulten Pflanzen ist wenig bekannt. Auch in diesem Entwicklungsstadium scheinen die Photorezeptoren eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung des Komplexes zu spielen. Überexpression von *phyA* und *cry1* führt zu

Zwergwachstum in adulten Entwicklungsstadien (Jordan et al., 1995; Lin et al., 1996). Ähnlich wie *phyA* interagiert *cry1* direkt mit der WD-Repeat-Domäne von COP1 und hemmt die Funktion von COP1 (Yang et al., 2001; Wang et al., 2001). Auch eine Interaktion zwischen *SPA1* und *cry1* konnte in Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien beobachtet werden (Kulajta, 2002). Demnach ist es möglich, dass *crys* die Funktion der SPA Proteine in adulten Entwicklungsstadien durch eine direkte Interaktion unterdrücken. Über die Substrate des COP1/SPA-Komplexes in vegetativen Entwicklungsstadien ist nicht viel bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor HFR1 eine wichtige Rolle in der vegetativen Entwicklung spielt (Sessa et al., 2005). *hfr1* Mutanten zeigen unter anderem stark verlängerte Petiolen (Sessa et al., 2005). Demnach ist möglich, dass die reduzierte Pflanzengröße von *cop1* und *spa* Quadrupelmutanten zum Teil durch eine verstärkte Akkumulation von HFR1 verursacht wird. Ferner zeigen Pflanzen, die CO überexprimieren, neben einer verfrühten Blütenbildung auch eine reduzierte Pflanzengröße (Onouchi et al., 2000). Da auch CO ein mögliches Substrat des COP/SPA-Komplexes ist (siehe IV.5), könnte die reduzierte Pflanzengröße der *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutante auch auf erhöhte CO Proteingehalte zurückzuführen sein.

IV.5 Die Rolle der SPA Proteine bei der Induktion der Blütenbildung

In der fakultativen Langtagpflanze *Arabidopsis* fördern lange Tage, wie sie im Frühling und Sommer herrschen, die Blütenbildung. In kurzen Tagen, wie sie im Winter herrschen, wird jedoch die Blütenbildung unterdrückt und damit verlangsamt. Die Gruppe der COP/DET/FUS Proteine reguliert nicht nur die Keimlingsentwicklung und das vegetative Wachstum, sondern auch die photoperiodische Induktion der Blütenbildung (McNellis et al., 1994; Pepper und Chory, 1997). In kurzen Tagen blühten *spa1* Mutanten und *spa1 spa3 spa4* Tripelmutanten sehr viel früher als wildtypische Pflanzen. Demnach wird die Induktion der Blütenbildung in kurzen Tagen in diesen Mutanten nicht mehr unterdrückt. Interessanterweise blühten *spa2 spa3 spa4* Tripelmutanten in kurzen Tagen zum gleichen Zeitpunkt wie wildtypische Pflanzen. Daher ist ein funktionelles *SPA1* Gen ausreichend für eine Repression der Blütenbildung in kurzen Tagen.

Ein wichtiger positiver Regulator der Blütenbildung ist FT (Samach et al., 2000; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Pflanzen, die sich in langen Tagen entwickeln, akkumulieren höhere *FT* Transkriptmengen als Pflanzen, die sich in kurzen Tagen entwickeln (Yanovsky und Kay, 2002; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Die frühblühenden *spa1* Mutanten und *spa1 spa3 spa4* Tripelmutanten zeigten im Vergleich mit dem Wildtyp eine stark erhöhte Akkumulation der *FT* mRNA in kurzen Tagen. Hingegen

zeigten *spa2 spa3 spa4* Mutanten, die in kurzen Tagen zum gleichen Zeitpunkt wie wildtypische Pflanzen zur Blüte gelangten, keine veränderten *FT* mRNA-Pegel. Demnach scheinen die erhöhten *FT* mRNA-Pegel für die verfrühte Blütenbildung der *spa1* Mutante und der *spa1 spa3 spa4* Tripelmutante verantwortlich zu sein. *FT* induziert im Sprossapex zusammen mit dem bZIP-Transkriptionsfaktor *FD* die Expression von *SOC1* und *AP1* (Wigge et al., 2005; Abe et al., 2005; Moon et al., 2005; Samach et al., 2000; Yoo et al., 2005). Die *SOC1* mRNA-Gehalte waren in der frühblühenden *spa1* Mutante jedoch nicht, oder in *spa1 spa3 spa4* Mutante nur leicht erhöht. Da *SOC1* ein direktes Zielgen von *FT* ist (Yoo et al., 2005), würde man in *spa* Mutanten mit erhöhten *FT* mRNA-Gehalten auch erhöhte *SOC1* mRNA-Pegel erwarten. Da die Expression von *SOC1* vornehmlich im Sprossapex induziert wird (Samach et al., 2000), könnte das im Rahmen dieser Arbeit gewählte Ausgangsmaterial (gesamte Pflanzen) für die RNA-Analysen suboptimal gewesen sein.

Die Expression von *FT* kann durch CO gefördert oder durch FLC reprimiert werden (Michaels et al., 2005; Samach et al., 2000; Wigge et al., 2005; Kardailsky et al., 1999). Die *FLC* mRNA-Gehalte waren jedoch in *spa1* Mutanten verglichen mit dem Wildtyp nicht verändert. In *spa1 spa3 spa4* und *spa2 spa3 spa4* Tripelmutanten waren die *FLC* mRNA-Pegel verglichen mit dem Wildtyp sogar leicht erhöht. Demnach sind Veränderungen in der mRNA-Abundanz des Repressor *FLC* nicht für die verfrühte Blütenbildung von *spa1* Mutanten und *spa1 spa3 spa4* Tripelmutanten verantwortlich.

Die photoperiodische Induktion der Blütenbildung wird durch CO, das die Transkription von *FT* aktivieren kann, gefördert (Wigge et al., 2005; Samach et al., 2000; Kardailsky et al., 1999; Putterill et al., 1995). Die *CO* mRNA-Pegel werden durch die zirkadiane Uhr reguliert und erreichen in kurzen Tagen ihre stärkste Abundanz in der Nachtphase (Suarez Lopez et al., 2001). Das gebildete CO Protein ist jedoch nur im Licht stabil (Valverde et al., 2004). Eine der einfachsten Erklärungen für die Erhöhung der *FT* Transkriptmengen in *spa1* Mutanten und *spa1 spa3 spa4* Tripelmutanten und die damit verbundene verfrühte Blütenbildung in kurzen Tagen wäre ein verändertes Expressionsmuster von *CO*, wie man es zum Beispiel in den frühblühenden *toc1* Mutanten findet (Yanovsky und Kay, 2002). *spa1* Mutanten und *spa1 spa3 spa4* Tripelmutanten zeigten jedoch verglichen mit dem Wildtypen keine Veränderungen in der *CO* mRNA-Akkumulation (siehe III.3.4). Die erhöhten *FT* mRNA-Pegel und der damit verbundene frühblühende Phänotyp der *spa1* Mutanten in kurzen Tagen prägten sich nur in Gegenwart von funktionellem *CO* aus. Da Mutationen im *SPA1* Gen nicht zu einer Veränderung der *CO* mRNA-Expression führen, könnte durch sie die Aktivität des CO Proteins beeinflusst werden. CO wird in Dunkelheit ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert (Valverde et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die SPA Proteine und

COP1 in vitro mit CO interagieren. Daher könnte CO ein Ubiquitinierungssubstrat des COP1/SPA-Komplexes sein. Tatsächlich akkumulieren *spa1* und *cop1* Mutanten erhöhte CO Proteinmengen (mündliche Mitteilung, Virginie Marchal, MPIZ Köln). Demnach könnte der COP1/SPA-Komplex für die Degradation von CO vor allem in kurzen Tagen verantwortlich sein (Abbildung 4.3 A). Außerdem sind die mRNA-Pegel einiger SPA Gene in den Abendstunden wie die von CO erhöht. Diese Beobachtung verstärkt die Hypothese, dass SPA Proteine eine wichtige Rolle im tageszeitlichen Abbau von CO spielen.

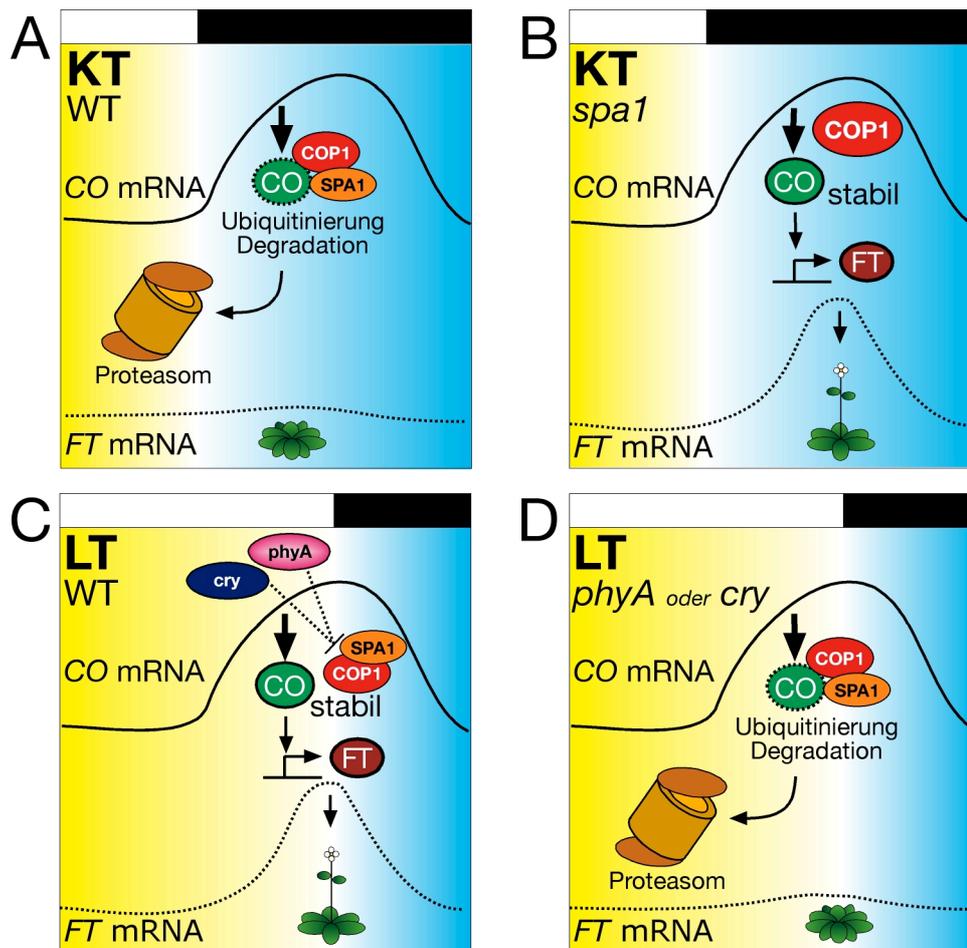


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Rolle des COP1/SPA-Komplexes am Beispiel von SPA1 in der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung. (A) Wildtypische Pflanzen, die sich in kurzen Tagen entwickeln. **(B)** *spa1* Mutanten, die sich in kurzen Tagen entwickeln. **(C)** Wildtypische Pflanzen, die sich in langen Tagen entwickeln. **(D)** *phyA* oder *cry* Mutanten, die sich in langen Tagen entwickeln.

Verantwortlich für die Stabilisierung von CO in der Lichtphase langer Tage sind die Photorezeptoren *phyA*, *cry1* und *cry2* (Valverde et al., 2004; Abbildung 4.3 C). Sollte der COP1/SPA-Komplex für die Degradation von CO verantwortlich sein, könnte die Stabilisierung von CO durch Licht auf einer direkten Inaktivierung des COP1/SPA-Komplexes durch die Photorezeptoren *phyA*, *cry1* und *cry2* beruhen (Abbildung 4.3 C). Ein möglicher Inaktivierungsmechanismus ist die Interaktion der Photorezeptoren mit dem COP1/SPA-

Komplex (beschrieben unter IV.3 und IV.4). Ein Indiz für die Hypothese, dass die Photorezeptoren die Aktivität des COP1/SPA-Komplexes im Licht drosseln und damit die Stabilität von CO erhöhen, ist die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete genetische Interaktion zwischen der *phyA* und der *spa1* Mutation. Sollte *phyA* die Aktivität von SPA1 im Licht hemmen, würde in *phyA* Mutanten die erhöhte Aktivität von SPA1 zu einer verspäteten Blütenbildung führen (Abbildung 4.3 D). Tatsächlich blühten *phyA* Mutanten spät in langen Tagen, und dieser Phänotyp konnte sich nur in Gegenwart von intaktem SPA1 voll ausprägen (siehe III.3.2). Deshalb könnte *phyA* in wildtypischen Pflanzen die Aktivität von SPA1 direkt hemmen und so die Blütenbildung in langen Tagen induzieren (Abbildung 4.3 C).

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass SPA Proteine eine wichtige Rolle in der Hemmung der Blütenbildung in kurzen Tagen spielen. CO, das die Blütenbildung in langen Tagen fördert, wird in kurzen Tagen ubiquitiniert und abgebaut. Verantwortlich für diesen Prozess könnte der COP1/SPA-Komplex sein. Die CO-stabilisierende Wirkung der Photorezeptoren *phyA*, *cry1* und *cry2* in langen Tagen könnte auf einer Inaktivierung des COP1/SPA-Komplexes beruhen.

IV.6 Die Existenz von vier SPA Proteinen könnte Pflanzen eine optimale Anpassung an veränderte Umweltbedingungen ermöglichen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die wichtigen Funktionen der SPA Proteine bei der Hemmung der Photomorphogenese in der Dunkelheit und im Licht, der vegetativen Entwicklung und der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung aufgedeckt werden. Dabei üben die SPA Proteine redundante, aber auch distinkte Funktionen, aus. Um die distinkten Funktionen jedes einzelnen SPA Gens zu ermitteln, ist eine Analyse der entsprechenden *spa* Einzelmutanten nicht ausreichend. Um beispielsweise die Funktion von SPA1 zu bestimmen, ist es nicht ausreichend, *spa1* Einzelmutanten zu analysieren, weil der Verlust der Funktionen von SPA1 durch die Funktionen von SPA2, SPA3 und/oder SPA4 übernommen werden könnte. Daher wurde für die Bestimmung der Funktion von SPA1 eine *spa2 spa3 spa4* Tripelmutante analysiert, die nur funktionelles SPA1 besitzt.

Die Analyse von Mutanten, die nur funktionelles SPA1, SPA2, SPA3 oder SPA4 enthalten, hat ergeben, dass SPA1 und SPA2 ausreichend für die Unterdrückung der Photomorphogenese in Dunkelheit sind. Für die Unterdrückung der Photomorphogenese im Licht ist kein einzelnes SPA Protein ausreichend, jedoch wird dieser Prozess vor allem von SPA1 und in geringerem Maße von SPA3 und SPA4 reguliert. Für eine wildtypische vegetative Entwicklung ist ein funktionelles SPA3 oder SPA4 ausreichend. SPA1 hingegen ist ausreichend für eine Hemmung der Blütenbildung in kurzen Tagen (Abbildung 4.4).

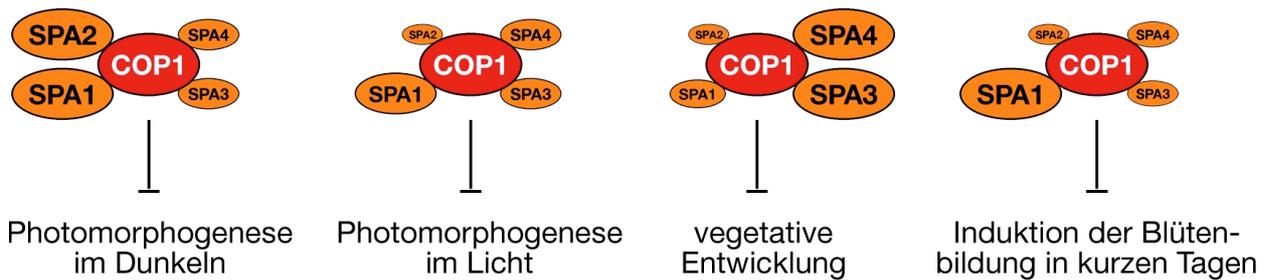


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Funktionen der SPA Proteine in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die vier SPA Proteine könnten durch Expressionsunterschiede ihrer entsprechenden Gene oder durch Unterschiede in ihrer Proteinsequenz distinkte Funktionen in der Entwicklung von Arabidopsis übernehmen.

Die unterschiedlichen Funktionen der SPA Gene sind zum Teil auf eine unterschiedliche SPA Genexpression zurückzuführen (Fittinghoff et al., 2006). Die SPA1, SPA3 und SPA4 mRNA-Mengen, jedoch nicht die SPA2 mRNA-Mengen, werden im Keimlingsstadium durch Licht erhöht (Fittinghoff et al., 2006). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Beobachtung, dass SPA2 die Photomorphogenese in der Dunkelheit, aber nicht im Licht hemmt. Auch in adulten Entwicklungsstadien zeigen sich Unterschiede in der Expression der SPA Gene. In adulten Pflanzen wird SPA3 von allen SPA Genen am stärksten exprimiert (Fittinghoff et al., 2006). Diese Beobachtungen korrelieren mit der größeren Bedeutung von SPA3 in der vegetativen Entwicklung. Hingegen können die Transkriptanalysen nicht die enorme Bedeutung von SPA1 in der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung erklären. Die SPA1 Transkriptmengen akkumulierten zwar in den Abendstunden, jedoch zeigten auch die Transkriptmengen von SPA3 eine Erhöhung in den Abendstunden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass CO im Phloem der Blätter wirkt und dort die Expression von FT induziert (An et al., 2004). Demnach wäre es möglich, dass nicht nur die Expressionsstärke der SPA Gene zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung, sondern auch das Gewebe, in dem SPA Gene exprimiert werden, von großer Bedeutung ist. Alternativ könnten auch Unterschiede in den Proteinsequenzen der verschiedenen SPA Proteine Auswirkungen auf deren Funktion haben.

Die Gruppe der COP/DET/FUS/SPA Proteine unterdrücken nicht nur die Photomorphogenese im Dunkeln, sondern regulieren auch die Keimlingsentwicklung im Licht, die vegetative Entwicklung und die Induktion der Blütenbildung (McNellis et al., 1994; Nakagawa und Komeda, 2004; Ma et al., 2003, Feng et al., 2003; Wang et al., 2003, Mao et al., 2005). Im Gegensatz zu den SPA Genen liegen Gene wie DET1, COP1 oder COP10 nur in einfacher Kopienzahl im Genom von Arabidopsis vor und werden in ihrer Expression nicht durch Licht beeinflusst (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Pepper et al., 1994;

Chamovitz et al., 1996; Suzuki et al., 2002; Deng et al., 1992). Die *SPA* Gene sind durch direkte Duplikationen auseinander hervorgegangen (Simillion et al., 2002). Dies könnte der Evolution ermöglicht haben, die neu entstanden *SPA* Gene zu sub- oder neofunktionalisieren. Im Laufe der Evolution könnte durch Veränderungen der zeitlichen und/oder räumlichen Expression der *SPA* Gene sowie Veränderungen der Proteinsequenzen der *SPA* Proteine eine optimale Anpassung der Pflanzen an die gegenwärtigen Lichtverhältnisse gewährleistet werden (Abbildung 4.4).

V. Zusammenfassung

Die Lichtsignaltransduktion wird in Pflanzen während der Dunkelheit durch den zentralen Repressor COP1 unterdrückt. Dadurch zeigen *cop1* Mutanten eine konstitutive Lichtantwort und entwickeln sich in Dunkelheit wie im Licht gewachsene Keimlinge. COP1 ist eine E3-Ubiquitinligase, die positiv wirkende Faktoren der Lichtsignaltransduktion der Degradation durch das 26S-Proteasom zuführt. COP1 wirkt nicht als Monomer, sondern ist Teil hochmolekularer Komplexe. Interaktionspartner von COP1 sind unter anderen die vier SPA Proteine (SPA1-SPA4). Die SPA Proteine beeinflussen die E3-Ubiquitinligaseaktivität von COP1 und binden Substrate, die von COP1 ubiquitiniert werden. *spa1*, *spa3* und *spa4* Mutanten zeigen im Keimlingsstadium eine verstärkte Reaktion auf Licht, sind in Dunkelheit jedoch nicht von wildtypischen Keimlingen zu unterscheiden. Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei den SPA Proteinen um negative Regulatoren handelt, die die Lichtsignaltransduktion nur im Licht hemmen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der SPA Proteine näher untersucht werden. Da alle SPA Proteine mit COP1 interagieren und eine hohe Sequenzhomologie auf Aminosäureebene aufweisen, wurde vermutet, dass SPA Proteine redundante Funktionen ausüben. Tatsächlich zeigten *spa1 spa2 spa3 spa4* Quadrupelmutanten ähnlich wie *cop1* Mutanten eine konstitutive Lichtantwort. SPA Proteine unterdrücken deshalb die Lichtsignaltransduktion nicht nur im Licht, sondern auch in der Dunkelheit. Durch die *spa* Mehrfachmutanten konnte außerdem gezeigt werden, dass SPA Proteine nicht nur die Keimlingsentwicklung regulieren, sondern auch das vegetative Wachstum adulter Pflanzen und die photoperiodische Induktion der Blütenbildung steuern. Es war bekannt, dass bei wildtypischen Arabidopsis-Pflanzen die Blütenbildung abhängig von der Tageslänge durch CONSTANS (CO) gefördert wird. CO aktiviert im Langtag die Transkription von *FT*, einem positiven Regulator der Blütenbildung. In kurzen Tagen wird das CO Protein abgebaut und die Blütenbildung wird daher nicht induziert. Verschiedene der untersuchten *spa* Mutanten gelangten jedoch in kurzen Tagen früh zur Blüte. Es konnte gezeigt werden, dass frühblühende *spa* Mutanten auch in kurzen Tagen stark erhöhte *FT* Transkriptmengen aufwiesen, ohne die mRNA-Pegel von *CO* zu beeinflussen. Da der frühblühende Phänotyp der *spa1* Mutante jedoch abhängig von intaktem CO war, wurde vermutet, dass SPA Proteine die Aktivität des CO Proteins in kurzen Tagen posttranslational kontrollieren. Durch Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass alle SPA Proteine und COP1 in vitro direkt mit CO interagieren. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass SPA Proteine zusammen mit der Ubiquitinligase COP1 die Stabilität des CO Proteins in kurzen Tagen kontrollieren. Die SPA Proteine spielen deshalb zusammen mit der Ubiquitinligase COP1 zentrale Rollen in der Kontrolle von pflanzlichen Entwicklungsprozessen wie der Keimlingsentwicklung, der vegetativen Entwicklung und der photoperiodischen Blühinduktion.

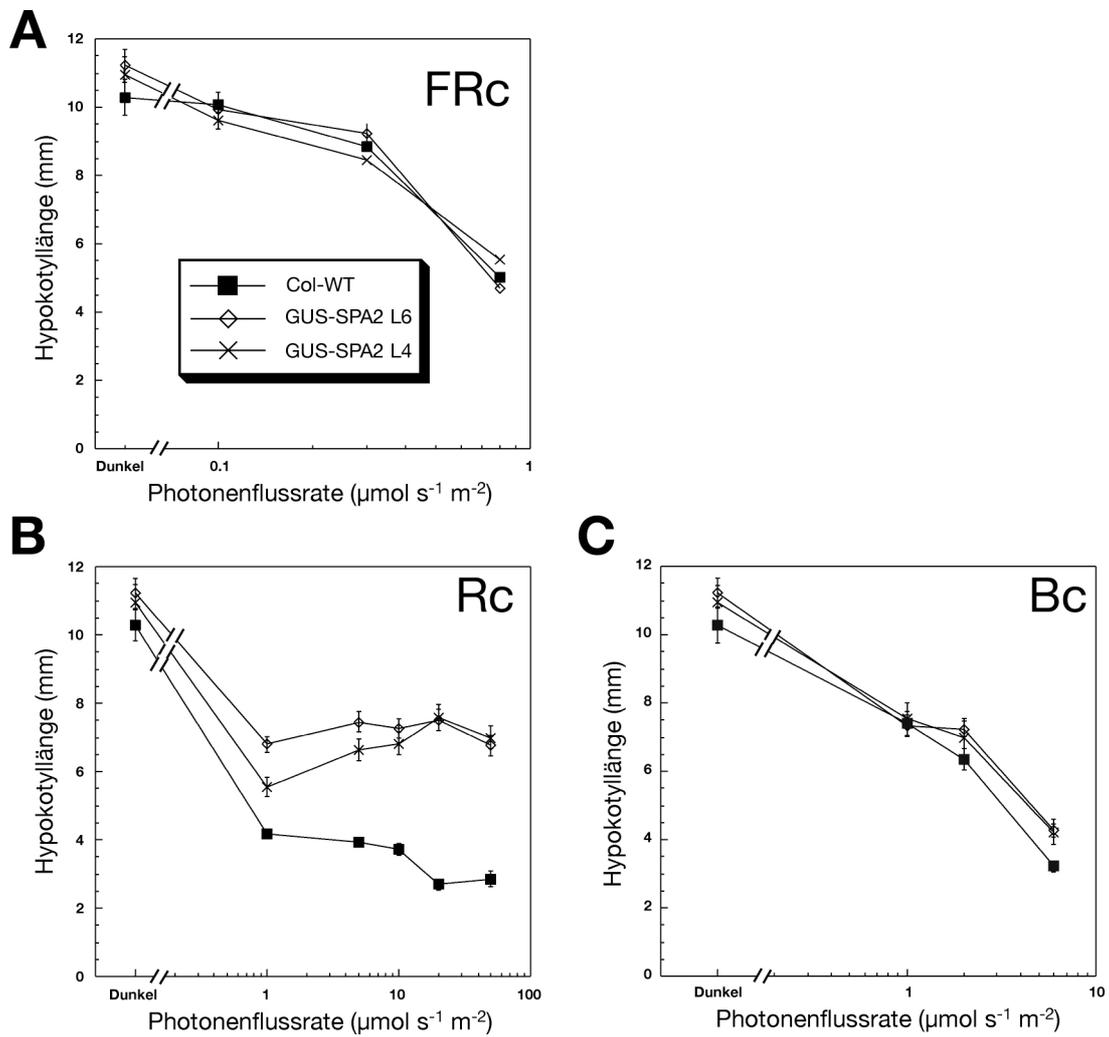
VI. Summary

Light signaling pathways in plants are regulated by positively and negatively acting factors. COP1 is a central suppressor of photomorphogenesis in dark-grown seedlings, whose activity is reduced in the light. *cop1* mutants undergo constitutive photomorphogenesis exhibiting features of light-grown seedling even in complete darkness. COP1 is an E3-ubiquitin ligase that targets positively acting light signaling intermediates for degradation via the 26S proteasome. COP1 acts together with other proteins and thereby forms high-molecular-mass complexes. We have shown previously that COP1 interacts with the four members of the SPA protein family (SPA1-SPA4). All SPA proteins contain a WD-repeat domain, a coiled-coil domain and a kinase-like domain. The biochemical function of SPA proteins is not known, but SPA1 has been reported to influence the E3-ubiquitin ligase activity of COP1 in vitro. In addition, SPA proteins also interact with light signaling intermediates that are targeted by the E3-ubiquitin ligase COP1. *spa1*, *spa3* and *spa4* mutants exhibit exaggerated photomorphogenesis in the light, but in contrast to *cop1* mutants, they were indistinguishable from wild-type seedlings when grown in complete darkness. Therefore, we concluded that SPA proteins act as repressors of photomorphogenesis only in the light.

Here, I show that SPA proteins act redundantly in suppressing photomorphogenesis also in the dark. This conclusion is based on the observation that the *spa1 spa2 spa3 spa4* quadruple mutant undergoes constitutive photomorphogenesis similar to a *cop1* mutant. SPA proteins also play important roles in plant development beyond the seedling stage. Analysis of different *spa* mutants revealed that SPA proteins have distinct, but overlapping functions in controlling vegetative plant growth and the induction of flowering. *spa1* mutants exhibit an early-flowering phenotype in short days, but not in long days. Genetic analysis in the past identified genes responsible for the initiation of flowering in Arabidopsis. Flowering in response to long days is accelerated by CO, which transcriptionally activates the expression of the floral inducer *FT*. We show that early-flowering *spa* mutants exhibit strongly elevated *FT* transcript levels, but do not show a change in *CO* transcript levels. Nevertheless, an epistatic analysis indicates that increased *FT* mRNA levels in *spa1* mutants depend on a functional *CO* gene. These results suggest that SPA proteins might regulate CO at a post-transcriptional level. Consistent with this idea, I found that SPA1 could physically interact with CO in vitro. Taken together with the evidence that the CO protein is unstable during the night phase, my results support the idea that SPA proteins, in concert with the ubiquitin ligase COP1, target CO for destruction via the 26S proteasome.

Taken together, the results presented in this work show that SPA proteins have overlapping, but distinct functions in suppressing photomorphogenesis in dark- and light-grown seedling, vegetative plant growth and the photoperiodic induction of flowering.

VII. Anhang



Anhang Abbildung 1: Transgene Keimlinge, die ein GUS-SPA2 Protein exprimieren, zeigen eine verminderte Antwort auf hellrotes Licht. (A-C) Hypokotyllängen wildtypischer Keimlinge und zwei unabhängigen *35S::GUS-SPA2* Linien (GUS-SPA2 L4 und L6) im dunkelroten Licht (FRc), im hellroten Licht (Rc) und im blauen Licht (Bc) unterschiedlicher Flussraten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

VIII. Literatur

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. und Araki, T.** (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, **309**, 1052-1056.
- Ahmad, M. und Cashmore, A.R.** (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, **366**, 162-166.
- Ahmad, M., Lin, C.T. und Cashmore, A.R.** (1995) Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J*, **8**, 653-658.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L. und Weigel, D.** (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *Embo J*, **25**, 605-614.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Lisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. und Ecker, J.R.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- An, H., Roussot, C., Suarez-Lopez, P., Corbesier, L., Vincent, C., Pineiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C. und Coupland, G.** (2004) CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development*, **131**, 3615-3626.
- Anderson, S.L., Somers, D.E., Millar, A.J., Hanson, K., Chory, J. und Kay, S.A.** (1997) Attenuation of phytochrome A and B signaling pathways by the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, **9**, 1727-1743.
- Ang, L.-H. und Deng, X.-W.** (1994) Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: Allele-specific and light-dependent interaction between the *HY5* and *COP1* loci. *Plant Cell*, **6**, 613-628.
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A. und Deng, X.-W.** (1998) Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell*, **1**, 213-222.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J.P., Grossniklaus, U. und Chua, N.H.** (2001) LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev*, **15**, 2613-2625.
- Briggs, W.R. und Huala, E.** (1999) Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 33-62.
- Briggs, W.R. und Olney, M.A.** (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol*, **125**, 85-88.
- Casal, J.J., Sanchez, R.A. und Yanovsky, M.J.** (1997) The function of phytochrome A. *Plant Cell Environ*, **20**, 813-819.
- Caspar, T. und Quail, P.H.** (1993) Promoter and leader regions involved in the expression of the *Arabidopsis* ferredoxin A gene. *Plant J*, **3**, 161-174.
- Chamovitz, D.A., Wei, N., Osterlund, M.T., Von Arnim, A.G., Staub, J.M., Matsui, M. und Deng, X.W.** (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*, **86**, 115-121.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.W. und Wei, N.** (1998) *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell*, **10**, 673-683.

- Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L. und Ausubel, F.** (1989) *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell*, **58**, 991-999.
- Datta, S., Hettiarachchi, G.H., Deng, X.W. und Holm, M.** (2005) Arabidopsis CONSTANS-LIKE3 Is a Positive Regulator of Red Light Signaling and Root Growth. *Plant Cell*.
- Dehesh, K., Franci, C., Parks, B.M., Seeley, K.A., Short, T.W., Tepperman, J.M. und Quail, P.H.** (1993) Arabidopsis *HY8* locus encodes phytochrome A. *Plant Cell*, **5**, 1081-1088.
- Deng, X.-W., Caspar, T. und Quail, P.H.** (1991) *cop1*: A regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **5**, 1172-1182.
- Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A. und Quail, P.H.** (1992) COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell*, **71**, 791-801.
- Deng, X.W. und Quail, P.H.** (1992) Genetic and phenotypic characterization of cop mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2**, 83-95.
- Duek, P.D. und Fankhauser, C.** (2003) HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J*, **34**, 827-836.
- Duek, P.D., Elmer, M.V., van Oosten, V.R. und Fankhauser, C.** (2004) The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol*, **14**, 2296-2301.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A. und Quail, P.H.** (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev*, **14**, 2377-2391.
- Fankhauser, C. und Chory, J.** (2000) RSF1, an Arabidopsis locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol*, **124**, 39-45.
- Fittinghoff, K.** (2004) Molekulare Untersuchungen zur negativen Regulation der Lichtsignaltransduktion bei *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Fittinghoff, K., Laubinger, S., Nixdorf, M., Baumgardt, R.L., Batschauer, A. und Hoecker, U.** (2006) Functional und expression analysis of Arabidopsis *SPA* genes during seedling photomorphogenesis and adult growth. Zur Begutachtung eingereicht bei Plant J.
- Franklin, K.A. und Whitelam, G.C.** (2005) Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann Bot (Lond)*, **96**, 169-175.
- Fuglevand, G., Jackson, J.A. und Jenkins, G.I.** (1996) UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **8**, 2347-2357.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J. und Chua, N.-H.** (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell*, **2**, 369-378.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C. und Lin, C.** (1998) Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science*, **279**, 1360-1363.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A. und Kay, S.A.** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, **290**, 2110-2113.
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M. und Shimamoto, K.** (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, **422**, 719-722.
- Hempel, F.D., Weigel, D., Mandel, M.A., Ditta, G., Zambryski, P.C., Feldman, L.J. und Yanofsky, M.F.** (1997) Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development*, **124**, 3845-3853.

- Hepworth, S.R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A. und Coupland, G.** (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *Embo J*, **21**, 4327-4337.
- Hoecker, U. und Quail, P.H.** (2001) The phytochrome A-specific signaling intermediate *SPA1* interacts directly with *COP1*, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **276**, 38173-38178.
- Hoecker, U., Xu, Y. und Quail, P.H.** (1998) *SPA1*: A new genetic locus involved in phytochrome A - specific signal transduction. *Plant Cell*, **10**, 19-33.
- Hoecker, U., Tepperman, J.M. und Quail, P.H.** (1999) *SPA1*, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science*, **284**, 496-499.
- Hoecker, U.** (2005) Regulated proteolysis in light signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 469-476.
- Holm, M., Hardtke, C.S., Gaudet, R. und 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, L.G., Qu, L.J. und 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.
- Huq, E. und Quail, P.H.** (2002) *PIF4*, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *Embo J*, **21**, 2441-2450.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K. und Quail, P.H.** (2004) Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science*, **305**, 1937-1941.
- Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R. und Kay, S.A.** (2003) *FKF1* is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, **426**, 302-306.
- Jang, I.C., Yang, J.Y., Seo, H.S. und Chua, N.H.** (2005) *HFR1* is targeted by *COP1* E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev*, **19**, 593-602.
- Jordan, E.T., Hatfield, P.M., Hondred, D., Talon, M., Zeevaert, J.A. und Vierstra, R.D.** (1995) Phytochrome A overexpression in transgenic tobacco. Correlation of dwarf phenotype with high concentrations of phytochrome in vascular tissue and attenuated gibberellin levels. *Plant Physiol*, **107**, 797-805.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J. und Weigel, D.** (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*, **286**, 1962-1965.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B. und Song, P.S.** (2003) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell*, **15**, 2399-2407.
- Kim, Y.M., Woo, J.C., Song, P.S. und Soh, M.S.** (2002) *HFR1*, a phytochrome A-signalling component, acts in a separate pathway from *HY5*, downstream of *COP1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **30**, 711-719.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schäfer, E. und Nagy, F.** (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell*, **11**, 1445-1456.
- Kleine, T., Lockhart, P. und Batschauer, A.** (2003) An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J*, **35**, 93-103.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. und Araki, T.** (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, **286**, 1960-1962.
- Kulajta, C.** (2002) Versuche zur Identifizierung von *SPA1* Interaktionspartner in der phyA Signaltransduktion. Diplomarbeit an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Kwok, S.F., Staub, J.M. und Deng, X.W.** (1999) Characterization of two subunits of *Arabidopsis* 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J Mol Biol*, **285**, 85-95.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laubinger, S.** (2002) Untersuchungen zur Funktion von *SPA1*-ähnlichen Genen in der Lichtsignaltransduktion. Diplomarbeit an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Laubinger, S. und Hoecker, U.** (2003) The SPA1-like proteins SPA3 and SPA4 repress photomorphogenesis in the light. *Plant J*, **35**, 373-385.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K. und Hoecker, U.** (2004) The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2293-2306.
- Lin, C.T., Ahmad, M. und Cashmore, A.R.** (1996) *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J*, **10**, 893-902.
- Liscum, E. und Briggs, W.R.** (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell*, **7**, 473-485.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W. und Dinesh-Kumar, S.P.** (2002) Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell*, **14**, 1483-1496.
- Ma, L.G., Li, J.M., Qu, L.J., Hager, J., Chen, Z.L., Zhao, H.Y. und Deng, X.W.** (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*, **13**, 2589-2607.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. und Yanofsky, M.F.** (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Nature*, **360**, 273-277.
- Mao, J., Zhang, Y.C., Sang, Y., Li, Q.H. und Yang, H.Q.** (2005) From The Cover: A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12270-12275.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E. und Quail, P.H.** (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, **288**, 859-863.
- Mas, P., Kim, W.Y., Somers, D.E. und Kay, S.A.** (2003) Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **426**, 567-570.
- McNellis, T.W., Von Arnim, A.G., Araki, T., Komeda, Y., Miséra, S. und Deng, X.-W.** (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.
- Michaels, S.D. und Amasino, R.M.** (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, **11**, 949-956.
- Michaels, S.D., Himmelblau, E., Kim, S.Y., Schomburg, F.M. und Amasino, R.M.** (2005) Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **137**, 149-156.
- Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y.C., Dolan, S. und Lin, C.** (2003) Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2140-2145.
- Mockler, T.C., Guo, H., Yang, H., Duong, H. und Lin, C.** (1999) Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development*, **126**, 2073-2082.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y. und Quail, P.H.** (2004) The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16091-16098.

- Moon, J., Parry, G. und Estelle, M.** (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell*, **16**, 3181-3195.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M. und Lee, I.** (2005) Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, **46**, 292-299.
- Mouradov A., Cremer F. und Coupland G.** (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, **14 Suppl**, 111-130.
- Nakagawa, M. und Komeda, Y.** (2004) Flowering of *Arabidopsis cop1* Mutants in Darkness. *Plant Cell Physiol*, **45**, 398-406.
- Ni, M., Tepperman, J.M. und Quail, P.H.** (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, **400**, 781-784.
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J.I., Kang, C. und Choi, G.** (2004) PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **16**, 3045-3058.
- Onouchi, H., Igeno, M.I., Perilleux, C., Graves, K. und Coupland, G.** (2000) Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell*, **12**, 885-900.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N. und Deng, X.W.** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, **405**, 462-466.
- Oyama, T., Shimura, Y. und Okada, K.** (1997) The *Arabidopsis HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev*, **11**, 2983-2995.
- Parks, B.M., Hoecker, U. und Spalding, E.P.** (2001) Light-induced growth promotion by SPA1 counteracts phytochrome-mediated growth inhibition during de-etiolation. *Plant Physiol*, **126**, 1291-1298.
- Peng, Z., Shen, Y., Feng, S., Wang, X., Chitteti, B.N., Vierstra, R.D. und Deng, X.W.** (2003) Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo. *Curr Biol*, **13**, R504-505.
- Pepper, A., Delaney, T., Washburn, T., Poole, D. und Chory, J.** (1994) *DET1*, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell*, **78**, 109-116.
- Pepper, A.E. und Chory, J.** (1997) Extragenic suppressors of the *Arabidopsis det1* mutant identify elements of flowering-time and light-Response regulatory pathways. *Genetics*, **145**, 1125-1137.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. und Coupland, G.** (1995) The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, **80**, 847-857.
- Quail, P.H.** (2000) Phytochrome-interacting factors. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 457-466.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. und 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.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M. und Chory, J.** (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol*, **104**, 1139-1149.
- Rockwell, N.C., Su, Y.S. und Lagarias, J.C.** (2006) Phytochrome Structure and Signaling Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*. Epub ahead of print.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B.** (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol*, **53**, 247-259.
- Ruiz-Garcia, L., Madueno, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J. und Martinez-Zapater, J.M.** (1997) Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9**, 1921-1934.

- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U. und Deng, X.W.** (2003) The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev*, **17**, 2642-2647.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. und Coupland, G.** (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science*, **288**, 1613-1616.
- Sambrook, J. und Russell, D.W.** (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sang, Y., Li, Q.H., Rubio, V., Zhang, Y.C., Mao, J., Deng, X.W. und Yang, H.Q.** (2005) N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell*, **17**, 1569-1584.
- Schepens, I., Duek, P. und Fankhauser, C.** (2004) Phytochrome-mediated light signalling in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 564-569.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M. und Kay, S.A.** (2001) A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 2659-2670.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M. und Deng, X.W.** (2001) Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science*, **292**, 1379-1382.
- Searle I., und Coupland G.** (2004) Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *Embo J*, **23**, 1217-1222.
- Seo, H.S., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A. und Chua, N.H.** (2004) Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev*, **18**, 617-622.
- Seo, H.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L. und Chua, N.H.** (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, **424**, 995-999.
- Serino, G. und Deng, X.W.** (2003) THE COP9 SIGNALOSOME: Regulating Plant Development Through the Control of Proteolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **54**, 165-182.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G. und Ruberti, I.** (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Dev*, **19**, 2811-2815.
- Shalitin, D., Yang, H.Y., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H.W., Whitelam, G.C. und Lin, C.T.** (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, **417**, 763-767.
- Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M.C., Zabeau, M. und Van de Peer, Y.** (2002) The hidden duplication past of Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13627-13632.
- Simon, R., Igeno, M.I. und Coupland, G.** (1996) Activation of floral meristem identity genes in Arabidopsis. *Nature*, **384**, 59-62.
- Simpson, G.G.** (2004) The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 570-574.
- Soh, M.S., Kim, Y.M., Han, S.J. und Song, P.S.** (2000) REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**, 2061-2073.
- Somers, D.E., Kim, W.Y. und Geng, R.** (2004) The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell*, **16**, 769-782.

- Somers, D.E., Sharrock, R.A., Tepperman, J.M. und Quail, P.H.** (1991) The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell*, **3**, 1263-1274.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. und Coupland, G.** (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, **410**, 1116-1120.
- Subramanian, C., Kim, B.H., Lyssenko, N.N., Xu, X., Johnson, C.H. und Von Arnim, A.G.** (2004) The *Arabidopsis* repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: Mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sullivan, J.A. und Deng, X.W.** (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev Biol*, **260**, 289-297.
- Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S.F., Matsui, M. und Deng, X.W.** (2002) *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev*, **16**, 554-559.
- Takemiya, A., Inoue, S., Doi, M., Kinoshita, T. und Shimazaki, K.** (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell*, **17**, 1120-1127.
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X. und Quail, P.H.** (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 9437-9442.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
- Torii, K.U., McNellis, T.W. und Deng, X.W.** (1998) Functional dissection of *Arabidopsis* COP1 reveals specific roles of its three structural modules in light control of seedling development. *EMBO J*, **17**, 5577-5587.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Mate, Z., Adam, E., Oakeley, E.J., Schafer, E. und Nagy, F.** (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1397-1402.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. und Coupland, G.** (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, **303**, 1003-1006.
- Von Arnim, A.G.** (2003) On again-off again: COP9 signalosome turns the key on protein degradation. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 520-529.
- Von Arnim, A.G. und Deng, X.-W.** (1994) Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell*, **79**, 1035-1045.
- Von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F. und Deng, X.W.** (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **114**, 779-788.
- Wagner, D., Sablowski, R.W. und Meyerowitz, E.M.** (1999) Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, **285**, 582-584.
- Wang, H.Y., Kang, D.M., Deng, X.W. und Wei, N.** (1999) Evidence for functional conservation of a mammalian homologue of the light-responsive plant protein COP1. *Curr Biol*, **9**, 711-714.
- Wang, H.Y., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y. und Deng, X.W.** (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, **294**, 154-158.
- Wang, X., Feng, S., Nakayama, N., Crosby, W.L., Irish, V., Deng, X.W. und Wei, N.** (2003) The COP9 signalosome interacts with SCF UFO and participates in *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell*, **15**, 1071-1082.

- Wei, N., Tsume, T., Serino, G., Dohmae, N., Takio, K., Matsui, M. und Deng, X.W.** (1998) The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol*, **8**, 919-922.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. und Meyerowitz, E.M.** (1992) LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, **69**, 843-859.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S. und Harberd, N.P.** (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell*, **5**, 757-768.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U. und Weigel, D.** (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, **309**, 1056-1059.
- William, D.A., Su, Y., Smith, M.R., Lu, M., Baldwin, D.A. und Wagner, D.** (2004) Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1775-1780.
- Yanagawa, Y., Sullivan, J.A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., Ishibashi, T., Saijo, Y., Rubio, V., Kimura, S., Wang, J. und Deng, X.W.** (2004) *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes Dev*, **18**, 2172-2181.
- Yang, H.Q., Tang, R.H. und Cashmore, A.R.** (2001) The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell*, **13**, 2573-2587.
- Yang, H.Q., Wu, Y.J., Tang, R.H., Liu, D.M., Liu, Y. und Cashmore, A.R.** (2000) The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, **103**, 815-827.
- Yang, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, X.W. und Wang, H.** (2005a) Light Regulates COP1-Mediated Degradation of HFR1, a Transcription Factor Essential for Light Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 804-821.
- Yang, J., Lin, R., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L. und Wang, H.** (2005b) Repression of light signaling by *Arabidopsis* SPA1 involves post-translational regulation of HFR1 protein accumulation. *Plant J*, **43**, 131-141.
- Yanovsky, M.J. und Kay, S.A.** (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*, **419**, 308-312.
- Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J., Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., Yoo, S.Y., Lee, J.S. und Ahn, J.H.** (2005) CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **139**, 770-778.

Mit Zustimmung des Betreuers wurden Teile dieser Arbeit veröffentlicht:

Laubinger, S., Fittinghoff, K. und Hoecker, U. (2004) The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 2293-2306.

Fittinghoff, K., Laubinger, S., Nixdorf, M., Baumgardt, R.L., Batschauer, A. und Hoecker, U. (2006) Functional und expression analysis of Arabidopsis *SPA* genes during seedling photomorphogenesis and adult growth. Zur Begutachtung eingereicht bei Plant J.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 31.03.2006

(Sascha Laubinger)